

文章编号:1005-6947(2008)01-0094-04

· 简要论著 ·

CD44_{V6}, c-Met 在原发性肝癌中的表达及其临床意义

张克兰^{1,2}, 王志明¹, 魏尚典², 陈能志², 黎有典², 魏伟¹, 董良¹

(1. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省常德市第一人民医院 普通外科, 湖南 常德 415003)

摘要:目的 探讨黏附分子 CD44_{V6} 与原癌基因 c-Met 共同在原发性肝癌中的表达、相关性及其与临床病理指标、复发、预后之间的关系。方法 采用免疫组织化学方法检测 50 例肝癌组织及 46 例癌旁组织中 CD44_{V6}, c-Met 的表达情况, 并分析肝癌细胞中 CD44_{V6}, c-Met 的表达与临床资料的关系。结果 (1) CD44_{V6} 在肝癌组织中的阳性表达率为 30.0%, CD44_{V6} 表达与静脉侵犯明显有关 ($P < 0.05$)。 (2) c-Met 阳性表达率为 52.0%, c-Met 表达与 Edmondson 分级明显有关 ($P < 0.05$)。 (3) CD44_{V6} 与 c-Met 表达呈有关 ($P < 0.05$)。 (4) CD44_{V6}, c-Met 阳性表达患者较 CD44_{V6}, c-Met 阴性表达患者术后 2 年内的复发率明显升高 ($P < 0.05$); CD44_{V6}, c-Met 阳性表达组术后生存率均明显低于阴性表达组 ($P < 0.01$)。结论 CD44_{V6}, c-Met 在肝癌的发生、发展有重要作用。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 94-97]

关键词: 肝肿瘤/病理学; CD44_{V6}; c-Met; 基因表达; 免疫组化

中图分类号: R 735.7

文献标识码: B

原发性肝癌的发生、复发、转移是一个十分复杂的肿瘤生物学问题, 其基础是由于基因突变, 使肿瘤细胞增殖并获得转移特性, 癌组织的黏附性降低, 癌细胞的迁移, 细胞间黏附分子的作用和细胞外基质的降解, 穿透基底膜进入结缔组织, 并侵袭淋巴结和血管等组织而发生转移^[1]。影响肿瘤细胞侵袭和转移行为的因素有很多。本研究旨在探讨黏附分子 CD44_{V6} 与原癌基因 c-Met 共同在原发性肝癌中的表达及与临床病理指标、复发、预后之间的关系。

1 资料与方法

1.1 标本及分组情况

1.1.1 肝癌组 50 例标本取自 2001 年—2004 年湘雅医院手术切除且均有随访资料的原发性肝癌患者, 男 45 例, 女 5 例; 年龄 21 ~ 68 (平均

48.45 ± 19.38) 岁。其中合并肝硬化 44 例; TNM 分期中 I ~ II 期 36 例, III ~ IV 期 14 例; 合并门静脉癌栓者 10 例; 肝细胞性肝癌 46 例, 胆管细胞性肝癌 3 例, 混合细胞性 1 例。术前均未接受介入、射频及化疗等治疗。

1.1.2 癌旁组织组 癌旁组织 (≥ 癌组织 2 cm) 46 例取自上述肝癌患者标本中。

1.2 观察指标

检测肝癌及癌旁组织中 CD44_{V6}, c-Met 的表达, 并分析两者表达与以下临床参数: 性别、年龄、乙肝表面抗原、甲胎蛋白、肿瘤直径、肿瘤结节数目、是否有肝硬化、Edmondson 分级、肝内静脉侵犯、包膜情况及其与肝癌复发、预后之间的关系。

1.3 主要试剂

兔抗人 c-Met 多克隆抗体、鼠抗人 CD44_{V6} 单克隆抗体、兔抗羊的 SP 试剂盒、DBA 显色试剂盒, 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 免疫组化

操作步骤按免疫组化试剂盒的说明进行。用

收稿日期: 2007-09-12; 修订日期: 2007-11-09。

作者简介: 张克兰, 男, 常德市第一人民医院副主任医师, 主要从事肝胆胰方面的研究。

通讯作者: 张克兰 E-mail: zhangkl88@163.com

试剂盒提供用已知 c-Met 阳性乳腺癌组织切片、CD44_{v6} 阳性的淋巴结切片作为阳性对照。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 替代一抗作为阴性对照。

