

直肠癌组织CD44v6, DNA含量的联合检测及临床意义

丁志杰, 单吉贤, 都姝妍

丁志杰, 单吉贤, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001
都姝妍, 中国医科大学附属第一医院中心实验室 辽宁省沈阳市 110001
丁志杰, 男, 1966-06-03生, 辽宁省辽中县人, 汉族. 1990年中国医科大学
本科毕业, 医学博士, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤的临床研究.
项目负责人: 丁志杰, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国
医科大学附属第一医院肿瘤科. zhijieding@sina.com
电话: 024-23256666-6227
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-25

Simultaneous detection of CD44v6 expression and DNA content in rectal cancer and its clinical significance

Zhi-Jie Ding, Ji-Xian Shan, Shu-Yan Du

Zhi-Jie Ding, Ji-Xian Shan, Department of Oncology, First Hospital of
China Medical University, Shenyang, 110001, Liaoning Province, China
Shu-Yan Du, Department of center laboratory, First Hospital of China
Medical University, Shenyang, 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Zhi-Jie Ding, Department of Oncology, First Hos-
pital of China Medical University, Shenyang, 110001, Liaoning Province,
China. zhijieding@sina.com
Received: 2002-11-29 Accepted: 2002-12-25

Abstract

AIM: To explore CD44v6 expression and DNA content and the ir significance in the progress of rectal cancer.

METHODS: In 40 cases of rectal cancer and 10 cases of normal intestinal tissues, CD44v6 expression and DNA content were detected simultaneously by flow cytometry.

RESULTS: The CD44v6 expression and DNA content in rectal cancer were significantly higher than those in normal tissue (70 % vs 0 %, 1.11 ± 0.6 vs 0.9 ± 0.65 , $P < 0.01$). The positive expression of CD44v6 was closely related to the depth of invasion (0 % vs 50 % vs 80 % vs 100 %, $P < 0.05$) lymphnode metastasis (93.3 % vs 56.0 %, $P < 0.05$) and Dukes stage (56.0 % vs 93.3 %, $P < 0.05$). The DNA aneuploidy in cancer was also related to lymph node metastasis (100 % vs 68 %, $P < 0.05$) and Duke's stage (68 % vs 100 %, $P < 0.05$). The expression of CD44v6 did not show any correlation with DNA ploidy of tumor cells (85.7 % vs 68.7 %, $P > 0.05$).

CONCLUSION: The abnormal expression of CD44v6 and DNA aneuploidy plays an important role in the development, invasion and metastasis of rectal cancer. The detection of CD44v6 and DNA content simultaneously may serve as a useful indicator to predict progress of tumor and lymph node metastasis.

Ding ZJ, Shan JX, Du SY. Simultaneous detection of CD44v6 expression and DNA content in rectal cancer and its clinical significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1382-1384

摘要

目的: 探讨直肠癌CD44v6表达情况和DNA含量及其临床意义.

方法: 应用流式细胞术同时检测40例直肠癌及10例正常组织中CD44v6表达量和DNA含量.

结果: 直肠癌中CD44v6表达量和DNA含量均显著高于正常组织(70 % vs 0 %, 1.11 ± 0.6 vs 0.9 ± 0.65 , $P < 0.01$), 肿瘤组织中CD44v6阳性表达与直肠癌浸润深度(0 % vs 50 % vs 80 % vs 100 %)、淋巴结转移(93.3 % vs 56.0 %)及Dukes分期(56.0 % vs 93.3 %)有关($P < 0.05$); DNA异倍体与淋巴结转移(100 % vs 68 %)及Dukes分期(68 % vs 100 %)有关($P < 0.05$). CD44v6表达与肿瘤细胞DNA倍体无关(85.7 % vs 68.7 %, $P > 0.05$).

结论: CD44v6表达异常及DNA倍体异常在直肠癌进展和浸润转移中起作用, 联合检测CD44v6和DNA倍体可作为预测直肠癌进展程度、淋巴结转移有用的指标.

丁志杰, 单吉贤, 都姝妍. 直肠癌组织CD44v6, DNA含量的联合检测及临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1382-1384

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1382.asp>

0 引言

CD44为细胞黏附分子, 存在于多种恶性肿瘤中, 其多种变异拼接体特别是CD44v6的表达与肿瘤转移复发有密切关系. DNA含量异常是恶性肿瘤的特征性改变之一, 能反映肿瘤的生物特性, 我们采用流式细胞术联合检测40例直肠癌中CD44v6的表达及DNA含量, 探讨二者在直肠癌发生发展及转移中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 直肠癌手术标本40例, 男13例, 女27例, 平均年龄61岁. 所有病例均经组织病理学证实. 另取10例癌远端正常肠组织作为对照组.

