

结直肠癌中 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 表达与临床病理的相关性研究

曹 歌, 沈志祥, 黄杰安, 罗和生

摘要:目的 探讨结直肠癌中 CD44v6、MMP-2 和 nm23-H1 的表达与临床病理特征的关系。方法 采用免疫组化 SABC 法结合计算机图像分析技术检测 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 蛋白在 24 例结直肠癌患者癌及癌旁组织中的表达。结果 24 例结直肠癌组织中 CD44v6、MMP-2 的阳性单位(PU 值)高于癌旁和正常组织($P < 0.05$), 而 nm23-H1 的 PU 值则低于癌旁和正常组织($P < 0.05$)。它们的异常表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小及部位无相关性, 而与浸润深度、淋巴结转移、远处转移、Duke's 分期密切相关($P < 0.05$)。结论 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 与结直肠癌的病理特征密切相关。它们的异常表达在肿瘤的侵袭转移中可能具有正、负协同作用, 联合检测 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 蛋白可作为预测结直肠癌侵袭转移及客观评价患者预后的生物学指标。

关键词:结直肠癌; CD44v6; MMP-2; nm23-H1; 肿瘤侵袭转移; 免疫组织化学

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2002)01-0053-04

Correlation between expression of CD44v6, MMP-2 and nm23-H1 in colorectal carcinoma and its clinicalopathological characters

CAO Ge, SHEN Zhi-xiang, HUANG Jie-an, et al

Department of Digestion, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: Objective To study the expression of CD44v6, MMP-2 and nm23-H1 protein in colorectal carcinoma and its relation with clinicalopathological characters, and to investigate the correlation of CD44v6, MMP-2 and nm23-H1 expression in colorectal carcinoma. **Methods** Immunohistochemical method in combination with computer -imaging analysis technique was used to detect the expression level of CD44v6, MMP-2 and nm23-H1 in cancerous, paracancerous and normal tissues from 24 patients with colorectal carcinoma. Some clinical pathological indexes were also analyzed. **Results** The CD44v6 and MMP-2 positive unit (PU) were higher in cancer than in paracancerous or normal tissues, while nm23-H1 positive unit (PU) was lower in cancer than in paracancerous or normal tissues ($P < 0.05$). The higher expression of CD44v6 and MMP-2, the lower expression of nm23-H1 were related to pathological grade, depth of infiltration, lymph node metastasis, distant metastasis and Duke's stage. **Conclusion** The invasion and metastasis of colorectal carcinoma were closely associated with the synergistic action of several genes. The expression of CD44v6, MMP-2, nm23-H1 were correlated with invasion and metastasis of colorectal carcinoma, so CD44v6, MMP-2, nm23-H1 may be used as hopeful marker for predicting the metastatic potential of colorectal carcinoma and the prognosis of these patients.

Key words: Colorectal neoplasms ; CD44v6 ; MMP-2 ; nm23-H1 ; Neoplasm invation and metastasis ; Immunohistochemistry

结直肠癌侵袭转移的发生是导致患者死亡的主要原因。恶性肿瘤侵袭转移是包括粘附、降解和移

动的序贯连续的过程, 与粘附分子、降解酶类、癌细胞运动及其受体等因素密切相关。粘附分子 CD44 是淋巴细胞的一种归巢受体, 其变异体 CD44v6 可使癌细胞获得侵袭的能力。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一类 Zn^{2+} 依赖的

收稿日期: 2001-04-03; 修回日期: 2001-05-23

作者单位: 430060 武汉大学人民医院消化内科

细胞外蛋白水解酶,能降解胞外基质促进恶性细胞的侵袭转移。抑癌基因 nm23-H1 编码核苷二磷酸激酶(NDPK),其异常表达被认为与肿瘤的转移密切相关。我们应用免疫组织化学(SABC)法结合免疫组化定量研究(图像分析法)检测了 24 例结直肠癌患者癌、癌旁和正常组织中 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 蛋白表达,结合临床病理参数分析,探讨它们的表达与结直肠癌侵袭转移的关系及它们之间的正、负协同作用。

1 材料和方法

1.1 材料 病例来源于武汉大学人民医院普外科和湖北省肿瘤医院 1999~10 至 2000~6 结直肠癌手术切除标本共 24 例,每例取癌组织,距癌 5cm(癌旁)组织,距癌 10cm(正常)组织各一块,固定,脱水,包埋和制备 4 μ m 厚连续切片,分别行 HE 染色作病理学诊断和免疫组织化学研究,临床病理参数见表 2。

