

CD44v6 和 FOXD3 蛋白在胃癌组织中表达及意义

Expressions and Significance of CD44v6 and FOXD3 Proteins in Gastric Cancer Tissues

LIU Kun-long, YAO Yuan-chun, YANG Wei-qiang

刘坤龙¹, 姚元春¹, 杨伟强²

(1. 吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000; 2. 吉首大学第二附属医院, 湖南 吉首 416000)

摘要: [目的] 探讨 CD44v6、FOXD3 蛋白表达及其与胃癌临床病理特征的关系。[方法] 采用免疫组织化学方法检测 CD44v6、FOXD3 蛋白在人胃癌正常组织及癌旁组织中的表达情况, 分析 CD44v6、FOXD3 蛋白与患者性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、浸润深度等因素之间的关系。[结果] CD44v6、FOXD3 蛋白在胃癌组织中呈高表达, 阳性表达率分别为 80.5%、72.5%, 癌旁正常组织中呈低表达阳性率分别为 31.9%、31.0%, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01); CD44v6、FOXD3 表达与淋巴结转移、分化程度、浸润深度、肿瘤大小有关 (P 均 < 0.05)。[结论] CD44v6、FOXD3 蛋白在胃癌组织中呈高表达, 其可能可为胃癌的发生发展提供参考。

关键词: 胃肿瘤; CD44v6; FOXD3; 免疫组化

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2018)06-0624-03

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.06.B018

胃癌(gastric cancer)是常见的消化道恶性肿瘤之一,在我国居各类恶性肿瘤发病第 2 位^[1],目前临床上尚无可靠的胃癌预测方法,胃癌转移是患者死亡的主要原因。

CD44 是一种跨膜糖蛋白,是透明质酸酶的表面受体,参与细胞内微环境的调节,与胃癌的发生、发展及其生物学行为密切相关^[2-4]。FOXD3 抑制肿瘤生长和血管生成,使血管内皮生长因子(VEGF)的表达减少,被广泛的用于胚胎发育等方面的研究^[3]。

目前关于 CD44v6、FOXD3 蛋白与胃癌之间的关系研究较少,本研究采用免疫组织化学方法检测胃癌组织中两者的表达情况,分析其表达与胃癌临床病理特征间的关系,探讨 CD44v6、FOXD3 蛋白在胃癌发生发展中的作用,以期对胃癌临床诊治、预后评估提供有效理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2012~2014 年湘西自治州人民医院(吉首大学第一附属医院)病理科胃癌手术切除标本 80

基金项目: 吉首大学 2015 年大学生研究性学习与创新性试验计划项目
通讯作者: 姚元春, 讲师, 硕士; 吉首大学医学院病理学教研室, 湖南吉首市人民南路 120 号(416000); E-mail: 215722526@qq.com
收稿日期: 2017-06-17; **修回日期:** 2017-08-15

例,每一例另取癌旁正常组织(距癌组织 5cm 以上);在排除 HE 染色制作过程中出现掉片、滑片现象病例,最终 CD44v6 有效病例 72 例,男性 50 例,女性 22 例;FOXD3 有效病例 69 例,男性 51 例,女性 18 例;年龄 24~76 岁,平均年龄 52 ± 24 岁;术前均未行任何放、化疗,术后均行病理检查;以癌旁正常胃黏膜组织作为对照组,染色结果由两位病理科医师进行诊断核实。

1.2 主要试剂

鼠抗人 CD44v6、FOXD3 单克隆抗体(浓缩型,工作浓度 1:200)均购自北京博奥森公司,SP-9000 免疫组化染色试剂盒及浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 免疫组化

免疫组化常规按 SP 试剂盒说明书进行,所有组织均常规固定,经脱水、包埋、连续 $3 \mu\text{m}$ 切片,脱蜡至水化,抗原微波修复,辣根过氧化物酶标记二抗孵育,DAB 镜下观察显色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,用已知阳性组织切片作为阳性对照。

1.3.2 结果判断

所有切片采用相同条件按试剂盒说明书方法进行。用已知阳性组织切片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。每张切片随机选择 5 个高

倍视野($\times 200$),采用半定量积分法^[5]判断阳性结果(阳性面积和强度共同判断):阳性面积判断:视野阳性细胞数 $\leq 5\%$ 计为0分, $5\% \sim 25\%$ 计为1分, $25\% \sim 50\%$ 计为2分, $50\% \sim 75\%$ 计为3分, $> 75\%$ 计为4分;阳性强度判断:基本不着色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;将两项积分相乘: $0 \sim 2$ 分为阴性(-), $3 \sim 4$ 分为弱阳性(+), $5 \sim 8$ 分为中度阳性(++), $9 \sim 12$ 分为强阳性(+++),最终将 ≥ 3 分(+---)判断为阳性表达。染色结果均由两位病理科医师诊断核实。

