

大肠癌组织RAB5A和CD44v9表达的意义

李志高, 李晓冬, 董新舒, 庞洪刚, 杜杰

■背景资料

研究表明RAB5A和CD44v9在肺癌和胃癌等组织中的高表达与肿瘤的分化、浸润和转移存在着正相关, 但其与多种消化道肿瘤的相关性尚待进一步研究。

李志高, 李晓冬, 董新舒, 庞洪刚, 杜杰, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科 黑龙江省哈尔滨市 150040

李志高, 2003年哈尔滨医科大学医学博士, 副教授、硕士研究生导师, 一直从事乳腺肿瘤, 消化道肿瘤的临床治疗和防治工作。

黑龙江省自然科学基金资助项目, No.9748

通讯作者: 李志高, 150040, 哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科. doctorxht@126.com
传真: 0451-86298317

收稿日期: 2005-12-17 接受日期: 2006-02-18

Significance of RAB5A and CD44v9 expression in colorectal cancer tissues

Zhi-Gao Li, Xiao-Dong Li, Xin-Shu Dong, Hong-Gang Pang, Jie Du

Zhi-Gao Li, Xiao-Dong Li, Xin-Shu Dong, Hong-Gang Pang, Jie Du, Department of Abdomen Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No.9748

Correspondence to: Zhi-Gao Li, Department of Abdomen Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. doctorxht@126.com

Received: 2005-12-17 Accepted: 2006-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of RAB5A and CD44v9 and their significances in colorectal cancer.

METHODS: SP immunohistochemical method was adopted to detect the expression of RAB5A and CD44v9 proteins in the pathological paraffin sections from colorectal cancer ($n = 43$). RNA samples of 60 fresh tissues excised from patients with colorectal cancer were extracted and reversely transcribed into cDNAs, and then real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of RAB5A and CD44v9 genes. The correlations of RAB5A and CD44v9 expression with the differentiation and metastasis of colorectal cancer were analyzed.

RESULTS: RAB5A protein was positively expressed in cytoplasm cell membrane with a rate of 100%, while CD44v9 protein was positively

expressed only in cytoplasm with a rate of 86.7%. RT-PCR results showed that T_m of each sample was coincided with that of positive control by melting curve analysis. The expression of RAB5A cDNA was lower in highly and moderately differentiated cancers than that of poorly differentiated ones ($P < 0.01$), and it was also lower in cancers without lymph node metastasis than that with lymph node metastasis ($P < 0.01$). The expression of CD44v9 gene and protein were positively related to those of RAB5A ($\chi^2 = 14.532, P < 0.01$).

CONCLUSION: The expression of RAB5A and CD44v9 are correlated with the differentiation and metastasis of colorectal cancer, which may play important roles in the signal transduction across cellular membrane and matrix invasion.

Key Words: RAB5A; CD44v9; Colorectal cancer; Differentiation; Metastasis

Li ZG, Li XD, Dong XS, Pang HG, Du J. Significance of RAB5A and CD44v9 expression in colorectal cancers tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):848-852

摘要

目的: 探讨大肠癌组织RAB5A和CD44v9表达的意义。

方法: 应用SP免疫组化法检测43例大肠癌病理蜡块中RAB5A和CD44v9的蛋白质表达; 取60例大肠癌患者新鲜组织标本, 提取RNA并逆转录合成cDNA, 应用Real-time PCR法检测组织样本中RAB5A和CD44v9的基因表达; 分析CD44v9和RAB5A的基因与蛋白质表达量与大肠癌分化及转移程度的相关性。

结果: RAB5A蛋白表达阳性率为100%, 阳性表达位于胞质和胞膜; CD44v9表达阳性率为86.7%, 阳性表达位于胞质; 荧光定量PCR结果经熔解曲线分析各样本扩增产物的 T_m 值一致并与阳性对照的 T_m 值吻合。RAB5A cDNA的表达量在高分化和中分化大肠癌组织中低于低分化大肠癌组织($P < 0.01$), 在无淋巴结转移的大肠癌组织中低于有淋巴结转移的组

织($P<0.01$), 而CD44v9 cDNA的表达趋势与RAB5A相同; RAB5A与CD44v9的蛋白和基因表达均呈正相关($\chi^2=14.532, P<0.01$).

