DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.023
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

文章编号:1000-5404(2001)05-0541-03

论著

CD44v3、CD44v6在非小细胞肺癌中的表达及其与淋巴结转移的关系

吴秋平[1],向明章[1],钟前进[2],肖颖彬[2] (第三军医大学附属新桥医院:[1]胸外科;[2]心血管外科;重庆 400037)

提 要:目的 研究CD44v3、CD44v6在肺癌中的表达及其与肺癌淋巴结转移的关系。方法 采用免疫组化、流式细胞术测定52例非小细胞肺癌(NSCLC)和12例正常肺组织的CD44v3、CD44v6的表达水平,并分析其与肺癌淋巴结转移之间的关系。结果 肺癌组织CD44v3、CD44v6水平明显高于正常肺组织($P<0.05$)。CD44v3、CD44v6在淋巴结转移组中的阳性表达率显著高于无淋巴结转移组($P<0.05$)。结论 CD44v3、CD44v6在非小细胞肺癌中有不同程度的表达,CD44v6与肺癌淋巴结转移的关系更密切,表达CD44v6的肺癌更易向周围淋巴结转移。检测CD44v6在肺癌中的表达,可能作为判断肺癌淋巴结转移潜能的一个辅助指标。

关键词:非小细胞肺癌;CD44基因;转移
中图法分类号:R392.13;R73-37;R734.2 文献标识码:A

Expression of CD44v3 and CD44v6 in patients with non small cell lung cancer and its relationship with lymph node metastasis

WU Qiu-ping, XIANG Ming-zhang, ZHONG Qian-jin, XIAO Ying-bin (Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40037, China)

Abstract: objective To study the expression of CD44v3 and CD44v6 and its relationship with lymph node metastasis in non small cell lung cancer (NSCLC). Methods Specimens (lung tissues) from 52 cases of NSCLS and 12 normal lung tissue were used to detect the expression of CD44v3 and CD44v6 by immunohistochemical method (SP method) and flow cytometry, correlation was analysed between the expression of CD44v3 or CD44v6 and lymph node metastasis of the lung cancer. Results CD44v3 and CD44v6 were not, or weakly expressed in all normal lung tissues from 12 cases. In contrast, the expression levels of CD44v3 and CD44v6 were obviously higher in lung cancer than that in normal tissue ($P<0.05$). The expression of CD44v3 and CD44v6 were much higher in patients with lymph node metastasis than those without lymph node metastasis ($P<0.05$). Conclusion ①CD44v3 and CD44v6 are expressed with different degree in NSCLC. ②There is a close relationship between high expression of CD44v6 and lymph node metastasis, and CD44v6 may be a co-marker for predicting the potentiality of lymph node metastasis in lung cancer.

Key words: non small cell lung cancer; CD44; metastasis

肺癌的发生、发展是多因素共同作用的结果。其中介导细胞粘附作用的细胞表面粘附分子的表达及其在肿瘤中的作用成为目前肿瘤研究中的一个重点。细胞粘附分子CD44及其变异体的表达在肿瘤的预测、早期诊断、病程进展、转移潜能与预后的估计等方面有很大的潜在价值。CD44v在人类癌的表达及其与转移的关系,在乳癌、大肠癌、肝癌、胃癌、脑肿瘤中研究较多且有较高的检出率,在肺癌中的表达研究较少。本实验采用免疫组化、流式细胞术等技术方法,以非小细胞肺癌手术切除标本和正常肺组织为研究对象,检测CD44v3、CD44v6在非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达,以及与肺癌淋巴结转移的相关性,以期对临床肺癌的诊断、治疗和预后判断提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本

52例标本取自第三军医大学附属新桥医院、大坪医院、西南医院肺癌手术病人,均经病理证实。鳞癌31例,腺癌21例;无淋巴结转移33例,有淋巴结转移19例;另取12例距离肿瘤组织5 cm以上的亦经病理证实的正常肺组织作为对照。

1.2 试剂

S-P免疫组化试剂盒、鼠抗人单克隆抗体CD44v3、鼠抗人单克隆抗体CD44v6为北京中山公司产品。FITC标记羊抗鼠IgG为美国Sigma公司产品。流式细胞仪为Facstar Plus型(Becton Dickison公司)。

1.3 方法

1.3.1 S-P法检测CD44v3、CD44v6在非小细胞肺癌及正常肺组织中的表达 免疫组化结果判定根据阳性细胞的显色有无和强弱分级。阳性信号为棕黄色颗粒,阳性分级:阴性(-),无显色;阳性(+),片中阳性细胞少于50%且染色浅;强阳性(++),片中阳性细胞50%以上或显色深。以药盒提供的阳性片为阳性对照,用TBS代替一抗为阴性对照。

