

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.03.04

肺癌组织 CD44 和 TSP-1 基因表达与肿瘤进展的关系

尤健 张熙曾 张建国 陈华 刘岩雪 孙丽

【摘要】 目的 研究肺癌组织中 CD44 和 TSP-1 的表达并分析其与患者临床预后的关系。方法 应用免疫组化法检测 112 例肺癌组织中 CD44 和 TSP-1 表达,其中 25 例标本同时用 RT-PCR 法检测 TSP-1 表达。结果 TSP-1 在肺腺癌中的表达 (74.36%) 明显高于鳞癌和小细胞癌 (47.17%, $P=0.03$; 35.71%, $P=0.02$)。CD44_H 及 CD44_{V6} 在小细胞肺癌中均表达极低; CD44_H 在肺腺癌中的表达 (61.54%) 高于鳞癌 (50.94%, $P=0.036$), CD44_{V6} 在肺鳞癌中的表达 (50.94%) 明显高于腺癌 (17.95%, $P=0.003$)。Kaplan-Meier 生存分析发现, TSP-1、CD44_H 及 CD44_{V6} 均与肺癌患者生存情况无明显关系,但以病理类型进行分层分析后,在肺腺癌的表达中,低 TSP-1 表达组的生存率明显高于中/高表达组 (Log Rank = 0.0163)。25 例标本同时用免疫组化法及 RT-PCR 法检测 TSP-1 表达,两法符合率为 84% (21/25),两法结果无显著性差异 ($P>0.05$)。结论 肺癌的 TSP-1、CD44_H 及 CD44_{V6} 表达均有一定的病理学特异性。肺腺癌中 TSP-1 可能与患者的预后有关。TSP-1 的免疫组化检测法能可靠地用于石蜡存档标本的检测。

【关键词】 肺肿瘤 CD44_H CD44_{V6} TSP-1 免疫组织化学 RT-PCR

Expression of thrombospondin-1 and CD44 in human lung cancer tissues and their prognostic significance

YOU Jian, ZHANG Xizeng, ZHANG Jianguo, CHEN Hua, LIU Yanxue, SUN Li. Department of Thoracic Surgery, Tianjin Cancer Hospital, Tianjin 300060, P. R. China

【Abstract】 Objective To analyze the expression of CD44H, CD44V6 and TSP-1 in human lung cancer tissues and their prognostic significance. **Methods** A total of 112 lung cancer samples were examined for CD44H, CD44V6 and TSP-1 expression by immunohistochemical staining. Moreover, 25 cases out of them were detected for TSP-1 by RT-PCR assay simultaneously. **Results** Stronger expression of TSP-1 was demonstrated in adenocarcinomas (74.36%) as compared with squamous cell carcinomas (47.17%, $P=0.03$) and small cell lung cancer (35.71%, $P=0.02$). All of small cell lung cancer had significantly low expression of CD44H and CD44V6. Adenocarcinomas (61.54%) showed stronger CD44H membranous expression than squamous cell carcinomas did (50.94%, $P=0.036$). Whereas, squamous cell carcinomas (50.94%) showed stronger CD44V6 membranous expression than adenocarcinomas did (17.95%, $P=0.003$). Kaplan-Meier survival statistical analysis for 100 cases with complete follow-up data indicated that there was no significant relationship among TSP-1, CD44H, CD44V6 expression and overall survival rate. However, after stratifying by histopathological types, the overall survival rate of patients with low expression of TSP-1 was significantly higher than that of moderate/high expression groups in adenocarcinomas (Log Rank = 0.0163). Immunohistochemical and RT-PCR technique were utilized in 25 out of 112 cases simultaneously. The accordance rate of the two methods was 84%, and no significant difference was found between them. **Conclusion** The expression of TSP-1, CD44H and CD44V6 is significantly related to histopathological types. TSP-1 expression might be a prognostic indicator in lung adenocarcinoma. TSP-1 can be detected reliably in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by immunohistochemical method.

【Key words】 Lung neoplasms CD44H CD44V6 TSP-1 Immunohistochemistry RT-PCR

This work was supported by a grant from the Scientific Fund of Tianjin Health Bureau (To You Jian) (98KYGG 20).

