基础研究 文章编号：0253-3626(2011)02-0163-05

CD44V6、P-gp、Top-Ⅱ在结直肠癌中的表达与临床病理的关系及其临床意义

王 欣，傅仲学
（重庆医科大学附属第一医院普外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨 CD44 拼接变异体 V6(CD44 variant V6，CD44V6)、P-糖蛋白(P-glycoprotein，P-gp)、拓扑异构酶Ⅱ(Topoisomerase Ⅱ，Top-Ⅱ)在结直肠中表达及其临床意义。方法：采用 HE 方法验证结直肠癌组织和正常大肠黏膜组织。采用免疫组织化学法 MaxVision 二步法检测 80 例结直肠癌组织及 46 例正常大肠黏膜组织中 CD44V6、P-gp、Top-Ⅱ蛋白的表达情况，将其与性别，临床 Dukes 分期，浸润深度，淋巴转移等临床病理学资料进行统计学分析。结果：CD44V6、P-gp、Top-Ⅱ蛋白在结直肠癌组织中的表达显著高于正常大肠黏膜组织。CD44V6 在结直肠癌中的表达强度与肿瘤的临床 Dukes 分期（r_s=0.328，P<0.05），浸润深度（r_s=0.356，P<0.01），淋巴转移（r_s=0.406，P<0.01）成显著正相关性，与性别无相关性；P-gp 在结直肠癌中的表达强度与性别，临床 Dukes 分期，肿瘤的浸润深度，淋巴转移无相关性。Top-Ⅱ在结直肠癌中的表达强度与性别，临床 Dukes 分期，肿瘤的浸润深度无相关性，但与淋巴转移有相关性（r_s=0.245，P<0.05）。结论：P-gp、Top-Ⅱ、CD44V6 在结直肠癌中均高表达。CD44V6 在结直肠癌中的表达与临床 Dukes 分期，肿瘤的浸润深度及淋巴转移情况存在正相关性。

【关键词】CD44 variant V6；P-glycoprotein；Topoisomerase Ⅱ；结直肠癌
【中国图书分类法分类号】R735.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-03-24

The relation of CD44V6, P-GP and Top-II expressions to the biological behavior of colorectal cancer

WANG Xin, et al
(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To elucidate the expression of CD44 splice variant V6 (CD44V6), P-glycoprotein (P-gp) and Topoisomerase Ⅱ (Top-Ⅱ) in CRC and their clinical significance. *Methods*: Hematoxylin-Eosine method was used to verify colorectal cancer and normal mucosa tissue. Immunohistochemistry was used to examine CD44V6, P-gp and Top-Ⅱ expressions in 80 colorectal carcinoma tissues and 46 normal intestinal tissues. The relationship of CD44V6, P-gp and Top-Ⅱ expressions with sex, Dukes staging, tumor invasion and lymph nodes metastasis was statistically analyzed. *Results*: The expressions of CD44V6, P-gp, Top-Ⅱ in CRC were higher than those in normal tissues. The expression of CD44V6 was positively related to the Dukes staging (r_s =0.328, P<0.05), tumor invasion (r_s =0.356, P< 0.01) and lymph node metastasis (r_s =0.406, P<0.01), but not to sex. The expression of P-gp was not related to sex, Dukes staging, tumor invasion or lymph node metastasis. The expression of Top-Ⅱ was not related to sex, Dukes staging, or degree of invasion, but related to the degree of lymph node metastasis (r_s =0.245, P<0.05). *Conclusion*: P-gp, Top-Ⅱ and CD44V6 are highly expressed in CRC. CD44V6 is positively related to the Dukes staging, tumor invasion and lymph node metastasis.

