肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0862-05

CD44V6 与 Ezrin 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

丁雪松,秦治明
(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 CD44V6 与 Ezrin 在肺癌组织中的表达、关系及临床意义。方法:采用免疫组化二步法检测 65 例肺癌及 15 例正常肺组织标本中 CD44V6 与 Ezrin 的表达,结合肺癌的临床病理特点进行分析。结果:CD44V6 在 NSCLC 中的阳性表达率 69.23%,与临床分期、淋巴结转移成正相关,与病理类型、组织分化程度无关;而在肺良性病变中无阳性表达。肺癌组织中 Ezrin 的阳性表达率(72.3%)较正常肺组织(100%)有所降低,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。Ezrin 表达下降与肺癌患者病理类型、组织分化程度无关,与有无区域淋巴结及远处转移有关。此外,肺癌组织 Ezrin 表达有从胞膜向胞浆移位的倾向。结论:CD44v6 与 Ezrin 在肺癌的发生,发展及转移过程中发挥调控作用,可作为判断肺癌转移及预后的重要生物学指标。

【关键词】非小细胞肺癌;CD44V6;Ezrin;肿瘤转移
【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-28

Significance of CD44V6 and Ezrin expression in human non-small cell lung cancer

Ding Xue-song, et al
(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of CD44V6 and Ezrin in human non-small cell lung cancer (NSCLC). *Methods*: CD44V6 and Ezrin were detected by two-step immunohistochemical staining technique in tumor tissues from 65 lung cancer cases and in normal lung tissues from 15 patients with benign disease and analyzed by the lung cancer clinicopathologic characteristics. *Results*: The positive rate of CD44V6 expression in NSCLC was 69.23%, and no difference was detected in the normal lung tissues. The up regulated of CD44V6 expression was significantly correlated with lymph node metastasis and distant metastasis, but not correlated with pathological type, the degree of differentiation of tissue and clinical stage. The positive incidence of Ezrin expression (72.3%) was significantly lower in lung cancer tissues than that in normal tissues (100%)($P<0.05$), and the down-regulation of Ezrin expression was significantly correlated with lymph node metastasis and distant metastasis, but not correlated with pathological type, the degree of differentiation of tissue. Also, Ezrin expression in lung cancer tended to move from cell membrance to cell plasma. *Conclusion*: CD44V6 and Ezrin are involved in carcinogenesis. The levels of CD44V6 and Ezrin may be a sensitive predictor for metastasis and prognosis in NSCLC.

【Key words】Non-Small Cell Lung Cancer; CD44V6; Ezrin; Neoplasm metastasis

肿瘤转移是基因调控下的多阶段、多因素、多步骤过程,发现并证实与肿瘤转移高度相关的基因,已成为肿瘤转移机制研究领域的热点。识别这些基因不但使我们深入了解肿瘤转移的机制,更重要的是这些基因及其产物有可能成为抗肿瘤转移的靶点或观察肿瘤患者预后、转移的指标。

CD44 是广泛存在于细胞表面的异质型跨膜糖蛋白黏附分子,近年来研究发现,CD44 与肿瘤的侵袭和转移密切相关,而被认为是肿瘤转移相关基因。其中以含有外显子 V6 的 CD44 变异体与肿瘤侵袭、转移的关系最为密切。Ezrin 蛋白为膜细胞骨架连接蛋白,是 ERM 家族成员中的一种,在肿瘤发展、侵润和转移过程中起着"核心蛋白"的作用。研究发现 CD44V6 蛋白与 Ezrin 蛋白在生理功能上关系密切,并在多种肿瘤的发展、浸润和转移过程中扮演重要角色。我们利用免疫组化技术,研究 CD44V6 与 Ezrin 在肺癌组织中的表达、探讨其对于肺癌浸润、转移的作用及临床意义。

