

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.11.011

P-gp 和 CD44v6 在胃癌组织中表达及与预后的关系

关云艳¹, 刘凯军², 欧希龙³, 郭庆明³

Expressions of P-gp and CD44v6 in Gastric Carcinoma and Their Correlation to Clinical Prognosis

GUAN Yun-yan¹, LIU Kai-jun², OU Xi-long³, GUO Qing-ming³

1. Wuxi Traditional Chinese Medical Hospital, Wuxi 214001, China; 2. The Fourth People's Hospital of Fuyang City; 3. The Affiliated Zhongda Hospital, Clinical Medical College, Southeast University

Corresponding Author: OU Xi-long, E-mail: ouxilong@126.com

Abstract: Objective To study the relationship between the expression of P-glycoprotein (P-gp) and CD44v6 as well as their clinical significance in gastric carcinoma. **Methods** The expressions of P-gp and CD44v6 were detected by immunohistochemistry method in 97 patients with gastric carcinoma. Then their relationship with pathophysiological characteristics was evaluated. Meanwhile, the relationship between expression of P-glycoprotein (P-gp) and CD44v6 and the effect of them on clinical prognosis were also analyzed. **Results** The positive rate of P-gp and CD44v6 in 97 cases of gastric carcinoma were 40.21% and 58.76% respectively. The expression of P-gp was associated with lymph node metastasis, vessel invasion and clinical stage; CD44v6 was associated with tumor size, lymph node metastasis, vessel invasion and clinical stage. There was a positive correlation between the expressions of P-gp and CD44v6. Moreover, survival rate of three years in both positive group was lower than that in both negative groups. **Conclusion** The expressions of P-gp and CD44v6 are not only associated with biologic behavior of gastric carcinoma, but also related to each other. Those who expressed both P-gp and CD44v6 have lower survival rate. Combined detecting of P-gp and CD44v6 may contribute to predicting the prognosis in gastric carcinoma.

Key words: Gastric carcinoma; P-glycoprotein; CD44v6; Immunohistochemistry; Prognosis

摘要:目的 探讨 P-gp 和 CD44v6 在胃癌组织中表达的相关性及其临床意义。**方法** 应用免疫组织化学方法,检测 97 例胃癌组织中 P-gp 及 CD44v6 的表达,并分析 P-gp 和 CD44v6 与胃癌病理特征的关系、两者表达的相互关系及对预后的影响。**结果** 97 例胃癌组织中 P-gp 和 CD44v6 的阳性率分别为 40.21%(39/97)和 58.76%(57/97),P-gp 阳性表达情况与胃癌的临床分期、有无淋巴结转移及有无血管侵犯有关($P < 0.05$)。CD44v6 阳性表达与病变大小、临床分期、有无淋巴结转移及有无血管侵犯有关($P < 0.05$)。P-gp 阳性表达与 CD44v6 阳性表达具有正相关性($P < 0.05$),两者表达均阳性者 3 年生存率低于两者表达均阴性组。**结论** P-gp 和 CD44v6 的表达不仅与胃癌的生物学行为有关,同时两者的表达具有明显的正相关性,而且两者表达均阳性者预后差,提示联合检测两者有助于判断胃癌的预后。

关键词: 胃癌; P-糖蛋白; CD44v6; 免疫组织化学; 预后

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)11-0940-04

0 引言

胃癌是我国发病率最高、导致死亡人数最多的恶性肿瘤。胃癌的浸润和转移以及在治疗时对化疗

药物的耐药是造成患者死亡的主要原因。作为肿瘤多药耐药基因 MDR-1 的蛋白表达产物 P-糖蛋白,是介导胃癌耐药的主要机制,且很多研究发现该蛋白的表达与肿瘤的侵袭及转移能力相关。目前已知 CD44v6 是一种重要的细胞表面黏附分子,在肿瘤的生长、转移中起重要作用。本文应用免疫组织化学方法检测了 97 例胃癌手术标本中两者的表达情况,并分析了它们之间的相关性以及与该肿瘤病理特征和预后之间的关系。

