

结直肠癌组织中ESA和CD44的表达及其临床病理意义

张秋菊, 刘斌, 邢传平, 苏勤军, 董亮, 钱震, 高自芳

张秋菊, 刘斌, 邢传平, 苏勤军, 董亮, 钱震, 高自芳, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科 甘肃省兰州市 730050
张秋菊, 兰州大学在读硕士, 主要从事临床肿瘤病理研究。

作者贡献分布: 张秋菊、刘斌、邢传平、苏勤军、董亮、钱震及高自芳对此文所作贡献均等; 此课题由刘斌和张秋菊设计; 研究过程由所有作者共同完成; 研究所用病例选取及结果分析由刘斌、邢传平、苏勤军及钱震负责; 试剂及技术指导由董亮与高自芳提供; 数据分析由张秋菊完成; 本论文写作由刘斌与张秋菊完成。

通讯作者: 刘斌, 主任医师, 教授, 730050, 甘肃省兰州市, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科. liumb@public.lz.gs.cn
电话: 0931-8994566

收稿日期: 2009-01-15 修回日期: 2009-03-30

接受日期: 2009-04-08 在线出版日期: 2009-05-18

Expression and clinicopathologic significance of ESA and CD44 in colorectal carcinoma

Qiu-Ju Zhang, Bin Liu, Chuan-Ping Xing, Qin-Jun Su, Liang Dong, Zhen Qian, Zi-Fang Gao

Qiu-Ju Zhang, Bin Liu, Chuan-Ping Xing, Qin-Jun Su, Liang Dong, Zhen Qian, Zi-Fang Gao, Department of Pathology, General Hospital of Lanzhou, Lanzhou Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Correspondence to: Professor Bin Liu, Department of Pathology, General Hospital of Lanzhou, Lanzhou Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. liumb@public.lz.gs.cn

Received: 2009-01-15 Revised: 2009-03-30

Accepted: 2009-04-08 Published online: 2009-05-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between expression of ESA and that of CD44 and their clinicopathologic significance in primary colorectal carcinoma.

METHODS: Expression of CD44 and ESA protein in 10 cases of normal mucosa, 13 cases of adenoma with atypical hyperplasia and 67 cases of colorectal carcinoma were detected using SP (streptavidin HRP) immunohistochemical method, and the relationship between CD44 and ESA were also analyzed.

RESULTS: The expressions of CD44 and ESA were significantly higher in colorectal carcinoma than in normal mucosa or than in adenoma with

atypical hyperplasia. Significant relationship was found among the expression of CD44 and lymphatic metastasis, pathological grade and Dukes stage ($\chi^2 = 8.375, 14.284, 7.948$, all $P < 0.05$). The expression of ESA was correlated with age, depth of infiltration, pathological grade and Dukes stage ($\chi^2 = 16.918, 15.195, 10.395, 7.681$, all $P < 0.05$). Meanwhile, there was a positive correlation between the expression of ESA and that of CD44 ($r = 0.614, P = 0.000$).

CONCLUSION: The expression of ESA and CD44 are highly related to occurrence, development, infiltration and metastasis of colorectal carcinoma, and the evaluation of the two markers will be very applicable guidance for the diagnosis of metastasis and invasion of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Cancer stem cell; Epithelial specific antigen; Epithelial cell adhesion molecule; CD326; CD44; Immunohistochemical method

Zhang QJ, Liu B, Xing CP, Su QJ, Dong L, Qian Z, Gao ZF. Expression and clinicopathologic significance of ESA and CD44 in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(14): 1417-1421

摘要

目的: 探讨原发性结直肠癌组织中ESA和CD44蛋白表达的关系及临床病理意义。

方法: 应用免疫组织化学SP法检测10例正常结直肠黏膜组织、13例伴不典型增生的结直肠腺瘤及67例结直肠癌组织中ESA和CD44的表达, 并比较两者不同病理参数的相关性。

结果: 结直肠癌组织中ESA和CD44的表达明显高于其在正常肠黏膜组织和伴不典型增生的结直肠腺瘤中的表达($P < 0.05$); 在结直肠癌中, CD44的表达与淋巴结转移、分化程度及Dukes分期有关($\chi^2 = 8.375, 14.284, 7.948$, 均 $P < 0.05$); ESA与年龄、浸润深度、分化程度及Dukes分期有关($\chi^2 = 16.918, 15.195, 10.395, 7.681$, 均 $P < 0.05$); ESA的表达与CD44的表达呈正相关($r = 0.614, P = 0.000$)。