本研究受天津市卫生局科技基金 (98KYGG-20) 资助
作者单位: 300060 天津市肿瘤医院胸外科

CD44 是一种被各种细胞, 包括肿瘤细胞广泛表达的细胞表面糖蛋白, 作为细胞间的粘附分子参与细胞

—基质、细胞—细胞之间的特异性粘附过程。凝血酶敏感蛋白 (Thrombospondin-1, TSP-1) 是一个多功能细胞基质糖蛋白,对细胞的生长、增殖、运动、血管形成以及肿瘤的转移等均有作用。二者的表达都与肿瘤转移有关。本研究应用免疫组化法综合检测 112 例肺癌组织中 CD44 和 TSP-1 的表达,并分析其与患者临床预后的关系,其中 25 例标本同时应用 RT-PCR 法检测 TSP-1 表达。

1 材料与方法

1.1 病例选择 全组 112 例标本取自 1988 年 12 月至 1998 年 12 月天津市肿瘤医院收治的经手术治疗的原发性肺癌患者。

1.2 免疫组织化学染色 采用 SP 法,SP 试剂盒为 VECTOR 公司产品。小鼠 CD44 (HCAM)、CD44 (V6) 及 TSP-1 (Ab-7) 单抗分别为 NOVOCASTRA 公司、R&D 公司、NEOMARKER 公司产品。预实验中的阳性组织切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。阳性判断标准:所有染色切片均经三位医师诊断,以全部取得统一结果为准。CD44_H、CD44_{V6} DAB 显色应呈棕褐色分布于细胞膜上,无背景着色,以阳性染色细胞占肿瘤细胞数(间质细胞除外)的 5% 以下、5%~50%、50% 以上分别判定为 +、#、###。TSP-1 DAB 显色应呈棕褐色、颗粒状、团块状或带状分布于细胞浆和细胞外间质中,无背景着色,以阳性染色细胞及间质占肿瘤细胞数及间质的 5% 以下、5%~50%、50% 以上分别判定为 +、#、###。

1.3 RT-PCR 法 采用 TRIzol 总 RNA 分离试剂 (GibcoBRL 公司),提取总 RNA。取 2 μg 总 RNA 进行逆转

录反应,然后取相当于 200 ng RNA 来源的 cDNA 为模板,分别进行 β-actin 和 TSP-1 的 RT-PCR。TSP-1 扩增条件为:94 60 s,55 60 s,72 60 s,最后一次循环延时 72 3 min,30 个循环。反应体系中不加 cDNA 模板者为阴性对照。TSP-1 的引物序列^[1]:5'-CGTCCTGTTCTGATGCATG3' (99-118),5'-GGCAGGACACCTTTTTCAGAG-3' (1115-1135)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS7.5 统计软件进行数据处理。单因素分析:χ² 检验、单因素方差分析、MCNEMAR 非参数检验、Mann-Whitney 非参数检验;多因素分析:COX 回归分析;生存分析:Kaplan-Meier 生存分析、Log Rank 检验。检验水准:双侧 α=0.05。

2 结果

因大细胞癌、细支气管肺泡癌和恶纤组病例数过少,故不进行统计学分析。为便于统计学处理,我们进行生存分析时把“#”和“###”合并为一组。

2.1 TSP-1 免疫组化染色结果及生存分析(表 1,图 1、2) TSP-1 在肺腺癌中的表达分别明显高于鳞癌和小细胞癌(χ² = 6.98, P = 0.03; χ² = 5.11, P = 0.02)。100 例随访资料完整的病例,应用 Kaplan-Meier 生存分析发现:低表达(+)组与中/高表达(+/#)组的生存率差异无显著性(Log Rank = 0.1599)。以病理类型进行分层研究发现,在肺腺癌的表达中,低 TSP-1 表达组的生存率明显高于中/高组(Log Rank = 0.0163),低表达组的 3 年生存率为 62.50%,中/高组为 25.08%。TSP-1 与年龄、性别、病期、吸烟指数、术前是否化放疗以及肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期之间均无明显关系(P > 0.05)。



图 1 肺鳞状细胞癌组织 TSP-1 SP 染色显微摄影图

Fig 1 Photomicrographs of paraffin-embedded tissue sections of squamous cell carcinoma stained with antibody to TSP-1

