基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.014

透明质酸介导的细胞游走受体在胆管癌侵袭和转移中的作用

陈 波[1]，赖 星[2]，罗玉政[1]，廖汪洋[2]，刘长安[2]

（1. 重庆市第九人民医院普外三科，重庆 400700；2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科，重庆 400010）

【摘 要】目的：探讨透明质酸介导的细胞游走受体（Receptor for hyaluronan-mediated motility，RHAMM）在胆管癌侵袭和转移中的作用。方法：收集临床上行胆管癌手术的患者的组织标本及正常胆管组织标本，根据分化程度将胆管腺癌组织标本分为高、中、低分化 3 组；按 TNM 分期标准将所有组织标本分为对照组、胆管癌组以及胆管癌伴转移组。免疫组织化学（SP）法测定 RHAMM 平均光密度值。RT-PCR 及 Western blot 法检测 RHAMM mRNA 和蛋白的表达水平。结果：免疫组织化学检测在不同分化程度的胆管腺癌中 RHAMM 均有不同程度的表达（$P>0.05$）；RHAMM 在胆管癌伴转移组阳性率最高，在对照组表达阳性率最低。RT-PCR 和 Western blot 检测 RHAMM mRNA 和蛋白表达水平在对照组和胆管癌组差异无统计学意义（$P>0.05$）。在胆管癌伴转移组明显高于对照组和胆管癌组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。结论：RHAMM 的表达程度与胆管腺癌的分化程度无关，但在胆管癌伴转移组中的高表达可能与胆管癌的侵袭相关，并最终促进了胆管癌的转移。

【关键词】透明质酸介导的细胞游走受体；胆管癌；侵袭；转移

【中国图书分类法分类号】Q71 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-07-05

The role of RHAMM in the invasion and metastasis of cholangiocarcinoma

CHEN Bo, LAI Xing, LUO YU-Zheng, LIAO Wang-yang, LIU Chang-an

(*Department of General Surgery, the Ninth People's Hospital of Chongqing*)

【Abstract】***Objective***: To discuss the role of RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility) in invasion and metastasis of cholangiocarcinoma. ***Methods***: Clinical specimens of normal bile duct and cholangiocarcinoma in patients were collected. The specimens of bile duct adenocarcinoma were divided into high, medium and poorly differentiated groups according to the degree of differentiation. All the tissue specimens were divided into three groups according to the TNM staging system. The expressions of RHAMM mRNA and protein level were assayed by RT-PCR and Western blot. ***Results***: There were different expression levels in different histological types of cholangiocarcinoma assayed by immunohistochemistry ($P>0.05$). Cholangiocarcinoma group and cholangiocarcinoma with metastasis group had positive expression of RHAMM with brown staining in the cytoplasm or membrane. The expression level of RHAMM was the lowest in the control group (0.033 ± 0.003), while increased in the cholangiocacinoma group (0.162 ± 0.013), and there was no significant difference between the two groups ($P>0.05$). The cholangiocarcinoma with metastasis group hold significantly higher expression than the other two groups, and the difference had statistical significance ($P<0.05$). ***Conclusion***: There is no relation between the degree of differentiation and the expression levels of RHAMM. However, its high expression in the cholangiocarcinoma with metastasis group may be associated with the invasion of cholangiocarcinoma, and promote the metastasis of cholangiocarcinoma ultimately.

【Key words】receptor for hyaluronan-mediated motility; cholangiocarcinoma; invasion; metastasis

胆管癌（Cholangiocarcinoma）是一种来源于肝内或肝外胆管上皮的肿瘤，其发病率仅次于肝癌。其发展隐蔽，临床症状及体征出现晚，恶性程度高。神经侵犯和周围纤维组织侵犯是胆管癌转移的重要特点，也是该病难以根治和术后复发率高的首要原因[1,2]。在诸多影响癌侵袭及转移的因素中，普遍存在于细胞外基质（Extracellular matrixc，ECM）中的透明质酸（Haluronic acid，HA）与癌细胞表面/内部受体的相互作用，与肿瘤的侵袭及转移密切相关。透明质酸介导的细胞游走受体（Receptor for hyaluronan-mediated motility，RHAMM）是一种可溶性的 HA 结合蛋白，是继 CD44 之后发现的重要 HA受体的一种。它的基因位于人染色体 5q33.2-qter 和小鼠第 11 号染色体，包含 18 个外显子，编码 85 000 蛋白质[3]。本实验通过收集临床上行胆管癌手术的患者的组织标本及正常胆管组织标本，观察各组标本中 RHAMM 的表达情况，探讨 RHAMM 在胆管癌发生、侵袭和转移中的作用。

