CD44 基因在肠息肉和结直肠癌中的表达及其临床意义

Expression of *CD44* in Patients with Intestinal Polyps and Colorectal Cancer and Its Clinical Significance // *CAI Ying-bin, WANG Yan, GUO Wen-jia, et al.*

蔡迎彬[1],王　岩[2],郭文佳[2],李　可[1]

(1. 新疆医科大学第五附属医院,新疆 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆医科大学附属肿瘤医院,新疆 乌鲁木齐 830011)

摘　要:[目的] 检测 *CD44* 基因在肠息肉和结直肠癌中的表达,探讨其对结直肠肿瘤癌变的临床意义。[方法] 采用 Real-time PCR 方法检测 *CD44* 在 82 例结直肠增生型炎性息肉、腺瘤性息肉和癌变息肉组织中的表达。[结果] 增生型炎性息肉组织中 *CD44* mRNA 相对表达量为 0.0006±0.0001,腺瘤性息肉组织中为 0.0019±0.0006,癌变息肉组织中为 0.0073±0.0016,三组相比,*P* 均<0.05。有淋巴结转移者与无淋巴结转移者肿瘤组织中 *CD44* mRNA 表达量相比,*P*<0.05;TNM 分期Ⅲ+Ⅳ者与Ⅰ+Ⅱ者肿瘤组织中 *CD44* mRNA 表达量相比,*P*<0.05。相关性分析结果显示,*CD44* 的表达强度与肠息肉癌变进展呈正相关(*r*=0.562,*P*<0.0001)。[结论] *CD44* 基因在结肠癌组织中表达异常升高,提示 *CD44* 可能与结肠癌的发生、发展有密切关系。

主题词:CD44;结直肠息肉;结直肠肿瘤;Real-time PCR
中图分类号:R735.35　　**文献标识码**:B
文章编号:1671-170X(2016)02-0152-03
doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2016.02.B015

结直肠癌是人类常见的恶性肿瘤。近年来,随着我国饮食西化,结直肠癌已成为我国癌症的第 3 死因,且发病人群逐渐趋向年轻化[1]。肠息肉是一种肠腔内黏膜表面的隆起病变,大量的研究将管状腺瘤息肉及绒毛状腺瘤息肉视为癌前病变,且证实大肠息肉与肠癌的发生具有密切关系。但目前关于大肠息肉发生癌变的具体机制尚不清楚,且对于两者之间的演进及肿瘤发生发展的规律也尚未阐明。因此,从细胞和分子生物学水平研究肠息肉发生规律及原因,对于肠息肉相关肿瘤的早期诊断与寻找新的治疗方法和新的靶点具有非常重要的意义。白细胞分化抗原分化簇第 44 号(CD44)是由单一基因所编码的具有高度异质性的单链细胞膜表面糖蛋白家族,位于人类 *CD44* 基因的 11 号染色体短臂上(11p13),其具有重要的生物学功能,研究证实,CD44 与细胞运动、肿瘤发生、浸润和转移关系密切[2]。许多类型的恶性肿瘤存在不同程度 CD44 分子表达,且与肿瘤的生长、发展、转移和预后密切相关[3,4]。本研究利用 Real-time PCR 检测结肠直肠息肉、腺瘤和癌组织中 *CD44* mRNA 含量,并结合患者临床病例资料,综合分析 CD44 对结肠癌发生发展的作用,为预测结直肠癌的浸润转移潜能以及判断患者的预后提供理论依据。

基金项目:新疆医科大学创新基金(XJC2013198)
通讯作者:李　可,主任医师,副教授,硕士生导师,学士;新疆医科大学第五附属医院消化内科,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市河南路 118 号(830011);E-mail:42912844@qq.com
收稿日期:2015-10-09;**修回日期**:2015-11-05

1　资料与方法

1.1　一般资料

收集 2014 年 1 月至 2014 年 12 月来新疆医科大学第五附属医院消化内科住院及门诊患者共 82 例,行结肠镜检查,发现息肉的患者则采用活检钳钳取息肉组织 1~2 块,立即置入液氮速冻,半小时后转入-80℃冰箱保存。其中男性 56 例,女性 26 例。年龄 37~67 岁,平均(56±0.52)岁。其中腺癌 23 例,腺瘤性息肉 16 例(包括管状腺瘤 10 例,绒毛状腺瘤 6 例),炎性增生型息肉 31 例以及正常黏膜 12 例。

1.2　试剂和仪器

RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自 Promega 公司,PCR 即用试剂盒购自上海生物工程公司,琼脂糖、溴化乙锭(EB)、氯仿、异戊醇、无水乙醇、异丙醇由新疆医科大学基础医学院科研中心提供,PCR 扩增仪(7500fast)购自美国 AB 公司;全波长分光光度计(Multiskan Go)购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.3　方　法

1.3.1　总 RNA 的提取与 cDNA 合成

按 Trizol 法总 RNA 提取试剂盒说明进行。取 1μg 所提取组织的 RNA,在全波长分光光度计下测定 OD_{260}、OD_{280} 及其比值,以确定所提取 RNA 的浓度和纯度在 1.8~2.1 左右,同时取 5μl RNA 在 1.2%的琼脂糖凝胶电泳,观察所提取 RNA 的 18S、28S 条带,以确定提取的 RNA 的质量。