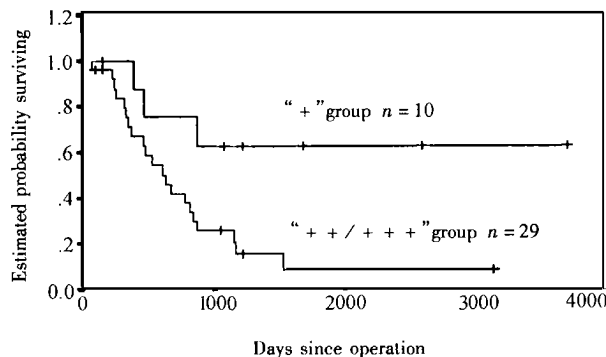


图 2 39 例肺腺癌患者 TSP-1 表达与生存率的关系

Fig 2 Relationship between the survival rate and TSP-1 expression in 39 patients with adenocarcinoma of the lung

表 1 TSP-1、CD44_H、CD44_{V6}免疫组化染色结果

Tab 1 The results of TSP-1, CD44H, CD44V6 expression by immunohistochemical staining

Items	Sex		Age (years)	Index of smoking	Histology			Tumor size		Lymph node status		TNM stage		Preoperative therapy		
	Male	Female			SCC	AC	SCLC	T1 + T2	T3 + T4	N0	N1 + N2	With	Without			
TSP-1																
+	34	16	55.18	378.70	28	10	9	38	12	24	26	22	12	16	13	37
+	16	14	58.10	208.83	10	13	5	23	7	7	23	7	8	15	4	26
+	14	18	57.79	419.69	15	16	0	26	6	15	17	12	7	13	5	27
CD44H																
+	43	15	54.97	352.76	26	15	14	47	11	24	34	22	15	21	15	43
+	15	17	58.63	388.75	20	10	0	21	11	11	21	8	8	16	6	26
+	6	16	58.23	260.45	7	14	0	19	3	11	11	11	4	7	1	21
CD44V6																
+	40	37	55.95	304.03	26	32	14	63	14	29	48	26	20	31	17	60
+	14	10	57.54	395.83	16	7	0	16	8	11	13	9	6	9	4	20
+	10	1	59.64	520.00	11	0	0	8	3	6	5	6	1	4	1	10

SCC: Squamous cell carcinoma; AC: Adenocarcinoma; SCLC: Small cell lung cancer

2.2 CD44_H、CD44_{V6}免疫组化染色结果及生存分析(表 1,图 3、4) CD44_H、CD44_{V6}在小细胞肺癌中不表达或表达极低。CD44_H在肺腺癌中的表达明显高于鳞癌 ($\chi^2 = 6.643, P = 0.036$)。CD44_{V6}在肺鳞癌中的表达明

显高于腺癌 ($\chi^2 = 9.13, P = 0.003$)。CD44_H、CD44_{V6}与年龄、病期、吸烟指数、术前是否化放疗、肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期以及生存时间无明显关系 ($P > 0.05$)。

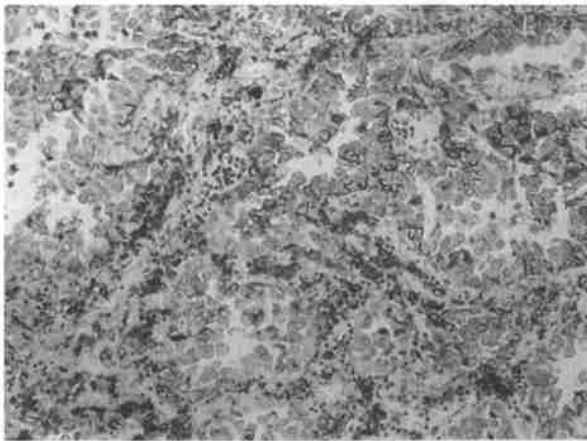


图 3 肺腺癌组织 CD44_H SP 染色显微摄影图

Fig 3 Photomicrographs of paraffin-embedded tissue sections of adenocarcinoma stained with antibody to CD44H