■背景资料

结直肠癌是我国常见的消化系统肿瘤, 术后转移复发是其导致死亡的主要原因。CD44和ESA是与肿瘤浸润转移密切相关的两种黏附分子, 可作为结直肠癌干细胞的表面标记。本文利用免疫组织化学法, 探讨了两者在结直肠癌中表达的相关性, 以期了解与结直肠癌的浸润转移及预后的关系。

■同行评议者

王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

■研究前沿

恶性肿瘤的形成和转移是一个多基因、多因素共同作用的结果,探讨和寻找肿瘤发生或转移的机制,是肿瘤学临床和基础研究的主题之一。

结论: ESA与CD44在结直肠癌的发生发展、浸润转移中密切相关,同步检测二者在结直肠癌组织中的表达并综合分析两者之间的关系对评价结直肠癌的侵袭转移能力判断具有一定价值。

关键词: 结直肠癌; 肿瘤干细胞; 上皮特异抗原; 上皮细胞黏附分子; CD326; CD44; 免疫组织化学法

张秋菊, 刘斌, 邢传平, 苏勤军, 董亮, 钱震, 高自芳. 结直肠癌组织中ESA和CD44的表达及其临床病理意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(14): 1417-1421

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1417.asp>

0 引言

恶性肿瘤的形成和转移是一个多基因、多因素共同作用的结果,探讨和寻找肿瘤发生或转移的机制,是肿瘤学临床和基础研究的主题之一。结直肠癌是我国常见的消化系肿瘤,术后转移复发是其导致死亡的主要原因。CD44和ESA是与肿瘤浸润转移密切相关的两种黏附分子,可作为结直肠癌干细胞的表面标记。本文利用免疫组织化学法,探讨了两者在结直肠癌中表达的相关性,以期了解与结直肠癌的浸润转移及预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 67例结直肠癌石蜡包埋标本取自中国人民解放军兰州军区总医院病理科2005-2007年外检档案。所有标本术前均未行放化疗。患者中男31例,女36例,年龄29-90(平均年龄57.2)岁。病理分级按WHO标准,高分化腺癌28例,中分化腺癌24例,低分化腺癌15例。有淋巴结转移及远处转移的38例。对照组为10例正常肠黏膜组织及13例伴不典型增生的结直肠腺瘤。鼠抗人mAb CD44(北京中杉生物技术公司),鼠抗人上皮特异抗体(ESA)(福州迈新生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 所有标本均经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋组织连续切片(厚4 μ m),每例标本分别做常规HE、免疫组织化学染色。免疫组织化学SP法分别标记ESA和CD44,操作步骤按说明书进行。DAB显色,苏木素复染核。PBS代替第一抗体作阴性对照。光学显微镜下观察结果。

1.2.2 染色结果判断: ESA阳性表达在结直肠癌细胞胞质内,呈棕黄色颗粒,均一弥漫性分布,所有上皮来源的肿瘤ESA均不同程度阳性,按染色强度,将其分为3级:浅黄色为(+),棕黄色为

(++),棕褐色为(+++); CD44阳性表达于细胞膜,部分胞质部位也有浅染色。CD44采用半定量方法,未见阳性细胞为(-),阳性细胞数0%-5%(+),5%-25%(++),>25%(+++). 细胞计数标准参照TomomiIshida的计数标准,40 \times 物镜视野下共查100个细胞,查10个视野^[1]。以上均由三位病理医生用盲法对染色结果进行评估,切片号码为随机确定,与临床病理资料无对应关系。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理,计数资料用 χ^2 检验,等级分组资料用Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 CD44及ESA的表达 在10例正常肠黏膜中,CD44几乎均为阴性(图1A),ESA呈不同程度弱阳性表达(图2A);在伴有不典型增生的肠黏膜中,CD44沿腺管基底侧呈小灶性弱表达(图1B),ESA亦呈弱阳性表达(图2B);癌组织中,CD44阳性细胞沿腺管基底侧呈局灶性表达(图1C),ESA有不同程度表达(图2C)。CD44仅在癌组织和伴有不典型增生的腺瘤中表达,且两者有明显差异($P<0.01$);ESA在癌组织、伴有不典型增生的腺瘤及正常肠黏膜中均表达,三者之间存在明显差异($P<0.01$),且成负相关($r = -0.548, P<0.01$,表1)。

