

CD44V₃在恶性卵巢肿瘤中的表达及其临床意义*

Expression of CD44V₃ and Its Clinical Significance in Malignant Ovarian Tumor

姚德生 李力 赵仁峰* 张洁清 唐步坚 古明华 陈心秋

Yao Desheng Li Li Zhao Renfeng Zhang Jieqing Tang Bujian Gu Minghua Chen Xinqiu

(广西医科大学肿瘤医院 南宁市滨湖路6号 530021)

(Cancer Hospital, Guangxi Medical University, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 为探讨卵巢恶性肿瘤组织中 CD44V₃的表达及其临床意义,用免疫组织化学和 RT-PCR方法,检测 41例恶性卵巢肿瘤、20例良性卵巢肿瘤和 21例正常卵巢组织中 CD44V₃基因及基因蛋白的表达情况,并分析相关的临床病理因素。结果: CD44V₃表达阳性率恶性组显著高于良性组和正常组(均 $P < 0.05$);有转移者 CD44V₃阳性率显著高于无转移者($P < 0.01$),转移灶阳性率高于原发灶($P = 0.01$); CD44V₃阳性表达者近期疗效比阴性者差($P < 0.05$); CD44V₃阳性表达率与临床期别有一定关系,但与病理类型、组织学级别无关($P > 0.05$)。表明, CD44V₃与肿瘤的发生、发展、卵巢恶性肿瘤的浸润和转移、以及近期疗效有关,可以作为预测肿瘤转移潜能和评估预后的指标。

关键词 CD44 PCR 卵巢肿瘤 免疫组织化学 肿瘤转移
中图法分类号 R 737.31; R 73-37

Abstract To detect the expression of CD44V₃ and to investigate its clinical significance in malignant ovarian tumor, the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical stain (IHCS) were used to detect the mRNAs content and expression proteins of CD44V₃ in biopsy samples of 41 malignant ovarian tumors, 20 benign ovarian tumors and 21 normal controls. In the positive expression rates of CD44V₃ (PERCD), the malignancy was higher than the benign and control (all $P < 0.05$); the residual focus of > 2 cm was higher than the residual focus of ≤ 2 cm ($P < 0.01$); the metastatic focus was higher than primary focus ($P = 0.01$); the primary focus with metastasis were higher than that without metastasis ($P < 0.01$). The short term curative effects of the patient with positive expression of CD44V₃ were lower than that of the negative patients ($P < 0.05$). No significant correlation was observed between PERCD and pathological type, or histological grade in cancer tissue. It suggests that CD44V₃ correlate with the carcinogenesis and progress of tumor, the metastasis of malignant ovarian tumor and the curative effects; CD44V₃ may be used for predicting the metastasis of cancer and would be a new marker for evaluating the curative effects and prognosis.

Key words CD44, PCR, ovarian neoplasms, Immunohistochemistry, metastasis

CD44是一种细胞表面跨膜糖蛋白,有 2种类型,一是标准型的 CD44 (CD44S),二是变异型 CD44 (CD44V),变异型 CD44有 10个亚型,分别用 CD44V₁... CD44V₁₀表示,最近的研究表明 CD44V 参与了多种肿瘤的浸润和转移^[1-3]。为了解 CD44V₃表达与恶性卵巢肿瘤之间的关系,我们应用免疫组织化学 (IHCS) 和逆转录 PCR (RT-PCR) 方法,研究了 41例

卵巢恶性肿瘤中 CD44V₃表达情况,并探讨其临床意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

分为 2组: (1) 恶性卵巢肿瘤组 41例; 年龄 14岁 ~ 72岁, 平均 40岁, 其中上皮性肿瘤 33例 (粘液性癌 1例, 浆液性癌 1例, 子宫内膜样癌 2例, 低分化腺癌 10例); 非上皮性肿瘤 8例 (内胚窦瘤 3例, 无性细胞瘤 2例, 颗粒细胞瘤、未成熟畸胎瘤、睾丸母细胞瘤各 1例), 按 FIGO 1985年标准, 临床 I期 12例, II期 4例, III期 22例, IV期 3例; (2) 良性卵巢肿瘤 20

1998-07-11收稿, 1998-11-09修回

* 国家自然科学基金资助 (编号 39560081)

** 广西区人民医院, 南宁, 530012 (Guangxi Provincial Hospital, Nanning, Guangxi, 530012)

例, 其中粘液性瘤 6例, 浆液性瘤 8例, 畸胎瘤 6例; (3) 正常卵巢组织 21例, 均来自子宫肌瘤同时行卵巢切除, 病理证实无异常者。

1.2 标本的采集与贮存

全部组织标本均在手术切除肿瘤 10 min 内收集, 分别取肿瘤原发病灶、转移灶组织各 1 g, 分装于 1.5 mL Eppendorff 管后立即放入液氮中保存直到提取总 RNA, 同时取相应部位组织用 10% 福尔马林固定以作常规病理检查及免疫组化检测。