作者介绍:丁雪松(1979-),男,硕士,
研究方向:肺癌的淋巴结转移。
通讯作者:秦治明,男,副教授,E-mail:zhimingqin@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 65 例原发性支气管肺癌标本均取自重庆医科大学附属第一医院 2006 年 1 月至 2007 年 12 月间手术切除标本存档蜡块。其中男性 34 例，女性 31 例。年龄 39～80 岁，平均年龄 55.2 岁。全部病例术前均未做化疗及放疗。另取同期手术切除的良性肺病远离病灶 2 cm 的正常肺组织 15 例（肺大疱 2 例、炎性假瘤 3 例，肺结核 5 例，支气管扩张 2 例，错够瘤 3 例）作对照。按照 AJCC 和 UICC 分期委员会 1997 年公布修订的分期标准，Ⅰ期 25 例，Ⅱ期 20 例，Ⅲ期 15 例，Ⅳ期 5 例；鳞癌 25 例，腺癌 35 例，腺鳞癌 5 例；根据有无淋巴结转移分为淋巴结转移阳性组 25 例，阴性组 40 例。术后病理均经重庆医科大学病理科诊断证实。

1.1.2 主要试剂 小鼠抗人 Ezrin 单克隆抗体购自福州迈新生物技术公司；二步法免疫组化检测试剂盒，DAB 显色试剂盒及山羊抗小鼠 IgG 购自北京中衫金桥生物技术有限公司；所用一抗为鼠抗人 CD44V6 单克隆抗体购置北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

免疫组化染色 采用二步法，具体步骤按 PV 两步法进行。用光学显微镜观察免疫组织化学染色的切片，进行半定量评估，无论胞膜染色还是胞浆染色均认为阳性。参考 Mathew 等[1]的分级标准，无阳性细胞者或<5%细胞着色为阴性（-），<50%细胞着黄色或者<30%细胞着棕黄色者为阳性（+），>50%细胞着黄色或者>30%细胞着棕黄色者为强阳性（++）。

1.3 统计学处理

应用 SPSS10.0 软件作统计学处理。染色阳性及强阳性合并为染色阳性组，与染色阴性组比较。计数资料用率表示，免疫组织化学染色结果与临床病理参数的关系采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD44V6 在正常肺组织与肺癌组织中的表达

CD44V6 蛋白在正常肺组织中阳性表达率为 0%（0/15），在肺癌组织中阳性表达率为 69.23%（45/65），二者比较差异具有统计学意义（χ^2=8.253，P=0.010）；CD44V6 蛋白在肺癌淋巴结转移阳性组表达率 80.0%（20/25），在淋巴结转移阴性组表达率为 37.5%（15/40），二者比较差异具有统计学意义（χ^2=6.384，P=0.021）（表 1、2）。CD44V6 在正常肺组织及肺癌组织的表达见图 1-2。

2.2 CD44V6 表达与肺癌临床病理特征的关系

CD44V6 蛋白表达水平与肺癌病理类型、分化程度等无关，与有无区域淋巴结转移及远处转移有关（表 2）。

2.3 Ezrin 在正常肺组织与肺癌组织中的表达

Ezrin 蛋白在正常肺组织中阳性表达率为 100%（15/15），在肺癌组织中表达率为 72.3%（47/65），二者比较差异具有统计学意义（χ^2=4.460，P=0.036）；正常肺组织中胞浆表达占 6.6%（1/15），肺癌组织中胞浆表达占 40.4%（19/47），二者比较差异具有统计学意义（χ^2=6.225，P=0.016）；Ezrin 蛋白在肺癌淋巴结转移阴性组表达率为 82.5%（33/40），在淋巴结转移阳性组表达率为 60.0%（15/25），二者比较差异具有统计学意义（χ^2=6.194，P=0.023）；另外肺癌组织中淋巴结转移阳性组，胞浆表达占 66.6%（10/15），同淋巴结转移阴性组占 30.3%相比（10/33）差异亦具有统计学意义（χ^2=5.021，P=0.041）（表 3）。Ezrin 蛋白在正常肺组织及肺癌的表达见图 3-5。