1.3.2 流式细胞仪检测

1.3.2.1 单细胞悬液的制备 将组织块修剪为1.0 mm直径大小的小块。生理盐水漂洗,胰蛋白酶消化30 min(恒温37 ℃),要间断振荡或吹打,将吹打后的组织置于300目筛网上,以注射器内芯在网上轻搓,同时以磷酸缓冲液(PBS)将搓下的细胞冲洗入网下方的平皿中,将收集的细胞悬液离心,800 r/min离心5 min,弃上清,沉淀用2 ml PBS液漂洗,再以1 500 r/min离心5 min,弃上清液,以70%乙醇固定10 min,后再离心去除乙醇,PBS调整细胞数为1×10^6/ml,于4 ℃冰箱保存、备检。

1.3.2.2 免疫荧光染色 以PBS漂洗离心悬液2次,再将悬液分别装入3个试管。其中①、②管中加入50 μl特异的鼠抗

作者简介:吴秋平(1967-),男,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事CD44及其变异体与肺癌转移的关系方面的研究。电话:(023)68755288

收稿日期:2001-01-03;修回日期:2001-03-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

人 CD44s、CD44v6 单克隆抗体工作液，37 ℃孵育 1 h 后 4 ℃过夜。洗涤、离心 3 遍后用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1∶100)孵育 1 h，2 000 r/min 离心 5 min，弃上清以除去未结合的荧光抗体，PBS 洗 3 遍。③管为免疫阴性对照，以 20μl 羊抗鼠 IgG FITC 与细胞悬液反应，步骤同上。

1.3.2.3 流式细胞仪检测 用 Facstar Plus 型流式细胞仪检测。每份样品记数 1 万个细胞。由计算机自动分析数据并打印结果。

1.4 统计学处理

采用SAS 统计软件包对数据进行分析，采用 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 CD44v3、CD44v6 在正常肺组织和非小细胞肺癌中的表达

2.1.1 免疫组化结果 肺癌组织中 CD44v3 阳性率 57.7%(30/52)，CD44v6 阳性率 69.2%(36/52)。阳性表达部位位于细胞膜，呈明显棕黄色染色。正常肺组织未见 CD44v3、CD44v6 表达。CD44v6 阳性表达与鳞癌、腺癌患者的年龄、性别无关。

2.1.2 流式细胞仪检测结果 CD44v3、CD44v6 表达在肺癌中有不同程度的表达，肺癌组织 CD44v3、CD44v6 水平明显高于正常肺组织($P<0.05$)，见表 1。

表 1 正常肺组织、肺癌组织 **CD44v3、CD44v6** 表达水平($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Expression of CD44v3 and CD44v6 in normal lung tissue and lung carcinoma($\bar{x}\pm s$)

Tissue Source	n	CD44v3	CD44v6
Normal lung tissue	4	4.78±1.52 *	5.56±2.71 *
Lung carcinomas	9	20.34±10.12	22.72±12.16

*: $P<0.05$ *vs* lung carcinoma

2.2 肺癌淋巴结转移者中 CD44v3、CD44v6 表达水平

2.2.1 免疫组化结果 CD44v3、CD44v6 在淋巴结转移组中的阳性表达率显著高于无淋巴结转移组($P<0.05$)，见表 2。

表 2 肺癌淋巴结转移病例中 **CD44v6、CD44v3** 的免疫组化结果

Tab 2 Expression of CD44v3 and CD44v6 in cases with or without lymph node metastasis

Lymphy node metastasis	n	CD44v3			Positive rate (%)	CD44v6			Positive rate (%)
		−	+	++		−	+	++	
(+)	19	4	5	10	78.9 *	1	7	11	94.7 *
(−)	33	17	10	6	48.5	13	10	10	60.6

*: $P<0.05$ *vs* (−)

2.2.2 流式细胞仪检测结果 有淋巴结转移肺癌 CD44v3、CD44v6 的表达水平显著高于无淋巴结转移肺癌($P<0.05$)，见表 3。

表 3 肺癌淋巴结转移病例 **CD44v3、CD44v6** 流式细胞仪检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Level of CD44v3 and CD44v6 in the cases with or without lymph node metastasis by flow cytometry detection($\bar{x}\pm s$)

Lymphy node metastasis	n	CD44v3	CD44v6
(+)	5	27.53±13.32 *	31.30±14.74 *
(−)	4	10.68±4.22	11.99±6.85

*: $P<0.05$ *vs* (−)