2.2 CD44和ESA的表达与临床病理特征的关系 67例结直肠癌中,CD44表达与淋巴结转移、Dukes分期有关($P<0.05$),与病理分级呈正相关($r = 0.272, P = 0.014<0.05$),病理分级越低,CD44表达越强;ESA与年龄、浸润深度及Dukes分期有关($P<0.05$),与病理分级($r_s = 0.386, P = 0.001<0.01$),病理分级越低,ESA表达越强(表2)。

2.3 CD44与ESA的表达的关系 Spearman等级相关分析,CD44与ESA在结直肠癌中呈正相关($r = 0.614, P = 0.000<0.01$)。

3 讨论

人类CD44基因位于11号染色体短臂13区上,由20个高度保守的外显子组成,仅含有组成型外显子CD44转录子称标准型CD(CD44s),而含有变异性外显子的CD44转录子称为变异性CD(CD44v)^[2]。CD44分子作为一种细胞黏附分子(CAM),其正常功能是介导淋巴细胞的归巢、淋巴细胞向炎症部位和黏膜相关淋巴组织归位、黏附细胞外基质等。近年来发现,CD44分子与许多恶性肿瘤的侵袭转移有着密切的联系。

ESA上皮特异抗原(EpCAM, CD326)又称上

表 1 CD44和ESA在正常肠黏膜及不同病变组织中的表达

分组	n	CD44				ESA		
		-	+	++	+++	+	++	+++
结直肠癌	67	0	24	21	22	12	19	36
不典型增生	13	0	11	1	1	9	3	1
正常肠黏膜	10	10	0	0	0	9	1	0

■ 相关报道

ESA 上皮特异抗原 (EpCAM, CD326) 又称上皮细胞黏附分子, 是一个由 GA-733-2 基因编码的 40 kDa 的糖蛋白, 表达在人类大多数上皮细胞的基底侧, 也是最早被发现的肿瘤标志物之一。但是, 他没有像其他黏附分子一样得到重视。最近研究发现了其更多的作用: 参与信号传递和细胞迁移、增殖及分化过程。