1.4 统计学处理

所有统计数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织与癌旁组织中 CD44v6、FOXD3 蛋白的表达

CD44v6、FOXD3 阳性染色呈棕黄(褐)色颗粒,定位于细胞质或细胞膜(Figure 1、2)。胃癌组织中 CD44v6 蛋白阳性表达率为 80.5% (58/72),FOXD3 阳性表达率为 72.5% (53/69),胃癌组织中 CD44v6、FOXD3 阳性表达率明显高于癌旁正常组织,见 Table 1。

2.2 胃癌组织中 CD44v6 和 FOXD3 蛋白的表达与临床病理参数间的关系

CD44v6、FOXD3 蛋白的表达与胃癌患者性别、年龄无关($P > 0.05$),与淋巴结转移、分化程度、浸润深度、肿瘤大小均相关(P 均 < 0.05),详见 Table 2。

3 讨论

胃癌的发生发展是多阶段和多基因参与的极为复杂的过程,Liu 等^[6]和 Yamamichi 等^[7]在恶性肿瘤研究中发现 CD44v6 呈高表达与肿瘤的进展程度关系密切。Katiyar 等^[8]关于 FOXD3 的表达下调 RhoA-ROCK 信号研究表明,抑制黑色素瘤细胞的迁移和侵袭,作为细胞周期负调控因子抑制黑色素细胞的形成,进而影响肿瘤的形成,在分化增殖及凋亡中发挥重要的作用。本研究结果检测发现,CD44v6、FOXD3 蛋白的阳性表达以++最多,+和+++级次多,随着分化程度的降低蛋白阳性表达逐渐增强,CD44v6 的高表达可能是由于作为细胞黏附分子 CD44 分子的一种拼接变体,在分化的过程中促进细胞黏附、参与信号传递等功能过程使蛋白的阳性表达逐渐增强,另外 FOXD3 高表达,可能由于作为

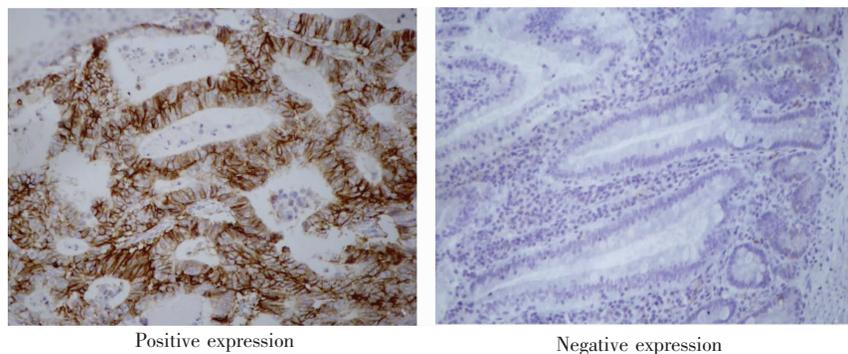


Figure 1 The expression of CD44v6 protein in GC($\times 200$)

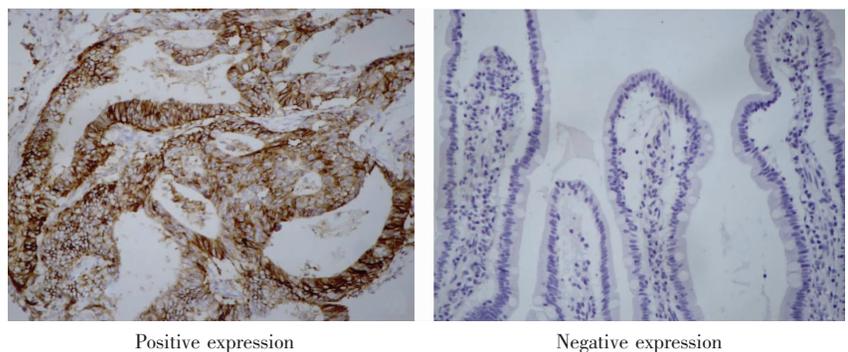


Figure 2 The expression of FOXD3 protein in GC($\times 200$)

Table 1 Expression of CD44v6 and FOXD3 in gastric cancer tissues and normal tissues

Groups	CD44v6						FOXD3					
	n	Negative	Positive	Positive rate(%)	χ^2	P	n	Negative	Positive	Positive rate(%)	χ^2	P
GC	72	14	58	80.5	34.568	<0.01	69	16	53	72.5	26.787	<0.01
Normal tissues	72	49	23	31.9			58	40	18	31.0		