作者介绍：陈 波（1971-），男，副主任医师，硕士，研究方向：普通外科基础及临床研究。

通信作者：刘长安，男，教授，Email:Chenbodoc@126.com。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2003 年 1 月~2010 年 1 月在重庆医科大学附属第二医院和重庆市第九人民医院手术治疗的，经临床诊断、病理证实的 54 例原发性胆管癌新鲜组织标本和 15 例肝外伤病人新鲜胆管组织标本。胆管癌病人中男 16 例，女 38 例，年龄 52~66 岁，平均 58 岁。胆管腺癌 51 例，占 94%，其中高分化腺癌 23 例，中分化腺癌 16 例，低分化腺癌 12 例。根据国际抗癌协会（UICC）提出的 TNM 分期标准：0~Ⅱ期，无淋巴结及远位转移；Ⅲ~Ⅳ期，侵及邻近组织或伴淋巴结转移，或伴远位转移。将胆管癌和肝外伤标本分为 3 个组：对照组正常胆管组织标本 15 例（取自肝外伤患者）；胆管癌组 TNM 分期 0~Ⅱ期胆管癌组织标本 35 例；胆管癌伴转移组 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期胆管癌组织标本 19 例。54 例病人行胆管癌切除术 41 例，姑息性手术 13 例。

1.2 主要试剂

兔抗人 RHAMM 抗体、SP 免疫组织化学染色试剂盒、总 RNA 提取试剂盒，胶回收试剂盒，RT-PCR 提取试剂盒购自美国 Promega 公司。对胆管癌组织的 RNA 蛋白提取和免疫组织化学方法按说明书进行。

1.3 免疫组织化学

每例标本均在离体 60 min 内切取，组织放入 10%中性甲醛中固定 24~48 h，常规脱水、透明、石蜡包埋、5 μm 厚切片，用于组织病理学及免疫组织化学染色（SP 法）。结果判定：光学显微镜下观察，RHAMM 染色阳性细胞为胞核内棕色或棕褐色颗粒。在 400 倍光镜下，用 HPIAS-1000 型医学彩色图像分析系统测量光密度值，每组各取 10 张片，每张切片取 2 个视野，分别测量，然后计算光密度值的均值作为此组代表值。

1.4 胆管癌组织 RHAMM mRNA 及蛋白检测

逆转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）测定各组胆管癌组织 RHAMM mRNA 表达水平。PCR 引物：RHAMM 上游引物 5'-GCAAAAGGAGGAACAAGCTGAA-3'，下游引物 5'-TC-CTGTTGCTTGAGTTGGTTCTG-3'，扩增产物为 240 bp；内参照 β-actin 上游引物 5'-CATTGTGATGGACTCCGGAG-3'，下游引物 5'-ATAGTGATGACCTGGCCGTC-3'，扩增产物为 487 bp；蛋白免疫印记法（Western blot）测定各组的 RHAMM 蛋白表达水平。50/A 蛋白样本在 10%聚丙烯酰胺凝胶内电泳分离，经转膜器移至 PVDF（Gelman，USA）滤膜，滤膜用含 5%脱脂乳（Gibco，USA）的 PBS 液封闭后，在室温下与兔抗人 RHAMM 抗体和辣根过氧化物酶的猪抗兔 IgG（Dako，Denmark）孵育。每次孵育后，均用含 0.02%Tween 20 的 PBS 洗脱 3 次，将化学荧光增强液 ECL（Amersham，UK）标记结合的信号并将其感光到 Kodak XAY 胶片。

1.5 统计学分析

平均光密度值数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用方差分析比较；RHAMM 在各组之间的表达情况和与胆管癌病理分型的关系用多个样本两两比较的秩和检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义，统计学软件采用 SPSS17.0。

2 结 果

2.1 不同分化程度胆管腺癌中 RHAMM 的表达情况

免疫组织化学分析在不同分化程度的胆管腺癌中 RHAMM 均有不同程度的表达，RHAMM 阳性率与腺癌组织分化程度无关（$P>0.05$）（表 1）。其中，中分化腺癌阳性率最高，低分化腺癌阳性率最低，但 3 组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 1 RHAMM 与胆管癌病理分型的关系