1.5 结果判断

双盲法阅片。CD44_{v6} 免疫组化染色则以细胞膜或细胞膜、胞浆中同时出现棕黄色颗粒者为阳性结果 (图 1); c-Met 免疫组化染色以细胞浆中出现棕黄色颗粒者为阳性结果 (图 2)。评分方法: 将染色强度评分 (无为 0 分; 浅黄色为 1 分; 棕黄色为 2 分; 棕褐色为 3 分) 和阳性细胞率评分 (<5% 为 0 分; 5~10% 为 1 分; 11~20% 为 2 分; 21~50% 为 3 分; >50% 为 4 分) 之和为该切片评分值。设定评分 1-2 为阴性, >2 为阳性。

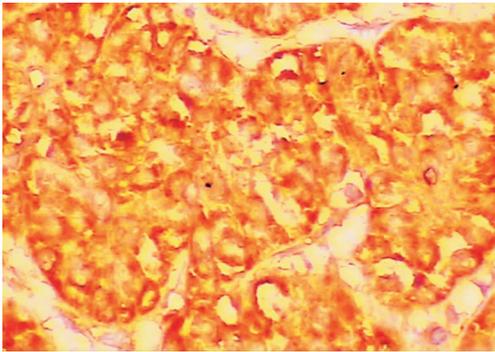


图 1 肝细胞癌 CD44_{v6} 阳性 (HE × 400)

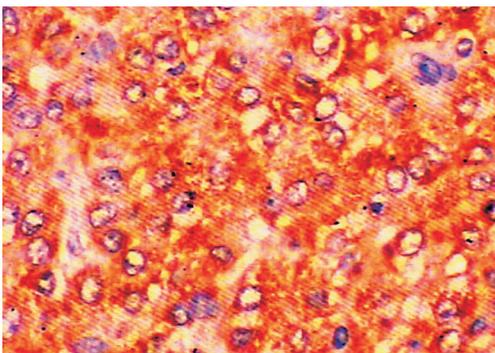


图 2 肝细胞癌 c-Met 阳性 (HE × 400)

1.6 统计学处理

计量资料以均数 ± 标准差表示, 使用 SPSS13.0 统计软件包辅助分析, 计数资料均采用四格表资料 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, 用 Kaplan-Meire 法计算中位生存时间及生存率, 绘制生存曲线。Log-Rank 法计算组间差异, $P < 0.05$ 认为差别有显著性。

2 结果

2.1 CD44_{v6}, c-Met 的表达与肝癌临床病理因素之间的关系

50 例肝癌组织中 15 例 (30.0%) CD44_{v6} 呈阳性表达, 35 例 (70.0%) CD44_{v6} 呈阴性表达。CD44_{v6} 表达与肝内静脉侵犯密切相关 ($P < 0.05$)。50 例肝癌组织中 26 例 (52.00%) c-Met 呈阳性表达, 24 例 (48.0%) 呈阴性表达。c-Met 表达与 Edmondson 分级密切相关 ($P < 0.05$)。46 例癌旁组织中, CD44_{v6} 无 1 例呈阳性表达, 2 例 (4.35%) c-Met 呈阳性表达, CD44_{v6}, c-Met 在肝癌组织与癌旁组织的表达差异均有非常显著性 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 CD44_{v6} 及 c-Met 的表达与肝细胞癌临床病理因素之间的关系

临床病理因素	n	CD44 _{v6} 阳性	P	c-Met 阳性	P
性别					
男	5	1	0.524	2	0.461
女	45	14		24	
年龄(岁)					
≤45	17	3	0.148	8	0.419
>45	33	12		18	
乙肝表面抗原					
阳性	40	11	0.341	22	0.310
阴性	10	4		4	
甲胎蛋					
阳性	38	13	0.217	21	0.312
阴性	12	2		5	
肿瘤直径(cm)					
<5	14	3	0.272	6	0.111
5~10	25	8		12	
>10	11	4		8	
肿瘤结节数					
单个	34	8	0.131	15	0.092
多个	16	7		11	
肝硬化					
无	6	1	0.409	2	0.295
有	44	14		24	
静脉侵犯					
有	10	7	0.004	7	0.179
无	40	8		19	
Edmondson 分级					
I~II	23	6	0.404	7	0.010
III~IV	27	9		19	
包膜					
完整	7	2	0.652	3	0.453
欠完整	43	13		23	

2.2 CD44_{v6}与c-Met表达间的关系

26例c-Met阳性的肝癌组织中,11例CD44_{v6}同时呈阳性表达,24例c-Met阴性的肝癌组织中,20例CD44_{v6}同时呈阴性表达。CD44_{v6}表达阳性的15例中,c-Met表达阳性11例(73.3%)。CD44_{v6}表达阴性的35例中,c-Met阴性20例(57.1%),两者表达有关($P < 0.05$)(表2)。