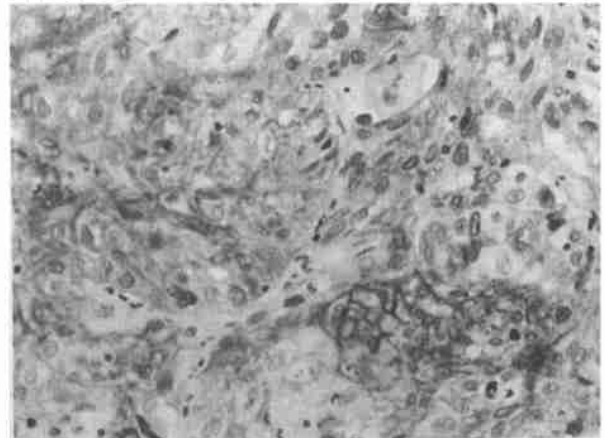


图 4 肺鳞状细胞癌组织 CD44_{V6} SP 染色显微摄影图

Fig 4 Photomicrographs of paraffin-embedded tissue sections of squamous cell carcinoma stained with antibody to CD44V6

2.3 RT-PCR 法检测 TSP-1 结果及与免疫组化法的比较 扩增 TSP-1 的电泳结果见图 5。免疫组化法中的“+”组相当于 RT-PCR 法中的“-”组,免疫组化法中的“+”及“++”组相当于 RT-PCR 法中的“+”组。经 MCNEMAR 检验两法无显著性差异 ($P = 0.625$),符合率为 84% (21/25)。RT-PCR 法检测的 25 例标本中,经统计学检验, TSP-1 与年龄、病期、吸烟指数、性别、术前是否化放疗、肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期以及病理类型之间均无明显关系 ($P > 0.05$)。

3 讨论

TSP-1 是一种分子量 450 ku 的糖蛋白,主要由血小板、肿瘤细胞、内皮细胞等分泌,存在于血浆和细胞外基质中。TSP-1 由三条相同的靠二硫键连接的多肽组成,每条多肽链均由数种基本的结构域组成,这些形形色色的结构域与细胞表面受体及大分子物质如胶原等相互作用,介导了一系列复杂的细胞功能,包括:细胞粘附、迁移、浸润、增殖、血管形成等^[2]。

有关 TSP-1 与肺癌进展的关系国内外报道不多。本研究虽未发现肺癌组织的 TSP-1 表达与肿瘤大小、淋巴结转移以及 TNM 分期的相关性,但却发现 TSP-1

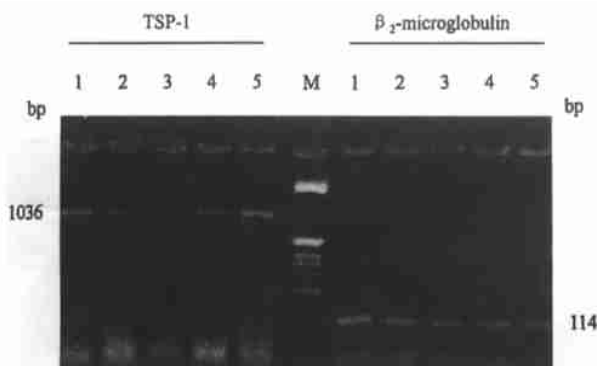


图 5 以 β_2 M 为内对照,肺癌组织特异扩增产物 TSP-1 电泳结果。 β_2 M 特异扩增带在 114 bp 处;TSP-1 特异扩增带在 1036 bp 处。2、3、5: 肺鳞癌组织;1、4:肺腺癌组织。

Fig 5 RT-PCR detection of TSP-1 in human lung cancer. Lane M:Marker; Lane 2,3,5:Squamous cell carcinomas; Lane 1,4:Adenocarcinomas.

表达在不同组织学来源的肺癌组织中有明显差异,即腺癌 > 鳞癌 > 小细胞癌。现知 TSP-1 在许多肿瘤细胞包括乳腺癌、膀胱癌、肺癌等中均能表达^[3,4]。有资料显示,TSP-1 表达可能受癌基因和抑癌基因的调节,不同组织学来源的肺癌细胞可能因为癌基因或抑癌基因不同,其细胞受这些基因的调节也不相同,故生物合成 TSP-1 的能力也有所不同。另外,不同类型的肺癌细胞结合 TSP-1 的能力也不一样。因此,不同组织学类型的肺癌中 TSP-1 表达的差异是可以理解的。