【Key words】CD44V6; P-gp; Top-Ⅱ; colorectal carcinoma

结直肠癌是消化道中最常见的恶性肿瘤，目前临床上的治疗主要采取了放疗，化疗，手术以及新辅助化疗等综合治疗的方式，其中手术切除是治疗结直肠癌的主要手段。但是患者术后常发生局部复发和全身转移，使得患者 5 年生存率不理想。许多研究者发现，肿瘤组织中促进肿瘤淋巴管的生成以及促使肿瘤细胞发生淋巴结转移的因子高表达，而且肿瘤组织中存在着许多与化疗药物耐药相关因子的表达。所以近些年来，关于肿瘤淋巴结转移相关因子和多药耐药(Multidrug resistance，MDR)基因之间关系的因子成为研究的热点。文献报道，CD44 拼接变异体 V6 在的过度表达与人类恶性肿瘤的浸润，转移及患者的预后密切相关[1]。由于肿瘤细胞对化学结构完全不同，作用机理各异的多种抗癌药物产生交叉耐药，这一现象即称作 MDR[2]。它限制了化疗疗效的发挥。MDR 产生的机理复杂，目前有多种观点，其中可能与 Top-Ⅱ数量的减少或活性降低以及与 mdrl、MRP、LRP 基因过度表达有关。检

作者介绍：王 欣(1967-)，男，副主任医师，硕士，
研究方向：结直肠癌肿瘤与器官移植。
通信作者：傅仲学，男，教授，Email：fzx990521@sina.com。

测 CD44V6、P-gp、Top-Ⅱ在结直肠癌中的表达有助于判断结直肠癌的转移潜能及预后，对指导化疗用药有一定意义。

本研究采用免疫组化 MaxVisionTM 二步法检测肿瘤标志物 CD44V6、P-gp、Top-Ⅱ在 80 例结直肠癌组织及 46 例正常大肠黏膜组织中的表达，探讨 CD44V6、P-gp、Top-Ⅱ与结直肠癌发生，发展的关系[3]，为预测结直肠的侵润转移潜能以及制定有效的化疗方案，判断患者的预后提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织材料

收集重庆市中山医院 2005 年 1 月 ~2009 年 5 月手术切除的结直肠癌标本 80 例作为实验组。收集 46 例正常大肠黏膜组织作为对照组。全部病例均经手术和病理证实，术前无放化疗，所有标本均用福尔马林固定，石蜡包埋，组织蜡块 4 μm 厚，连续切片，常规采用 HE 染色及免疫组化进行检测。

1.2 试剂和试剂盒与免疫组化方法

一抗：鼠抗人 CD44V6 单克隆抗体，鼠抗人 P-gp 单克隆抗体，鼠抗人 Top-Ⅱ免疫组化单克隆抗体。

二抗：即用型快速免疫组化 MaxVision™ 试剂盒。

以上试剂均购自福州迈新生物技术开发公司。

切片放置于二甲苯中进行二次脱蜡，每次 10 min。采用 100%、95%、80%、70%、系列梯度酒精脱苯，水化各 3 min，自来水冲洗各 3 min；使用 PBS 液浸泡 2 次，各 3 min；将切片置于 3%的过氧化氢溶液中，放于 38℃干燥箱中孵育 15 min，可阻断内源性过氧化氢酶活性；PBS 液浸泡 2 次，各 5 min；将每张切片中滴入 1 滴或 50 μl 一抗，并放入 4 度冰箱中过夜；PBS 液浸泡 5 min，各 2 次；滴加二抗 1 滴或 50 μl，室温下孵育 10~15 min；PBS 液浸泡 5 min，各 2 次；每张切片上滴加 DAB 显色液 1 滴或 50 μl，显色 4~10 min；自来水充分水洗，终止显色反应；苏木素复染 30 s，自来水冲洗；1%盐酸酒精分化，自来水冲洗，饱和碳酸锂返蓝，自来水冲洗。切片置于 80%、95%、95%、100%、100%酒精脱水，电吹风吹干；中性树胶封片。

