

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2005.03.12

· 临床研究 ·

# 非小细胞肺癌 CD44v6 的表达及其在患者预后判定中的作用

吴秋平 蒋耀光 闵家新 向明章

**【摘要】** 背景与目的 CD44v6 的过度表达与人类多种恶性肿瘤的发生、发展和转移密切相关。本研究旨在观察 CD44v6 在非小细胞肺癌中的表达及其在患者预后判定中的作用。方法 采用 RT-PCR 和免疫组化法,对 52 例非小细胞肺癌患者手术标本进行 CD44v6 检测,并随访。结果 免疫组化法和 RT-PCR 法测得 52 例肺癌组织中 CD44v6 阳性表达率分别为 69.2% 和 75.0%。低分化肺癌组织中 CD44v6 阳性表达率显著高于高分化和中分化肺癌 ( $P < 0.05$ ),有淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者 ( $P < 0.01$ ), 期显著高于期和期 ( $P < 0.05$ )。CD44v6 阴性表达者生存率显著高于 CD44v6 阳性表达者 ( $P = 0.0115$ )。多元 logistic 回归分析显示,CD44v6 阳性表达 ( $P = 0.048$ ) 和 pTNM 分期 ( $P = 0.035$ ) 对生存率有显著影响。结论 肺癌中存在 CD44v6 过度表达,检测 CD44v6 的表达有助于预测肺癌患者的预后。

**【关键词】** 非小细胞肺癌 CD44v6

**【中图分类号】** R734.2

**Expression of CD44v6 and its prognostic significance in non-small cell lung cancer** WU Qiuping, JIANG Yaoguang, MIN Jiaxin, XIANG Mingzhang. Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, P. R. China

Corresponding author: WU Qiuping, E-mail: qiupw@yahoo.com.cn

**【Abstract】** **Background and objective** Overexpression of CD44v6 is associated with occurrence, development and metastasis of a variety of human malignant tumors. The aim of this study is to determine the expression of CD44v6 and its prognostic significance in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** CD44v6 expression was detected in 52 NSCLC tissues and 12 normal pulmonary tissues by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry (SP method). **Results** The positive expression rate of CD44v6 was 69.2% (SP method) and 75.0% (RT-PCR method) in NSCLC, respectively. Significantly higher expression of CD44v6 was demonstrated in poorly differentiated tumors than that in moderately/well differentiated tumors ( $P < 0.05$ ). The expression of CD44v6 was remarkably higher in patients with lymphatic metastasis than that in those without lymphatic metastasis ( $P < 0.01$ ). CD44v6 expression in stage NSCLC was remarkably higher than that in stage and NSCLC ( $P < 0.05$ ). Survival rate of patients with negative CD44v6 expression was significantly higher than that of those with positive CD44v6 expression ( $P = 0.0115$ ). Multi-variate logistic analysis showed the expression of CD44v6 ( $P = 0.048$ ) and pTNM stage ( $P = 0.035$ ) were significantly prognostic factors. **Conclusion** Overexpression of CD44v6 is very common in lung cancer tissues. Detection of CD44v6 expression may be helpful to predict the prognosis of NSCLC patients.

**【Key words】** Non-small cell lung cancer CD44v6

肺癌的转移是治疗失败和患者死亡的主要原因。肿瘤的侵袭转移是一个十分复杂的生物学现象,包括癌细胞由原发瘤上分离、脉管内异质或同质瘤栓的形成、在靶器官大量增殖形成转移灶,其中细胞黏附参与整个过程并起重要作用<sup>[1]</sup>。CD44 是一种分布极广的

细胞表面糖蛋白,主要参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的特异性粘连过程。它分为两大类:不含有 V 区外显子的转录子称为标准型 CD44 (CD44s),含有 V 区外显子的转录子称为 CD44 变异体 (CD44v)。CD44v (尤其是 CD44v6) 的过量表达与人类多种恶性肿瘤的发生、发展和转移密切相关。细胞黏附分子 CD44v6 的表达在肿瘤的预测、早期诊断、病程进展、转移潜能与预后的估计等方面有很大的潜在价值,受

作者单位:400037 重庆,第三军医大学附属新桥医院胸外科(吴秋平、闵家新、向明章);第三军医大学附属大坪医院胸外科(蒋耀光)(通讯作者:吴秋平, E-mail: qiupw@yahoo.com.cn)