1.2 试剂 抗 MMP-2Ab 购自北京中山试剂公司,抗 CD44v6、nm23-H1 试剂盒购自武汉博士德试剂公司。

1.3 方法 切片二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后微波法抗原修复。按试剂盒说明常规 SABC 法进行免疫组化染色,DAB 显色,苏木素复染,常规脱水,透

明,封片,观察结果。同时用 PBS 代替一抗作为阴性对照,以试剂盒内附阳性片作为阳性对照。

1.4 免疫组织化学定量研究(图像分析法) 通过显微摄影系统放大 400 倍摄取图像,输入 HIPAS-2000 型计算机图像分析系统(同济千屏影像工程公司产品)。图像进行灰度变换,使染色阳性面积与背景分开,进行自动测量。以测量窗口为固定面积,对阳性染色及背景的灰度级和面积进行测试,参照申氏方法^[1]计算代表阳性染色相对含量的阳性单位(positive unit, PU)。每张切片随机选 5 个视野,求 PU 均值。

1.5 统计学处理 数据行 SPSS 9.0 软件的 t 检验,方差分析,多因素相关分析。P<0.05 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 结直肠癌、癌旁和正常组织 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 基因蛋白表达

阳性染色呈棕黄色颗粒或团块状,CD44v6 主要位于癌细胞胞膜,少数见于胞浆,部分淋巴细胞及肿瘤血管也有阳性染色。MMP-2 在癌细胞胞浆、胞膜和间质均有表达。nm23-H1 主要在胞浆表达,少数胞膜表达,见表 1。

表 1

24 例 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 蛋白在结直肠癌、癌旁组织中的表达

项目	癌组织	癌旁组织	正常组织	F 值
CD44V6 PU($\bar{x} \pm s$)	38.21 ± 17.93*	26.23 ± 11.28	18.04 ± 7.47	14.670
MMP-2 PU($\bar{x} \pm s$)	36.79 ± 6.57**	30.97 ± 3.45	28.66 ± 3.61	18.569
Nm23-H1 PU($\bar{x} \pm s$)	38.01 ± 6.06***	43.68 ± 6.41	46.95 ± 6.96	11.688

癌组织 CD44v6 和 MMP-2 的 PU 值明显高于癌旁和正常组织, nm23-H1 的 PU 值却明显低于癌旁和正常组织,存在显著性差异(P<0.01)。

2.2 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 蛋白表达与结直肠癌临床病理参数的关系

低分化、有淋巴结转移或远处转移、Duke's C/D 期癌组织中 CD44v6 和 MMP-2 的 PU 值显著高于高中分化、无转移、Duke's A/B 期者(P<0.05),而 nm23-H1 的 PU 值显著低于高中分化、无转移、Duke's A、B 期者,差异存在显著性(P<0.05)。此外浆膜层有浸润的肿瘤中 CD44v6 和 MMP-2 PU 值明显高于浸润仅限于肌层者(P<0.05)。见表 2。

2.3 MMP-2、CD44v6、nm23-H1 之间的相互关系,见表 3。

3 讨论

粘附分子 CD44 为高度异质性的单链跨膜糖蛋白,参与细胞之间、细胞与基质间的粘连,有标准型(CD44s)和变异型(CD44v)两型。Günthert^[2]与 Rudy^[3]发现 CD44v4-7 和 CD44v6-7 是大鼠转移性胰腺癌细胞(BSP73ASML)株中表达最强的两种 CD44v,Seiter^[4]用抗 CD44v 抗体预先处理细胞则可防止发生转移。关于 CD44v6 与结直肠癌侵袭转移,预后关系的研究,许多学者结论不一。Mulder^[5]认为肿瘤进展期 CD44v6 过度表达,可作为独立估计结直肠癌侵袭转移,预后的标记物,指导 Duke's B/C 期结直肠癌治疗方案的制定。Wielenga^[6]也认为 CD44v6 表达对结直肠癌预后的预测有显著意义。但 Coppola^[7]认为 CD44v6 不能作为结直肠癌的预后指标。Weg-Remers^[8]的研究甚至提示 CD44v6 在转移性肠癌和转移灶中表达降低。本研究结果显

