

胃癌中 CD44v6 表达及与微血管密度和生物学行为的关系 *

李 强 黄 波[△] 何 莲 刘 骞 孙 媛 商冠宁

(辽宁省肿瘤医院病理科 辽宁 沈阳 110042)

摘要 目的 探讨 CD44v6 在胃癌中的表达及其与微血管密度(microvessel density ,MVD) 和生物学行为的关系。方法 采用免疫组化法检测 80 例胃癌组织 CD44v6、CD34 的表达,以 CD34 标记肿瘤微血管,并在显微镜下计数微血管密度(MVD)。结果 :CD44v6 在胃癌组织中的表达与肿瘤浸润深度、临床分期、淋巴结转移相关($P<0.05$) , CD44v6 强阳性表达组中 MVD 明显高于 CD44v6 阴性表达组($P<0.05$)。结论 :CD44v6 的表达和 MVD 计数是反映胃癌生物学特性的良好的指标 ,对判断胃癌的浸润转移具有一定的临床意义。

关键词 :胃癌; CD44v6 ;微血管密度 ;浸润和转移

中图分类号 :R735.2 文献标志码 :A 论文编号:1673-6273(2012)09-1686-04

Expression of CD44v6 and its Relationship with Microvessel Density and Biological Behaviour in Gastric Carcinoma*

LI Qiang, HUANG Bo[△], HE Lian, LIU Qian, SUN Yuan, SHANG Guan-ning

(Pathological department, Liaoning tumor hospital, Liaoning, Shenyang, 110042, China)

ABSTRACT Objective: To discuss CD44v6 expression in gastric carcinoma and its relationship with microvessel density (MVD) and biological behaviour. **Methods:** Using immunohistochemistry method to detect CD44v6 and CD34 in gastric carcinoma (n= 80). Count microvessel density(MVD). **Results:** The expression of CD44v6 had correlation with the depth of infiltration, the TNM staging and lymph node metastasis ($P<0.05$), The quantity of MVD in the group with CD44v6 strong positive was greater than that in the group with CD44v6 negative ($P<0.05$). **Conclusions:** CD44v6 and MVD are valuable indicators for the biological characteristics of primary gastric carcinoma and helpful in distinguishing malignant from benign tumors.

Key words: Gastric carcinoma; CD44v6; MVD; Invasion and metastasis

Chinese Library Classification (CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)09-1686-04

前言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一 ,近年来发病率呈上升趋势 ,但治疗有效率低 ,仍有 1/4-1/3 的患者最终死于复发和转移^[1]。本研究采用免疫组化方法探讨了 CD44v6 与胃癌的临床病理因素及 MVD 之间的关系,旨在为胃癌的预后判断提供有用的参考指标。

1 材料与方法

1.1 材料

80 例胃癌手术切除标本。其中男性 58 例,女性 22 例,年龄 42~82 (平均 58.54) 岁。高分化腺癌 22 例、中分化腺癌 31 例 ;低分化腺癌(包括粘液腺癌、印戒细胞癌)27 例;;无淋巴结转移 43 例,淋巴结转移 37 例 ;TNM 分期:I 期 15 例 , 期 40 例 , 期 20 例 , 期 5 例。所有标本手术前未经任何治疗。本组病例术后切除标本均取离肿瘤边缘 5cm 的正常胃粘膜作为对照。标本均经 10 %中性福尔马林固定,石蜡包埋,常规制成 4 μ m 厚切片。

1.2 试剂

CD44v6、CD34 鼠抗人单克隆抗体、MaxViosiontm2/HRP 试剂盒、DAB 显色剂购自迈新公司。

1.3 方法

应用免疫组化 MaxViosiontm2/HRP 法 ,染色步骤 :①石蜡切片脱蜡、水化 ,自来水冲洗。②采用高压锅高温高压抗原修复法。③切片滴加过氧化物酶阻断剂 ,室温下孵育 10 分钟。PBS 冲洗 3 $\times$ 3 分钟。④除去 PBS ,切片分别滴加 CD34 和 CD44v6 单克隆抗体 ,室温下孵育 60 分钟。PBS 冲洗 3 $\times$ 3 分钟。⑤除去 PBS ,切片滴加 MaxViosiontm2/HRP 试剂 ,室温孵育 15 分钟 , PBS 冲洗 3 $\times$ 3 分钟。⑥除去 PBS ,切片滴加新鲜配制的加强型 DAB 显色试剂显色。⑦自来水冲洗终止显色 ,苏木素复染 ,PBS 反蓝 ,梯度酒精脱水 ,二甲苯透明 ,中性树胶封片。光镜下观察。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判断