到众多学者注意。本实验采用 RT-PCR、免疫组化等技术,对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者 CD44v6 的表达及其与肺癌临床病理特征的关系进行研究,并对其预测生存率的价值进行探索,为肺癌的诊断、治疗和预后判断提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 全部标本取自第三军医大学新桥医院、大坪医院、西南医院肺癌手术患者,共 52 例。其中男性 39 例,女性 13 例;年龄 50.5 岁  $\pm$  4.3 岁(33~72 岁)。病理分型:鳞癌 31 例,腺癌 21 例;分化程度:高分化 15 例,中分化 20 例,低分化 17 例;pTNM 分期(UICC,1997): A 期 7 例, B 期 12 例, A 期 8 例, B 期 12 例, A 期 10 例, B 期 2 例, 期 1 例;病理检查淋巴结转移情况:有淋巴结转移者 19 例,无淋巴结转移者 33 例。另取离肿瘤组织 5 cm 以上的肺组织作为对照的正常肺组织,共 12 例。

**1.2 免疫组织化学染色** 采用 SP 法,SP 免疫组化试剂盒和鼠抗人 CD44v6 单克隆抗体均为北京中山公司产品。免疫组化结果判定根据阳性细胞的显色有无和强弱分级。阳性信号为棕黄色颗粒,阳性分级:阴性(-),无显色;阳性(+),片中阳性细胞少于 50%且染色浅;强阳性(+) ,片中阳性细胞占 50%以上或显色深。以药盒提供的阳性片作为阳性对照,用 TBS 代替一抗作为空白对照。

**1.3 RT-PCR 法** 参照 Yamamichi 等<sup>[2]</sup>的序列合成一对 CD44v6 基因的引物,由北京中山生物技术有限公司合成。CD44v6 上游引物序列 5'-CA GACCTGC-CCAATGCCTTTGATGGACC-3',下游引物序列 5'-TCCCTGTTGTCGAATGGGAGTCTT-3',扩增片段为 386 bp。-actin 上游引物序列 5'-AAGAGA G-GCATCCTCACCT-3',下游引物序列 5'-TACATG-GCTGGGGTGTGAA-3',扩增片段为 218 bp。按以下参数在 PCR 扩增仪上进行:94 变性 45 s,60 退火 30 s,72 延伸 2 min;经 34 个循环周期后,4 贮存备用。取 5  $\mu$ l PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色后,紫外透射反射仪下观察结果,并在凝胶成像仪上照相。以观察到 386 bp 的扩增条带为 CD44v6 mRNA 的阳性表达。

**1.4 术后随访** 52 例患者术后随访时间为 1 个月~7 年,平均 33 个月。有 8 例失访,随访率为 84.6%。

**1.5 统计学处理** 采用 SAS6.12 软件包对数据进行分析,对数据作  $\chi^2$  检验、单元和多元 logistic 回归分析。以  $\alpha=0.05$  为显著性水准。生存分析采用 Kap-

lan-Meier 曲线图示,行 log-rank 检验。

## 2 结果

**2.1 CD44v6 的表达及其与 NSCLC 临床病理特征的关系**(图 1~3,表 1) 免疫组化法示 CD44v6 阳性表达位于细胞膜,呈明显棕黄色染色。正常肺组织未见 CD44v6 表达。免疫组化和 RT-PCR 法分别测得 52 例肺癌组织中 CD44v6 阳性表达率为 69.2% 和 75.0%。鳞癌 CD44v6 的阳性表达率显著高于腺癌( $P<0.01$ ),低分化者显著高于高分化和中分化者( $P<0.05$ ),有淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者( $P<0.01$ ), 期显著高于 期和 期( $P<0.05$ )。

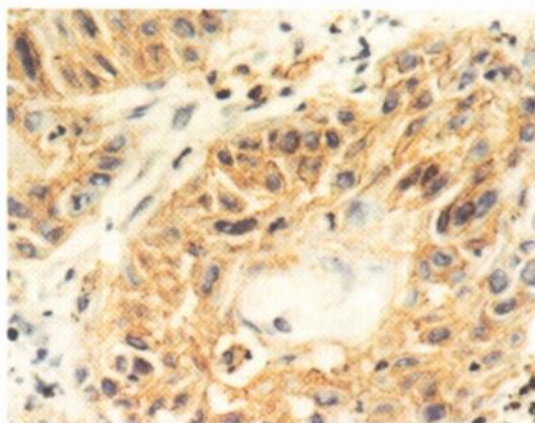


图 1 肺鳞癌组织 CD44v6 阳性染色(SP  $\times$ 400)

