

细胞黏附分子 CD44v6 在肝癌组织中的表达及意义

殷茜, 陈孝平

殷茜, 陈孝平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科
湖北省武汉市 430030

殷茜, 女, 1977-12-10 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 2000 年华中科技大学同济医学院本科毕业, 2005 年华中科技大学同济医学院硕士研究生毕业, 住院医师, 主要从事肝脏、甲状腺以及乳腺的恶性肿瘤的实验和临床研究.

通讯作者: 殷茜, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科. yinqian@medmail.com.cn
电话: 027-83663820

收稿日期: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-20

Expression of cell adhesion molecule CD44v6 in hepatocellular carcinoma

Qian Yin, Xiao-Ping Chen

Qian Yin, Xiao-Ping Chen, Department of General Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Qian Yin, Department of General Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Dadao, Wuhan 430030, Hubei Province, China. yinqian@medmail.com.cn

Received: 2005-04-20 Accepted: 2005-05-20

Abstract

AIM: To investigate the expression of cell adhesion molecule CD44v6 in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on the biological behavior of HCC.

METHODS: The expression of CD44v6 was detected in liver tissue specimens of patients with hepatic cell carcinoma ($n = 32$), portal hypertension ($n = 8$) and hepatic trauma ($n = 5$) by immunohistochemical staining. The level of CD44v6 expression and its relationship with some biological behaviors (capsule invasion, intrahepatic or extrahepatic metastasis and accompanied cirrhosis) and indexes [Edmonson grading and alpha fetoprotein (AFP) level] were analyzed.

RESULTS: CD44v6 expression was found negative or weak positive in some lymphocytes and interstitial cells in trauma and cirrhosis groups, while strong positive CD44v6 expression was observed in 25 cases of HCC group and CD44v6 was mainly located in cell plasma and membrane. The positive rate in HCC group was significantly higher than that in trauma and cirrhosis group (78.2% vs 40.0%, 62.3%; $P < 0.05$). The level of CD44v6 expression in HCC group was significantly higher than that in trauma and cirrhosis group (113.3 ± 13.3 vs 23.6 ± 10.6 , 42.4 ± 12.3

positive cells, $P < 0.05$). CD44v6 expression was markedly higher in capsule invasion, Edmonson grading IV, and metastasis group than that in non-capsule invasion, Edmonson grading II-III and non-metastasis group (125.9 ± 14.7 vs 95.2 ± 15.2 , $P < 0.05$; 122.5 ± 24.3 vs 99.4 ± 15.3 , $P < 0.05$; 165.4 ± 17.5 vs 95.3 ± 12.4 , $P < 0.01$). CD44v6 expression was not significantly related to tumor size, AFP level and hepatic cirrhosis ($P > 0.05$).

CONCLUSION: CD44v6 can be one possible indicator to evaluate the malignancy and metastasis of hepatocellular carcinoma. Further study should be performed on the role of CD44v6 in biological behaviors and mechanisms of HCC.

Key Words: Cell adhesion molecule; CD44v6; Hepatocellular carcinoma

Yin Q, Chen XP. Expression of cell adhesion molecule CD44v6 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(11):1295-1298

摘要

目的: 检测细胞黏附分子 CD44v6 在肝癌细胞组织中的表达, 并初步探讨其与肝癌部分生物学行为的关系.

方法: 选择同济医院手术肝细胞癌患者标本 32 例, 以门脉高压肝硬变患者 8 例及肝外伤患者 5 例标本作为对照. 采用免疫组织化学染色法检测正常肝脏、肝硬化组织和肝癌组织中 CD44v6 的表达情况, 并分析其表达水平与肝癌部分生物学行为如肿瘤直径、有无包膜侵犯、肝癌病理分级(Edmonson 分级)、是否伴有肝内外转移、合并肝硬化情况以及甲胎蛋白(AFP)的表达等指标间的关系.

结果: 正常肝脏组织及肝硬化组织中 CD44v6 几乎不表达或仅在少量淋巴细胞和间质细胞中呈弱阳性表达, 32 例肝癌组织中有 25 例可见 CD44v6 的强阳性表达, 主要集中于细胞质和细胞膜上, 阳性率为 78.3%. 肝癌组织中 CD44v6 表达阳性率高于正常肝脏组织(78.2% vs 40.0%, $P < 0.05$)及肝硬化组织(78.2% vs 62.3%, $P < 0.05$). 肝癌细胞组织中 CD44v6 的表达明显强于正常肝脏(113.3 ± 13.3 vs 23.6 ± 10.6 个阳性细胞, $P < 0.05$)及肝硬化组织(113.3 ± 13.3 vs 42.4 ± 12.3 个阳性细胞, $P < 0.05$). 有包膜浸润、Edmonson IV 以及转移者 CD44v6 表达比无包膜浸润、Edmonson II-III 和无转移者显著增高(125.9 ± 14.7 vs 95.2 ± 15.2 , $P < 0.05$;

122.5 ± 24.3 vs 99.4 ± 15.3, $P < 0.05$; 165.4 ± 17.5 vs 95.3 ± 12.4, $P < 0.01$). CD44v6 表达与肿瘤直径、AFP 水平以及有无肝硬化无显著相关性 ($P > 0.05$).