2.4 Ezrin 表达与肺癌临床病理特征的关系

Ezrin 蛋白表达水平与肺癌病理类型、分化程度等无关，与有无区域淋巴结转移及远处转移有关（表 4）。

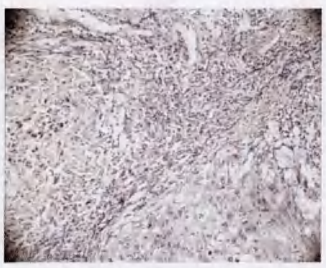


图 1 CD44V6 在正常肺组织中阴性表达（×400）

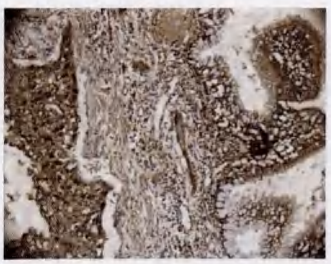


图 2 CD44V6 在肺癌组织中阳性表达（×400）

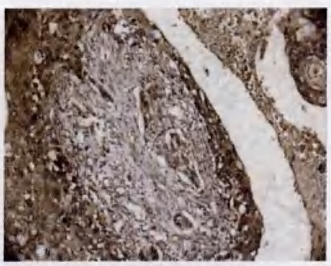


图 3 Ezrin 在正常肺组织胞膜和胞浆表达（×400）

表 1　肺癌组织与正常肺组织 CD44V6 蛋白表达的比较

组织	n	CD44V6 表达			χ^2 值	P 值
		−	+	++		
肺癌	65	20(30.7%)	14(21.5)	31(47.8%)	8.253	0.010
正常肺	15	15(100%)	0(0%)	0(0%)		

表 2　CD44V6 蛋白表达与临床病理特征的关系

临床病理特征		n	CD44V6 表达			χ^2 值	P 值
			−	+	++		
病理类型	腺癌	35	5(14.2%)	10(28.5%)	20(57.3%)	3.862	0.066
	鳞癌	25	8(32.0%)	6(24.0%)	11(44.0%)		
	腺鳞癌	5	1(20.0%)	1(20.0%)	3(60.0%)		
分化程度	高分化	6	1(16.70%)	2(33.3%)	3(50.0%)	2.181	0.326
	中分化	47	8(17.0%)	9(19.1%)	30(63.9%)		
	低分化	8	2(25.0%)	3(37.5%)	3(37.5%)		
	未分化	4	1(25.0%)	1(25.0%)	2(50.0%)		
淋巴结	N_0	38	5(13.1%)	6 (15.7%)	27(71.2%)	6.327	0.018
	N_1	19	7(36.8%)	3(15.8%)	9(47.4%)		
	N_2	7	2(28.5%)	2(28.5%)	3(43.0%)		
	N_3	1	1(100%)	0(0.0%)	0(0.0%)		
远处转移	M_0	60	11(18.3%)	9(15.0%)	40(66.7%)	8.216	0.013
	M_1	5	3(60.0%)	0(0.0%)	2(40.0%)		
pTNM 分期	Ⅰ	25	4(16.0%)	4(16.0%)	17(68.0%)	1.753	0.272
	Ⅱ	20	5(25.0%)	4(26.6%)	11(48.4%)		
	Ⅲ	15	3(20.0%)	4(20.0%)	8(60.0%)	9.220	0.007
	Ⅳ	5	3(60.0%)	2(40.0%)	0(0.0%)		
淋巴结转移	有	25	5(20.0%)	4(16.0%)	16(64.0%)	6.384	0.021
	无	40	25(62.5%)	7(17.5%)	8(20.0%)		

表 3　肺癌组织与正常肺组织 Ezrin 蛋白表达的比较

		Ezrin				Ezrin 定位				
	n	−	+	χ^2 值	P 值	n	胞浆	胞膜	χ^2 值	P 值
正常肺	15	0(0%)	15(100%)	4.460	0.036	15	1(6.7%)	14(96.3%)	6.225	0.016
肺癌	65	18(27.7%)	47(72.3%)			47	19(40.4%)	28(59.6%)		
淋巴结转移阴性组	40	7(17.5%)	33(82.5%)	6.194	0.023	33	10(30.3%)	23(69.7%)	5.053	0.042
淋巴结转移阳性组	25	10(40.0%)	15(60.0%)			15	10(66.7%)	5(33.3%)		