示:癌组织中 CD44v6 表达显著升高,明显高于癌旁和正常组织,存在显著性差异($P<0.01$);其阳性表达与肿瘤侵袭深度、分化程度、淋巴结转移、远处转

移、Duke's 分期密切相关,支持 CD44v6 是癌转移相关因子的观点。

表 2 24 例结直肠癌 CD44v6、MMP-2、nm23-H1 表达与临床病理参数的关系

临床及病理参数	例数	CD44V6 PU(±s)	MMP-2 PU(±s)	NM23-H1 (±s)
性别				
男	13	43.94±17.72	37.58±6.81	36.12±5.99
女	11	31.42±16.41	34.85±5.25	40.23±5.60
年龄(岁)				
<55	7	37.15±20.17	36.18±6.76	38.24±5.79
≥55	17	39.45±15.75	36.51±5.73	37.73±6.46
肿瘤部位				
直肠	14	34.98±18.31	34.55±4.98	39.64±6.23
结肠	10	42.72±17.28	38.82±7.05	35.73±6.64
长径(cm)				
≤3	7	36.58±16.98	35.8±77.62	38.50±6.52
>3	17	38.88±18.78	36.52±5.74	37.80±6.06
组织学类型				
高中分化管状腺癌	12	33.87±14.96	35.85±5.81	38.89±5.59
低分化管状腺癌	5	52.76±21.03**	42.19±6.71**	32.16±1.05**
其它类型	7	35.25±17.41	32.97±3.48	40.68±6.65
浸润范围				
肌层	9	22.77±5.32	33.03±3.49	41.49±4.47
浆膜层	15	47.47±16.34**	38.31±6.67**	35.91±6.03
淋巴结转移				
无	13	24.45±6.71	32.68±3.32	41.86±5.21
有	11	54.46±12.22**	40.64±6.05**	33.46±3.13**
其它部位转移				
无	17	31.37±14.52	34.77±5.12	40.75±5.01
有	7	58.71±9.49**	41.02±7.14**	31.35±0.92**
Dukes 分期				
A	8	22.16±5.35	32.70±2.84	41.67±4.75
B	4	25.11±3.99	32.65±2.49	44.83±2.90
C	6	44.18±10.90	38.20±2.45**	36.01±2.86**
D	6	59.56±9.10**	41.97±6.98**	31.35±0.92**

表 3 多因素相关分析(Pearson 分析)

侵袭转移	CD44v6 与 MMP-2	CD44v6 与 nm23-H1	MMP-2 与 nm23-H1
肌层	0.62	-0.68	-0.67*
浆膜层	0.508	-0.877**	-0.532*
无淋巴结转移	0.38	-0.362	-0.672*
有淋巴结转移	0.322	-0.901**	-0.344
总的趋勢	0.674**	-0.800**	-0.686**

相关系数的显著性检验 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

ECM 是癌细胞在侵袭转移中的第一道屏障。MMP 能降解 ECM 中的主要成分—IV 型胶原酶纤维,被认为是侵袭转移过程中的主要蛋白溶解酶。Parsons^[9]认为结直肠癌和胃癌中 MMP-2 和 MMP-

9 较相应正常组织中的含量和活性均明显增加,且与肿瘤侵袭转移相关。Zeng ZS^[10]认为随着 MMP-2 和 MMP-9 蛋白活性形式表达增加,基膜中 IV 型胶原降解,是结直肠癌进展的重要原因之一,对 MMP 的抑制有利于控制结直肠癌的进展。本研究中,癌组织 MMP-2 的表达比癌旁和正常组织显著增加($P<0.01$),有转移者更明显。MMP-2 异常表达与侵袭深度、分化类型、淋巴结转移,远处转移密切相关。支持 Parsons 与 Zeng 等的观点,MMP-2 在癌组织中的高表达可提示结直肠癌可能已发生侵袭转移。

核苷二磷酸激酶(NDPK/nm23)即 NME 基因家族被认为参与了同恶性肿瘤转移相关的多种调节活动。人类转移抑制基因 nm23-H1 定位于 17q21.