1.3 疗效判断及随访

按 WHO 1988 年的四级评定标准, 随访 6 个月至 20 个月, 没有失访及意外死亡。

1.4 免疫组化方法

采用 S-P 法, 鼠抗人 CD44V₃ 单抗, R&D 公司产品, 购自北京中山生物工程公司, S-P 试剂盒购自福州迈新生物工程公司, 抗原修复用微波抗原修复法。以 PBS 和兔血清代替一抗作阴性对照, 以 CD44V₃ 阳性的乳腺癌组织切片作为阳性对照。结果判断: 在显微镜下观察, 以细胞膜或细胞浆或细胞核中有棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞, 无棕黄色者为阴性细胞, 按文献 [4] 标准评定强度。

1.5 RT-PCR 法

组织总 RNA 的提取采用酸性异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法 [5]。cDNA 合成采用美国 Promega 公司提供的逆转录 cDNA 合成试剂盒, 按厂家操作规程合成, PCR 扩增引物按文献 [6-8] 设计, 由中科院上海生物工程研究中心合成, 序列为上游引物: 5'-GCA GGC TGG GAG CCA AAT GAA GAA AAT GAA-3'; 下游引物: 5'-ATC TTC ATC ATC ATC AAT GCC TGA TCC AGA-3'。TaqDNA 聚合酶、dNTPs 购自上海 Promega 公司, 分子量参照物 pGEM-7zf (+) HaeIII Markers 购自华美生物工程公司。每次反应均设计对照三个: ① 空白对照, 反应体系只加水; ② 阴性对照: 不加样品, 余相同; ③ 质控对照: 不加引物, 余相同。PCR 扩增用三步 PCR 法: 94°C 变性 60 s, 64°C 复性 60 s, 72°C 延伸 90 s, 30 循环。PCR 产物电泳用 4% PAG 电泳, 用银染方法染色。与 Makers 对照, 以出现与目的基因碱基数 (500 bp) 相同的区带为阳性。

1.6 数据处理

率的比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 恶性、良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织中 CD44V₃ 的表达

从表可以看出 CD44V₃ 基因蛋白阳性表达率

表 1 恶性、良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织中 CD44V₃ 阳性表达情况

Table 1 The positive expression of CD44V₃ in malignant, benign ovarian tumor, normal ovary with IHCS and RT-PCR

类别 Type	总例数 No. total cases	IHCS	RT-PCR
		No. cases	No. cases
恶性 Malignant	41	17(41.5) [▲]	19(46.3) [▲]
良性 Benign	20	1(5.0) [*]	4(20.0) [*]
正常 Normal	21	0(0.0) [*]	1(4.8) [*]

括号内数字为占总例数的百分率 The values in brackets are percentages accounting for No. of total cases; * 与恶性组比较 $P < 0.05$, [▲] 与正常组比较 $P > 0.05$ * Compared with the malignancy, $P < 0.05$; [▲] Compared with the normal, $P > 0.05$.

恶性组高于良性组 ($P = 0.003$) 和正常组 ($P = 0.0005$), 良性组与正常组无显著性差异 ($P = 0.3$), RT-PCR 结果显示 CD44V₃ 基因表达阳性率恶性组显著高于良性组 ($P = 0.04$) 和正常组 ($P = 0.0009$), 良性组与正常组间无显著性差异 ($P = 0.18$).

2.2 CD44V₃ 阳性表达与临床、病理特征、预后关系

免疫组化和 RT-PCR 结果均显示, CD44V₃ 阳性表达率在有转移或浸润者 (II ~ IV 期) 高于无浸润转移者 (I 期) ($P < 0.05$), 残留病灶 > 2 cm 者阳性表达率显著高于 ≤ 2 cm 者 ($P < 0.01$), 转移灶阳性表达率显著高于原发灶 ($P = 0.01$), 而 CD44V₃ 与病理类型及组织学级别无关 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 CD44V₃ 阳性表达与临床、病理特征关系

Table 2 The relationship between the positive expression of CD44V₃ and clinical stage or pathological characters with IHCS or RT-PCR

类别 Type	总例数 No. total cases	IHCS ⁺		RT-PCR ⁺	
		No. cases	P	No. cases	P
临床期别					
FIGO stage					
I	12	2(16.7)		2(16.7)	
II ~ IV	29	15(51.7)	0.038	17(58.6)	0.014
病理类型					
Pathological types					
上皮性 Epithelial cancer	33	17(51.5)	0.87	14(42.4)	0.21
非上皮性 Non-Epithelial tumor	8	5(5/8)		6(6/8)	
组织学级别					
Histological grade					
1	4	2(2/4)		2(2/4)	
2	27	11(40.7)		12(44.4)	
3	10	4(40.0)		5(50.0)	
残留病灶					
Residual focus(cm)					
≤ 2	26	7(26.9)	0.01	8(30.8)	0.008
> 2	15	10(66.7)		11(73.3)	
病灶 focus					
原发灶 Primary focus	41	17(41.5)	0.01	19(46.3)	0.01
转移灶 Metastasis	23	17(73.9)		20(87.0)	

括号内数字为占总例数的百分率 The values in brackets are percentages accounting for No. of total cases.