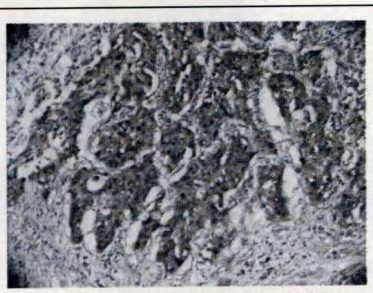


图 4　Ezrin 在肺癌组织胞浆中表达（×400）

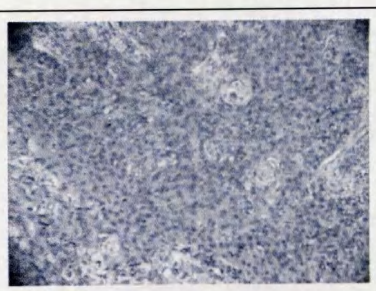


图 5　Ezrin 在肺癌组织阴性表达（×400）

表 4 Ezrin 蛋白表达与临床病理特征的关系

临床病理特征		n	Ezrin 表达			χ^2 值	P 值
			-	+	++		
病理类型	腺癌	35	4(11.4%)	9(25.7%)	22(62.9%)	3.921	0.068
	鳞癌	25	7(28.0%)	6(24.0%)	12(48.0%)		
	腺鳞癌	5	1(20.0%)	0(0.0%)	4(80.0%)		
分化程度	高分化	6	0(0.0%)	2(33.3%)	4(66.7%)	2.185	0.324
	中分化	47	9(19.1%)	10(21.2%)	28(59.7%)		
	低分化	8	2(25.0%)	3(37.5%)	3(37.5%)		
	未分化	4	1(25.0%)	1(25.0%)	2(50.0%)		
淋巴结	N_0	38	5(13.1%)	5 (13.1%)	28(73.8%)	6.705	0.017
	N_1	19	8(42.1%)	3(15.8%)	8(42.1%)		
	N_2	7	2(28.5%)	2(28.5%)	3(43.0%)		
	N_3	1	1(100%)	0(0.0%)	0(0.0%)		
远处转移	M_0	60	12(20.0%)	9(15.0%)	39(65.0%)	8.101	0.012
	M_1	5	3(60.0%)	2(40.0%)	0(0.0%)		
pTNM 分期	Ⅰ	25	4(16.0%)	3(14.0%)	18(70.0%)	1.721	0.252
	Ⅱ	20	5(25.0%)	3(15.0%)	12(60.0%)		
	Ⅲ	15	3(20.0%)	3(20.0%)	9(60.0%)	9.534	0.005
	Ⅳ	5	3(60.0%)	2(40.0%)	0(0.0%)		
淋巴结转移	有	25	10(40.0%)	4(16.0%)	11(44.0%)	6.194	0.023
	无	40	7(17.5%)	7(17.5%)	26(65.0%)		

3 讨 论

3.1 CD44V6 蛋白

CD44 为一未分类的黏附分子，具有促进细胞黏附、参与信号传递等多种生物学功能。人类 CD44 基因由 20 个外显子组成，其外显子可分为组成型外显子及 V 区变异型外显子。CD44V6 蛋白是人类白细胞分化抗原 CD44 基因第 6 号变异型外显子在转录过程中被插入到 mRNA 中所形成的一种跨膜糖蛋白，由于出现了变异外显子的特殊表达，使其黏附能力大为增强，从而改变了细胞的理化特性。它在肿瘤中有特殊表达，与多种恶性肿瘤的转移有关[2]。