1.3 结果判断

光镜下观察以细胞内出现粗细一致的棕黄色颗粒为阳性细胞。根据肿瘤细胞的阳性细胞数及染色反应的深浅进行判断。选 10 个高倍镜（×50），每个视野计数 100 个肿瘤细胞，从而计算阳性比例。染色结果定为 4 级：阴性（-）：无阳性细胞染色；弱阳性（+）：阳性细胞 1%-25%；阳性（++）：阳性细胞为 26%~50%；强阳性（+++）：阳性细胞＞50%。阳性细胞比例＞25%记为阳性表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 系统统计学分析学分析软件进行统计学处理。3 种肿瘤标志物在结直肠癌中的表达与正常大肠黏膜间的差异采用 R×C 表资料的 χ^2 检验中多个样本的比较。3 种肿瘤标志物在结肠癌、直肠癌中的表达与性别、临床 Dukes 分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移情况的关系采用 Spearman 秩相关分析。

2 结 果

2.1 临床病理资料

本实验组 80 例结直肠癌患者中，男性 43 例，女性 37例；年龄 33~95 岁，平均年龄（62.0 ± 0.5）岁。Dukes A 期 20 例；Dukes B 期 38 例；Dukes C 期 16 例；Dukes D 期 6 例。无淋巴结转移 62 例；有淋巴结转移 18 例。

2.2 CD44V6 的表达情况

CD44V6 在结肠癌、直肠癌及正常大肠组织中的表达率分别为 36.67%（见图 1）、75%（见图 2）、4.35%（见图 3），其在结直肠癌中的表达显著高于正常大肠组织，差异有统计学意义（$P<0.01$）。CD44V6 在结肠癌与直肠癌中的表达无统计学意义（见表 1）。

结直肠癌中 CD44V6 的表达与临床 Dukes 分期（$r_s=0.328$，$P<0.05$）、肿瘤浸润深度（$r_s=0.356$，$P<0.05$）、淋巴结转移（$r_s=0.406$，$P<0.01$）均成正相关性，与性别无相关性（见表 2）。

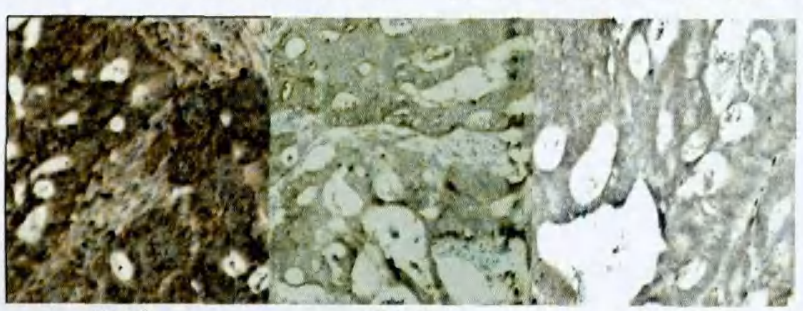
2.3 Top-Ⅱ的表达状况

Top-Ⅱ在结肠癌、直肠癌及正常大肠组织中的阳性表达率分别为 68.3%（见图 4），80%（见图 5），26.1%（见图 6），其在结肠癌直肠癌中的表达高于正常肠组织，差异有统计学意义（$P<0.05$）。Top-Ⅱ在结肠癌与直肠癌的表达无统计学意义（见表 3）。

Top-Ⅱ在结直肠癌中的表达与性别、临床 Dukes 分期、浸润深度无相关性与淋巴结转移呈正相关性（$r_s=0.245$，$P<0.05$）（见表 4）。

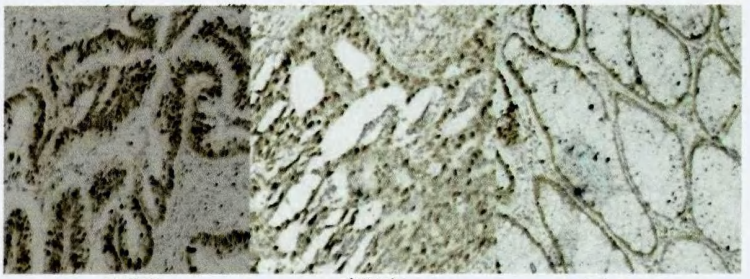
2.4 P-gp 的表达状况

P-gp 在结肠癌、直肠癌及正常大肠组织中的阳性表达率分别 75%（见图 7）、85%（见图 8）、56.5%（见图 9），其在结直肠癌中的表达高于正常大肠组织，但差异无统计学意义。