结论: RAB5A和CD44v9的表达与大肠癌的分化和转移有关, 可能在跨膜信号传导和基质侵袭中共同发挥作用.

关键词: RAB5A; CD44v9; 结直肠肿瘤; 分化; 转移

李志高, 李晓冬, 董新舒, 庞洪刚, 杜杰. 大肠癌组织RAB5A和CD44v9表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(9):848-852
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/848.asp>

0 引言

大肠癌为常见多发病, 其发病率有逐年上升趋势. 近年来, 人们对大肠癌的浸润与转移机制进行了广泛的研究. RAB5A和CD44v9是近期研究较多的两类分化和转移相关靶基因, 研究表明, 其在肺癌和胃癌等组织中的高表达与肿瘤的分化、浸润和转移存在着正相关^[1], 但其与多种消化道肿瘤的相关性尚待进一步研究. 我们研究了大肠癌组织标本中RAB5A和CD44v9基因和蛋白质的表达, 以探讨二者与大肠癌分化及转移的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 RAB5A和CD44v9抗体由美国Santa Cruz公司生产; SYBR荧光定量PCR即用试剂盒由美国ABI公司生产; Trizol试剂由美国Invitrogen生物公司生产; MuMLv Reverse transcriptase由美国Promega生物技术公司生产; DEPC由美国Sigma生化试剂公司生产; 其他均为国产试剂纯. Gene Amp PCR System 2400型PCR仪由美国MJ公司生产; J2-21M型台式冷冻离心机由美国Beckman公司生产. 2003-01/2003-05资料完整并经病理证实的大肠癌石蜡包埋组织43例, 男27例, 女16例. 年龄26-74岁, ≥ 55 岁21例, <55 岁22例. 高分化12例, 低分化31例(含黏液腺癌10例). 应用Primer Premier5.0进行引物设计. 引物序列分别如下: CD44v9上游引物F_{CD44v9}: 5'-GCA GAG TAA TTC TCA GAG CTT CTC TAC AT-3'; 下游引物R_{CD44v9}: 5'-TTG ATG TCA GAG TAG AAG TTG TTG GAT GG-3', 扩增产物片段长度为195 bp. RAB5A上游引物F_{RAB5A}: 5'-AGC ACT AGG CTT GAT TTG-3'; 下游引物R_{RAB5A}: 5'-CAC CGC CAT AGA TAC ACT-3', 扩增产物片段长度为299 bp.

由上海生工生物工程公司合成.

1.2 方法 免疫组化按照说明书步骤进行操作, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 结果判定: RAB5A阳性表达以细胞膜和/或细胞质内出现棕黄色颗粒为准, CD44v9以血管内皮细胞的细胞质内或细胞膜出现棕黄色颗粒者为准, 计数5个高倍视野或1 000个细胞. 按染色强度计分: 0分为无色, 1分为淡黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色. 按阳性细胞所占百分比计分: 0分为阴性, 1分为阳性细胞 $\leq 10\%$, 2分为阳性细胞数11%-50%, 3分为阳性细胞数51%-75%, 4分为阳性细胞数 $>75\%$. 染色强度与阳性细胞所占百分比乘积3-5分计为(+), 6-9分为(++), 12分为(+++). 各指标 ≥ 6 分为高表达, <6 分为低表达. 另入院手术病理证实的大肠癌患者新鲜组织标本60例, 男37例, 女23例. 年龄35-87岁, ≥ 55 岁39例, <55 岁21例. 高中分化48例, 低分化12例. 取全层组织标本约100 mg, 经典Trizol法提取总RNA、逆转录cDNA第一链合成. 先用 β -actin上、下游引物进行扩增以确定实验条件, 然后进行RAB5A和CD44v9基因扩增. RAB5A的反应条件为95℃预变性10 min; 95℃ 30 s, 50.8℃ 30 s, 72℃ 45 s; CD44v9的反应条件为95℃预变性10 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 均扩增30个循环. 在每一循环的退火温度时收集荧光信号. PCR反应后, 按1.0℃/step的温度上升速率从65℃递增至99℃进行熔解曲线分析. 用ABI Prism 7000专用软件进行结果分析, cDNA的定量以扩增曲线的交叉点(crossing point, Cp)的数值来表示. 产物特异性经解链曲线分析确定, 并取反应产物5 μ L进行琼脂糖凝胶电泳, 以检验反应的特异性.