分型	例数	RHAMM表达				
		−	+	++	+++	阳性率（%）
高分化腺癌	23	7	6	6	4	69.6*
中分化腺癌	16	3	3	5	5	81.3#
低分化腺癌	12	5	0	1	6	58.3

注：*，与中分化腺癌比较 $P=0.302>0.05$，与低分化腺癌比较 $P=0.506>0.05$；#，与低分化腺癌比较 $P=0.365>0.05$

2.2 RHAMM 与胆管癌转移的关系

用图像分析软件计算平均光密度（Average optical density，AOD）得出结果，RHAMM 蛋白表达水平在胆管癌伴转移组阳性率最高，对照组最低，而胆管癌组的蛋白表达居于前 2 组之间（表 2、3）；RT-PCR 和 Western blot 检测结果：用内参照对待测物灰度值进行标准校正。RHAMM 蛋白表达水平在胆管癌伴转移组明显高于对照组和胆管癌组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。在对照组和胆管癌组差异无统计学意义（$P>0.05$）（图 1~3）。

表 2 RHAMM 在各组之间的表达情况

组别	例数	RHAMM表达				
		−	+	++	+++	阳性率（%）
对照组	15	13	2	0	0	15.4
胆管癌组	35	28	5	2	0	20.0#
胆管癌伴转移组	19	2	3	5	9	89.5*

注：对照组，正常胆管组织；胆管癌组，TNM 分期 0~Ⅱ期；胆管癌伴转移组，TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期。*，$P=0.004<0.05$，与对照组和胆管癌组比较；#，$P=0.423>0.05$，与对照组比较

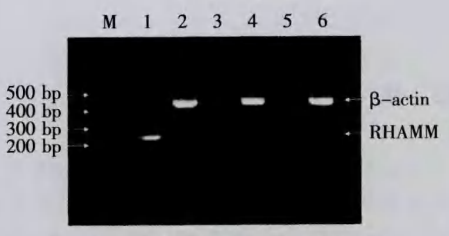
表 3 免疫组织化学染色图像分析平均光密度值（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	RHAMM
对照组	0.05 ± 0.02
胆管癌组	0.17 ± 0.04
胆管癌伴转移组	0.33 ± 0.06*

注：*，$P<0.05$，分别与对照组和胆管癌组比较

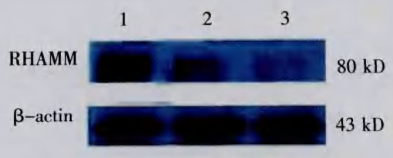
3 讨 论

在众多影响癌细胞侵袭和转移的因素中，ECM 中的 HA 与癌细胞表面相应受体的相互作用已引起广泛关注。Turley



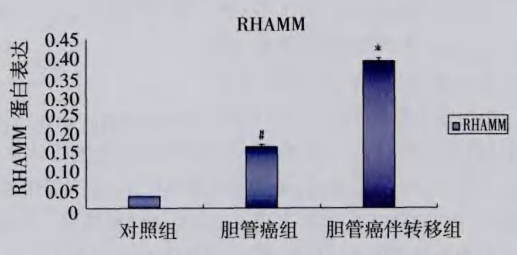
1、3、5：胆管癌伴转移组、胆管癌组、对照组

图 1 RHAMM mRNA 表达水平



1~3 分别为：胆管癌伴转移组、胆管癌组、对照组

图 2 RHAMM 蛋白 Western blot 结果



*，$P<0.05$，与其它 2 组比较；#，$P>0.05$，与对照组比较

图 3 Western blot 分析各组中 RHAMM 蛋白表达

等最先克隆的 HA 结合受体 RHAMM，属于细胞结构蛋白家族成员，对于细胞的生长、分化和运动起着重要作用，多数研究认为它在细胞内的异常表达可能促进细胞转化[4]。RHAMM 位于细胞膜表面和细胞内纤维丝中，在正常组织中低表达或不表达，而在白血病、肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌及多发性骨髓瘤等多种肿瘤组织及肿瘤细胞系中检测到 RHAMM 的异常表达[5]。

