

甲状腺乳头状癌中 CD44v6 和 p16 基因表达的原位杂交研究

谷化平¹, 尚培中², 周翠玲³

摘要:目的 探讨 CD44v6 和 p16 基因表达与甲状腺乳头状癌(PTC)侵袭转移的关系。方法 应用原位杂交方法,检测 46 例 PTC 组织中 CD44v6 和 p16 的 mRNA 表达。结果 PTC 组织中 CD44v6 和 p16 的 mRNA 表达阳性率分别为 76.1% 和 60.9%, 均与 PTC 侵袭转移相关($P < 0.05$); CD44v6mRNA 与 p16mRNA 表达呈负相关($r = -0.36$, $P < 0.005$)。结论 CD44v6 和 p16 基因表达可作为判断 PTC 预后的参考指标。

关键词:甲状腺肿瘤;侵袭;转移;CD44v6 基因;p16 基因

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2002)06-0453-02

Expression of CD 44v6 and p16 gene in papillary thyroid carcinoma studied by insitu hybridization

GU Hua -ping, SHANG Pei -zhong, ZHOU Cui -ling

Department of Pathology, PLA 251st Hospital, Zhan gjiakou 075000, China

Abstract: Objective To investigate the correlation of CD44v6 and p16 gene expression with the potential of invasion and metastasis in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** Insitu hybridization method was used to detect CD44v6 mRNA and p16 mRNA expression in 46 cases of PTC. **Results** The positive rates of CD44v6 mRNA and p16 mRNA in PTC were 76.1% and 60.9% respectively. There was a positive correlation between CD44v6 mRNA expression and tumor invasion and metastatic potential in PTC ($P < 0.05$), and a reverse correlation between p16 mRNA expression ($P < 0.05$). Moreover, there was a reverse correlation between the CD44v6 mRNA and p16 mRNA expression in PTC ($r = -0.36$, $P < 0.005$). **Conclusion** CD44v6 mRNA and p16 mRNA may be prognostic indicators in PTC.

Keywords: Thyroid neoplasm; Invasion; Metastasis; CD44v6 gene; p16 gene

细胞粘附分子 CD44v6 及 p16 基因的表达有助于细胞获得转移潜能^[1-5]。我们应用原位杂交方法,旨在从分子水平探讨这两种基因表达与甲状腺乳头状癌(Papillary thyroid carcinoma, PTC)侵袭转移的关系及预后意义。

1 材料与方

1.1 标本来源 取自解放军第 251 医院 1993 年~2001 年间手术切除的 PTC 标本 46 例。其中伴有浸润(包膜、血管或周围组织浸润)33 例,无浸润 13 例;有颈部淋巴结转移 30 例,无转移 16 例。取正常甲状腺组织(尸解标本)10 例作为对照观察。所有病例术前均未经任何治疗。

1.2 试剂来源 生物素化酪胺盐(BT)和催化信号放大(catalyzed signal amplification, CSA)试剂盒均为丹麦 Dako 公司产品。生物素化抗 DIG 二抗为德国宝灵曼

公司产品。CD44v6cDNA 和 p16cDNA 质粒(PGEH-42)由第二军医大学长海医院倪灿荣教授惠赠。

1.3 方法

1.3.1 杂交前准备 新鲜组织标本用 4% 多聚甲醛固定 24h, 新鲜系列乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4μm 厚连续切片,贴在涂有 1% 多聚赖氨酸切片粘合剂的载玻片上,58℃ 烤片 24h。常规二甲苯脱蜡水化,PBS 液冲洗,20μg/ml 蛋白酶 K37℃ 温育 20 min,PBS 洗 3 次 ×3min,0.2 M ×柠檬酸盐缓冲液(SSC)洗 2 次 ×5min。用 4% 多聚甲醛后固定 10 min,系列乙醇脱水,PBS 洗 3 次 ×3min,0.2 M ×SSC 洗 2 次 ×5min。

1.3.2 杂交和检测 按文献 CSA 方法^[6]操作。H₂O₂-DAB 显色。

1.3.3 对照设计 原位杂交阳性对照均按 Gen Point 试剂盒内配置阳性切片为标准。杂交液中不加探针结果为阴性。

1.3.4 结果判断 原位杂交染色阳性呈棕黄色。根据染色强度及显色癌细胞比例将染色结果分为(-)、(+),

收稿日期:2002-01-28; 修回日期:2002-04-12

作者单位:1.075000 张家口,解放军第 251 医院病理科,2. 普外科;3. 张家口医学院一附院普外科

(++)级。统计学处理采用²检验和相关分析。

2 结果

2.1 CD44v6mRNA 和 p16mRNA 表达与 PTC 浸润转移的关系 染色结果显示,CD44v6mRNA 呈 PTC 细胞膜和细胞质阳性,10 例正常甲状腺组织未见阳性染色;p16mRNA 呈 PTC 细胞核阳性,10 例正常甲状腺滤泡上皮细胞质均呈 p16 蛋白不同程度阳性反