CD44v6 阳性颗粒呈棕色 ,位于细胞膜。CD44v6 阳性结果:阳性细胞数 无阳性细胞染色 =0 , <1/3 细胞染色 =1 ,多灶性细胞(<2/3) 染色 =2 ,弥漫性(>2/3)细胞染色 =3 染色阳性程度 :

* 基金项目 辽宁省科技攻关项目(2010225015)

作者简介 李强(1973-) 男 ,副主任医师。研究方向 肿瘤的临床诊断及研究

[△]通讯作者 黄波 ,女 ,主任医师 ,E-mail: hungbo1970@gmail.com

(收稿日期 2011-12-02 接受日期 2011-12-30)

无着色 =0 ,淡黄色 =1 ,深黄色 =2 ,棕色 =3。将前述二者分值相加 ,则为最后结果。

>4 者为强阳性^[2]。MVD :凡染色棕色 ,明显与微血管分开的内皮细胞或内皮细胞簇均可视为单个微血管 ,先在低倍镜下 (40× 倍)找出微血管最丰富区(热点区) ,在(200× 倍)下各计数 10 个视野 ,取其平均值者代表该标本的计数。管腔内径大于 8 个红细胞或有较厚肌层的血管不予计数^[3]。

1.5 统计学处理

率的比较采用 X² 检验 ,计数资料采用($\bar{x} \pm s$)表示 ,多组资料的差异性采用 t 检验。采用 SPSS13.0 软件包进行 ,以 P<0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 CD44v6 在癌组织中表达

CD44v6 在胃癌组织中高表达 ,阳性率 69.2%。棕色颗粒弥

漫分布于细胞膜 ,可少量见于胞浆。CD44v6 在癌巢边缘最强。在癌旁以及正常组织未见表达。CD44v6 表达与癌组织分型、分化程度无关 ,与浸润深度和临床分期、淋巴结转移密切相关。CD44v6 在胃癌的表达与临床病理因素的关系 ,见表 1。

2.2 MVD 在癌组织中的表达

CD34 染色定位于微血管内皮细胞的细胞浆 ,癌组织中微血管分布主要位于癌灶边缘(血管活性生成区) ,形态不规则,呈异质性。而在癌旁正常组织中血管比较规则,稀少,分布较均匀。淋巴结转移组的 MVD 高于无淋巴结转移组的(P<0.05) 。且与癌组织浸润深度和临床分期密切相关。MVD 在胃癌中的表达与临床病理因素的关系 ,见表 1。

2.3 CD44v6 表达与 MVD 的相关性

CD44v6 强阳性组 MVD 值明显大于 CD44v6 阴性组。见表 2。

表 1 胃癌中 CD44v6 表达与临床病理因素的关系
Table 1 Expression of CD44v6 and its relationship with Clinicopathological factors in Gastric Carcinoma

Item	n	CD44v6 positive number(%)	P-value	MVD ($\bar{x} \pm s$)	P-value
Gender					
Male	58	36 (62.07)	>0.05	38.31± 11.52	>0.05
Female	22	13 (59.09)		34.64± 6.31	
Age					
< 50	32	18 (56.25)	>0.05	39.26± 12.12	>0.05
≥ 50	48	29 (60.42)		36.09± 8.74	
Histological type					
Papillary adenocarcinoma	9	6 (66.67)	>0.05	30.78± 8.83	>0.05
Tubular adenocarcinoma	60	42(70.00)		35.46± 9.26	
Mucinous adenocarcinoma	6	4 (66.67)		38.64± 11.22	
Signet ring cell carcinoma	5	3 (60.00)		38.89± 12.10	
The degree of differentiation					
Well-differentiated	22	12(54.55)	> 0.05	39.64± 12.59	> 0.05
In differentiation	31	19(61.29)		45.23± 10.14	
Poorly differentiated	27	19(70.37)		43.64± 12.23	
Serosal invasion					
Yes	44	32(72.73)	< 0.05	56.52± 17.53	< 0.05
No	36	13(36.11)		35.46± 15.86	
Lymph node metastasis					
Yes	43	33(76.74)	< 0.05	55.12± 18.53	< 0.05
No	37	14(37.83)		38.74± 16.28	
TNM staging					
/	55	19(34.55)	< 0.05	38.24± 16.85	< 0.05
/	25	20(80.00)		56.21± 18.96	

表 2 胃癌中 CD44v6 表达与 MVD 的相关性
Table 2 The correlation of CD44v6 and MVD in gastric carcinoma