与细胞运动密切相关的 HA 结合蛋白主要有 RHAMM，Cdc37 和 P68 等，它们可与细胞内信号转导相关的酶以及细胞骨架相关蛋白相结合，调节其功能，从而影响细胞的运动。其中，RHAMM 的作用最为明显。HA 存在于 ECM 中和细胞表面，而且还存在于很多类型的细胞内部，细胞内 HA 的分布也十分广泛，在细胞浆、细胞核周区、核仁以及运动状态细胞的板状伪足部位均有 HA 的聚集[6]。HA 与 RHAMM 结合后可以激活多条信号转导通路，从而调节细胞运动。HA 与细胞表面 RHAMM 结合后可短暂激活 Src 激酶，对复合体粘着斑激酶（Focal adhesion kinase，FAK）中的酪氨酸进行磷酸化，导致细胞粘着斑解聚和细胞运动能力增加。RHAMM 还可激活 Ras，Ras 激活后至少可以激活 3 种 MAPK 通路，而 RHAMM 激活的是 ERK1 激酶通路[7]。对于 RHAMM 与肿瘤发生转移的机制可能是[8]：①RHAMM 过表达可能激活了 Ras 通路，促进 Ras 引起肿瘤发生转移；②RHAMM 通过激活细胞内的信号级联系统，调节细胞运动；③引导纺锤丝，干扰有丝分裂和增进新生血管的形成等方式促进肿瘤的侵袭和转移。

胆管癌组织学类型 95%以上为腺癌，腺癌的分化程度与其恶性程度相关，但并非所有低分化腺癌都发生转移，是否发生侵袭和转移还与癌组织发生的位置等因素相关[9]。本研究通过免疫组织化学测量不同分化程度胆管腺癌中 RHAMM 的平均光度值，表明在高分化腺癌、中分化腺癌、低分化腺癌胆管腺癌中 RHAMM 表达无特定规律，阳性表达率差异无统计学意义，这说明 RHAMM 的表达程度与胆管腺癌的分化程度无关。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测出 RHAMM 在胆管癌伴转移组中表达明显高于胆管癌组和对照组，证明 RHAMM 只与肿瘤是否发生转移有关，其机制可能是RHAMM 与HA结合后促进肿瘤细胞的运动，从而发生侵袭和转移。

侵袭和转移是恶性肿瘤最本质的特性，也是导致患者死亡的主要原因。然而从正常胆管组织发展到原位癌，还与原癌基因突变等因素有关。本文实验结果显示 RHAMM 在对照组和胆管癌组表达并没有显著差异，说明 RHAMM 在正常胆管组织发展为胆管癌组织这一过程中，并未起决定性作用，但是，RHAMM 可通过上述分子机制，激活细胞内的信号级联系统等方式，最终促进胆管癌的转移。

参 考 文 献

[1] Shaib Y H, Ei-serag H B, Nooka A K, et al. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study[J]. Gastroenterology, 2005, 128(3): 620-623.

[2] Shaib Y H, Ei-serag H B, Nooka A K, et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: a hospital-based case control study[J]. Am J Gastroenterol, 2007, 102(5): 1016-1021.

[3] Spicer A P, Roller M L, Camper C A, et al. The human and mouse receptors for hyaluronan-mediated motility, RHAMM, genes (HMMR) map to human chromosome 5q33.2-qter and mouse chromosome 11[J]. Genomics, 1995, 30(1): 115-117.

[4] Turley E A, Moore D, Hayden L T. Characterization of hyaluronat binding proteins isolated from 3T3 and murine sarcoma virus transformed 3T3 cell[J]. Biochemistry, 1987, 26(11): 2997-3005.

[5] Zhou R, Wu X, Skalli. The hyaluronan receptor RHAMM/IHABP in astrocytoma cells: expression of a tumor-specific variant and association with microtubules[J]. J Neuroncol, 2002, 59(1): 15-26.

[6] Tolg C, Poon R, Fodde R, et al. Genetic deletion of receptor for hyaluronan[U1]-mediated motility (Rhamm) attenuates the formation of aggressive fibmmatosis (desmoid tumor) [J]. Oncogene, 2003, 22 (44): 6873-6882.

[7] Slevn M, Krupinski J, Gaffney J, et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways[J]. Matrix Biol, 2007, 26(1): 58-68.

[8] James W L, Charlotte A L, Maddy P, et al. A novel PKC-regulated mechanism controls CIM4_ezrin association and directional cell motility [J]. Nature Cell Biol, 2002, 4(6): 399-407.

[9] Trishe Y, Leong M, Wannakrairot P, et al. Pathology of cholangiocarcinoma[J]. Current Diagnostic Pathology, 2007, 13(1): 54-64.

（责任编辑：张学颖）