应。46 例 PTC 组织中,CD44v6mRNA 和 p16mRNA 表达阳性率分别为 76.1% (35/46)和 60.9% (28/46)。其中 CD44v6mRNA 表达阳性率在伴有浸润和颈部淋巴结转移的 PTC 组织中均显著高于无浸润和无颈部淋巴结转移者($P < 0.05$);p16mRNA 表达阳性率在伴有浸润和颈部淋巴结转移的 PTC 组织中均显著低于无浸润和无颈部淋巴结转移者($P < 0.05$),见表 1。

表 1 CD44v6mRNA 和 p16mRNA 表达与 PTC 浸润转移的关系

组别	n	CD44v6mRNA 表达			阳性数 (%)	p16 mRNA 表达			阳性数 (%)
		-	+	++		-	+	++	
浸润									
有浸润	33	5	9	19	28(84.8)	17	7	9	16(48.5)
无浸润	13	6	2	5	7(53.8)	1	1	11	12(92.3)
转移									
有转移	30	4	8	18	26(86.7)	16	6	8	14(46.7)
无转移	16	7	3	4	9(56.3)	2	2	12	14(87.5)

注:与无浸润比较, $P < 0.05$; 与无转移比较, $P < 0.05$

2.2 CD44v6mRNA 与 p16mRNA 表达之间的关系 在 CD44v6mRNA 阳性表达的 35 例 PTC 中,p16mRNA 阳性表达者为 17 例(48.6%),CD44v6mRNA 阴性的 11 例中,p16mRNA 均为阳性者表达(100%)。PTC 组织中 CD44v6mRNA 表达与 p16mRNA 表达呈显著负相关性($r = -0.36, P < 0.005$)。

3 讨论

CD44 是一种分布极广泛的细胞表面跨膜糖蛋白,属细胞表面的粘连分子,主要参与细胞-细胞,细胞-基质之间的特异性粘连过程。CD44 作为淋巴细胞的归巢受体和透明质酸酶的主要受体,能连接细胞基质中的纤维连接蛋白、层粘蛋白、型胶原和透明质酸分子以及骨架蛋白相结合,参与细胞的伪足形成,引起细胞形态和游动性改变,因此,CD44 能直接参与肿瘤的浸润和转移^[1,2]。CD44v6 是 CD44 的一种拼接变异体,其表达可改变肿瘤细胞表面 CAM 的构成和功能,有助于肿瘤细胞获得转移潜能。近年来较多研究表明,CD44v6 的过量表达与多种人体恶性肿瘤,如结肠癌、胃癌、乳腺癌及恶性黑色素瘤等许多肿瘤的发生发展、侵袭和转移密切相关^[3]。p16 基因是 1994 年分离鉴定出的一种新型抑癌基因,因其对多种肿瘤有抑制作用而被命名为多肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor 1, MTS1)^[4]。研究发现,p16 基因及其产物在人类许多原发肿瘤和细胞株发生缺失,并导致肿瘤细胞无限制生长^[5]。本研究结果显示,CD44v6mRNA 高表达和 p16mRNA 低表达均与 PTC 的浸润和转移密切相关。提示,CD44v6 具有促进 PTC 浸润转移;p16 具有抑制 PTC 浸润转移的作用,检测两种基因的表达对预测 PTC 的生物学行是一种有价值的指标。

水平变化的多阶段过程。在其过程中不同功能的基因对细胞所产生的影响协同地增加了细胞的癌变,其中细胞粘附分子在此过程中起着关键性作用。它们不仅与细胞凋亡乃至肿瘤发生、浸润及转移等密切相关,而且也受细胞各种生物因子变化影响,参与细胞间的信息传递、或成为细胞内的第二信使,并行使辅助分子功能,可将胞外信息传至细胞质及细胞核,调控基因表达^[7]。本研究发现,在 PTC 组织中 CD44v6mRNA 表达与 p16mRNA 表达呈明显负相关性。提示在 PTC 的侵袭转移过程中,CD44v6 与 p16 具有负调节的协同作用可能。深入探讨它们之间的作用机理,将对阐明和阻断肿瘤侵袭转移的形成具有重要价值。

参考文献:

- [1] EmakG, Jemin gsT, RobinsonL, et al. Restricted pattern of CD44 variant exon expression in human papillary thyroid carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56 (5): 1037-1039.
- [2] KainzC, TemplerC, KohlsbergerP, et al. Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastases of cervical cancer[J]. Int J Cancer, 1997, 74 (2): 185-189.
- [3] KarfmannM, HeiderKH, SinnHP, et al. CD44 variant expression in primary breast cancer and its effect on survival[J]. Lancet, 1995, 34 (5): 615-618.
- [4] KambA, OraisNA, Weaver-FeldhausJ, et al. Cell cycle regulator p16: a potential tumor suppressor gene in human cancer[J]. Science, 1994, 264 (2): 436-438.
- [5] OkamotoA, DemetrickDJ, SillarsEA, et al. Mutations and altered expression of p16 (INK4) in human cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 81 (4): 11045-11048.
- [6] 倪灿荣, 朱明华, 马大烈. 催化信号放大系统在原位杂交检测中的应用研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2000, 9 (1): 110-111.
- [7] 周同, 宋长玲. 细胞粘附分子研究的某些进展[J]. 生命科学, 1994, 6 (3): 27-31.

(刘红武校对)