结论: CD44v6 的表达有可能作为肝癌恶性程度和转移的指标之一, 有必要进一步研究细胞黏附分子 CD44v6 在肝癌生物学行为中的作用及机制.

关键词: 细胞黏附分子; CD44v6; 肝细胞癌

殷茜, 陈孝平. 细胞黏附分子 CD44v6 在肝癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(11):1295-1298
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1295.asp

0 引言

细胞黏附分子 CD44V6 是一种分布广泛的细胞表面跨膜糖蛋白, 其正常功能是作为受体识别透明质酸 (HA) 和胶原蛋白 I、IV, 主要参与免疫识别、淋巴细胞聚集以及细胞—细胞、细胞—基质之间的特异性黏附过程. 可分为标准型 (CD44s) 和 CD44 拼接变异体 (CD44v). 目前认为 CD44 与肿瘤的进展程度、浸润、转移密切相关, 其中以 CD44v6 的意义最为显著. 肝细胞癌为肝脏最常见的恶性肿瘤, 其浸润和转移的机制尚不十分清楚, 一般认为是一个多步骤、受多因子影响的复杂过程, 其中细胞表面黏附分子及其相关的信号传导在肿瘤生长分化和浸润转移的过程中起到重要作用. 我们通过免疫组织化学染色法检测正常肝脏、肝硬化组织和肝癌组织中 CD44v6 的表达情况, 并初步探讨了其与肝癌部分生物学行为的关系, 为进一步研究肝细胞癌浸润及转移的机制和治疗肝癌转移和复发的方法提供新的线索.

1 材料和方法

1.1 材料 所有病例均来自同济医院 2004-01/08 住院患者. 肝癌患者 32 例, 其中男性 29 例, 女性 3 例, 平均年龄 44 ± 5.5 岁. 均经手术后病理切片证实为肝细胞癌, 病理分级 (Edmonson 分级): II-III 级 19 例, IV 级 13 例. 肿瘤直径 < 5 cm 者 7 例, > 5 cm 者 25 例, 平均直径 11.2 ± 5.6 cm, 均为单中心肝癌. 肿瘤包膜完整者 13 例, 有包膜侵犯者 19 例, 伴有转移者 (包括肝外转移、肝内转移及门静脉癌栓) 14 例. 24 例合并肝硬化, 术前检查甲胎蛋白 (AFP) 阴性者 9 例, 阳性者 23 例. 另选取 8 例门脉高压肝硬变及 5 例肝外伤病例作为对照. 其中男性 8 例, 女性 5 例, 平均年龄 45 ± 6.2 岁.

1.2 方法

1.2.1 标本采集及病理切片 标本石蜡包埋, 常规行石蜡切片并进行 HE 染色, 切片厚度 4 μm. 由病理医师阅片, 并行 Edmonson 病理分级.

1.2.2 免疫组化法检测 CD44v6 的表达 免疫组化试剂盒由中山公司提供, 检测步骤如下: (1) 切片脱蜡到水; (2) 蒸馏水新鲜配置 30 mL/L H₂O₂, 室温 7 min 以灭活内源性酶, 蒸馏水洗 2 min × 3 次; (3) 滴加复合消化液 (试剂盒中提供) 1 滴, 室温 15 min, 蒸馏水洗 2 min × 3 次; (4) 滴加正常血清封闭液, 室温 20 min, 甩去多余液体, 不洗; (5) 滴加一抗 (兔抗 CD44v6, 浓缩液 1:100 稀释), 37°C 120 min, 0.01 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次; (6) 滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37°C 20 min. 0.01 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次; (7) 滴加试剂 SABC, 37°C 20 min, 0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 4 次; (8) DAB 显色: 滴加 DAB 显色液 (实验室提供) 1 滴 / 片, 镜下控制反应时间, 蒸馏水洗 2 min × 7 次; (9) 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片.

1.2.3 判断标准 观察 CD44V6 表达以细胞质及细胞膜呈棕黄色者为阳性细胞, 首先在低倍视野下取阳性细胞较集中的 5 个区域, 再于 200 倍视野下计数阳性细胞并取其平均值.