Fig 1 Positive staining of CD44v6 in squamous cell carcinoma (SP  $\times$  400)

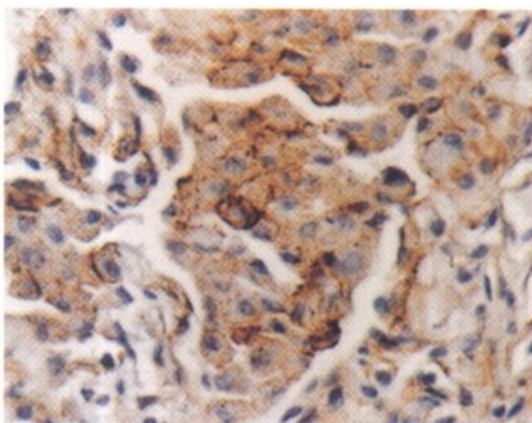


图 2 肺腺癌组织 CD44v6 阳性染色(SP  $\times$ 400)

Fig 2 Positive staining of CD44v6 in adenocarcinoma (SP  $\times$ 400)

**2.2 CD44v6 表达与 NSCLC 患者生存率的关系**(图 4) 获随访的 44 例患者中,CD44v6 阴性表达者 12 例,其 1、3 年生存率分别为 91.2% 和 41.6%;CD44v6 阳性表达者 32 例,1、3 年生存率分别为 56.2% 和 21.9%。两组生存率差异具有显著性( $\chi^2=6.384$ ,  $P=0.0115$ )。

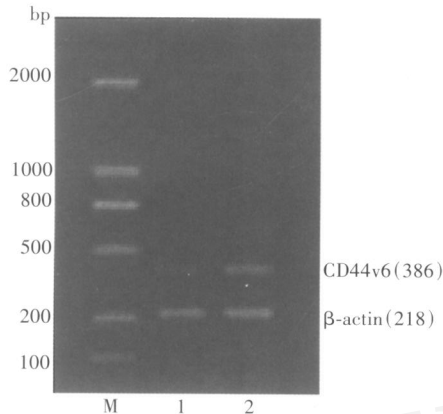


图 3 CD44v6 在 NSCLC 组织中表达的 RT-PCR 检测结果

Fig 3 RT-PCR results of CD44v6 expression in NSCLC tissues  
M: DNA marker; 1: Adenocarcinoma; 2: Squamous cell carcinoma

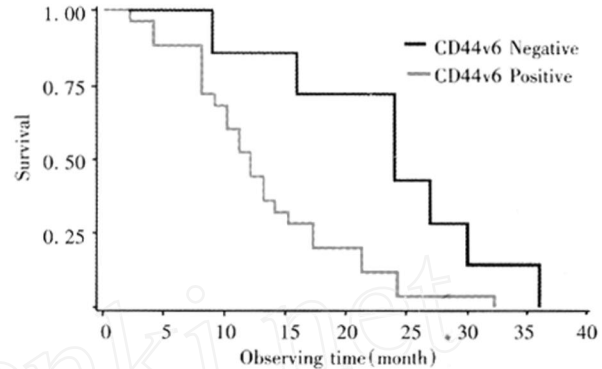


图 4 NSCLC 患者 CD44v6 阳性表达组与阴性表达组的生存率比较

Fig 4 Comparison of survival rate of NSCLC patients between the positive and negative CD44v6 expression groups

表 1 CD44v6 阳性表达与 NSCLC 临床病理特征之间的关系

Tab 1 Relationship between CD44v6 expression and clinical pathological characteristics in NSCLC