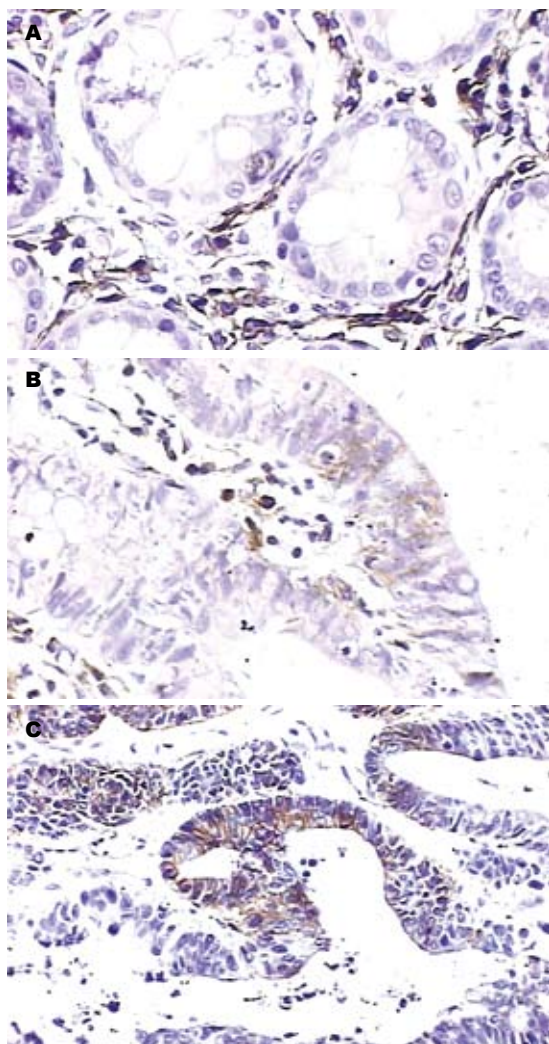


图 1 CD44的表达(IHC × 200). A: 正常组织中CD44几乎不表达; B: 腺瘤中CD44呈小灶性弱表达; C: 癌组织中CD44呈灶性强表达。

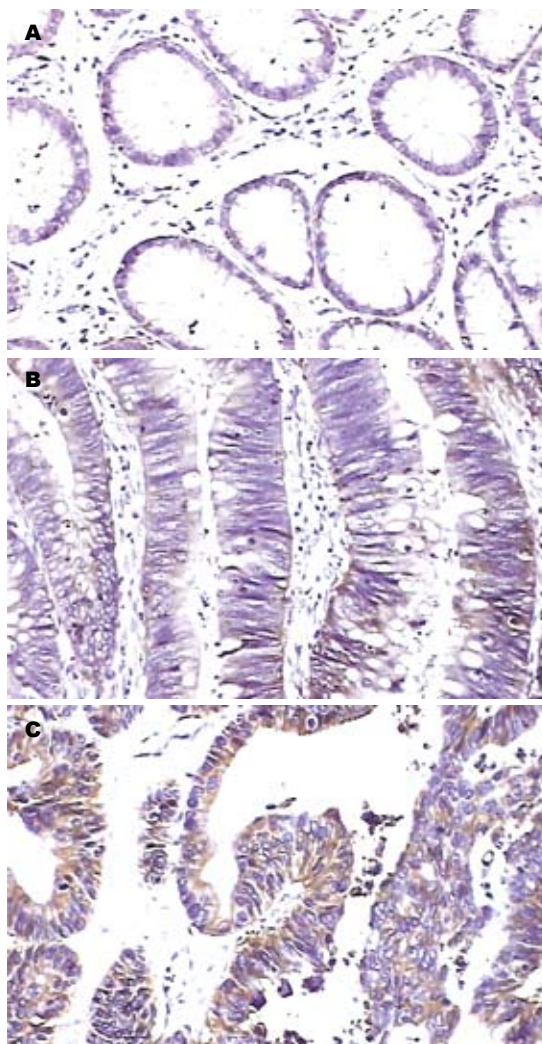


图 2 ESA的表达(IHC). A: 正常组织中ESA呈弱阳性(× 100); B: 腺瘤中ESA在呈弱阳性(× 200); C: 癌组织中ESA呈强阳性表达(× 200)。

皮细胞黏附分子, 是一个由 GA-733-2 基因编码的 40 kDa 的糖蛋白, 表达在人类大多数上皮细胞的基底侧, 也是最早被发现的肿瘤标志物之一^[3]。但是, 他没有像其他黏附分子一样得到重视。最近研究发现了其更多的作用: 参与信号传递和细胞迁移、增殖及分化过程^[4]。ESA 高表达与肿瘤患者生存时间缩短密切相关^[5]。

本研究结果显示, CD44 在正常肠黏膜中不表达, 在结直肠癌及伴不典型增生的腺瘤组织

中, CD44 沿腺管样结构呈局灶状表达; ESA 在所有不同病变的组织中均有不同程度表达; 且 CD44 和 ESA 在结直肠癌组织中的表达与伴有不典型增生的结直肠腺瘤中的表达均有明显差异, 这就说明从正常肠黏膜到腺瘤到癌的转变过程中 CD44 和 ESA 起了重要作用。CD44 的表达与淋巴结转移、病理分级及 Dukes 分期这三者有关, 进一步证实了 CD44 与结直肠癌的浸润转移有密切的联系。而 ESA 的表达与年龄、病理分级、浸

■应用要点

ESA与CD44在结直肠癌的发生发展、浸润转移中密切相关,同步检测二者在结直肠癌组织中的表达并综合分析两者之间的关系对评价结直肠癌的侵袭转移能力判断具有一定价值。