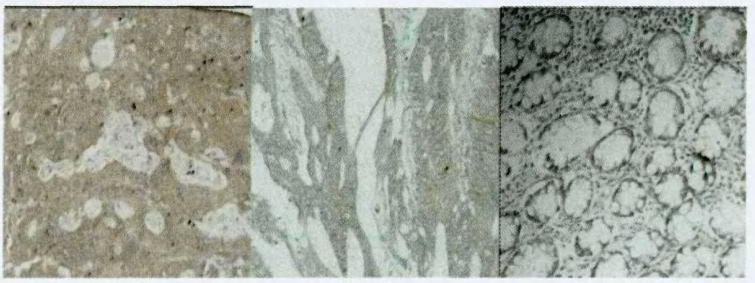
结肠癌　　直肠癌　　正常大肠组织

图 1　CD44V6 在不同组织中的表达情况（×200）



结肠癌　　直肠癌　　正常大肠组织

图 2　Top-Ⅱ在不同组织中的表达情况（×200）



结肠癌　　直肠癌　　正常大肠组织

图 3　P-gp 在不同组织中的表达情况（×200）

表 1　CD44V6 在正常大肠组织、结肠癌及直肠癌中的表达

组织标本	例数	CD44V6				阳性率(%)	χ^2	P
		-	+	++	+++			
正常大肠组织	46	40	4	2	0	4.35	44.140	<0.001[a]
结肠癌	60	9	16	10	12	36.67	0.155	0.985[b]
直肠癌	20	6	12	6	9	75.00	39.049	<0.001[c]

注：a. 正常大肠组织与结肠癌比较；b. 结肠癌与直肠癌比较；c. 直肠癌与正常大肠组织比较

表 2　CD44V6 在结直肠癌中的表达与临床病理特征的关系（Spearman 秩相关分析）

临床病例特征	例数	CD44V6				χ^2	P
		-	+	++	+++		
性别						0.115	0.311
男	43	8	12	10	13		
女	37	7	16	6	8		
Dukes 分期						0.328**	0.003
A	20	6	8	4	2		
B	38	7	15	7	9		
C	16	2	4	3	7		
D	6	0	1	2	3		
浸润深度						0.356**	0.001
T1	1	1	0	0	0		
T2	22	7	14	1	0		
T3	39	4	8	11	16		
T4	18	3	6	4	5		
淋巴结转移						0.406**	<0.001
无转移	62	14	25	13	10		
有转移	18	1	3	3	11		

注：**：CD44V6 与临床 Dukes 分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移情况均成正相关

P-gp 在结肠癌与直肠癌的表达无统计学意义（见表 5）。

结直肠癌中 P-gp 的表达与性别、临床 Dukes 分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移均无相关性（见表 6）。

3 讨 论

CD44V6 是一种能广泛表达的细胞粘附分子，它能特异性结合基质成分透明质酸以及胶原的细胞表面跨膜糖蛋白，介导细胞与基质间的异质粘附作用[4]。CD44 基因分别由 10 个组成型外显子及 10 个变异型外显子组成，CD44 拼接变异体是指含不同变异型外显子编码序列的变异体，其中 CD44 拼接变异体 6 即 CD44V6 与结直肠癌的复发、转移之间密切相关。郝青等报道大肠正常黏膜上皮 CD44V6 表达呈阴性，在结直肠癌中的表达分别为 43.3%和 63.3%[5]。本研究中 46 例正常大肠黏膜上皮标本中的 CD44V6 阳性表达为 4.35%，结直肠癌的阳性表达率分别为 36.67%，75%。这与之前的文献报道一致，与结直肠癌患者的 CD44 表达的失控与基因突变有关。此外，本研究还发现 CD44V6 在结直肠癌中的表达与性别无相关性，与临床 Dukes 分期、肿瘤浸润深度、淋巴转移均成正相关性，与大部分文献报告相一致。