Characteristic	n	Positive CD44v6 expression (%)	
		Immunohistochemistry	RT-PCR
<b>Histology</b>			
Squamous cell carcinoma (SCC)	31	28(90.3) *	29(93.5) *
Adenocarcinoma (AC)	21	8(38.1)	10(47.6)
<b>Differentiation</b>			
Well	15	8(53.3)	9(60.0)
Moderate	20	12(60.0)	14(70.0)
Poor	17	16(94.1)	16(94.1)
<b>Lymphatic metastasis</b>			
+	19	18(94.7) #	18(94.7) #
-	33	18(54.5)	21(63.6)
<b>pTNM stage</b>			
( A+ B)	19	11(57.9)	12(63.2)
( A+ B)	20	14(70.0)	15(75.0)
( A+ B)	12	10(83.3)	11(91.7)
	1	1(100)	1(100)

\* : Compared with adenocarcinoma,  $P < 0.01$ ; # : Comparison between poor differentiation and moderate/well differentiation,  $P < 0.05$ ; : Comparison between poor differentiation and moderate/well differentiation,  $P < 0.05$ ; # : Compared with non-lymphatic metastasis,  $P < 0.01$ ; : Comparison between stage and stage / ,  $P < 0.05$

2.3 单元和多元 logistic 回归分析影响肺癌患者术后生存率的因素 单元 logistic 回归分析结果显示,对生存率有影响的因子有 p TNM 分期 ( $P < 0.05$ )、病理类型 ( $P < 0.05$ )、CD44v6 阳性表达 ( $P < 0.05$ ) 以及有无淋巴结转移 ( $P < 0.05$ )。

多元 logistic 回归分析显示,对生存率有影响的因子有 CD44v6 阳性表达 ( $P = 0.048$ ) 和 p TNM 分期 ( $P = 0.035$ ) (表 2)。

### 3 讨论

揭示肿瘤转移的机制,预测肿瘤的转移潜能,有效地判断预后和选择合理的治疗方案,延长患者的生存期,提高其生活质量,是当前肿瘤学研究的重要课题。

表 2 多元 logistic 回归分析肺癌患者术后生存的影响因子

Tab 2 Multi-variate logistic analysis of influencing factors on postoperative survival rate of lung cancer patients

Factor	Value of RR	95 % CI	P value
Age (each group with 10-year interval)	0.95	0.91-1.02	0.53
Sex (male/female)	1.84	0.54-6.03	0.30
Histology (SCC/AC)	1.26	0.04-1.48	0.13
pTNM stage (UICC,1997)	1.98	1.02-3.85	0.035
Expression of CD44v6 (+/-)	1.88	1.15-2.76	0.048
Lymphatic metastasis (+/-)	1.36	0.80-2.30	0.237

95 % CI: 95 % confidence interval

近年来,随着肿瘤生物学和分子遗传学的进展,发现了许多很有潜力的显示预后的因素,如 cerbB2 原癌基

因、p53 抑癌基因、p21 基因、Rb 蛋白、Ki-67 抗原、PCNA 等,研究这些生物学标志物对预测术后肺癌患者的预后以及指导临床治疗具有重要意义<sup>[3]</sup>。

介导细胞黏附作用的 CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白黏附分子,CD44 编码基因位于第 11 号染色体的短臂上,CD44 基因组由 20 个外显子组成,全长 50 kb,包括 10 个组成型外显子和 10 个 V 区变异性拼接外显子<sup>[4]</sup>。由于 V 区外显子在 mRNA 水平的选择性拼接,产生多种 CD44 变异体<sup>[5]</sup>,主要包括 CD44v3、CD44v5、CD44v6、CD44v9 等。我们采用免疫组化和 RT-PCR 法测得 52 例肺癌组织中 CD44v6 阳性表达率分别为 69.2% 和 75.0%,其中鳞癌 CD44v6 的阳性表达率显著高于腺癌 ( $P < 0.01$ )。结果显示 CD44v6 普遍存在于肺癌组织中。

我们常常用传统的病理学方法来评价肿瘤的预后,主要考虑肿瘤的病理变化,如肿瘤大小,组织学分类,肿瘤分化程度,血管、淋巴管浸润,肿瘤分期等,其中肿瘤分期具有显著的预后意义。本研究结果显示,

期 NSCLC 组织中 CD44v6 蛋白阳性表达率显著高于 期和 期,提示 CD44v6 蛋白表达更多见于晚期肺癌,因而测定 NSCLC 组织中 CD44v6 蛋白的免疫组化表达,有助于正确评估肺癌的临床病理分期和制订合理的治疗方案。