统计学处理 运用SAS 6.12软件包分析数据. 计量资料的数据以mean \pm SD表示, 组间差异采用方差分析处理, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组化检测结果 43例大肠癌组织中, RAB5A蛋白阳性率达100%, 高分化的12例中只有3例强阳性, 而低分化的31例中28例强阳性, 即随着大肠癌分化程度逐渐降低, RAB5A表达明显增高; 阳性表达位于胞质和胞膜(图1). 在43例大肠癌组织中, 35例有不同程度的CD44v9表达, 阳性率为81.4%, 阳性表达主要位于胞质(图2). 随着大肠癌分化程度逐渐降低, CD44v9蛋白表达呈明显增高的趋势. RAB5A表达随着大肠癌分

■研究前沿
RAB5A和CD44v9
与恶性肿瘤转移
的相关性为近期
研究的重点.

■创新盘点

关于RAB5A和CD44v9与大肠癌的相关研究目前多集中于蛋白水平,而本文则从基因水平对其与大肠癌的相关性作了较为深入的研究。

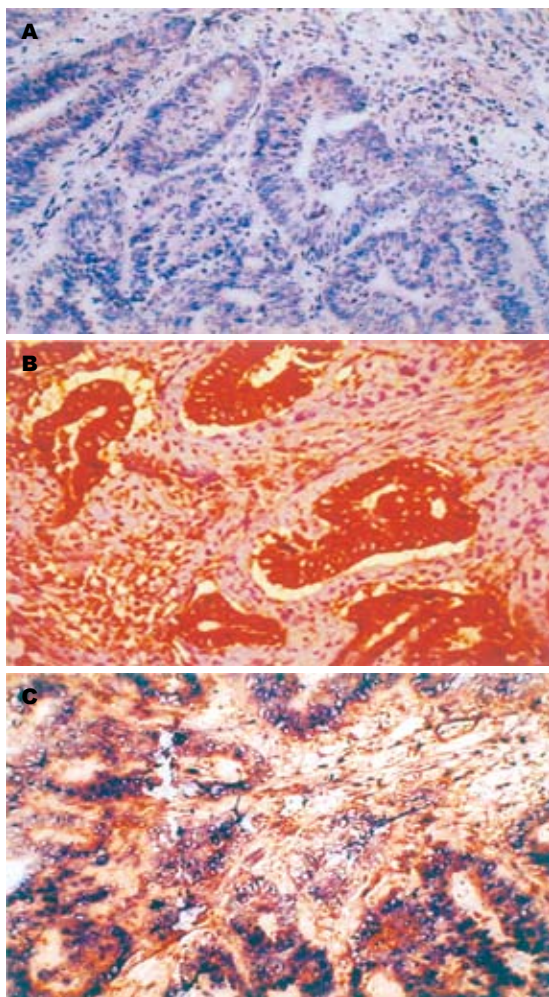


图1 大肠癌组织RAB5A蛋白表达(SP×200)。A: 阴性对照; B: 低分化大肠癌组织; C: 高分化大肠癌组织。

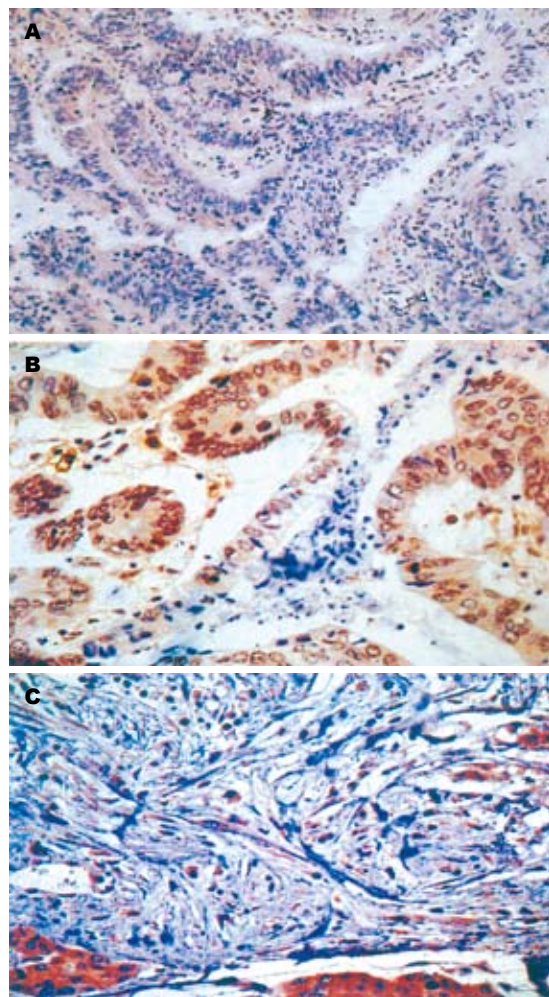


图2 大肠癌组织CD44v9蛋白表达(SP×200)。A: 阴性对照; B: 低分化大肠癌组织; C: 高分化大肠癌组织。