3 讨论

CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白粘附分子，它分为：①标准型 CD44s，主要表达在造血细胞、淋巴细胞等正常细胞上。②变异型 CD44v，主要表达上皮源性细胞和肿瘤中。由于 V 区外显子在 mRNA 水平的选择性拼接，产生多种 CD44 变异体，参与体内多种生理功能：①介导淋巴细胞与后毛细血小静脉中的高内皮细胞结合，使淋巴细胞穿过血管壁回到淋巴组织；②参与淋巴细胞的激活过程；③能与细胞外基质中的透明质酸、胶原蛋白、纤粘蛋白、层粘蛋白等基质分子结合；④能与细胞骨架蛋白结合，参与细胞的伪足形成，并与细胞的迁移运动有关；⑤参与肿瘤细胞的增生与转移。CD44 基因的变异性表达与肿瘤转移的相关性是近几年提出的新课题。Gunthert 等[1] 用单克隆抗体技术发现 CD44v6 基因能够使大鼠胰腺癌细胞获得转移能力。在众多 CD44 变异体中，对 CD44v6 的研究较多，目前比较肯定的是 CD44v6 表达与胃癌和结肠癌的转移及对预后的影响密切相关[2~4]。

本研究结果发现，CD44v3、CD44v6 在肺癌中有不同程度的表达，肺癌组织 CD44v3、CD44v6 水平明显高于正常肺组织($P<0.05$)，有的标本既表达 CD44v3，又表达 CD44v6。提示 CD44v3、CD44v6 普遍存在于肺癌组织中，且多种形式的 CD44v 可在同一肿瘤内共存。CD44v6 的阳性率高于 CD44v3，说明 CD44v6 与肺癌的关系更为密切。

在许多肿瘤中还发现，虽有 CD44v 的表达，但其类型不一。有关 CD44 及其变异体与肺癌淋巴结转移的相关性的研究，报道较少。黄丹等[5] 用 LSAB 检测 50 例 NSCLC 中 CD44 的表达，认为 NSCLC 的 CD44 表达与其淋巴结转移有相关性，但该研究仅用了广谱型 CD44 单克隆抗体，且指标的特异性不强。本实验结果显示：CD44v3、CD44v6 的表达量在有淋巴结转移及无淋巴结转移的两组病例间有显著差异($P<0.05$)，CD44v3 和 CD44v6 阳性表达率在肺癌淋巴结转移组有高表达，且以 CD44v6 与肺癌淋巴结转移的关系更密切，说明表达 CD44v6 的肺癌更易向周围淋巴结转移。提示检测 CD44v6 在肺癌中的表达，可能作为判断肺癌淋巴结转移潜能的一个辅助指标。CD44 变异体促转移作用的机制尚不清楚，其可能的机制是：①细胞表面 CD44v 分子的 NH_2^- 末端功能区能连接细胞外间质及基底膜的透明质酸盐，从而调节细胞的运动及形态[6]。肿瘤细胞即可能通过其表达的 CD44v 与透明质酸盐的这种反应而“锚”在宿主细胞外间质及基底膜上[7]，导致了侵袭的发生。另外，透明质酸降解产物还能启动局部的管发生，为侵袭转移奠定基础[8]。②CD44 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[9]。③CD44v 通过与远隔血管和淋巴管内尚未查明的配体结合，使转移至该处的癌细胞更稳定地寄宿、集

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

落生长,有效地形成转移瘤[10]。

在研究中还发现,5 例有淋巴结移者 CD44v3、CD44v6 表达阴性,这说明 CD44v3、CD44v6 虽然参与了肺癌的转移,但癌的发生、发展和转移不只是某一个因素决定的,而是多因素相互作用的结果。

参考文献:

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

[2] Saito H, Tsujitani S, Katano K, *et al*. Serum concentration of CD44 variant 6 and relation to prognosis in patients with gastric carcinoma[J]. Cancer, 1998, 83(6): 1 094—1 101.

[3] 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.

[4] Bhatavdekar J M, Padel D D, Chikhlikar P R, *et al*. Overexpression of CD44: a useful independent predictor of prognosis in patiants with colorectal carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 1998, 5(6): 495—501.

[5] 黄　丹,廖剑辉,司徒锐. 人肺癌细胞 CD44 表达及其与淋巴结转移的相关性[J]. 中华病理杂志, 1997, 26(2): 116—117.

[6] Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation[J]. Lancet, 1992, 340(8 826): 1 053—1 058.

[7] Mayer B, Jauch K W, Gunthert U, *et al*. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer[J]. Lancet, 1993, 342(8 827): 1 019—1 022.

[8] West D C, Kumar S. Hyaluronan and angiogenesis[J]. Ciba Found Symp, 1989, 143(12): 187—201.

[9] Finn L, Dougherty G, Finley G, *et al*. Alternative splice of CD44 pre-mRNA in human colorectal tumors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 200(2): 1 015—1 022.

[10] Arch R, Wirth K, Hofmann M, *et al*. Participation in normal immune responses of a metastasis inducing splicing variant of CD44[J]. Science, 1992, 257(5 070): 682—685.