Table 2 The relationship between the expression of CD44v6 and FOXD3 and the clinicopathological factors of gastric cancer

Features	CD44v6					χ^2	P	FOXD3					χ^2	P
	n	-	+	++	+++			n	-	+	++	+++		
Gender						0.218	0.749						0.288	0.746
Male	50	9	9	27	5			51	11	10	24	6		
Female	22	5	6	8	3			18	5	4	8	1		
Age(years)						0.15	0.769						0.001	0.986
<60	29	5	6	16	2			26	6	7	12	1		
≥60	43	9	9	19	6			43	10	7	20	6		
Histological grade						6.334	0.016						7.672	0.008
High	30	10	8	9	3			27	11	6	8	2		
Low	42	4	7	26	5			42	5	8	24	5		
Tumor diameter(cm)						12.899	0.001						8.422	0.008
<5	31	12	6	10	3			30	12	5	7	6		
≥5	41	2	9	25	5			39	4	9	25	1		
Metastases						5.32	0.031						6.221	0.018
No	27	9	6	10	2			25	10	4	8	3		
Yes	45	5	9	25	6			44	6	10	24	4		
Invasion depth						5.125	0.035						9.294	0.004
T ₁₋₂	32	10	7	12	3			29	12	5	10	2		
T ₃₋₄	40	4	8	23	5			40	4	9	22	5		

一种转录抑制因子,其超表达显著抑制细胞的生长,在抑制的过程中,基因水平向恶性生长方向转化,使蛋白在低分化呈高表达,与 CD44v6、FOXD3 在其他肿瘤研究结果基本一致^[8]。淋巴结转移组阳性表达高于无淋巴结转移组,可能是由于在肿瘤细胞生长的过程中,作为干细胞因子获得淋巴细胞样的“伪装”,在逃避人体免疫系统的识别和杀伤过程中,进入淋巴结,继而导致转移所引起,Hofmann 等^[9]的研究结果也提到了这一说法,具体机制仍不明确,有待进一步研究证实。本研究结果还发现蛋白表达随着浸润的深度增加阳性逐渐增强,这种高表达可能与基因的信号传导有关,肿瘤细胞在生长过程中,其基因的水平失去的正常的调控,导致在恶性转化过程中 T₃₋₄ 表达水平增高,也有可能是在肿瘤分化增殖及凋亡中发挥重要的作用与浸润的深度呈相关性,目前关于这一研究文献报道较少,我们下一步将进行其他方法检测。

综上所述,胃癌组织中 CD44v6、FOXD3 蛋白表达可能与肿瘤发生、发展相关。

参考文献:

[1] Chen WQ,Zheng RS,Zhang SW,et al.Report of cancer incidence and mortality in China,2013 [J].China Cancer, 2017,26(1):1-7.[陈万青,郑荣寿,张思维,等.2013年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2017,26(1):1-7.]

[2] Nagano O,Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage[J]. Cancer Sci,2004,95(12):930-935.

[3] Yan JH,Zhao CL,Ding LB,et.FOXD3 suppresses tumor growth and angiogenesis in non-small cell lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun,2015,466(1):111-116.

[4] Zhou CY .Expression of Foxd3 in liver cancer and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2013,(3):968-970.[周春艳.肝癌中 Foxd3 的表达及其临床意义[J].中华临床医师杂志(电子版),2013,(3):968-970.

[5] Yao YC,Zhang H,Lai LQ,et al. Expression and clinical significance of GRP78,GRP94 protein and mRNA in human gastric cancer tissues [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nahui,2013,48(2):152-5.[姚元春,张红,赖丽琴.GRP78、GRP94 蛋白和 mRNA 在人胃癌组织中的表达及临床意义[J].安徽医科大学学报,2013,48(2):152-155.]

[6] Liu AX,Sun J,Shao WQ,et al Steroid cell tumors,not otherwise specified(NOS),in an accessory ovary:a case report and literature review[J].Gynecol Oncol,2005,97(1):260-262.

[7] Yamamichi K,Uehara Y,Kitamura N,et al. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer[J]. Int J Cancer,1998,79(3):256-262.

[8] Katiyar P,Aplin AE. FOXD3 regulates migration properties and Rnd3 expression in melanoma cells [J]. Mol Cancer Res,2011,9(5):545-552.

[9] Hofmann M,Rudy W,Zoller M,et al.CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats;homologous sequences are expressed in human tumor cell lines [J].Cancer Res,1991,51(19):5292-5297.