化程度的降低而明显增高($P<0.01$),而与大肠癌患者的年龄、性别无明显相关($P>0.05$,表1)。不同分化程度大肠癌组织CD44v9的表达程度差异有显著性($P<0.01$),与大肠癌患者的年龄、性别也无明显相关($P>0.05$,表1)。此外,RAB5A蛋白强阳性表达的31例中,26例同时CD44v9强阳性表达,5例CD44v9阴性/弱阳性表达;RAB5A蛋白弱阳性表达12例中,10例同时CD44v9阴性/弱阳性表达,2例CD44v9强阳性表达,两者的表达水平差异有显著性($P<0.01$),显示RAB5A蛋白与CD44v9的表达呈正相关。

2.2 荧光定量PCR实验结果 经熔解曲线分析各样本扩增产物的 T_m 值一致并与阳性对照的 T_m 值吻合,阴性对照均未见扩增(图3A-B)。其中,RAB5A cDNA的表达量在高分化和中分化大肠癌组织中要低于低分化大肠癌组织($P<0.05$),显著低于大肠癌黏液腺癌组织($P<0.01$)。而CD44v9 cDNA的表达趋势与RAB5A相同。定量PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果可见RAB5A基因的产物在

表1 RAB5A与CD44v9蛋白表达程度与大肠癌临床病理特征间的关系

临床及病理学指标	n	RAB5A蛋白表达程度		CD44v9表达程度	
		+ / ++	+++	- / ++	+++
男	27	8	19	14	13
女	16	4	12	9	7
年龄≤55	21	6	15	12	9
>55	22	6	16	11	11
高分化	12	9	3	10	2
低分化	31	3	28 ^b	13	18 ^b
有淋巴结转移	32	5	27	13	19
无淋巴结转移	11	8	3 ^d	8	3 ^d