1.2 方法 取新鲜标本, 用眼科剪刀剪碎, 细胞悬液经400目尼龙网过滤, PBS冲洗离心, 去上清后调整细胞数为 $1 \times 10^9/L$, 加入FITC标记的小鼠抗人CD44v6单克隆抗体VFF-18 (Benoler Medsystem, 1:20), 另一管加入阴性对照FITC标记的小鼠IgG1(Becton Dickinson, 1:20), 4 °C, 避光30 min, 0.01 mol/L PBS冲洗离心后加10 g/L多聚甲醛固定5 min, 离心后加入PI染色液(PI 5 mg, RNase 2 mg, Triton X-100 1 mL, 枸

柠檬酸钠 100 mg, 0.01mol/L PBS 65 mL, 加蒸馏水至 100 mL; pH7.2-7.6)1 mL, 4 °C, 避光 30 min 后上机检测. 流式细胞仪为 FACscan (Becton Dickinson), 200 mW 氩激光(488 nm), 同时检测 PI 红色荧光(DNA)和 FITC 绿色荧光(CD44v6)信号, 采集 10 000 个细胞, 所测数据用 Cellquest 软件处理. 以 DNA 指数(DNA index, DI)判断 DNA 含量, 用正常人体周围血淋巴细胞 DNA 含量作为参考标准, 公式为: $DI = (\text{样品 } G_0/G_1 \text{ 期 DNA 量平均值}) / (\text{标准二倍体 DNA 量平均值})$. $DI = 1.0 \pm 0.1$ 为二倍体肿瘤, $DI \neq 1.0 \pm 0.1$ 为异倍体肿瘤. 以荧光指数 (fluorescence index, FI) 表示 CD44v6 的相对含量, 公式为: $FI = (\text{癌组织 CD44v6 平均荧光强度} - \text{对照组平均荧光强度}) / \text{正常组织中 CD44v6 平均荧光强度}$, 如 $FI > 2.0$ 为 CD44v6 阳性, $FI < 2.0$ 为阴性.

统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件对计量资料进行 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验.

2 结果

癌组织中 CD44v6 的表达量及 DNA 含量均显著高于正常组织(表 1 和图 1-4), 40 例直肠癌中, CD44v6 阳性率为 70% (28/40), 异倍体检出率为 80% (32/40). CD44v6 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 Dukes 分期有关($P < 0.05$), 和大体类型、生长方式及病理类型无关. DNA 异倍体也与淋巴结转移及 Dukes 分期有关($P < 0.05$), (表 2). 在 CD44v6 阳性的 28 例标本中, 异倍体 24 例(85.7%), CD44v6 阴性的 12 例中, 异倍体 8 例(68.7%), 二者经统计学处理, 无显著性差异($\chi^2 = 0.9, P > 0.05$).

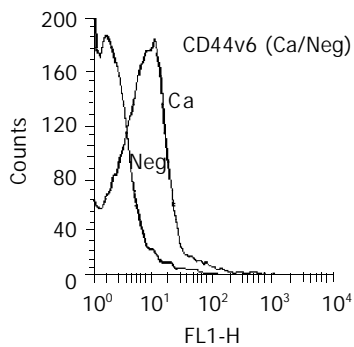


图 1 示同一癌组织内实验管(Ca) CD44v6 表达量明显高于对照管(Neg).

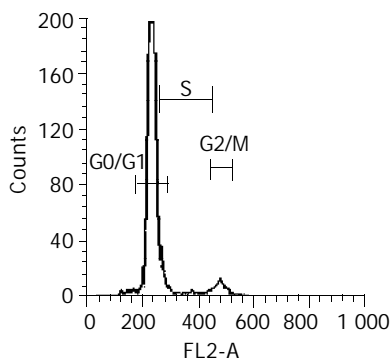


图 2 示正常癌旁组织 DNA 直方图 未见异倍体峰.

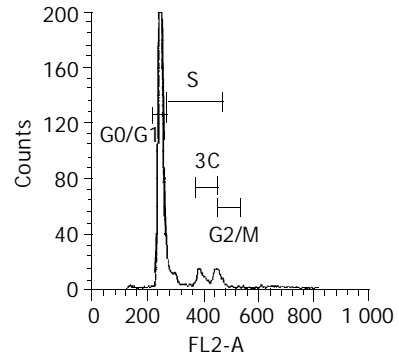


图 3 示癌组织 DNA 直方图出现三倍体峰(3C).

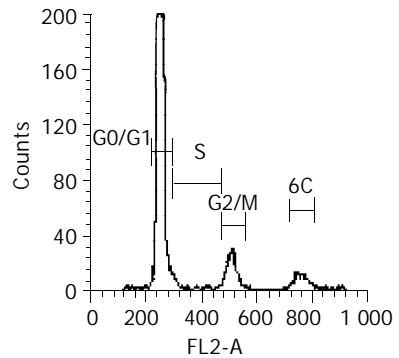


图 4 示癌组织 DNA 直方图出现六倍体峰(6C).