免疫组化显示 CD44V₃阴性表达者治疗近期有效率 (CR+ PR) 显著高于阳性者 ($P = 0.01$), RT-PCR 结果也显示阴性者疗效好于阳性者 ($P = 0.04$), 见表 3

表 3 CD44V₃阳性表达与近期疗效关系

Table 3 The relationship between the positive expression of CD44V₃ and the curative effects in malignant ovarian tumor with IHCS or RT-PCR

类别 Type	总例数 No. cases total	近期疗效 (CR+ PR) Curative effects)	
		No. cases	P
IHCS (+)	17	9 (52.9)	0.01
	(-)	24	
RT-PCR (+)	19	11 (57.9)	0.04
	(-)	22	

括号内数字为占总例数的百分率 The values in brackets are percentages accounting for No. of total cases.

3 讨论

CD44基因蛋白是一种分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白, 属于粘附分子, 主要参与细胞-细胞、细胞-基质之间的特异性粘连过程。近年来的研究表明, 在许多类型的肿瘤中 CD44参与了肿瘤的浸润和转移^[1-3]。

免疫组化和 RT-PCR结果均显示 CD44V₃在恶性卵巢肿瘤中表达阳性率显著高于良性组和正常组 ($P < 0.05$), 良性组与正常组间无显著差异 ($P > 0.05$), 提示 CD44V₃基因表达与卵巢癌的恶性行为有关, 这与 Dall Kallakury等对其他肿瘤的研究结果相似^[8,9]。RT-PCR阳性率比免疫组化阳性率高, 是与 RT-PCR敏感性比免疫组化高有关。

无论是免疫组化或 RT-PCR结果均显示, CD44V₃在有浸润转移组(II~IV期)表达阳性率均比无浸润转移组(I期)高 ($P < 0.05$), 转移灶的阳性率显著高于原发病灶 ($P = 0.01$), 表明肿瘤细胞中的 CD44V₃的出现与肿瘤的浸润转移有关, 即阳性表达者更易发生浸润和转移, 更能加速病程的发展。这与文献报道的其他系统肿瘤情况相符^[8,9]。其机理目前普遍认为是变异型 CD44作为一种透明质酸的受体, 能与细胞外间质及基底膜的透明质酸结合, 调节细胞的运动及形态, 同时“锚”定在宿主细胞外间质及基底膜上, CD44阳性细胞更易与后毛细小静脉中的高柱状内皮细胞结合, 使肿瘤更易进入淋巴系统和循环系统, 同时透明质酸降解产物还能启动血管的发

生, 为侵袭转移奠定基础, 这些因素均能使 CD44V₃阳性肿瘤细胞获得更强的浸润和转移能力^[8-10]。

CD44V₃表达在不同的病理类型和组织学级别之间均无显著性差异。

无论是免疫组化或 RT-PCR法, CD44V₃在残留病灶 $> 2\text{ cm}$ 肿瘤中表达阳性率明显高于 $\leq 2\text{ cm}$ 者 ($P < 0.01$), 其机理可能是 CD44V₃阳性者更易发生浸润转移, 转移灶多、生长快、易融合, 处在的临床期别晚, 以至手术难以完全切除。免疫组化和 RT-PCR结果均显示 CD44V₃阴性者治疗有效率 (CR+ PR) 比阳性者高 ($P < 0.05$), 因而可以作为评估疗效和预后的指标。

参考文献

- 1 Wielenga V JM, Heider K H, Off erhaus G J A et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer related to tumor progression. *Cancer Res*, 1993, 53: 4754.
- 2 Mayer B, Jauch K W, Gunthert U et al. Denovo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet*, 1993, 342: 1019.
- 3 Joensuu H, Klenip J, Toikkanens et al. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Amer J Pathol*, 1993, 143: 867.
- 4 Ristamki R, Anssuu H, Ovesoderstrom K et al. CD44V₆ expression in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathology*, 1995, 176: 259.
- 5 Chomczynski P, Sacchif N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156.
- 6 Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM et al. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the castilage link. *Cell*, 1989, 56: 1057.
- 7 Homfmann M, Rudy W, Zoller M et al. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell line. *Cancer Res*, 1991, 51: 5292.
- 8 Dall P, Heider K H, Simm H P et al. Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44 expression: a new prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer*, 1995, 60: 471.
- 9 Kallakury B V, Yang F, Figge Jet al. Decreased levels of CD44 protein and mRNA in prostate carcinoma, Correlation with tumor grade and ploidy. *Cancer*, 1996, 78: 1461.
- 10 Haynes B F, Telen M J, Hale L P. CD44-A molecule involved in Leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today*, 1989, 10: 423.

(责任编辑: 蒋汉明)