^b $P<0.01$ vs 高分化, ^d $P<0.01$ vs 有淋巴结转移。

299 bp处有特异性条带(图4),而CD44v9基因的产物在195 bp处有特异性条带。

3 讨论

RAB5A是位于质膜,早期内体上的GTP酶开关,

负责调控胞吞中早期内体的融合, 与细胞内物质运输、蛋白分选以及信号传导、受体下调和病原体吞噬有关. RAB5A蛋白突变体研究表明, RAB5A蛋白的突变可导致细胞功能失调, 引起多种疾病发生. 李钰 *et al*^[2]采用mRNA差异展示技术发现RAB5A基因在具有高转移潜能的人肺腺癌细胞系Anip973中高表达, 而在其低转移潜能的母系AGZY83-a中低表达, 是一个肺癌转移相关基因. 陈宇 *et al*^[3]曾应用免疫组化SP法检测胃癌石蜡包埋组织RAB5A蛋白的表达情况, 发现RAB5A与胃癌分化程度相关, 分化程度越低RAB5A的表达越高. 为进一步研究RAB5A与消化道肿瘤分化程度的相关性, 我们以大肠癌为研究对象, 选用与大肠癌分化相关的细胞黏附分子CD44v9作为参照, 以探讨其在大肠癌进而在肿瘤的形成和演进中的作用. CD44是细胞黏附分子家族中的一员, 主要位于细胞表面, 介导细胞与细胞间或细胞与基质间相互接触和结合, 以配体-受体对应的形式发挥作用. CD44基因在转录过程中, 外显子经过选择性剪切可产生多种变异型, 与肿瘤的形成、演进、转移及复发有明显关系^[4]. CD44v9是由外显子14插入CD44标准型近细胞膜细胞外功能区上形成的. Higashikawa *et al*^[5]研究证明CD44v9与消化道肿瘤关系最为密切, 可能与大肠癌的分化有密切关系.

我们发现, RAB5A蛋白在43例高低不同分化程度的大肠癌组织中表达的阳性率达100%(43/43), 其表达随着大肠癌分化程度的降低而明显增高($P<0.01$), 并随着大肠癌转移度的增高而增加($P<0.01$), 提示RAB5A蛋白的表达程度可能与大肠癌细胞分化以及浸润转移的能力密切相关. 同时发现CD44v9蛋白表达随着大肠癌分化程度的降低也明显增高($P<0.01$), 这与已有研究报道相符^[6-7]. 统计学相关性分析表明RAB5A蛋白与CD44v9的表达水平呈显著性正相关($P<0.01$), 因此与分化相关细胞黏附分子CD44v9可作为阳性参照, 以探讨RAB5A与大肠癌分化的关系, 并进一步探讨RAB5A作为蛋白质跨膜分选的信号调控开关, 在高低不同分化程度的大肠癌中与CD44v9表达的相关性. 同时也提示两者在大肠癌分化过程和浸润转移中共同发挥调控作用, 联合检测两蛋白表达对预测肿瘤分化程度、远隔转移的发生及评估预后将具有一定的指导意义.

荧光定量PCR技术是目前基因定量的最

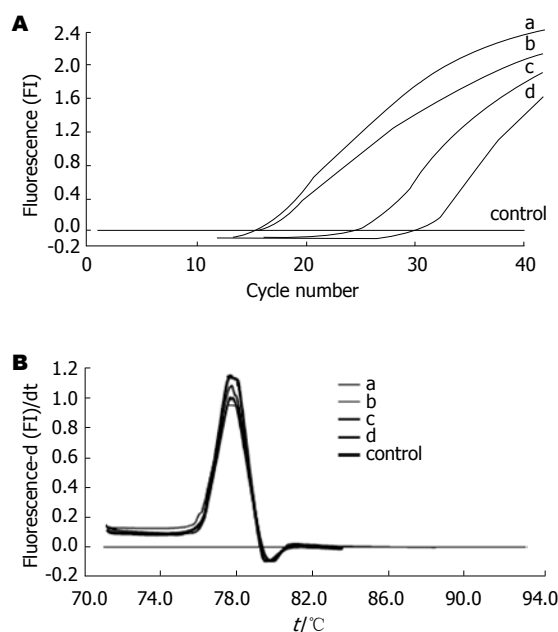


图3 RAB5A cDNA定量RT-PCR结果和熔解曲线. A: 定量RT-PCR结果; B: 熔解曲线. a: 黏液腺癌; b: 低分化腺癌; c: 中分化腺癌; d: 高分化腺癌; control: 阴性对照组.