表 1 直肠组织中 CD44v6 和 DNA ($\bar{x} \pm s$)

组织	n	FI	CD44v6 阳性率 / %	DI	异倍体率 / %
癌	40	2.68 ± 1.48 ^b	70 ^b	1.11 ± 0.60 ^a	80 ^b
正常	10	0.55 ± 0.16	0	0.90 ± 0.65	0

^aP < 0.05, vs 正常; ^bP < 0.01, vs 正常.

表 2 CD44v6、DNA 倍体与临床病理因素关系

病理因素	n	CD44v6 阳性率 / %	DNA 异倍体率 / %
大体类型	隆起型	11 (72.7)	10 (90.91)
	溃疡型	29 (69.0)	22 (75.9)
生长方式	团块状	29 (69.0)	22 (75.9)
	巢状	11 (72.7)	10 (90.9)
病理类型	高分化腺癌	19 (63.2)	15 (79.0)
	中分化腺癌	7 (85.7)	5 (71.4)
	低分化腺癌	2 (50.0)	2 (100.0)
	乳头状腺癌	9 (77.8)	7 (77.8)
黏液腺癌	3 (66.7)	3 (100.0)	
浸润深度	黏膜层	0	0
	肌层	12 (50.0)	9 (75.0)
	浆膜下	25 (80.0)	21 (84.0)
浆膜外	2 (100.0) ^a	2 (100.0)	
淋巴结转移	有	15 (93.3)	15 (100.0)
	无	25 (56.0) ^a	17 (68.0) ^a
Dukes 分期	A/B	25 (56.0)	17 (68.0)
	C/D	15 (93.3) ^a	15 (100.0) ^a

^aP < 0.05 vs 组内比较.

3 讨论

肿瘤侵袭和转移是恶性肿瘤最重要的生物学特性, 肿瘤侵袭转移涉及多个环节, 其中肿瘤细胞表面的黏附分子起着重要作用. CD44v6 作为黏附分子 CD44 的变构体, 通过迁移, 外渗, 增生等形式赋予肿瘤细胞转移潜能^[1]. 研究表明 CD44v6 可能影响大肠癌细胞骨架肌动蛋白的分布, 聚合, 解聚的过程来增强癌细胞运动能力, 促使其容易发生转移^[2]. 认为 CD44v6 表达是大肠癌细胞形成的特征性变化, 与癌细胞穿透肠壁有关^[3]. 目前关于 CD44v6 在大肠癌发生发展过程中作用尚存在分歧. 部分学者认为 CD44v6 绝大部分表达于腺瘤、腺癌中, 与大肠癌发生有关, 与反映肿瘤进展的临床病理因素及预后无关^[3-7]. 另外一些研究则表明 CD44v6 不仅与肿瘤分化程度、Dukes 分期、淋巴结转移有关^[8, 9], 而且与肝转移、术后复发及生存率有关^[10-13], 认为 CD44v6 是大肠癌转移相关因子. 我们采用流式细胞术可定量检测肿瘤中 CD44v6 表达情况, 结果表明癌组织 CD44v6 表达程度显著高于正常组织, CD44v6 表达阳性率为 70% (28/40), 而正常组织中未见 CD44v6 表达. 40 例肿瘤组织中 CD44v6 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 Dukes 分期有关 ($P < 0.05$), 与大体类型、生长方式及病理类型无关, 此结果与国内外报道基本一致^[8, 9, 14, 15], 提示 CD44v6 与直肠癌发生发展及转移有关. 尤其是淋巴结阳性及肿瘤侵袭浆膜组中 CD44v6 阳性表达率明显高于淋巴结阴性及肿瘤局限于黏膜下或肌层, 从而在基因水平上证实了 CD44v6 与直肠癌局部浸润远处转移高度相关.