表2 CD44_{v6}与c-Met表达之间的关系

c-Met	例数	CD44 _{v6}			
		阳性		阴性	
		例数	(%)	例数	(%)
阳性	26	11	42.31	15	57.69
阴性	24	4	16.67	20	83.33

2.3 CD44_{v6},c-Met与原发性肝癌复发之间的关系

50例肝癌患者中,1年内复发13例,2年内复发22例,1,2年复发率分别为26.0%(13/50),44.0%(22/50)。CD44_{v6}阳性表达患者较CD44_{v6}阴性表达患者术后1,2年内的复发率均明显升高($P < 0.05$)。c-Met阳性表达患者较c-Met阴性表达患者术后1年内的复发率略升高,无统计学意义($P > 0.05$);术后2年内的复发率明显升高,($P < 0.05$)(表3)。

表3 CD44_{v6},c-Met表达与原发性肝癌复发间关系

复发时间	复发例数	CD44 _{v6}		P值	c-Met		P值
		阳性组(15例)	阴性组(35例)		阳性组(26例)	阴性组(24例)	
≤1年	13	8	5	<0.05	9	4	>0.05
≤2年	22	11	11	<0.05	15	7	<0.05

2.4 CD44_{v6},c-Met与原发性肝癌生存率之间的关系

50例肝癌患者中,3年间共死亡28例,1,2,3年死亡例数分别为9,19,28例;1,2,3年生存率分别为82.0%(41/50),62.0%(31/50),44.0%(22/50)。CD44_{v6}阳性表达组术后生存率明显低于CD44_{v6}阴性表达组,差异有非常显著性($P < 0.01$)。c-Met阳性表达组术后生存率明显低于c-Met阴性表达组生存率,差异有非常显著性($P < 0.01$)(表4)。

表4 CD44_{v6},c-Met与原发性肝癌生存率之间的关系

组别	例数	1年内死亡数	2年内死亡数	3年内死亡数	P值
CD44 _{v6} 阳性组	15	6	12	13	
CD44 _{v6} 阴性组	35	3	7	15	<0.01
c-Met阳性组	26	7	14	21	
c-Met阴性组	24	2	5	7	<0.01

3 讨论

CD44(白细胞抗原分化群44,cluster of differentiation 44)是一种细胞表面黏附分子,又称透明质酸受体。CD44_{v6}为其变异体,通常在肿瘤细胞表面异常表达,它不仅介导肿瘤细胞与细胞外基质的黏附,还参与肿瘤细胞之间、肿瘤细胞与血管内皮细胞、白细胞等的相互作用^[2]。研究表明CD44_{v6}与肿瘤的生长、浸润和转移有关^[3]。本实验显示CD44_{v6}在肝癌组织、癌旁组织中的表达差异有统计学意义,与Endo K等对107例肝细胞癌检测结果类似(27%)^[4]。CD44_{v6}还可影响基质金属蛋白酶的活性,使胶原IV降解,从而“创造途径”促进肝癌细胞侵袭^[5]。CD44_{v6}与基质主要成分透明质酸结合后,破坏基质的屏障功能,为浸润生长和血道转移提供条件。本实验发现CD44_{v6}表达与静脉侵犯明显有关($P = 0.004$),说明其在HCC的浸润过程中起重要作用。CD44_{v6}不但通过多种机制参与肿瘤的侵袭与转移,而且还参与肿瘤免疫逃逸。研究发现,CD44_{v6}构型改变与肿瘤的免疫逃逸有关^[6]。

人c-Met是一种受体型原癌基因,c-Met受体的配体为肝细胞生长因子(HGF),被HGF激活的c-Met受体对多种细胞的增殖、分化、形态发生和浸润运动等均有调节作用,因而与肿瘤的发生、发展有关。本实验中肝癌组织与癌旁组织c-Met的差异表达,说明其与HCC的发生有关。实验发现c-Met表达还与Edmondson分级明显有关($P < 0.01$),与Varnholt等^[7]报道相符。说明c-Met在HCC的增殖、分化过程中起重要作用。Osada等^[8]研究30例肝癌手术标本发现,c-Met高表达者更易出现肝内复发及转移,7例c-Met高表达者半年内即出现肿瘤复发。

