

骨桥蛋白与 CD44v6 在结肠腺癌中的表达及其临床意义

张晔¹, 卞永生², 刘进忠²

(1. 承德医学院, 河北 承德 067000; 2. 保定市第一医院普外科, 河北 保定 071000)

摘要: **目的** 研究结肠腺癌组织中骨桥蛋白和 CD44v6 的表达及其意义。**方法** 用免疫组化法检测 80 例结肠腺癌组织 (有淋巴结转移 32 例, 无淋巴结转移 48 例)、30 例结肠腺瘤组织、20 例距结肠肿物 (息肉、腺瘤、肿瘤等) 5 cm 以上的正常组织中骨桥蛋白和 CD44v6 的表达水平, 并分析骨桥蛋白与 CD44v6 在结肠腺癌中表达的相关性。**结果** 在结肠腺癌组织及其周围淋巴结中, 骨桥蛋白和 CD44v6 的表达水平显著高于正常结肠组织和结肠腺瘤组织的表达水平 ($P<0.05$), 在有转移的结肠腺癌中骨桥蛋白与 CD44v6 的表达水平显著高于无转移的结肠腺癌组织 ($P<0.05$)。结肠腺癌组织中骨桥蛋白的表达与 CD44v6 的表达具有一致性 ($P<0.05$)。**结论** 骨桥蛋白和 CD44v6 与结肠腺癌的发生、发展相一致, 骨桥蛋白与 CD44v6 联合检测对于明确结肠腺癌发展及预后提供一定依据, 对临床诊治具有一定指导意义。

关键词: 结肠腺癌; 肿瘤转移; 骨桥蛋白; CD44v6; 免疫组织化学

中图分类号: R36

文献标志码: A

文章编号: 1674-490X(2014)01-0024-04

Expression of osteopontin and adhesion molecule CD44v6 in colon adenocarcinoma and their clinical significance

ZHANG Ye¹, BIAN Yongsheng², LIU Jinzhong²

(1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. General Surgery, The First Hospital of Baoding, Baoding 071002, China)

Abstract: **Objective** To investigate expression of osteopontin (OPN) and adhesion molecule CD44v6 in colon adenocarcinoma and their clinical significance. **Methods** 80 cases of colon cancer tissue were detected by immunohistochemical methods (with lymph node metastasis in 32 cases, 48 cases without lymph node metastasis), 30 cases of colorectal adenoma, 20 cases from colon tumor (polyp, adenoma, cancer, etc.) 5 cm above normal tissue osteopontin and CD44v6 expression levels were examined to analyze the correlation of osteopontin and CD44v6 expression in colon adenocarcinoma. **Results** Adenocarcinoma of the colon and surrounding lymph nodes, osteopontin and CD44v6 expression were significantly higher than that of normal colon tissue and colonic adenoma expression levels ($P<0.05$), colon adenocarcinoma with metastasis in osteopontin CD44v6 protein expression levels were significantly higher than that of non-metastatic colon adenocarcinoma ($P<0.05$). Colon adenocarcinoma osteopontin expression and expression of CD44v6 were in a state of consistency ($P<0.05$). **Conclusion** OPN-CD44v6 with colon adenocarcinoma, developing consistent, osteopontin and CD44v6 joint detection for colon cancer development and prognosis explicitly provide a basis for clinical diagnosis and treatment, which has a certain significance in clinical practices.

收稿日期: 2013-11-20

作者简介: 张晔 (1981—), 男, 河北邢台人, 在读硕士, 主要从事普外科的临床和科研。E-mail: 63435382@qq.com

通信作者: 卞永生 (1963—), 男, 河北衡水人, 教授, 硕士生导师, 主要从事肝胆外科的临床和科研。

E-mail: 630067812@qq.com

Key words: colon adenocarcinoma; tumor metastasis; osteopontin; CD44v6; immunohistochemistry

结肠癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤之一，近年来中国结肠癌的发病率及病死率均逐渐上升，复发及转移是结肠癌致死的主要原因。而结肠癌的病理表达中结肠腺癌占大部分比例。骨桥蛋白（osteopontin, OPN）是一种具有多种功能分泌型钙结合磷酸化糖蛋白，与肿瘤细胞的转化、浸润和转移相关，并通过与整合素受体、CD44 受体的结合来调节细胞基质相互作用和信号转导，使细胞无限制增殖，形成肿瘤^[1]。CD44 是分布极为广泛的细胞表面跨膜蛋白，同时是一条糖基化的跨膜多糖链。CD44v6 作为其配体在这个过程中起到重要作用。目前，OPN 与 CD44v6 在结肠腺癌组织中表达状况的文献较少。对 OPN、CD44v6 在结肠腺癌中的表达水平进行研究，旨在初步了解其临床意义。