P-gp 是 MDR 基因的产物，通过 ATP 供能，将长春新碱、秋水仙素、放线菌素 D 等药物泵出细胞外，从而产生 P-gp 介导的 MDR。大量研究表明 P-gp 高表达伴随肿瘤治疗的预后不良，可作为肿瘤患者预后判断的一项评价指标。本研究表明 P-gp 在结直肠癌中的表达与性别，临床 Dukes 分期，肿瘤的浸润深度，淋巴转移均无相关，与大部分文献报道相一致。但有文献报道，P-gp 与肿瘤的浸润深度存在正相关，与肿瘤分期越晚化疗效果越差的临床事实相一致。因此它对肿瘤病人选择化疗方案有重要的意义[6]，可以作为判断患者预后的指标之一。

表 3 Top-Ⅱ在正常大肠组织、结肠癌及直肠癌中的表达

组织标本	例数	-	+	++	+++	阳性率(%)	χ^2	P
正常大肠组织	46	9	25	10	2	26.1	32.161	<0.001[a]
结肠癌	60	14	5	20	21	68.3	5.634	0.131[b]
直肠癌	20	1	3	11	5	80.0	17.491	0.013[c]

注：a. 正常大肠组织与结肠癌比较；b. 结肠癌与直肠癌比较；c. 直肠癌与正常大肠组织比较

表 4 Top-Ⅱ在结直肠癌中的表达与临床病理特征的关系（Spearman 秩相关分析）

临床病例特征	例数	-	+	++	+++	χ^2	P
性别						-0.137	0.226
男	43	10	3	19	11		
女	37	5	5	12	15		
Dukes 分期						0.101	0.372
A	20	3	4	6	7		
B	38	8	3	18	9		
C	16	4	1	4	7		
D	6	0	0	3	3		
浸润深度						-0.060	0.598
T1	1	0	0	1	0		
T2	22	3	4	4	11		
T3	39	11	3	14	11		
T4	18	1	1	12	4		
淋巴结转移						0.245*	0.029
无转移	62	13	7	27	15		
有转移	18	2	1	4	11		

注：*：Top-Ⅱ与淋巴结转移情况有一定相关性

表 5 P-gp 在正常大肠组织、结肠癌及直肠癌中的表达

标本组织	例数	-	+	++	+++	阳性率(%)	χ^2	P
正常大肠组织	46	4	16	7	19	56.5	3.441	0.329[a]
结肠癌	60	4	12	11	33	75.0	4.174	0.243[b]
直肠癌	20	1	2	8	9	85.0	7.202	0.066[c]

注：a. 正常大肠组织与结肠癌比较；b. 结肠癌与直肠癌比较；c. 直肠癌与正常大肠组织比较

表 6 P-gp 在结肠癌、直肠癌中的表达与临床病理特征的关系(Spearman 秩相关分析)

临床病例特征	例数	-	+	++	+++	χ^2	P
性别						0.002	0.983
男	43	1	9	11	22		
女	37	4	5	8	20		
Dukes 分期						0.047	0.678
A	20	2	4	4	10		
B	38	1	6	12	19		
C	16	1	3	2	10		
D	6	1	1	1	3		
浸润深度						0.156	0.166
T1	1	0	1	0	0		
T2	22	2	4	7	9		
T3	39	2	6	9	22		
T4	18	1	3	3	11		
淋巴结转移						-0.120	0.290
无转移	62	2	10	17	33		
有转移	18	3	4	2	9		