收稿日期:2008-07-28;修回日期:2008-12-30

作者单位:1. 214001 江苏无锡市中医医院;2. 阜阳市第四人民医院内科;3. 东南大学医学院附属中大医院消化科

通信作者:欧希龙, E-mail: ouxilong@126.com

作者简介:关云艳(1970-),女,硕士,主要从事消化道肿瘤的临床研究

1 资料与方法

1.1 标本来源

材料选自东南大学附属中大医院 2003 年 1 月~2005 年 5 月期间进行手术的胃癌患者共 97 例,均有完整的临床及病理资料,所有患者术前均未行化疗或其他针对肿瘤的治疗。患者中男 78 例,女 19 例;年龄 34~83 岁,平均年龄 58.34 岁;病变直径 ≥ 5 cm 者 43 例, < 5 cm 者 54 例;根据 1988 年国际抗癌联盟(UICC)公布的 TNM 分期及临床分期标准, I 期 16 例, II 期 17 例, III 期 61 例, IV 期 3 例;有淋巴结转移的 61 例,无转移的 36 例;侵犯血管形成癌栓者 33 例,未侵犯血管者 64 例;病理类型显示乳头状腺癌和管状腺癌分别为 38 例和 52 例,印戒细胞癌 7 例。

1.2 试剂和方法

所有标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,制成 4 μ m 的连续切片, P-gp、CD44v6 一抗试剂盒均购自福州迈新生物工程技术公司,为即用型抗体。采用免疫组织化学 SP 法检测胃癌手术标本的肿瘤组织中 P-gp 和 CD44v6 的表达。应用微波炉恒温抗原修复及 DAB 显色。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照,以结肠癌阳性片作阳性对照。

1.3 结果判断

在光学显微镜下观察,以细胞结构中存在粗细一致的棕黄色颗粒为阳性,其中 P-gp 阳性颗粒分布于细胞膜或同时在胞质和胞膜上表达,见图 1; CD44v6 阳性颗粒分布于细胞膜,见图 2。双盲法随机观察 5 个不同高倍视野,各计数 500 个细胞,判断标准如下:根据染色的细胞数量分为阴性(-):无阳性细胞染色或阳性细胞数低于 10%;弱阳性(+):阳性细胞在 10%~25%之间;中度阳性(++):阳性细胞 25%~75%;强阳性(+++):阳性细胞大于 75%。

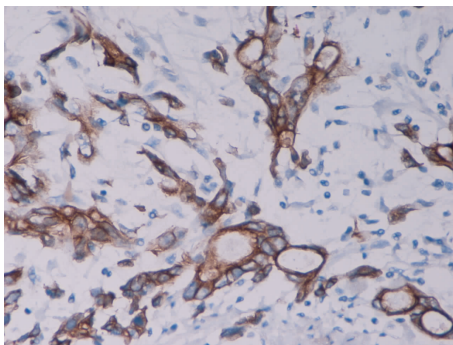


图 1 P-gp 在胃癌组织中的表达(SP \times 400)

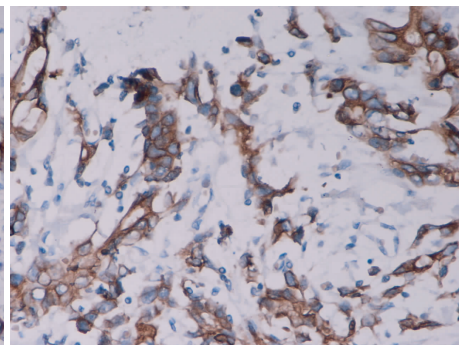


图 2 CD44v6 在胃癌组织中的表达(SP \times 400)

Figure 1 Expression of p-glycoprotein(P-gp) in gastric carcinoma(SP \times 400)

Figure 2 Expression of CD44v6 in gastric carcinoma(SP \times 400)

1.4 随访

对所有患者进行了三年的随访,这些患者术后选用以 5-氟尿嘧啶(5-Fu)为基础的联合化疗,每个个体化疗持续时间及间期相同,如患者未死亡则观察时间持续三年。

1.5 统计学方法

应用 SAS 8.1 统计软件对计数资料进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。并用寿命表法统计术后生存率。

2 结果

2.1 P-gp 和 CD44v6 在胃癌中的表达与临床病理特点的关系

97 例胃癌手术标本中, P-gp 表达阳性者 39 例(40.21%); P-gp 的表达与有无淋巴结转移、有无血管侵犯及临床分期有关。CD44v6 阳性 57 例(58.76%); CD44v6 阳性表达情况与病变大小、临床分期、有无淋巴结转移及有无血管侵犯有关,见表 1。

2.2 P-gp 和 CD44v6 在胃癌中表达的相关关系

两者在胃癌中的共同阳性表达率为 22.68%(22/97);且两者表达间有正相关性,见表 2。

2.3 随访结果

P-gp 与 CD44v6 表达均阴性者 25 例,随访过程中失访 2 例,3 年内死亡 9 例,累积生存率为 62.32%; P-gp 单项表达阳性者 17 例,随访过程中失访 1 例,3 年内死亡 10 例,累积生存率为 37.83%; CD44v6 单项表达阳性者 33 例,随访过程中失访 2 例,3 年内死亡 19 例,累积生存率为 39.93%; P-gp 和 CD44v6 单项表达阳性组与两项均阴性组相比生存率低,但差异无统计学意义。两项表达均阳性者 22 例,随访过程中失访 1 例,3 年内死亡 15 例,累积生存率为 25.75%。与两项均阴性组相比,生存率明显降低($\chi^2 = 4.6186, P = 0.0316$),见图 3。