Penno 等[3]发现将高表达 CD44 的癌细胞株静脉接种大鼠后在肺部形成几十个肉眼可见的转移灶，而低表达 CD44 的癌细胞株静脉接种后仅在肺部形成 1~2 个肉眼不可见的转移灶，提示 CD44 可作为转移促进因子在肿瘤的生长和扩散中起重要作用。1991 年 Gunthert 等[4]采用针对大鼠转移性胰腺癌细胞表面糖蛋白的一种单抗，分离其编码抗原的 cDNA 序列，分析表明与 CD44 同源，后证实为 CD44V6，将这种单抗与肿瘤细胞同时注入裸鼠体内，可延缓甚至完全阻断其淋巴结和肺转移灶形成。该试验最早提出了 CD44V6 与肿瘤转移相关。已有研究证实，CD44V6 高表达的癌细胞可能获得淋巴细胞的“伪装”，逃避人体免疫系统的识别和杀伤，更易进入淋巴结形成转移[5]。本研究显示，在肺良性病变中未见 CD44V6 表达，而肺癌中均有表达，且与组织类型、分化程度无关，与临床分期及淋巴结转移呈正相关，有淋巴结转移者其阳性率显著高于无转移者。所以我们可将 CD44V6 的表达作为判断 NSCLC 转移能力的一个实验室指标，对预测 NSCLC 淋巴结转移具有重要意义。

3.2 Ezrin 蛋白

Ezrin 是 1981 年首先作为表皮生长因子受体蛋白酪氨酸激酶的底物被发现，1983 年由 Bretscher 在鸡的小肠上皮刷状缘纯化，1989 年 Gould 等克隆得到人 Ezrin cDNA 并将其测序。越来越多的研究表明，Ezrin 表达与亚细胞定位改变是早期肿瘤转移的重要特征。Ezrin 是将膜蛋白与肌动蛋白细胞骨架连接起来的桥接蛋白，这种连接通过介导膜与细胞骨架的连接，在细胞形态改变、运动、黏附及信号转导等方面发挥重要作用。活化的 Ezrin 与细胞表面的分子结合后能将信号转导到下游从而影响细胞功能，亦可通过连接 F-肌动蛋白丝与胞膜的 CD44、E-钙黏蛋白、细胞间黏附分子等发挥功能。生理状态下，Ezrin 能维持细胞极性、参与细胞运动、细胞间

及细胞与 ECM 黏附,调节免疫细胞功能,并与细胞衰老死亡有关。Ezrin 蛋白广泛存在于微绒毛、纤毛、细胞膜皱褶以及细胞间连接处。Ezrin 蛋白表达具有相对的组织和细胞特异性,在成人组织中分布于脑、肾、肠、肺、周围神经和施万细胞等,尤其在小肠、胃、肺、胰腺和肾中具有极高的表达水平。

Ezrin 蛋白亚细胞定位于胞质膜、顶端的微绒毛、肌动蛋白包含的表面物质、细胞间黏结点。Ezrin 蛋白从胞膜到胞浆移位的机制,可能与 Ezrin 蛋白存在状态有关。Ezrin 蛋白在细胞中以休眠和激活两种状态存在。研究表明激活形式参与膜分子间相互作用,休眠形式存在于胞浆中。在正常肺组织中以激活状态存在,在肺癌组织中以休眠状态存在。根据免疫组化结果(表 3),肺癌组织及淋巴结转移阳性的肺癌组织 Ezrin 蛋白在胞浆中的表达比正常肺组织及淋巴结转移阴性的肺癌组织在胞浆中的表达高,二者差异具有统计学意义,提示 Ezrin 蛋白有从胞膜到胞浆移位的亚细胞定位改变。研究表明[6],Ezrin 蛋白的丧失使肿瘤细胞聚集现象减少而分离现象增加,不能维持细胞间极性,细胞间隙增宽,伪足形成,运动能力增强,与基质黏附力增加,侵袭力增强。在胞浆中 Ezrin 蛋白相对高表达,这种相对高表达与肿瘤细胞的转移潜力密切相关,可能是使位于胞膜激活状态的 Ezrin 蛋白转移到胞浆而进一步使其丧失,同时使其由激活状态转为休眠状态而不能发挥正常的生理功能和膜分子间的作用来促进肿瘤转移的。