Top-Ⅱ在正常细胞的 DNA 合成和细胞分裂中起重要作用,它是 DNA 复制和转录的基本核酶[7],是抗癌药物如蒽环类抗生素、足叶乙甙、替尼泊甙的重要靶点[8]。其含量的高低与抗癌药物的作用成正比。如细胞中该酶含量低就会产生耐药性[9]。本实验 46 例正常大肠黏膜中 12 例 Top-Ⅱ阳性,阳性率 26.1%,60 例结肠癌中 41 例 Top-Ⅱ为阳性,阳性率 68.3%。20 例直肠癌 16 例为阳性,阳性率为 80%。Top-Ⅱ在结肠癌、直肠癌组织中的表达高于正常大肠组织,差异有统计学意义,而不能判定 Top-Ⅱ在结肠癌与直肠癌的表达差异有统计学意义。因此对于这部分患者,化疗方案可以使用一些针对 Top-Ⅱ为靶点的药物如 VP-16 等。本实验还显示结直肠癌中 Top-Ⅱ的表达与性别,肿瘤大小发病部位,临床 Dukes 分期,组织学类型无关,与淋巴转移成正相关,与文献报道的一致[10]。而罗敏等文献报告 Top-Ⅱ表达与大肠癌组织类型、淋巴转移有关,与 Dukes 分期无关[11]。

4 结 论

P-gp 在结肠癌中的表达高于正常结肠组织,但差异无统计学意义。结直肠癌中 P-gp 的表达与性别、临床 Dukes 分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移均无相关。

Top-Ⅱ在结肠癌直肠癌中的表达高于正常大肠组织,差异有统计学意义。Top-Ⅱ在结直肠癌中的表达与性别、临床分期、浸润深度无相关与淋巴转移成正相关。

CD44V6 在结直肠中的表达显著高于正常大肠组织,差异有统计学意义。结直肠癌中 CD44V6 的表达与临床 Dukes 分期、肿瘤浸润深度、淋巴转移均成正相关,与性别无相关。

参 考 文 献

[1] 聂志红,韦庭炫. 大肠癌微转移检测的研究进展[J].肿瘤研究与临床,2009,21(3):207-211.

[2] O'Connor R,Clynes M,Dowling P,et al. Drug resistance in caner-searching for mechanisms,markers and therapeutic agents[J].Expert Opin Drug Metab Toxicol,2007,3(6):805-817.

[3] Peng J,Lu J J.Zhu J.Prediction of treatment outcome by CD44v6 after total mesorectal excision in locally advanced rectal cancer [J].Cancer J, 2008, 14(1):108-112.

[4] Cai S J.Lu H F.Predicting prognosis of rectal cancer patients with total mesorectal excision using molecular markers[J].World Journail of Gastroenterology,2007,13(21):3009-3015.

[5] 郝 青, 陈子辉.E-钙粘附素和 CD44V6 在结直肠癌中的表达及其意义[J].齐鲁医学杂志,2003,18(2):124-125.

[6] Morimasa W.Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response[J]. Cancer Lett,2006,234(1):40-50.

[7] Haas K D A, Prados M D,Tihan T, et al. Epidermal growth factor receptor,protein kinase B/AKt ,and glioma response to erlotinib[J].J Natl Cancer Inst,2005,97(12):880-887.

[8] Jiunn H L,Masayo Y. Clinical relevance of P-Glycoprotein in drug therapy [J]. Drug Metabolism Reviews,2003,35(4):417-454.

[9] Naniwa J,Kigawa J,Kanamori Y,et al.Genetic diagnosis for chemosensitivity with drug-resistance genes in epithelial ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer,2007,17(1):76-82.

[10] 杨 华,王化修,张灿云.结直肠癌中 P-gp、GST-π、Top-Ⅱ的表达[J].医学理论与实践,2006,19(6):626-627.

[11] 罗 敏,张世琼.大肠癌组织中 P-gp 和 GTS-π 及 Top-Ⅱ的表达及临床意义的研究[J].中华肿瘤预防杂志,2007,14(15):1152-1155.

(责任编辑:冉明会)