表 1 P-gp 和 CD44v6 的表达与临床病理特征的关系

Table 1 The expression of P-gp and CD44v6 and the correlation to clinical pathophysiological characteristics

Group	P-gp				χ^2	P	CD44v6				χ^2	P
	-	+	++	+++			-	+	++	+++		
Gender					3.83	0.2799					1.34	0.7188
Male	50	14	8	6			33	19	19	7		
Female	8	4	4	3			9	3	4	3		
Age					3.19	0.3629					6.21	0.1016
≥ 65	29	9	3	3			22	7	13	2		
< 65	29	9	9	6			20	15	10	8		
Tumor size					6.21	0.1017					12.54	0.0057
≥ 5 cm	22	7	9	5			11	10	16	6		
< 5 cm	36	11	3	4			31	12	7	4		
Histologic differentiation					5.09	0.1651					3.33	0.3438
Poorly	25	9	9	6			17	13	14	5		
Well/Moderate	33	9	3	3			25	9	9	5		
Lymph node metastasis					10.07	0.0180					15.71	0.0013
Absent	28	6	1	1			24	7	5	0		
Present	30	12	11	8			18	15	18	10		
Vessel invasion					9.47	0.0237					12.07	0.0071
Present	15	5	7	6			7	8	12	6		
Absent	43	13	5	3			35	14	11	4		
Clinical stage					7.92	0.0472					14.70	0.0021
I、II	23	8	2	0			23	5	4	1		
III、IV	35	10	10	9			19	17	19	9		

表 2 P-gp 和 CD44v6 在胃癌组织中表达的相关关系

Table 2 The relationship between the express of P-gp and CD44v6 in gastric carcinoma

P-gp	CD44v6				Total
	-	+	++	+++	
-	25	17	13	3	58
+	12	3	3	0	18
++	5	0	2	5	12
+++	0	2	5	2	9
Total	42	22	23	10	97

3 讨论

P-gp(P-糖蛋白)具有“药物外流泵”的功能,该蛋白不仅分布在细胞膜上,同时也存在于高尔基体的内腔表面。因而既可使细胞内药物主动转运至细胞外,又可使药物在细胞内重分布,很多研究证实高尔基体上的 P-gp 在介导细胞耐药中也有着重要作用^[1-2]。此外,该蛋白还可抑制细胞凋亡蛋白酶 Caspase-3 和 Caspase-8 的激活从而抑制细胞的凋亡^[3],最终导致细胞产生耐药。目前认为在各种血液和实体肿瘤中均有不同程度的 P-gp 表达^[4]。我们实验结果显示该蛋白在胃癌中表达率较低(40.21%),但其表达与淋巴结转移、血管侵犯及临床分期呈正相关,这一表达特点与国外有关报道一致^[5-6]。分析其与临床病理特征相关的原因有如下可能:首先,P-gp 具有抑制细胞凋亡的作用;其次,P-gp 在向细胞外泵出物质时会引起肿瘤细胞膜边缘的波动,提高肿瘤细胞的游走、着床能力^[5],后来该研究人员又证实在高表达 P-gp 的多药耐药细胞中,基质金属蛋白酶(包括 MMP-1、MMP-2 和 MMP-9)的数量和活性均明显增加^[6],从而促进了肿瘤细胞的侵袭能力。

CD44 也是一种细胞表面跨膜糖蛋白,作为细胞基质透明质酸受体,参与细胞-细胞及细胞-基质之间的特异性黏附过程,并参与淋巴细胞归巢,此外

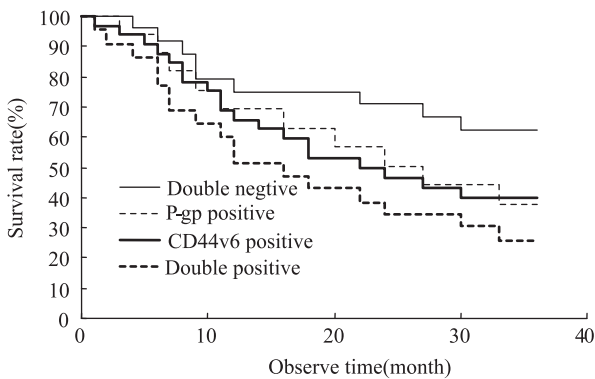


图 3 胃癌患者术后三年生存率曲线

Figure 3 Survival curves of gastric carcinoma patients in three years after operation