1.3.2　cDNA 合成及 PCR 反应

取稀释的总 RNA 标本 1μl 加 oligo(dt)引物 1μl,双蒸水 9μl,混匀后置于 72℃ 10min,取出后置于冰上逐次加入 $MgCl_2$ 24μl,dNTP 2μl,10 倍反应缓冲液 2μl,RNA 酶抑制剂 0.5μl,逆转录酶 0.5μl (5U),混匀后置于 42℃ 1h,用 95℃ 5min 终止反应,取出后置于冰上,加 80μl 双蒸水,得到 100μl 逆转录产

物。PCR 扩增体系反应体系为 20μl,其中含逆转录标本2μl,各基因上下引物(10μg/L)各 0.25μl,2.5Master mix 9μl。以$2^{-\triangle\triangle cT}$分析目的基因相对表达量(Table 1)。

Table 1 The primer sequences of two genes,PCR products amplified PCR fragment size and conditions

Gene	Primer sequences	Size(bp)	RT-PCR procedure
GAPDH	GCGGGCTCTCCAGAACATCA TAGCCCCAGCGTCAAAGGTG	226	94℃ 40s→59℃ 50s→72℃ 60s, 40 cycles;72℃ 10min
CD44	ATGTTAAACTCCGCGTCATA AGCATACAGGAAGTTAATCC	173	

1.3.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行统计学分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,多组比较采用方差分析,相关性分析采用秩相关。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 增生型炎性息肉、腺瘤性息肉和癌变息肉组织 *CD44* 表达比较

增生型炎性息肉组织中 *CD44* mRNA 相对表达量为 0.0006±0.0001,腺瘤性息肉组织中为 0.0019±0.0006,癌变息肉组织中为 0.0073±0.0016,三组相比,$F=336.2477$,$P=0.000$。

2.2 *CD44* mRNA 表达与结直肠癌临床病理参数的关系

有淋巴结转移者与无淋巴结转移者肿瘤组织中 *CD44* mRNA 表达量相比,$P<0.05$;TNM 分期Ⅲ+Ⅳ者与 I+Ⅱ者肿瘤组织中 *CD44* mRNA 表达量相比,$P<0.05$(Table 2)。

2.3 肠息肉的病理类型与 *CD44* mRNA 表达水平的相关性分析

相关性分析结果可见,*CD44* 的表达量与肠息肉癌变进展呈正相关($r=0.562$,$P<0.0001$)(Table 3)。

Table 3 The correlation analysis between intestinal polyps pathological type with *CD44* mRNA expression level

Pathological types	N	*CD44* mRNA expression level
Inflammatory hyperplastic polyps	31	0.0006±0.0001
Adenomatous polyps	16	0.0019±0.0006
Cancerous polyps	23	0.0073±0.0016

3 讨 论

CD44 是一种分布广泛的跨膜糖蛋白分子，具有激活淋巴细胞、参与信号传递、促进细胞间粘附等多种生物学功能。Kim 等[5]研究认为在 *K-ras* 基因突变相关的结肠癌进展过程中,*CD44* 基因的表达会逐渐上调,证实其可作为肿瘤发生早期检测的分子标志物。Ishida 等[6]研究发现 CD44 的同种型变异体 CD44v6 在大肠癌的形成与转移中最有重要的意义，CD44v6 在正常的结肠细胞中不表达，而在肿瘤发展的早期阶段表达开始上调。丁秀杰等[7]研究发现结肠癌组织中 *CD44* mRNA 含量明显高于癌旁组织。在我们的研究中也证实了 *CD44* 在增生型炎性息肉织中表达较低，随着息肉类型从增生型到腺瘤性演进，*CD44* 的表达逐渐上调，尤其在腺瘤性息肉和腺癌组织中。CD44 参与肿瘤迁袭过程的机制可能为:CD44 是一种透明质酸、骨桥蛋白受体,可以与基底膜、细胞外间质的透明质酸和骨桥蛋白相结合,影响细胞的形态和运动,有利于肿瘤的浸润和转移；其次表达 CD44 的细胞能够模拟淋巴归巢导致肿瘤细胞可逃避免疫防御;CD44 还能激活细胞体内某些信号通路而分泌蛋白水解酶,以此加速细胞外基质的降解[8]。

陈仕才等[9]研究发现 *CD44* 基因与结直肠癌患者的性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和肿瘤分化等因素无关。安慧敏[10]研究发现 CD44 的表达与肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移存在相关性。我们的研究表明 CD44 与结直肠癌患者的 TNM 分期及淋巴侵袭有关，与部分报道不一致,尚需扩大样本含量进一步研究。同时我们的研究表明作为 CD44 结直肠干细胞的标志，与结直肠癌的发生发展具有相关性。但目前对于 CD44 参与息肉发生癌变以及肿瘤发生发展的机制尚不明确,也有待于进一步深入分析。