然而仅靠肿瘤分期已不能准确判断预后,尤其是在 NSCLC,因其具有明显的异质性(heterogeneity),同一期组织学相似的 NSCLC 可能有不同的临床后果:有的肿瘤可能有潜在的浸润和转移能力,而有的可能已发生了微转移(micrometastasis),这些危险性变化单靠临床分期(cTNM 分期)、外科评价分期(sTNM)、手术后分期或病理分期(pTNM)不易发现。本研究表明 CD44v6 表达与肺癌淋巴结转移、pTNM 分期有密切关系。CD44v6 阳性表达率在淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组 ( $P < 0.01$ ),说明表达 CD44v6 的肺癌更易向周围淋巴结转移,与文献报道一致<sup>[6]</sup>。提示 CD44v6 可作为一项预测肺癌转移潜能的生物学指标。检测肺癌组织中 CD44v6 的表达对判断预后及指导临床治疗有较重要的应用价值,对 CD44v6 阳性表达的肺癌患者,即使未发现淋巴结转移,亦应重视术后综合治疗。

关于 CD44 基因与肿瘤的转移机制可能是<sup>[7]</sup>:参与细胞-细胞、细胞-细胞外基质之间的特异性黏附,CD44 蛋白可以促进肿瘤细胞脱离原发灶,促进形成肿瘤细胞转移的低阻力通道;转移到淋巴结的肿瘤细胞通过 CD44 蛋白与透明质酸结合,结合时的降解

物能促进肿瘤细胞滋养血管生长;肿瘤细胞通过膜上变异的蛋白 CD44v,可适应淋巴结周围的环境,在生长过程中和进入循环血液后能避开免疫系统的识别和攻击。

52 例患者中获随访者 44 例,随访率为 84.6%,随访时间为 1 个月~7 年,平均 33 个月。该 44 例中,CD44v6 阴性表达者 12 例,1、3 年生存率分别为 91.2% 和 41.6%;CD44v6 阳性表达者 32 例,1、3 年生存率分别为 56.2% 和 21.9%。两组生存率差异具有显著性 ( $P = 0.0115$ )。

单元 logistic 回归分析显示,对生存率有影响的因子有 pTNM 分期、病理类型、CD44v6 阳性表达和有 无淋巴结转移;多元 logistic 回归分析进一步显示,当  $\alpha = 0.05$  时,在这个回归模型中,仅有 CD44v6 阳性表达和 pTNM 分期进入模型,即对生存率有影响的仅有 CD44v6 阳性表达和 pTNM 分期两个指标,其余指标未显示有显著预测意义,这与 Nguyen 等<sup>[8]</sup>的研究结果相类似。本研究表明肺癌患者完全性切除手术后的生存率还与其它目前尚未知的多个因素有关。从而提示,CD44v6 可作为独立的检测指标,为临床肺癌的诊治和预后的判定提供理论依据。

## 参 考 文 献

- Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest*, 1993, 68(1) 4-17.
- Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura N, et al. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer*, 1998, 79(3) 256-262.
- Zhou QH, Wang H. The key points and direction of basic research on lung cancer of the 21th century in China. *Chin J Lung Cancer*, 2000, 3(1) 5-7. [周清华,汪惠. 21 世纪我国肺癌基础研究的重点与方向. *中国肺癌杂志*, 2000, 3(1) 5-7.]
- Fujita N, Yaegashi N, Ide Y, et al. Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues: possible implication of reduced expression of CD44 in lymphovascular space involvement of cancer cells. *Cancer Res*, 1994, 54(14) 3922-3928.
- Tarin D, Matsumura Y. Deranged CD44 gene activity in malignancy. *J Pathol*, 1993, 171(4) 249-250.
- Tran TA, Kallakury BV, Sheehan CE, et al. Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol*, 1997, 28(7) 809-814.
- Guo YJ, Liu G, Wang X, et al. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res*, 1994, 54(2) 422-426.
- Nguyen VN, Mirejovsky T, Melinova L, et al. CD44 and its v6 spliced variant in lung carcinomas: relation to NCAM, CEA, EMA and UPI and prognostic significance. *Neoplasma*, 2000, 47(6) 400-408.

(收稿:2004-12-25 修回:2005-03-03)

(本文编辑 李蓓兰)