统计学处理 所有数据以均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 采用 SAS 统计分析软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结果

2.1 CD44v6 在肝组织中的表达 (表 1) 正常肝脏组织及肝硬化组织中 CD44v6 几乎不表达或仅在少量淋巴细胞及间质细胞中呈弱阳性表达 (图 1A-B), 32 例肝癌组织中有 25 例可见 CD44v6 的棕褐色强阳性表达, 阳性率为 78.2%, 在肝癌组织中可见较多阳性细胞, CD44v6 表达主要集中于细胞质和细胞膜上, 在肝癌组织和正常肝脏交界处以及肝内微血管密集处尤为明显, 在肝癌细胞和癌旁组织中也有少量表达 (图 1C). 其中病理分级 IV 级者 13 例中有 11 例呈阳性表达, 阳性率为 84.6%, 高于 HCC 组平均值. 伴有肝内外转移者 14 例中有 12 例呈阳性表达, 阳性率为 85.7%, 亦高于 HCC 组平均值.

表 1 CD44v6 在不同组织中的表达

| 分组 | n | 阳性细胞数 (个) |
|------|----|----------------------------|
| 正常肝脏 | 3 | 23.6 ± 10.6 |
| 肝硬化 | 5 | 42.4 ± 12.3 |
| 肝癌 | 25 | 113.3 ± 13.3 ^{ac} |

^a $P < 0.05$ vs 正常肝脏; ^c $P < 0.05$ vs 肝硬化.

2.2 CD44v6 的表达水平与 HCC 部分病理指标的关系 (表 2) 有包膜侵犯者高于无包膜侵犯者 ($P < 0.01$), 病理分级 IV 级组高于 II-III 级组 ($P < 0.05$), 有肿瘤转

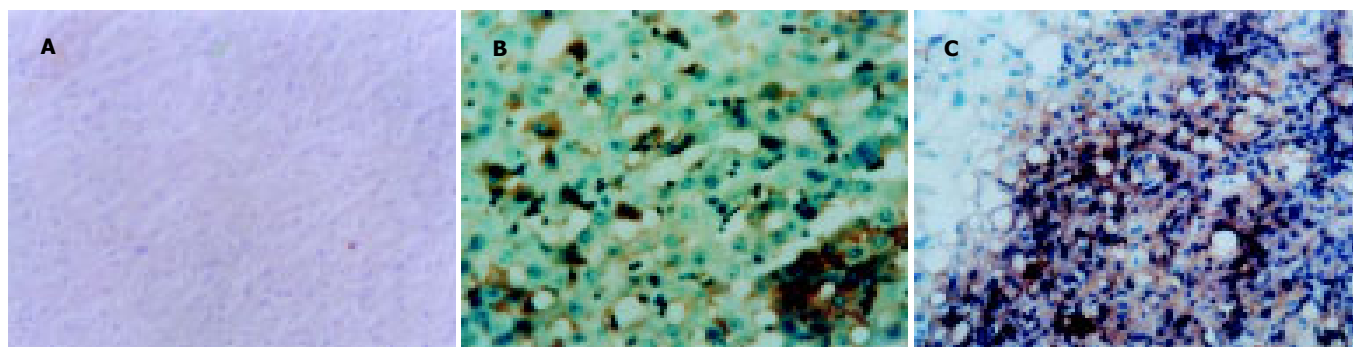


图1 CD44v6在肝脏组织中的表达.A:正常肝脏($\times 200$); B:肝硬化($\times 400$); C:肝癌($\times 200$).

移组高于无肿瘤转移组($P<0.01$), 均有显著性差异. CD44v6 的表达在不同肿瘤直径, 不同 AFP 水平, 是否合并肝硬化组中无显著性差异($P>0.05$).

表2 CD44v6 表达水平与 HCC 病理指标的关系

| 病理指标 | 组别 | n | 阳性细胞数(个) |
|------|----------|----|--------------------|
| 肿瘤直径 | ≤ 5 | 7 | 104.5 ± 25.2 |
| | >5 | 18 | 115.9 ± 22.4 |
| 包膜侵犯 | 有 | 12 | 125.9 ± 14.7^a |
| | 无 | 13 | 95.2 ± 15.2 |
| 病理分级 | IV | 11 | 122.5 ± 24.3^c |
| | II-III | 14 | 99.4 ± 15.3 |
| 肿瘤转移 | 有 | 12 | 165.4 ± 17.5^b |
| | 无 | 13 | 95.3 ± 12.4 |
| AFP | - | 9 | 102.4 ± 21.2 |
| | + | 16 | 117.4 ± 21.2 |
| 肝硬化 | 有 | 24 | 111.6 ± 22.3 |
| | 无 | 1 | 113.9 ± 17.3 |

^a $P<0.05$ vs 无色膜侵犯; ^b $P<0.01$ vs 无转移; ^c $P<0.05$ vs II-III 级.