Expression of CD44v6	MVD ($\bar{x} \pm s$)	P-value
Negative	33.58 $\pm$ 16.44	>0.05*
Weakly positive	47.55 $\pm$ 28.09	>0.05**
Strong positive	63.40 $\pm$ 26.77	<0.05***

注：* 阴性组与弱阳性组两两比较(Note: Comparison between negative and weakly positive);
** 弱阳性组与强阳性组两两比较(Note: Comparison between Weakly positive and Strong positive);
*** 阴性组与强阳性组两两比较(Note: Comparison between negative and Strong positive)

3 讨论

肿瘤的侵袭和转移是肿瘤恶性表现的重要特征 ,是临床上绝大多数肿瘤患者的致死因素。肿瘤生长、侵袭及转移是肿瘤细胞和宿主细胞的一个复杂、多步骤、多因素参与过程。在此过程中多种转移相关基因激活是导致肿瘤细胞转移的重要因素^[4]。肿瘤细胞的黏附力和对周围基质蛋白的降解能力与恶性肿瘤的转移和预后密切相关。新生的毛细血管也是必不可少的条件。

CD44 是一个近年来很关注而分布极为广泛的细胞表面黏附分子。根据其基因外显子表达方式不同 ,编码两种不同类型的蛋白即标准型 CD44s 和变异型 CD44v。在不同的细胞上 ,由于 CD44 结构差异而介导不同的功能。CD44s 在生理状态下主要参与细胞与细胞、细胞与间质之间的黏连 ,介导淋巴细胞的归巢及细胞的迁移。CD44v 则主要出现机体的病理过程 ,特别是肿瘤的发生发展过程。CD44v6 是 CD44v 分子的一种拼接变异体 ,其表达可改变癌细胞表面粘附分子的构成和功能^[5] ,使肿瘤细胞侵袭与转移的能力增强^[6,7]。近年来许多研究资料显示 CD44v6 的过量表达与多种肿瘤的发生、发展关系密切^[8-11]。

本实验结果显示 ,CD44v6 在癌组织中高表达 ,而在癌旁组织及正常组织内不表达。提 CD44v6 在胃癌的发生、发展过程中发挥重要作用 ,可以作为良恶性诊断的参考指标。CD44v6 表达在癌巢边缘最强。浸润深度越深 ,CD44v6 表达越强。强表达的细胞浸润能力强。可能是 CD44v6 作为一种整合膜糖蛋白 ,作为基质中透明质酸受体 ,能连接细胞外基质中的纤维连接蛋白、层黏蛋白、型胶原和透明质酸分子以及与骨架蛋白相结合 ,且参与细胞的伪足形成^[12] ,增加游动性改变。细胞外基质 (ECM)是肿瘤在浸润转移中的第一道屏障 ,因此在恶性肿瘤浸润转移的黏附、降解、移动的三步中 ,瘤细胞借助于 CD44v6 先与 ECM 黏附 ,CD44v6 与基质蛋白酶协同^[13] ,降解基质成分 ,使基质溶解 ,组织间隙增大 ,有利于瘤细胞与原基质成分脱粘附形成转移。

在本实验中 ,CD44v6 与淋巴结转移和远处转移密切相关。CD44v6 作为淋巴细胞的归巢受体 ,可通过与远端血管及淋巴管内的配体结合 ,使转移的癌细胞更稳定地寄宿 ,集落式生长 ,逃避人体免疫系统的识别和杀伤 ,产生免疫逃逸 ,有效地形成转移瘤^[14]。

肿瘤浸润和转移需要新生血管的形成作为前提条件。新生血管是肿瘤转移和生长的物质基础。它的形成不仅为肿瘤生长提供营养 ,而且由于新生血管基底膜的缺损而提供癌细胞进入血管的途径 ,从而促进肿瘤细胞的扩散 ,与肿瘤生物学行为密切相关^[15-17]。肿瘤内 MVD 不仅反映了肿瘤微血管形成的强度和活性 ,而且反映多种实体肿瘤的恶性程度^[18]。本实验结果表明 ,肿瘤组织内 MVD 值明显大于正常组织。有淋巴结转移的原发灶 MVD 值明显高于无淋巴结转移的原发灶。MVD 与肿瘤的浸润深度和临床分期正相关。均与以上观点相一致。