血道播散是肝细胞癌常见转移方式,肝内小血管侵犯为常见现象。Fujisaki^[9]发现CD44_{v6}刺激

能诱导肿瘤细胞 c-Met 表达, HGF 能放大 CD44_{v6} 预刺激引起的 LFA - 1 介导的黏附, 并进一步放大和触发整合素介导的黏附, 使癌细胞黏附于血管内皮并促进其跨过血管壁。HGF/c-Met 还可通过磷脂酰肌醇 3 激酶通路诱导血管内皮生长因子 (VEGF) 的分泌和表达, HGF/c-Met 可间接促进血管的生成^[10]。c-Met 能与胞膜受体, 如 CD44_{v6}, 整合素, FAS 及其他受体酪氨酸激酶 (RTK) 相互作用, 促进肿瘤的发生、转移^[11]。本实验中 c-Met 及 CD44_{v6} 阳性表达患者较阴性表达患者术后 2 年内复发率明显升高 ($P < 0.05$), 并且 CD44_{v6}, c-Met 阳性表达组术后生存率均明显低于阴性表达组 ($P < 0.01$)。Orian 等^[12]发现, CD44_{v6} 胞外区存在 c-Met 自动磷酸化结合位点, 其信号转导则是通过 CD44_{v6} 胞内区招募 ERM 蛋白家族及 Ras 形成 CD44_{v6} - c-Met-HGF 复合体完成。通过 c-Met 和 CD44_{v6} 的共转染实验, 还发现 CD44_{v6} 可作为 HGF/SF 的协同受体, 促进 c-Met 受体酪氨酸激酶磷酸化, 激活下游信号转导蛋白 (如激活 MAP 激酶 ERK1 和 ERK2), 促进肿瘤的生长和转移^[13]。本实验中 c-Met 阳性肝癌组织中 CD44_{v6} 阳性表达率也高。c-Met 阴性的肝癌组织中 CD44_{v6} 阴性表达例数也多 ($P < 0.05$)。说明 CD44_{v6}, c-Met 共同参与原发性肝癌的发生、发展。

总之, CD44_{v6}, c-Met 对于肝癌的发生、发展及预后都有一定的关系^[14], 通过各种手段下调 CD44_{v6}, c-Met 的表达水平 (如反义核酸或基因沉默技术), 将为 HCC 的基因治疗提供一条有效途径。

参考文献:

- [1] 韩玥, 石景森, 杨毅军, 等. CD44_{v6} 和基质金属蛋白酶 - 2 表达与胆囊癌的侵袭和转移关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(2): 98 - 101.
- [2] 郭琳琅, 郭颖, 曹长安. 原发性肝癌组织中粘附分子 CD54, CD44 及 E - cadherin 的表达及意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2000, 09(5): 424 - 426.
- [3] Zavrides HN, Zizi - Sermpeztoglou A, Panousopoulos D, et al. Prognostic evaluation of CD44 expression in correlation with bcl - 2 and p53 in colorectal cancer [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2005, 43(1): 31 - 36.
- [4] Endo K, Terada T. Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships tumor grade, clinicopathologic parameters, P53 expression, and patient survival [J]. J Hepatol, 2000, 32(1): 78 - 84.
- [5] Kajita M, Itoh Y, Chiba T, et al. Membrane - type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration [J]. Cell Biol, 2001, 153(5): 893 - 904.
- [6] Takahashi K, Takahashi F, Hirama M, et al. Restoration of CD44_{v6} In nonsmall cell lung cancer cells enhanced their susceptibility to The macrophage cytotoxicity [J]. Lung Cancer, 2003, 41(2): 145 - 153.
- [7] Varnholt H, Asayama Y, Aishima S, et al. c-Met and hepatocyte growth factor expression in combined hepatocellular and cholangiocarcinoma [J]. Oncol Rep, 2002, 9(1): 35 - 41.
- [8] Osada S, Kanematsu M, Imai H, et al. Evaluation of extracellular signal regulated kinase expression and its relation to treatment of hepatocellular carcinoma [J]. J Am Coll Surg, 2005, 201(3): 405 - 411.
- [9] Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, et al. CD44 stimulation induces integrin mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by upregulation of integrins and c-Met and activation of integrins [J]. Cancer Res, 1999, 59(17): 4427 - 4434.
- [10] Dong G, Chen Z, Li ZY, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor - induced activation of MEK and PI - 3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleuin - 8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2001, 61: 5911 - 5918.
- [11] Corso S, Comoglio PM, Giordano S. Cancer therapy: can the challenge be MET? [J]. Trends Mol Med, 2005, 11(6): 284 - 292.
- [12] Orian - Rousseau V, Morrison H, Matzke A. hepatocyte growth factor - induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44_{v6} and F - Actin [J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(1): 76 - 83.
- [13] Van - der - Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, et al. Heparan sulfatemedified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met [J]. Biol Chem, 1999, 274(10): 6499 - 6506.
- [14] 谷化平, 尚培中, 周翠玲. CD44_{v6} 和 E - 上皮钙粘附素在胃癌中的表达与预后的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(4): 303 - 305.