3-22,包含5个外显子和4个内含子,编码核苷二激酶(NDPK)的A亚基,其基因改变可发生在DNA,mRNA及蛋白3个不同层次。nm23-H1基因抑制肿瘤转移的机制可能是:它编码的nm23蛋白即NDPK是仅有的一类与三磷酸核苷(ATP除外)生物合成以及微管聚合、G蛋白介导的信号传递有关的酶。NDPK异常改变一方面可引起微管聚合而成的纺锤体异常,导致非整倍体形成;另一方面可通过细胞骨架及细胞素等信号反应性的改变引起细胞运动从而参与侵袭和转移过程^[11]。Yamaguchi^[12]认为nm23-H1在分期早无转移的结直肠癌中表达强,在有转移的晚期结直肠癌中的表达弱。国内余保平等研究发现检测nm23-H1蛋白表达对预测结直肠癌的肝转移、淋巴结转移都具有一定意义,是独立的预后参数^[13]。本研究结果显示:正常和癌旁组织中nm23-H1的PU值比癌组织中的要高($P<0.05$),nm23-H1低表达与淋巴结转移显著相关($P<0.05$)。此结果与多数学者提出的nm23-H1的高表达与肿瘤转移及预后不良呈负相关一致,对判断结直肠癌有无淋巴结或远处转移都具有一定实用价值。

恶性肿瘤的侵袭转移是一个复杂的连续过程,不少学者提出了多基因协同假说,认为在肿瘤发生发展和转移的各个阶段,至少有两个或两个以上功能不同的异常激活的癌基因各自发挥着不同作用,并在时间和空间上相互配合,协同促进了细胞的癌变和转移。我们用免疫组织化学定量研究(图像分析法),采用计算机图像分析系统对阳性染色进行半定量测试,发现总的的趋势为CD44v6与MMP-2呈正相关(Pearson相关系数0.674),CD44v6和MMP-2的与nm23-H1的呈负相关(Pearson相关系数为-0.800和-0.686)。肿瘤限于肌层时MMP-2与nm23-H1的相关系数值为-0.67;侵袭至浆膜层时为-0.532,而此时CD44v6与nm23-H1的相关系数则为-0.877。无淋巴结转移时MMP-2与nm23-H1的相关系数值为-0.672;有淋巴结转移组,MMP-2与nm23-H1之间无显著性相关,但CD44v6与nm23-H1的相关系数则达到了-0.901。提示在促进结直肠癌的侵袭转移过程中,早期可能主要为MMP-2与nm23-H1负协同,而晚期可能主要为CD44v6与nm23-H1负协同作用;CD44v6与MMP-2之间可能具有正协同作用,但其机制有待进一步探讨。本研究结果初步提示,若联合检测手术后结直肠癌组织

中CD44v6、MMP-2与nm23-H1蛋白的表达,对结直肠癌的淋巴结、远处转移的预测并客观评价患者的预后具有重要的意义。(本文图略)

参考文献:

- [1] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,1995,4(1):89-91.
- [2] Günthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells[J]. Cell, 1991, 65(1):13-24.
- [3] Rudy W, Hofmann M, Schwartz-Albiez R, et al. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants; each one individually suffices to confer metastatic behavior[J]. Cancer Res , 1993, 53(6):1262-1268.
- [4] Seiter S, Arch R, Reber S, et al. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44v[J]. J Exp Med , 1993, 177(2):443-455.
- [5] Mulder JWR, Kruijt PM, Sewnauth M, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 protein [J]. Lancet , 1994, 344:1470-1472.
- [6] Wielenga VAJ, van Der Voort R, Mulder JWR, et al. CD44 splice variants as prognostic markers in colorectal[J]. J Gastroenterol, 1998, 33:82-87.
- [7] Coppola D, Hyacinthe M, Fu L, Cantor AB, Karl R, Marcet J, Copper DL, Nicosia SV, Cooper HS. CD44v6 expression in human colorectal carcinoma [J]. Hum Pathol, 1998, 29: 635-637.
- [8] Weg Remers S, Anders M, von Lampe B, et al. Decreased expression of CD44 splicing variants in advanced colorectal carcinomas[J]. Eur J Cancer , 1998, 34(10):1607-1611.
- [9] Parsons SL, Watson SA, Collins HM, et al. Gelatinase (MMP-2 and MMP-9) expression in gastrointestinal malignancy[J]. Br J Cancer, 1998, 78(11):1495-1502.
- [10] Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis[J]. Carcinogenesis 1999, 20(5): 749-755.
- [11] 薛开先. 肿瘤转移基因与转移抑制基因的研究进展[J]. 国外医学遗传学分册. 1993,16(1):1-5.
- [12] Yamaguchi A, Urano T, Fushida S, et al. Inverse association of nm23-H1 expression by colorectal cancer with liver metastasis[J]. BR J Cancer, 1998, 68(5):1020-1024.
- [13] 余保平,王伟岸,于皆平,等. nm23-H1表达预测大肠癌转移的价值研究[J]. 肿瘤防治研究,2000,27(2):103-104.

(安凤校对)