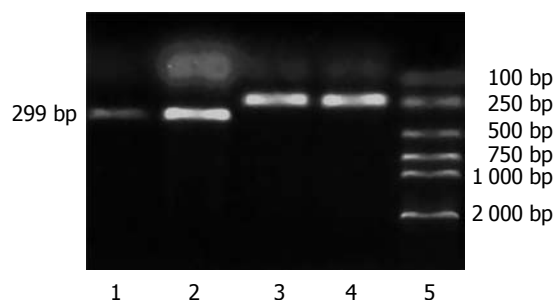


图4 大肠癌标本RAB5A定量PCR特异性检测. 1: 高分化无转移; 2: 低分化有远处转移; 3, 4: 相应标本的 β -actin PCR产物; 5: DL2000 Marker.

常用的技术, 可以实时动态地显示PCR扩增曲线的生成, 定量的线性范围大于7个数量级, 区分5 000和10 000个拷贝的DNA模板可信度达99.7%. SYBR Green I是一种只与DNA双链结合的荧光染料, 与DNA双链结合时发出荧光, 从DNA双链上释放出来时, 荧光信号急剧减弱. 因此, 在一个体系内, 其信号强度代表了双链DNA分子的数量^[8]. 本研究应用SYBR Green I荧光染料一步法, 对60例大肠癌临床标本中RAB5A和CD44v9的表达进行了研究. 结果可见, RAB5A基因在大肠癌标本中均有表达, 随着肿瘤分化程度的降低其表达量逐渐增多, 尤其是伴有淋巴结转移的组织, 其表达量明显高于无转移的组织. 同时, CD44v9基因的表达也随其转移度的增加而增加. 此现象与应用免疫组化法

应用要点

本文为进一步研究肿瘤转移相关基因提供了新的研究靶点, 下一步可对其与肿瘤细胞的侵袭等转移相关特性进行研究.

■同行评价

本文采用的方法合理,结果可信,对大肠癌的转移和预后评估增加了新的指标。

得出的RAB5A和CD44v9蛋白质表达趋势相同。两结果互相验证,从而在mRNA和蛋白质两个水平同时证明了RAB5A和CD44v9的表达与大肠癌的转移程度呈正相关。

总之, RAB5A和CD44v9的表达与大肠癌的分化和淋巴结转移有关, RAB5A在大肠癌的发展和分化过程中可能通过调控蛋白质跨膜运输通路发挥重要的作用, 并且二者可能共同在肿瘤转移过程中发挥作用, 而其中的具体机制有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Eisterer W, Bechter O, Hilbe W, van Driel M, Lokhorst HM, Thaler J, Bloem AC, Gunthert U, Stauder R. CD44 isoforms are differentially regulated in plasma cell dyscrasias and CD44v9 represents a new independent prognostic parameter in multiple myeloma. *Leuk Res* 2001; 25: 1051-1057
- 2 李钰, 宋岩, 陆纲, 邹荣, 邹亚男, 张贵寅, 李璞. 一个与非小细胞肺癌转移相关的基因——RAB5A基因. *遗传* 1999; 21: 6-10
- 3 陈宇, 李钰, 白静, 周立新, 张贵寅, 李璞. 胃癌组织中RAB5A蛋白的表达及其与转移的关系. *中国肿瘤* 1999; 8: 234-236
- 4 Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-1313
- 5 Higashikawa K, Yokozaki H, Ue T, Taniyama K, Ishikawa T, Tarin D, Tahara E. Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinomas and normal tissues. *Int J Cancer* 1996; 66: 11-17
- 6 Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993; 53: 4754-4756
- 7 高远帆, 何金, 陈泳莲. CD44及其变异型在大肠癌浸润转移中的表达. *上海医学* 2000; 23: 151-153
- 8 吴亚云, 耿晓霞, 程明亮. 丹芍化纤方对体外大鼠肝细胞增生、Caspase-3mRNA及白蛋白合成的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 781-783

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

NERD及相关疾病国际研讨会

本刊讯 NERD及相关疾病国际研讨会将于2006-08在三亚举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和结构式摘要800字, 电脑打印附软盘或E-mail, 2006-06-15截稿。

2 联系方式

北京市鼓楼大街41号中国医学论坛报社 张莉; 邮编: 100009; 电话: 010-64002844; E-mail: NERD@gisummit.com.