本实验中 CD44v6、MVD 的表达与性别、年龄、病理类型、以及分化无关。与浸润深度、淋巴结转移、临床分期相关 ,而且两者之间正相关 ,即 CD44v6 表达增强的同时 ,MVD 值增大。同时我们也观察到肿瘤内微血管在肿瘤浸润的边缘最密集。与 CD44v6 分布规律有一致性。其机制可能是 CD44v6 在导向性调节肿瘤细胞向基质迁移的过程中 ,透明质酸降解产物能诱导肿瘤细胞或肿瘤间质释放特异性血管形成因子 ,如碱性成纤维生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)等。这些因子能特异性地促进血管内皮细胞分裂增殖 ,从而原位诱导血管生成^[19,20]。

本研究表明 CD44v6 与 MVD 在胃癌的发生发展中有重要作用 ,CD44v6 与 MVD 共同作用 ,增加了肿瘤细胞发生浸润和转移的机会。因此 ,临床上对胃癌术后患者进 CD44V6 和 MVD 联合检测 ,将有助于筛选容易转移和预后差的患者 ,可以对其进行系统的辅助治疗 ,提高胃癌患者的生存率。

参 考 文 献(References)

[1] 孙燕,赵平,吴孟超,等. 临床肿瘤学进展[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2005 :193
Yan sun,Ping zhao,Mengchao wu,et al .Advance In Clinical Oncology [M]. Peking Union Medical College Press,2005:193
[2] Strojnik T,Kos J,Zidanik B,et al. Cathepsin B immunohistochemistry staining in tumor and endothelial cells is a new prognostic factor for survival in patients with brain tumor [J]. Clin Cancer Res,1999,5(3): 559-567
[3] Weidner N,Joseph P,William R, et al.Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma [J]. N Eng J Med, 1991,324(1):1
[4] Ajani JA,Mansfield PF,Janjan N,et al. Multi-institutional trial of pre-operative chemoradiotherapy in patients with potentially resectable

- gastric carcinoma [J] Clin Oncol, 2004,22(14):2744-2780
- [5] Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, et al. Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration [J]. J Biol Chem, 2004, 279(6): 4541-4550
- [6] Montgomery E, Abraham SC, Fisher C, et al. CD44 loss in gastricstomal tumors as a prognostic marker[J]. Am J Surg Pathol, 2004,28 (2): 168-177
- [7] Chen JQ, Zhan WH, He YL, et al. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas [J]. World Gastroenterol, 2004, 10(6): 776-782
- [8] Yamaguchi A, Goi T, Yu J, et al. Expression of CD44v6 in advanced gastric cancer and its relationship to hematogenous metastasis and long-term prognosis[J]. J Surg Oncol, 2002, 79(4): 230-235
- [9] Diaz LK, Zhou X, Wright ET, et al. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(9): 3309-3314
- [10] Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, et al. Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration[J]. J Biol Chem, 2004, 279(6): 4541-4550
- [11] Chen JQ, Zhan WH, He YL, et al. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas[J]. World Gastroenterol, 2004, 10(6): 776-782
- [12] Matusan K, Dordevic K, Mozetic V, et al. Expression of osteopontin and CD44 molecule in papillary renal cell tumors [J]. Pathol Oncol Res, 2005, 11(2): 108-113
- [13] Murray D, Morrin M, McDonnell S. Increased invasion and expression of MMP-9 in human colorectal cell line by a CD44-dependent mechanism[J]. Anticancer Res 2004, 24(2A): 489-494
- [14] Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, et al. Relates expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exons 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes stage CorD [J]. World Gastroenterol, 2003, 9(7): 1482-1486
- [15] Matsuyama K, Chiba Y, Sasaki M, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic marker in operable non small cell lung cancer [J]. Ann Thor Surg, 1998, 65(5): 1405-1409
- [16] Zotota V, Gerokosta A, Melachrinou M, et al. Microvessel density, proliferating activity, p53 and bcl-2 expression in situ ductal carcinoma of the breast [J]. Anticancer Res, 1999, 19(4B): 3269
- [17] Blanchet MR, Maltby S, Haddon DJ, et al. CD34 facilitates the development of allergic asthma [J]. Blood, 2007, 110(6): 2005-2012
- [18] Curran S, Dundas SB, Buxton J, et al. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identities poor prognosis colorectal cancers[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8229-8234
- [19] Zagzag D. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia [M]. Am J Pathol, 1995, 146(2): 293-309
- [20] Zhang B, Cao H, Rao GN. Fibroblast growth factor-2 is a downstream mediator of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling in 14,15-e-poxyeicosatrienoic acid-induced angiogenesis[J]. J Biol Chem, 2006, 281(2): 905