还可通过黏着斑激酶的磷酸化而抑制细胞凋亡^[7]。CD44 按外显子表达方式不同分为两种类型:一种是标准型 CD44(CD44s),另一种是 V 区变异型 CD44(CD44v),V 区外显子有 10 个,由于参与拼接的 V 区外显子可多少不一,从而使转录片段长短不同,便产生了多种变构体,目前发现的 CD44v 至少有 10 种(V1~V10)。近年研究表明,变构体 CD44v6 参与了胃肠道肿瘤的转移机制,其阳性表达与胃癌进展程度有关^[8-9],故在判断胃癌恶性程度、预测转移和预后上具有应用价值。本组结果表明:CD44v6 在胃癌中阳性表达率为 58.76%,在有淋巴结转移及血管侵犯组中阳性率明显高于无淋巴结转移及无血管侵犯组;在病变直径 ≥ 5 cm 组中的阳性表达明显高于病变直径 < 5 cm 组;在临床分期中 III、IV 期的阳性表达率明显高于 I、II 期组。

在两者表达的关系上,Yu^[10]应用流式细胞仪检测了 P-gp 和 CD44 在胃癌中的表达情况,结果显示在 P-gp 阳性表达组中 CD44 的表达水平明显高于 P-gp 阴性组。许沈华^[11]用同样的方法检测了两者在食道癌的表达,也显示出两者表达的正相关性。最近,Miletti-Gonzalez^[12]利用耐药癌细胞株研究时发现,P-gp 和 CD44s 有共免疫沉淀现象;且将 CD44s 转染肿瘤细胞后可诱导 MDR-1 的表达,并产生功能性的 P-gp;而利用 RNA 干扰抑制 P-gp 表达则降低了细胞的迁移能力,但在仅有 P-gp 表达而 CD44s 表达阴性的细胞株中,P-gp 表达的增加并不能增加其迁移力;说明此两种蛋白通过相互作用而促进了肿瘤细胞的迁移及侵袭能力。但有的研究结果与上述报道并不一致,Molinari^[13]发现在黑色素瘤中随着 P-gp 表达增多,CD44 等黏附分子的表达下调。本文结果显示 P-gp 和 CD44v6 的表达不仅与胃癌的生物学行为有关,同时两者的表达具有明显的正相关关系,且两者均阳性者术后三年生存率明显降低。提示两者在促进胃癌的生长和转移过程中可能起协同作用,这也是 P-gp 表达与肿瘤进展程度及预后有关的另一重要原因。因此,联合检测两者有助于判断胃癌的预后。

参考文献:

- [1] Meschini S, Calcabrini A, Monti E, et al. Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(5): 615-628.
- [2] Arancia G, Molonari A, Calcabrini A, et al. Intracellular P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells[J]. *Ital J Anat Embryol*, 2001, 106(2 Suppl 1): 59-68.
- [3] Ruefli AA, Tainton KM, Darcy PK, et al. P-glycoprotein inhibits Caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation[J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(11): 1266-1272.
- [4] Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L, et al. Multidrug resistance transporters and modulation[J]. *Curr Opin Oncol*, 2000, 12(5): 450-458.
- [5] Yang JM, Vassil A, Hait WN. Involvement of Phosphatidylinositol-3-Kinase in membrane ruffling induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant carcinoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(5): 959-966.
- [6] Yang JM, Xu Z, Wu H, et al. Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(6): 420-427.
- [7] Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, et al. CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect[J]. *FEBS Lett*, 2002, 528(1-3): 101-108.
- [8] Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2B): 1581-1588.
- [9] Chen JQ, Zhan WH, He YL, et al. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(6): 776-782.
- [10] Yu CD, Xu SH, Ling YT, et al. Study on the relationship between P-glycoprotein and CD44 expression in gastric carcinoma [J]. *Chin-Ger J Clin Oncolog*, 2006, 5(4): 253-256.
- [11] 许沈华, 凌雨田, 朱赤红, 等. 食管癌细胞 P-糖蛋白与 CD44 表达的相关性研究[J]. *全科医学临床与教育*, 2005, 3(1): 18-21.
- [12] Miletti-Gonzalez KE, Chen S, Muthukumaran N, et al. The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(15): 6660-6667.
- [13] Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, et al. What is the relationship between P-glycoprotein and adhesion molecule expression in melanoma cells? [J]. *Melanoma Res*, 2002, 12(2): 109-114.

[编辑:安 凤;校对:贺 文]