表 2 结直肠癌CD44和ESA表达与临床病理及其两者之间的关系

临床病理	n	CD44			χ^2 值	P值	ESA			χ^2 值	P值
		+	++	+++			+	++	+++		
性别					5.125	0.077				0.948	0.623
男	31	9	14	8			6	7	18		
女	36	15	7	14			6	12	18		
年龄(岁)					0.762	0.683				16.918	0.000
≤50	16	7	5	4			1	11	4		
>50	51	17	16	18			11	8	32		
肿瘤直径(cm)					3.278	0.194				12.290	0.002
≤3	24	12	6	6			3	13	8		
>3	43	12	15	16			9	6	28		
淋巴结转移					8.375	0.015				5.135	0.077
无	29	16	6	7			7	11	11		
有	38	8	15	15			5	8	25		
病理分级					14.284	0.006				10.395	0.034
高	28	16	4	8			8	11	9		
中	24	7	8	9			3	6	15		
低	15	1	9	5			1	2	12		
浸润深度					5.172	0.075				15.195	0.001
≤肌层	11	7	3	1			2	8	1		
≥浆膜	56	17	18	21			11	10	35		
Dukes分期					7.948	0.019				7.681	0.021
A+B	27	15	5	7			8	10	9		
C+D	40	9	16	15			5	8	27		

润深度及Dukes分期都有关。ESA的表达与病理分级呈正相关,病理分级越低,ESA表达越强,而病理分级越低,肿瘤的恶性程度就越高,浸润转移的能力就越强,这说明ESA的表达与结直肠癌的浸润转移亦有关系;Dukes分期对结直肠癌的预后判断有一定意义,他依据结直肠癌的癌变扩散范围以及有否淋巴结和远隔器官的转移而定,ESA的表达与Dukes分期有关,说明ESA与结直肠癌的预后有一定关系。CD44与ESA在结直肠癌中呈正相关($r_s = 0.614$, $P = 0.000 < 0.01$),且两者同时与病理分级及Dukes分期均呈正相关,这就表明,在结直肠癌中CD44与ESA的表达存在着协同作用,两者之间可能存在一种机制将两者联合起来,共同促进肿瘤细胞的浸润转移及预后,而且两者联合作用比任何一种黏附分子单独作用都更能促进肿瘤的浸润转移。这种作用机制在ESA和CD44变异型中得到证实,ESA可与CD44v4-V7、Claudin-7形成复合结构促进结直肠癌的浸润转移^[6-8],因此,ESA和CD44之间也可能存在相似的复合结构,以EpCAM^{high}/CD44⁺为表型的结直肠癌干细胞发现后^[9],证明了这种复合结构可能存在于结直肠癌干细胞上,

这也为肿瘤干细胞理论提供了一个有力的证据。而ESA与年龄有关,他可能与结直肠癌患者的生存时间缩短有关,肿瘤干细胞是突变在时间上的积累,ESA作为一个可能的肿瘤干细胞表面标记,他在年龄上的积累也可能与肿瘤干细胞的形成有关。

现在已研发了以CD326(ESA)为靶点的药物,具有特异性杀伤效应,有可能发现和根除肿瘤干细胞。此外,CD326还表达于肿瘤干细胞的后代细胞上,单独使用这类药物或者与标准治疗联合使用,能够使肿瘤团块缩小^[10]。这种药物的作用机制有可能使CD326和CD44的复合体遭到破坏,使其失去了向肿瘤分化的能力,从而达到根治肿瘤的目的。

4 参考文献

- 1 Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg Today* 2000; 30: 28-32
- 2 Gao AC, Lou W, Dong JT, Isaacs JT. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res* 1997; 57: 846-849
- 3 Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen

- is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1994; 125: 437-446
- 4 Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 417-423
- 5 Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Köchli OR, Haas P, Mross F, Zuber M, Dietrich H, Bischoff S, Mirlacher M, Sauter G, Gastl G. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 86: 207-213
- 6 Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnölzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G, Zöller M. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* 2005; 309: 345-357
- 7 Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 2007; 171: 386-395
- 8 Kuhn S, Koch M, Nübel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW, Weitz J, Zöller M. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 553-567
- 9 Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10158-10163
- 10 Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 2006; 94: 128-135

■同行评价

本文利用免疫组织化学法, 探讨CD44和ESA表达与结直肠癌的浸润转移等临床病理因素的关系, 其中人上皮特异抗原ESA与大肠癌临床病理因素的相关性研究有一定的新意, 具有较好的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-18)