恶性肿瘤组织基本生物学特性是肿瘤细胞处于无限分裂增生状态, 表现为 DNA 含量的异常改变, 呈现异倍体状态. 异倍体作为一种遗传不稳定形式, 有可能提高肿瘤细胞产生异质性的能力^[16], 因此 DNA 倍体状况是反映大肠癌生物学行为重要因素^[17]. 许多研究表明大肠癌细胞中不仅 DNA 倍体异常, 而且其 DNA 倍体形式和细胞周期增生指数还与肿瘤大小、分期、淋巴结转移、血管侵袭以及预后有关^[18-20]. 本组资料中, 40 例肿瘤标本中 32 例检出异倍体, 异倍体率 (80%) 显著高于正常组织, 统计分析还表明肿瘤异倍体与淋巴结转移及 Dukes 分期有关, 低分化腺癌和黏液腺癌中异倍体率达 100%, 高于高、中分化腺癌 (76.7%), 肿瘤侵犯浆膜下或浆膜者异倍体率也较局限于黏膜下或肌层者高, 但二组均无显著性差异. 结果提示肿瘤细胞 DNA 倍体与肿瘤转移有关, 异倍体肿瘤较二倍体肿瘤更容易发生淋巴结转移, 病期偏晚, 预后较差. 本实验结果还表明 CD44v6 阳性者中异倍体率 (85.7%) 与 CD44v6 阳性者中异倍体率 (66.7%) 无显著性差异, 说明 CD44v6 的表达与肿瘤细胞 DNA 倍体无关, 各自为一个独立的预后影响因素.

4 参考文献

1 Clarke G, Ryan E, O'Keane JC, Crowe J, Mathuna PM. Mor-

- ality association of enhanced CD44v6 expression is not mediated through occult lymphatic spread in stage II colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1028-1031
- 2 Li Z, Ding Y, Deng Y. Mechanism of CD44v6 in human colorectal carcinoma metastasis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1998;78:729-732
- 3 Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg Today* 2000;30:28-32
- 4 Coppola D, Hyacinthe M, Fu L, Cantor AB, Karl R, Marcet J, Cooper DL, Nicosia SV, Cooper HS. CD44v6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29:627-635
- 5 Gu J, Zhu X, Ye Y, Qu J, Huang L, Li R, Yu Y, Leng X. The level of expression of adhesion molecules CD44v6 and E-cadherin in colorectal cancer and analysis of correlates with metastasis. *Zhonghua Waikexue Zazhi* 1999;37:108-109
- 6 Junglin B, Menges M, Goebel R, Wittig BM, Weg-Remers S, Pistorius G, Schilling M, Bauer M, Konig J, Zeitz M, Stallmach A. Expression of CD44v6 has no prognostic value in patients with colorectal cancer. *Z Gastroenterol* 2002;40:229-233
- 7 Morrin M, Delaney PV. CD44v6 is not relevant in colorectal tumour progression. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:30-36
- 8 Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Expression of CD44 and variant proteins in human colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:301-309
- 9 Masson D, Denis MG, Lustenberger P. Limitations of CD44v6 amplification for the detection of tumour cells in the blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2000;82:1283-1289
- 10 Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology* 1999;56:232-238
- 11 Nanashima A, Yamaguchi H, Sawai T, Yasutake T, Tsuji T, Jibiki M, Yamaguchi E, Nakagoe T, Ayabe H. Expression of adhesion molecules in hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:1004-1009
- 12 Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology* 1999;56:232-238
- 13 Nanashima A, Yamaguchi H, Sawai T, Yamaguchi E, Kidogawa H, Matsuo S, Yasutake T, Tsuji T, Jibiki M, Nakagoe T, Ayabe H. Prognostic factors in hepatic metastases of colorectal carcinoma: immunohistochemical analysis of tumor biological factors. *Dig Dis Sci* 2001;46:1623-1628
- 14 蔡崎, 陆红芬, 孙孟红, 杜祥, 范月珍, 施达仁. 结直肠癌组织中 CD44v3, V6 蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1255-1285
- 15 李升平, 王吉浦, 张昌卿, 谭卫民, 刘锦怀, 潘邦敏. CD44v6 表达与大肠癌预后的相关性研究. *中华实验外科杂志* 1998;15:294-299
- 16 Risques RA, Moreno V, Marcuello E, Petriz J, Cancelas JA, Sancho FJ, Torregrosa A, Capella G, Peinado MA. Redefining the significance of aneuploidy in the prognostic assessment of colorectal cancer. *Lab Invest* 2001;81:307-315
- 17 Berczi C, Bocsi J, Bartha I, Math J, Balazs G. Prognostic value of DNA ploidy status in patients with rectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3737-3741
- 18 Zou L, Mao Y, Lei S, Wei Y, Zhao X, Kan B, Jiang Y, Peng F, Wang Q, Tian L, Yang L, Liu J. The relationship of cellular DNA content with clinical stage and biological features of colorectal cancer. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2000;31:180-182
- 19 Salud A, Porcel JM, Raikundalia B, Campjohn RS, Taub NA. Prognostic significance of DNA ploidy, S-phase fraction, and P-glycoprotein expression in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1999;72:167-174
- 20 Garcia-Hirschfeld Garcia J, Blanes Berenguel A, Vicioso Recio L, Marquez Moreno A, Rubio Garrido J, Matilla Vicente A. Colon cancer: p53 expression and DNA ploidy. Their relation to proximal or distal tumor site. *Rev Esp Enferm Dig* 1999;91:481-488