综上所述,*CD44* 基因可作为肿瘤早期诊断的一种分子标志物。CD44 的表达与结直肠腺瘤、腺癌的转化及癌细胞的侵袭能力等密切相关。通过观察 CD44 在肿瘤发生中的演进过程和生物学行为对结直肠癌的早期预防、诊断及预后具有重要意义。

Table 2 The correlation analysis between *CD44* mRNA expression with clinicopathological parameters of colon cancer patients

Clinicopathological parameters	N	Twist mRNA	*t*	*P*	Fascin mRNA	*t*	*P*
Differentiation							
Poorly differentiated	6	0.0027±0.0013	1.2393	0.2371	0.0289±0.0059	0.2371	0.3272
Highly differentiated	9	0.0034±0.0009			0.0320±0.0057		
TNM staging							
Ⅰ,Ⅱ	5	0.0011±0.0005	4.5741	0.0005	0.0103±0.0024	8.2004	0.0000
Ⅲ,Ⅳ	10	0.0041±0.0014			0.0404±0.0111		
Lymph node metastasis							
No	5	0.0012±0.0004	6.7017	0.0000	0.0106±0.0020	14.9123	0.0000
Yes	10	0.0044±0.0014			0.0399±0.0041		

参考文献：

[1] Chai NL,Zhang WC,Wang YM,et al. Lgr5 and CD44 expressions in different types of intestinal polyps and colorectal cancer[J]. Southern Medical University,2013,33(7):972-976. [柴宁莉,张文成,王艳敏,等. Lgr5 和 CD44 在肠息肉和结直肠癌中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报,2013,33(7):972-976.]

[2] Misra S,Heldin P,Hascall VC,et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potentialtar-gets for cancer therapy[J]. FEBs J,2011,278(9):1429-1443.

[3] Spiegelberg D,Kuku G,Selvaraju R,et al. Characterization of CD44 variant expression in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Tumour Biol,2014,35(3):2053-2062.

[4] Zeilstra J,Joosten SP,Vermeulen L,et al. CD44 expression in intestinal epithelium and colorectal cancer is independent of p53 status[J]. PLoS One,2013,8(8):e72849.

[5] Kim H,Yang XL,Rosada C,et al. CD44 expression in colorectal adenomas is an early event occurring prior to K-ras and p53 gene mutation[J]. Arch Biochem Biophys,1994,310(2):504-507.

[6] Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma[J]. Surg Today,2000,30(1):28-32.

[7] Ding XJ,Zhang R. CD44 expression in colorectal cancer and its significance[J]. Modern Oncology,2014,22(6):1363-1364.[丁秀杰,张睿. CD44 基因在结肠癌组织中的表达及其意义[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(6):1363-1364.]

[8] Chen MX,Liu KP,Luo F. Expression changes of CD44v6 and E-cadherin in primary and metastatic colorectal cancer[J]. Shandong Pharmaceutical,2014,5(18):1-3.[陈梅香,刘坤平,罗枫. 结直肠癌原发灶及淋巴结转移灶中 CD44 V6、E-cadherin 蛋白表达变化及意义[J]. 山东医药,2014,5(18):1-3.]

[9] Chen SC,Song XM,Chen ZH,et al. Correlation analysis of CD133/CD44 expression in colorectal cancer tissues and 5-year survival rate in colorectal cancer patients[J]. Chinese Journal of Physiology Pathology,2011,27:883-889.[陈仕才,宋新明,陈志辉,等. CD133 和 CD44 在结直肠癌细胞中的表达及其与患者 5 年生存率的相关性分析[J]. 中国病理生理学杂志,2011,27:883-889.]

[10] An HM. The expression levels and significance of OPN and CD44 v6 in colorectal cancer and colorectal adenoma [J]. Zhejiang Journal of Traumatic Surgery,2014,19(1):26-28. [安慧敏. OPN 和 CD44 V6 在结直肠癌和结直肠腺瘤中的表达及意义[J]. 浙江创伤外科,2014,19(1):26-28.]

第一届消化道肿瘤钱塘峰会预告

为进一步提高消化肿瘤内科的诊治水平,推进肿瘤内科诊治科学化、规范化,由浙江省肿瘤医院和浙江省抗癌协会联合主办，肿瘤学杂志社承办的 2016 第一届消化道肿瘤钱塘峰会,将于 2016 年 3 月 11 日~13 日在杭州举行。

本次研讨会特别邀请了一批国内著名肿瘤学专家就消化道肿瘤相关领域作学术报告，同时还将进行病例分享及 MDT 多学科讨论。本研讨会将本着规范与前沿并重的原则,在重点介绍消化肿瘤内科规范化治疗的同时,亦将对相关领域的最新进展及同道们关心关注的热点难点问题进行对话与讨论。对全程参会者将按规定授予国家级Ⅰ类继续教育学分。

诚挚地邀请省内外的专家和同道能莅临杭州,相聚在美丽的西子湖畔,畅叙友情,交流心得,共同促进肿瘤内科医学事业的发展。

浙江省肿瘤医院
浙江省抗癌协会
肿瘤学杂志社
2016 年 1 月