1 资料和方法

1.1 资料

收集保定市第一医院 2005 年 1 月至 2012 年 12 月经病理学诊断证实为结肠腺癌标本 80 例，其中无淋巴结转移 48 例，有淋巴结转移 32 例。其中男 47 例，女 33 例；年龄 35~80 岁，平均年龄 58 岁。所有选取标本术前均未行任何相关治疗。结肠腺癌标本均在癌灶中央取材，中性福尔马林固定，常规石蜡包埋，4 μm 厚度连续切片。另取距结肠肿物（息肉、腺瘤、肿瘤等）5 cm 以上的正常结肠组织 20 例和结肠腺瘤组织 30 例作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

OPN 抗体（兔抗人单克隆抗体，上海江莱生物科技有限公司），工作液浓度为 1:150；CD44v6（即用型，兔抗人单克隆抗体）；免疫组化试剂盒。

1.2.2 实验过程

免疫组化（SP）法，标本石蜡切片，厚度 4 μm ，常规固定染色，DAB 显色，苏木素复染细胞核，中性树胶封片。PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.3 阳性结果判定

OPN 主要分布于细胞的细胞质中，DAB 染色为棕黄色。CD44v6 于细胞膜染色呈棕黄色。判断标准根据，按切片中阳性细胞数占细胞总数的比例计分：0 分，无阳性细胞显染色；1 分，阳性细胞 <25% 染色；2 分，阳性细胞 25%~50% 染色；3 分，阳性细胞 >50% 染色。阳性反应由两位高年资病理师独立观察每张切片后一起作出判断。

1.3 统计学处理

实验数据的统计学处理通过 SPSS17.0 统计软件完成，采用 Spearman 等级相关分析 OPN、CD44v6 的相关性。计数资料采用 χ^2 检验，当某一个理论数 $1 < T \leq 5$ 时，须对 χ^2 进行连续性校正，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组织中 OPN 和 CD44v6 的表达

OPN、CD44v6 在细胞中表达定位观察：免疫组化结果显示，OPN 主要表达于癌细胞胞质中，呈强

染色或中等染色，巢状或片状分布，部分腺腔上皮细胞和血管内皮细胞亦呈中等染色，间质细胞中无或弱染色；而 CD44v6 主要在癌细胞胞膜上表达，胞质内偶见棕黄色颗粒，间质中几乎无阳性细胞。OPN 在 80 例结肠腺癌组织中 58 例表达，30 例结肠腺瘤组织中和 20 例正常结肠组织分别有 7 例和 0 例阳性表达。阳性表达率分别 72.5%、23.3% 和 0.0%。CD44v6 在结肠腺癌组织中 64 例表达，在结肠腺瘤组织中 11 例阳性表达，在正常结肠组织中 1 例阳性表达。阳性表达率分别是 80.0%、25.6% 和 5.0%，见表 1。在正常结肠组织和结肠腺瘤组织中 OPN 表达差异有统计学意义 ($\chi^2=5.426$, $P=0.02$)，在正常结肠组织和结肠腺癌中 OPN 表达差异有统计学意义 ($\chi^2=34.524$, $P<0.001$)，在结肠腺瘤和结肠腺癌中 OPN 表达差异有统计学意义 ($\chi^2=22.818$, $P<0.001$)。在正常结肠组织和结肠腺瘤组织中 CD44v6 表达差异有统计学意义 ($\chi^2=6.579$, $P=0.01$)，在正常结肠组织和结肠腺癌中 CD44v6 表达差异有统计学意义 ($\chi^2=39.560$, $P<0.001$)，在结肠腺瘤和结肠腺癌中 CD44v6 表达差异有统计学意义 ($\chi^2=18.885$, $P<0.001$)。

表 1 OPN、CD44v6 在不同结肠组织中的表达

组别	n	OPN		CD44v6	
		阳性	阳性表达率/%	阳性	阳性表达率/%
正常	20	0	0	1	5.0
腺瘤	30	7	23.3	11	25.6
结肠癌	80	58	72.5	64	80.0

2.2 结肠腺癌中骨桥蛋白和 CD44v6 与临床及病理特征之间的关系

经统计学分析，OPN 与 CD44v6 的表达与结肠腺癌的淋巴结转移差异有统计学意义 ($P<0.05$)，见表 2。

表 2 结肠腺癌中 OPN 和 CD44v6 与淋巴结转移的关系

淋巴结转移	n	OPN		CD44v6	
		阳性	阳性率/%	阳性	阳性率/%
是	32	28	87.50 [*]	30	93.75 [#]
否	48	30	62.50	34	70.83

^{*} $\chi^2=0.07524$, ^{*} $P=0.014$; [#] $\chi^2=6.44613$, [#] $P=0.012$ 。

2.3 结肠腺癌中 OPN 与 CD44v6 表达的相互关系

80 例结肠腺癌中 OPN 与 CD44v6 均阴性表达为 8 例，均阳性表达为 56 例。OPN 阴性且 CD44v6 表达阳性的 14 例。OPN 阳性且 CD44v6 表达阴性的 8 例。通过 Spearman 相关分析，结肠腺癌中 OPN 表达与 CD44v6 的表达存在正相关，随着结肠腺癌中 OPN 阳性表达的增强，CD44v6 的阳性表达逐渐增高 ($r=0.252$, $P<0.05$)。