关于 TSP-1 表达和肺癌患者预后的关系文献中尚未见报道。我们对本组随访资料完整的 100 例患者的生存时间进行了 Kaplan-Meier 生存分析,发现在全组肺癌患者中,TSP-1 表达与肺癌患者的生存率无显著性差异;但如以病理类型进行分层分析,则发现在肺腺癌患者中,TSP-1 低表达者有比中/高表达者更好的预后。研究发现,TSP-1 具有调节血小板聚集、细胞粘附、运动、生长的功能,在低浓度时能抑制由碱性纤维蛋白生长因子(bFGF)诱导的血管内皮的生长和运动,减少内皮细胞的粘附和形成管状结构的能力,而在高浓度时其作用正相反^[5,6]。Tuszynski 等^[7]证实了外源性增加 TSP-1 可促进 ADP 及凝血酶刺激的血小板聚集,特别是肿瘤细胞在毛细血管床滞留时尤为突出。由于 TSP-1 介导了肿瘤细胞与血小板结构的相互作用,导致血小板聚集,促进了肿瘤的血行转移。

CD44 是一种具有广泛异质性的单链膜表面糖蛋白,参与细胞与细胞、细胞与间质之间的相互作用,在淋巴细胞归巢、血细胞生成、细胞移动及转移中起重要作用。已知 CD44 基因由 10 个组成型外显子和 10 个

变异型外显子组成,含有不同变异型外显子编码序列的 CD44 称为 CD44 拼接变异体(CD44_v),而完全不含 10 种变异型外显子编码序列的 CD44 称为 CD44 标准型(CD44_H或 CD44_S)^[8]。目前通过 PCR 技术在许多细胞系中已发现 10 多种 CD44_v。在这些变异体中,CD44_{v6}的表达是非转移性大鼠胰腺癌细胞株获得转移潜能所必需的^[13]。CD44_H和 CD44_{v6}与肺癌患者肿瘤进展状况及预后关系的研究近年来在国外有一些报道,认为 CD44 与肺癌的病理类型有密切关系,但与分期、复发率及生存率则无明显关系。

本研究结果显示,CD44_H及 CD44_{v6}在小细胞癌中几乎不表达,CD44_{v6}在鳞癌中的表达高于腺癌,相反 CD44_H在腺癌中的表达要高于鳞癌。CD44 在不同组织学类型表达的特点可能与其组织学来源有关^[10,11]。支气管粘膜上皮及 I 型肺泡上皮均表达 CD44_{v6},肺鳞癌常在支气管粘膜上皮的鳞状上皮化生基础上癌变,文献报道和本研究都证实了鳞癌可特异性地高表达 CD44_{v6}。小细胞未分化癌有其独特的组织学来源——Kultschitzky 细胞,属 APUD 系统,可能是其 CD44 表达缺失的原因。腺癌则来源于粘液腺的癌变。目前尚无 CD44_H是否在支气管粘液腺中表达的资料,但本研究发现 CD44_H在肺腺癌的表达明显高于鳞癌。CD44_H是细胞膜上主要的透明质酸受体,体外实验已经证实 CD44_H可在含透明质酸的环境中促进肿瘤细胞的运动^[12],而细胞外基质中富含透明质酸,这正是肿瘤外侵、血行转移的重要条件。研究发现 CD44_v对透明质酸的亲合性远低于 CD44_H^[13]。腺癌中 CD44_H高表达也与肺腺癌较鳞癌易于血行转移的临床特点相符。

本研究有 25 例标本同时使用免疫组化法和 RT-PCR 进行 TSP-1 的检测,经统计学检验两法无显著性差异,符合率达 84%。已有文献报道,免疫组化法能可靠地检测 TSP-1,选择适宜的抗原修复条件是检测可靠性的关键^[14]。Grossfeld 使用 pH=1 的 Tris-HCl 缓冲液及微波炉高温加热的抗原修复条件,但我们在预实验中发现,经 pH=1 的缓冲液处理后的切片染色后细胞结构完全毁坏,使基质和细胞难以区分,而用 pH=6 的枸橼酸缓冲液则可使基质和细胞浆染色满意,故我们在正式实验中使用枸橼酸缓冲液、微波炉高温加热为标准抗原修复条件。手术切除的肿瘤组织多以石蜡包埋存档,TSP-1 石蜡包埋标本免疫组化检测法的应用使 TSP-1 的检测能与患者的随访资料相结合,并了解其在组织中的存在部位,拓宽了 TSP-1 的研究范围。