关于 Ezrin 在肿瘤侵袭转移过程中的作用目前有两种相反的观点。一种观点认为,Ezrin 在肿瘤细胞下调、肿瘤侵袭转移过程中起抑制作用,导致细胞间黏附力下降,细胞移动侵袭能力增强。另一种观点认为,Ezrin 为肿瘤侵袭转移的促进因素,在多种侵袭性癌组织中高表达,参与肿瘤细胞侵袭与转移。由此推测,Ezrin 蛋白在肿瘤的发生及发展过程中发挥着不同的作用,尤其是 Ezrin 蛋白的亚细胞定位的改变在肿瘤的转移中尤为重要[7]。我们的研究显示 Ezrin 在肺癌组织中的表达下调,与区域淋巴结转移和远处转移有关,且存在 Ezrin 从细胞膜到细胞浆移位改变。目前 Ezrin 下调的机制仍不清楚,Zeng H 等[8]研究证实 Ezrin 表达下调伴随着高度增生趋势,但有关其上游调节因素还需进一步研究。

3.3 CD44V6 与 Ezrin 的关系

CD44 是第一个被发现的可以与 ERM 蛋白家族相互作用的细胞表面蛋白,并且通过体外实验证实 CD44 可直接与 ERM 蛋白家族大多数成员的氨基端连接。Ezrin 与 CD44 间的连接由 GTP 连接蛋白 Rho 和 PIP2 调控,后者连接在细胞膜的氨基端。通过免疫荧光试验发现仓鼠和小鼠细胞中 CD44 和 Ezrin 连接在一起。关于 Ezrin 与 CD44 形成的复合体与肿瘤转移的关系研究证实,两者在转移的肿瘤细胞中共同表达。Ezrin 直接与 CD44 分子的胞浆部分发生作用,影响细胞骨架蛋白的构象和分布,从而改变肿瘤细胞的运动能力、细胞间及细胞与 ECM 连接,促进转移和增殖。这与 Ezrin 蛋白从胞膜到胞浆的亚细胞改变有着密切关系[9]。本研究显示在肺癌组织中 Ezrin 与 CD44 呈负相关的关系。但二者在肺癌中的具体作用机制有待于进一步的研究。

从临床应用角度,我们目前开展的研究初步揭示了 CD44V6 与 Ezrin 表达水平及部位与肺癌发生发展之间的关系。今后通过在不同肿瘤中深入研究 CD44V6 与 Ezrin 表达水平与患者预后的关系,有可能使 CD44V6 与 Ezrin 成为多种肿瘤预后或转移的分子标志物。同时,通过对 CD44V6 与 Ezrin 相互关系的进一步深入研究,将有助于证实其在肿瘤发生发展中的确切作用机制,找到有效治疗肿瘤转移的生物靶点,从而有效的控制肿瘤转移。

参 考 文 献

[1] Mathew J, Hines J E, Obafunwa J O, et al.CD44 is expressed in hepatocellular carcinoma showing vascular invasion[J]. Pathol, 1996, 179(1):74-79.

[2] Takigawa N, Segawa Y, Mandai K, et al.Serum CD44 levels in patients with non small cell lung cancer and their relationship with clinicopathological features lung cancer[J]. Cancer Res, 1997, 18(2):147-157.

[3] Penno M B, August J T, Baylin S B, et al.Expression of CD44 in human lung tumors[J].CancerRes, 1994, 54(5):1381-1387.

[4] Gunthert U, Hofmann M.Rudy W, et al.A new variant of glycoprotein CD44 confer metastatic potential to rat carcinoma cells [J]. Cell, 1991, 65 (1):13-24.

[5] Seiter S, Arch R, Reber S, et al.Prevention of tumor metastasis formation by antivariant CD44[J].Exp Med, 1993, 177(2):442-455.

[6] Hiscox S, Jiang WG.Ezring regulates cell-cell and cell-matrixadhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin [J]. Cell Sci, 1999, 112 (18):3081-3090.

[7] 兰 岚,孙铁英,刘东戈,等.Ezrin 在肺癌中的表达及临床意义[J].中国肺癌杂志,2008,11(1):67-72.

[8] Zeng H, Xu L Xiao D, et al.Altered expression of Ezrin in esophageal squamous cell carcinoma[J].Histochem Cytochem, 2006, 54(8):889-896.

[9] Martin T A, Harrison G, Mansel RE, et al.The role of the CD44/Ezrin complex in cancer metastasis[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2003,46(2):165-186.

(责任编辑:关蕴良)