3 讨论

目前关于 CD44v6 与肿瘤转移, 预后关系的意见尚不一致. Wielenga *et al*^[1]在对结肠癌患者进行临床观察时, 发现 CD44v6 过度表达的患者出现转移的机会更大, 并且预后明显差于 CD44v6 低水平表达者, 认为 CD44v6 可作为反映结肠癌转移、预后的标志. Gunthert *et al* 在^[2]动物模型中将 CD44 变异体 cDNA 转染到非转移性的大鼠胰腺癌细胞株后, 观察到转移的出现. Yokoyama *et al*^[3]对肝外胆管癌手术标本进行检测, 发现 CD44v6 的阴性表达更多出现于进展期肿瘤中, 且较 CD44v6 阳性者淋巴结转移更多见, 认为 CD44v6 的表达缺乏代表着肿瘤的高转移能力和低生存率. 这说明在不同类型的肿瘤中, CD44v6 的表达及生物学意义存在很大的差异.

我们发现, HCC 组织中 CD44v6 的表达水平较正常肝脏组织及肝硬化组织高, 具有显著性差异. CD44v6

高表达更多出现在有侵袭转移能力的癌组织中. 进一步分析 HCC 的病理指标, 发现在低分化、有转移的癌组织中, CD44v6 的表达水平明显高于中度分化、无转移者, 并且 CD44v6 的表达水平在不同肿瘤直径、不同的 AFP 水平、有无肝硬化组间无明显差异. 说明 CD44v6 高表达反映了肿瘤的高侵袭转移能力. Endo *et al*^[4]的研究也证实了这一结果. 同时 Endo *et al* 对肝癌组织中 p53 与 CD44 蛋白的研究中, 观察到 CD44v6 的高表达与 p53 的过度表达显著相关, 认为 CD44v6 可能与肿瘤的生长有关. Washington *et al*^[5]认为 CD44 在肝癌中的表达与肝癌病理分级无关, 我们认为原因可能有两个: (1) CD44s 及各种 CD44v 在肿瘤中的表达及生物学意义有很大的差异, 实验中如不区分 CD44s 和多种 CD44v 将造成统计结果的差异; (2) 样本数量不够以及低分化肝癌病例数的不同使显著性检验结果不同. 另外, Mathew *et al*^[7]现 CD44v6 的表达与肝癌的血管浸润性有一定的关系, 这方面的研究尚有待深入. 关于 CD44V6 影响肿瘤浸润, 转移的具体机制尚不清楚. 有研究认为 CD44V6 变异体可能通过促进癌细胞与血管内皮细胞和细胞外机制的黏附, 促进肿瘤向基质侵犯, 从而影响肿瘤细胞的迁徙和运动能力, 并可能通过影响肿瘤细胞骨架构象和分布, 从而以该细胞的运动能力, 影响肿瘤转移^[6]. 我们观察到 CD44v6 在肝癌组织中的表达水平高于正常肝组织和肝硬化组织, 并与包膜侵犯、肝癌病理分级及转移有关. 我们认为 CD44v6 的表达水平可反映肝细胞癌侵袭, 转移能力, 有望成为判断预后的指标, 从而为临床评价病情及制订治疗方案提供依据. 通过抑制 CD44v6 的表达来降低 HCC 浸润转移能力的策略, 为防治肝癌的转移和复发提供了新的思路. 目前已有体外实验, 通过使用反义寡核苷酸, 特异性抗体等方法抑制 CD44v6 等在肿瘤中的表达, 并观察到肿瘤细胞侵袭能力的降低^[5], 这种策略有望为肝癌治疗提供新的方向.

4 参考文献

- 1 Wielenga VJ, van der Voort R, Mulder JW, Kruijt PM, Weidema

- WF, Oosting J, Seldenrijk CA, van Krimpen C, Offerhaus GJ, Pals ST. CD44 splice variants as prognostic markers in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:82-87
- 2 Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24
- 3 Yokoyama Y, Hiyama E, Murakami Y, Matsuura Y, Yokoyama T. Lack of CD44 variant 6 expression in advanced extrahepatic bile duct/ampullary carcinoma. *Cancer* 1999;86:1691-1699
- 4 Endo K, Terada T. Protein expression of CD44(standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol* 2000;32:78-84
- 5 Washington K, Telen MJ, Gottfried MR. Expression of cell adhesion molecule CD44 in primary tumors of the liver: an immunohistochemical study. *Liver* 1997;17:17-23
- 6 Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zoller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993; 177:443-455
- 7 Mathew J, Hines JE, Obafunwa JO, Burr AW, Toole K, Burt AD. CD44 is expressed in hepatocellular carcinomas showing vascular invasion. *J Pathol* 1996;179:74-79

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). **论文排序:** 期刊论文数, 点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. *癌症* 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. **方法:** 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选;运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达;并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. **结果:** 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985)表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$). **结论:** 染色体 3p21 区域 EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)