参 考 文 献

- 1 Fontanini G, Boldrini L, Calcinaï A, et al. Thrombospondins and messenger RNA expression in lung carcinoma: Relationship with p53 alterations, angiogenic growth factors, and vascular density. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(1) 155-161.
- 2 Mosher DF. Physiology of thrombospondin. *Ann Rev Med*, 1990, 41 (-HD-) 85-97.
- 3 Fruehanf JP, Mehta R, Mechetner E, et al. Regulation of angiogenic in carcinoma of the breast, prostate, colon and malignant melanoma by p53 and thrombospondin. *American Asso for Cancer Res*, 1998, 39 180-195.
- 4 Campbell SC, Volpert OV, Vanovich M, et al. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res*, 1998, 58(6) 1298-1304.
- 5 God DJ, Pelverini B, Rastinejad F, et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(17) 6624-6628.
- 6 BenEzra D, Griffin BW, Mafizir G, et al. Thrombospondin and in vivo angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor or lipopolysaccharide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(13) 3601-3608.
- 7 Tuszyński GP, Rothman VL, Murphv AA, et al. Thrombospondin promotes platelet aggregation. *Blood*, 1988, 72(1) 109-115.
- 8 程湘. CD44 分子的结构特征. *国外医学免疫学分册*, 1998, 21(4) 185-188.
- 9 Gühthert U, Hofman M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cell. *Cell*, 1991, 65(1) 12-18.
- 10 Sell S, Pierce CB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancer. *Lab Invest*, 1994, 70(1) 6-22.
- 11 Fasano M, Sabatini MT, Wieczorek R, et al. CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors. *Cancer*, 1997, 80(1) 34-41.
- 12 Thomas L, Byers HR, Vink J, et al. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biology*, 1992, 118(4) 971-977.
- 13 Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A, et al. Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med*, 1994, 180(1) 53-56.
- 14 Grossfeld CD, Shi S, Ginsberg DA, et al. Immunohistochemical detection of thrombospondin 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*, 1996, 44(7) 761-766.

(收稿:1999-11-11 修回:2000-02-28)
(本文编辑 李蓓兰)

· 期刊文摘 ·

肺减容术和肺叶切除术对肺循环的不同影响[英]/ Harniuda M ... *Ann Surg*, 2000, 231(1) 119-125

目的:阐明肺减容术(LVRS)对运动时心肺循环的影响,并与肺癌肺叶切除术相比较。背景资料总结:LVRS可快速地改善经挑选的异质性肺气肿患者的肺功能和呼吸困难症状。然而极少有资料涉及LVRS对心肺循环,尤其是在运动时对其的影响。方法:LVRS(7例)和肺叶切除术(8例)患者于术前及术后6月行静息和运动时肺功能测试与肺血流动力学检查。在负荷实验中,取仰卧位,使用电制动自行车测力计至少2 min或直至疲劳或呼吸困难出现。结果:在肺叶切除术后,肺活量值,预计肺活量的百分比,第1秒用力呼气容积,预计第1秒用力呼气量百分比,残气容积/肺总量比值,以及最大自主通气量明显恶化。而在LVRS术后6月,肺活量、肺活量百分比无明显变化,且第1秒用力呼气量,第1秒用力呼气量百分比,一氧化碳弥散量和最大自主通气量均有显著改善。在两个手术

组,无论是静息或运动时的心脏指数均无改变,尽管肺叶切除组的术后肺动脉压于运动后显著升高,但LVRS无论于静息或运动时均对术后肺动脉压无影响。肺叶切除组的肺毛细血管楔压在术后无明显变化,而LVRS可以改善运动时观察到的明显升高的肺毛细血管楔压。肺叶切除术后,在静息和运动时均可观察到肺血管阻力指数明显升高。LVRS可明显升高静息时的肺血管阻力指数,但在运动时则不升高。在肺叶切除组,术后流量-压力曲线上移,且其梯度较术前更陡峭。在LVRS组,曲线平行上移。这些结果表明,无论是在肺叶切除术后还是在LVRS术后,为了获得相同的心输出量,需要更多的右心做功来克服增高的肺动脉压。结论:现行研究证实,LVRS对心肺循环的影响不可忽略,尤其是在运动时。成功的LVRS依赖于改善了呼吸功能与心功能储备,从而耐受手术本身对肺血管床的损伤。

(陈玉成 译 张世雯 校)