3 讨 论

OPN 是近几年来发现的一种与恶性肿瘤发展、转移有关的磷酸化蛋白。研究表明，OPN 的过量表达与肝癌、胆囊癌、胃癌、前列腺癌等肿瘤恶性程度、转移、早期复发等有密切关系，OPN 阳性表达患者的预后比阴性表达患者生存率低^[2-3]；原发肿瘤在促进转移方面是多方面协同发生的，其中一方面是分泌一些如 OPN 的因子促进肿瘤的外侵及转移^[4]。在肝癌的研究^[5]中发现，OPN mRNA 的过表达与肿瘤的分化、分级及早期复发有密切关系，并且可以作为判断预后的指标和预测早期复发的标志。体外试验^[6]发现，大部分癌细胞株和癌组织中均有 OPN 高表达，随着癌细胞株侵袭能力的增强，细胞中 OPN 信使 RNA 的表达量也相应增加。本研究证明，OPN 表达与结肠腺癌有无淋巴结转移有相关性；有淋巴

结转移者 OPN 的阳性表达率比无淋巴结转移者升高，证明 OPN 的高表达与结肠腺癌的病变发展及预后密切相关。而且本研究证明，OPN 的表达与取材标本的年龄、性别及肿瘤大小无关，与 Pan 等^[5]在 OPN 肝癌中的研究结论相一致。

CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族，其在细胞外基质中与透明质酸结合，维持组织或器官的结构，促进细胞浸润和介导细胞迁移。CD44 广泛分布于细胞表面，是细胞与细胞、细胞与细胞外基质相互识别和作用的分子基础。CD44 又是一种特异性淋巴细胞归巢受体，在多种高转移性肿瘤细胞上表达，CD44 阳性的瘤细胞可能因获得类似淋巴细胞成分的伪装，而容易进入淋巴结形成转移灶。CD44 基因与许多肿瘤的浸润和转移有关^[7]。研究^[8]表明，CD44 表达与结直肠癌发生、淋巴结转移和患者预后密切相关。CD44 因存在多种编码的外显子而存在多种变异型表达。有研究^[9]表明，含有 v6 外显子的 CD44 变异型表达与结肠癌的浸润及转移密切相关。研究发现，CD44v6 在结肠腺瘤和无转移结肠腺癌组织中及有转移的结肠腺癌中的阳性表达率逐步升高，与 OPN 表达具有一致性。

OPN 通过其特有的 RGD 结构与整合素结合，通过非依赖 RGD 结构的方式与 CD44 结合。双变量相关性分析显示，OPN 和 CD44v6 的表达有明显相关性，说明两者在结肠腺癌的侵袭转移中有相互促进作用。有研究发现，其发生机制可能是 OPN 与 CD44v6 相结合后促使肿瘤细胞发生趋化黏附和浸润转移，并导致肿瘤的发生、发展，并促进其转移。其结果与 Sun 等^[10]研究的 OPN 和 CD44v6 结合，是一种新型非小细胞肺癌患者根治术预后的标志物相一致。但其确切的发生机制还有待于进一步研究。综上所述，联合检测 OPN 和 CD44v6 在结肠腺癌中的表达有助于临床对判断结肠腺癌临床治疗及愈后和复发等具有参考价值。

参考文献：

- [1] LEE J L, WANG M J, SUDHIR P R, et al. Osteopontin promotes integrin activation through outside-in and inside-out mechanisms: OPN-CD44V interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 2089–2097.
- [2] MI Z, GUO H, WAI P Y. Differential osteopontin expression in phenotypically distinct sub clones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45): 46659–46667.
- [3] GUARINO V, FAVIANA P, SALVATORE G, et al. Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(9): 5270–5278.
- [4] GEIGER T R, PEEPER D S. Metastasis mechanisms[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 193–308.
- [5] PAN H W, OU Y H, PENG S Y, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2003, 98(1): 119.
- [6] TUCK A B, CHAMBERS A J. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies[J]. *Mammary Gland Neoplasia*, 2001, 6(4): 419–429.
- [7] LOUDERBOUGH J M, BROWN J A, NAGLE R B, et al. CD44 promotes epithelial mammary gland development and exhibits altered localization during cancer progression[J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(8): 771–781.
- [8] 蔡慧云, 于波, 白雪. CD44在结直肠癌病灶及转移淋巴结中的表达及临床意义[J]. *临床军医杂志*, 2012, 40(4): 851–853.
- [9] HSIEH H F, YU J C, HO L I, et al. Molecular studies into the role of CD44 variants in metastasis in gastric cancer[J]. *Mol Pathol*, 1999, 52(1): 25–28.
- [10] SUN Bingsheng, LI Yue, ZHANG Zhenfa, et al. Osteopontin combined with CD44v6, a novel prognostic biomarker in non-small cell lung cancer undergoing curative resection[J]. *Ann Thorac Surg*, 2013, 96(6): 1943–1951.

(责任编辑：刘俊华)