(编辑　潘式文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)05-0543-01

31 例心脏粘液瘤的外科治疗

Surgical treatment of 31 cases of cardiac myxoma

陈柏成,肖颖彬,陈　林,钟前进,王学锋,陈劲进　(第三军医大学附属新桥医院心血管外科, 重庆 400037)

31 例病人中男 11 例,女 20 例,年龄 7~60 岁,其中 12 岁以下 3 例,18 岁以上 28 例。体重 20~57 kg。病程 1 个月至 10 年,劳累后心悸,气促 28 例。反复发作有一过性晕厥,眩晕 4 例,肢体栓塞者 1 例,长期低热,贫血者 9 例。3 例心悸,气促,咯血,院外以风湿性心脏病,二尖瓣狭窄治疗,病情无缓解反而加重,经超声检查明确诊断;1 例主诉为胸痛。症状因体位改变而变化显著者 6 例。心尖区闻及舒张期杂音 29 例,双期杂音 9 例,肿瘤扑落音 13 例。心电图示心房纤颤 5 例,右室肥厚 8 例。X 线胸片示两肺瘀血 26 例,心胸比例 0.49~0.68。超声心动图检查均探及心腔内团块状物随心脏舒缩而移动于心房,心室之间。

全组均在体外循环下手术,其中 19 例采用冷晶体心脏停搏液灌注(中度低温 25~28 ℃),2 例采用冷血间断灌注,10 例采用浅低温不停跳方法保护心肌。4 例病人由于严重心衰,循环不稳定,而行急诊手术。均经右心房-房间隔切口,切除瘤蒂周围 0.5~1.0 cm 的房间隔或心房壁组织,探查并彻底冲洗各心腔以防止遗漏多发瘤或瘤栓。全组 28 例肿瘤呈团块状,有完整包膜 26 例,无包膜 5 例,呈团块状,半透明,质脆,胶冻样。左房粘液瘤 29 例,其中多发瘤 1 例。瘤蒂位于房间隔 29 例,右心房壁 1 例,二尖瓣及三尖瓣 1 例。

术后死亡 1 例,病人术前严重心衰,行急诊手术,术中见全心明显水肿,术后发生顽固性室性心律失常而死亡。

讨论

心脏粘液瘤是起源于心内膜下间叶组织的原发性心脏良性肿瘤。多发生于成人,儿童及婴儿少见。多发生于女性[1]。多发生于左心房,其余依次为右心房,右心室,左心室。瘤蒂大多位于卵园窝处,其余依次为心房壁,心耳,心瓣膜,心室游离壁,室间隔。薛淦兴等[2]总结 211 例心脏粘液瘤综合征属复杂心脏粘液瘤,粘液细胞有远距离种植能力,具有低度恶性或恶性倾向,多发于男性青年。本组发生于左房 28 例,右房 2 例。多发瘤 1 例。年龄 7~60 岁,男 11 例,女 20 例,与文献基本符合。本组中有 1 例罕见的多发粘液瘤,为一 7 岁,女性,发生于二尖瓣前瓣及三尖瓣隔瓣。

依据病史、体征及彩色多普勒超声心动图可明确诊断。其中彩色多普勒超声心动图具有确诊价值,可确定瘤体位置,数量,所在心腔,有无合并心脏疾患等。由于粘液瘤对心功能影响迅速而严重,瘤栓脱落可导致栓塞,瘤体嵌顿于房室瓣口可引起猝死等,故本病一经确诊应立即尽早手术治疗。我们选用右心房—房间隔切口显露术野。对瘤蒂附着处周围房间隔或心房壁组织予以切除以防局部复发。切除肿瘤后彻底冲洗心腔,以防止瘤组织脱落导致肿瘤种植或栓塞。术后处理同一般体外循环手术,但应注意避免过量补充胶体液而引致急性左心衰竭及肺水肿。本组 10 例病人在浅低温不停跳下行手术,术后心功能恢复较冷晶体,冷血心肌保护要好。

关键词: 心脏粘液瘤; 外科治疗; 体外循环; 不停跳
中图法分类号: R732.104　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Hall R A, Anderson R P. Cardiac neoplasms[A]. In: Henry E L. Cardiac Surgery in the adult[M]. New York: McGRAW-HILL health professions division, 1997. 1 346—1 353.

[2] 薛淦兴,吴清玉,吕　锋,等. 心脏粘液瘤的新概念[J]. 中华外科杂志, 1995, 33(6): 323—325.

(编辑　薛国文)

作者简介: 陈柏成(1965—),男,湖南省临武县人,硕士,主治医师,主要从事未成熟心肌保护方面的研究。电话: (023)68755579

收稿日期: 2000-07-20; 修回日期: 2000-10-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net