

粘附分子 CD44v6 在口腔鳞癌组织中的表达^①程 斌¹ 陈小华¹ 侯景辉²

(中山医科大学 1 口腔医学院 2 肿瘤医院; 广州, 510060)

摘要 目的 观察分析 CD44v6 在口腔鳞癌原发组织和转移组织中的表达, 以期明确 CD44v6 在口腔鳞癌淋巴道转移中的作用。方法: 免疫组织化学染色、半定量评估染色强度和测算阳性染色细胞后统计分析。结果: CD44v6 分子在正常口腔粘膜上皮基底层、基底上层、棘层细胞膜表达; 不同部位口腔粘膜上皮的阳性表达模式基本一致。在口腔鳞癌原发组织中, CD44v6 表达减弱, 表现为阳性反应产物形态的改变和 CD44v6 阳性细胞数明显少于正常组织 ($P < 0.05$)。口腔鳞癌转移组织中, 只有肿瘤细胞表达 CD44v6, CD44v6 阳性细胞数也明显少于其原发组织 ($P < 0.05$)。结论: CD44v6 在口腔鳞癌的侵袭和转移过程中以下行调节(down-regulation)的方式表达, CD44v6 在口腔鳞癌的侵袭和转移中的作用有待进一步的研究。

关键词 受体, 淋巴细胞归巢/免疫学; 癌, 鳞状细胞/免疫学; 口腔肿瘤/免疫学; 基因表达

中图分类号 R 739.85

EXPRESSION OF ADHESION MOLECULE CD44v6 IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA TISSUES

Cheng Bin¹ Chen Xiaohua¹ Hou Jinghui²

(1 College of Stomatology 2 Tumor Hospital Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510060)

Abstract Objective: To define the role of adhesion molecule CD44v6 in metastasis of oral squamous cell carcinoma(SCC). **Methods:** Immunohistochemical technique, semi-quantitative and quantitative analysis were used to analyse CD44v6 expression pattern of primary and metastatic tissues of oral SCC. **Results:** In normal oral mucosa CD44v6 was found to express along cell membrane of stratum basale, stratum suprabasale and stratum spinosum; the expression pattern did not differ in various anatomic locations. In primary tissues of oral SCC, CD44v6 expression was correlated with differentiation, the form of positive staining changed and the number of stained cells was different significantly from that in normal tissues ($P < 0.05$), which indicated reduction of CD44v6 expression. In metastatic tissues, CD44v6 expression was restricted to tumor cells; the number of positive cells decreased significantly compared with that in its primary tissues ($P < 0.05$). **Conclusions:** Our findings suggest that CD44v6 expresses in form of down-regulation during invasion and metastasis of oral SCC, it is necessary to evaluate further the role of CD44v6 in invasive and metastatic process of oral SCC.

Subject headings receptors, lymphocyte homing/immunology; carcinoma, squamous cell/immunology; mouth neoplasms/immunology; gene expression

细胞粘附分子 CD44 参与介导肿瘤细胞的侵袭和淋巴道转移^[1,2], CD44 的异构体 CD44v6 主要

在角朊细胞及相关肿瘤组织中表达^[3]。口腔粘膜鳞癌是角朊细胞起源的恶性肿瘤, 其转移以淋巴道

转移为主,但目前对 CD44v6 在口腔鳞癌转移形成中的作用及其与口腔鳞癌预后关系等仍有分歧。因而,有必要分析比较 CD44v6 分子在口腔鳞癌原发和转移组织中的表达。

1 材料和方法

1.1 病例资料

从 1990~1996 年存档的病理组织中选取石蜡组织块进行如下分组:①Pm 组:术后病理证实已出现转移的口腔鳞癌原发组织;②L 组:术后病理证实已出现转移的口腔鳞癌转移淋巴结组织;③Pnm 组:术后病理证实未出现转移的口腔鳞癌原发组织;④N 组:整形手术切除的大致正常口腔粘膜组织。相应病例的简要临床病理资料见表 1,其中 L 组中的 7 例为 Pm 组病例的转移淋巴结组织。

表 1 简要临床病理资料

Table 1 Summary of clinicopathologic data of patients

Group	Pm (n = 7)	L (n = 10)	Pnm (n = 10)	N (n = 4)
Male/Female	7/0	7/3	8/2	3/1
Age(yr)	58 ± 14	58 ± 9	58 ± 10	33 ± 7
Location				
tongue	2	0	5	1
gingiva	2	0	2	1
mouth floor	2	0	2	0
palate	1	0	0	0
lip	0	0	1	1
cheek	0	0	0	1
lymph nodes	0	10	0	0
Differentiation				
well	2	0	6	
moderate	3	5	2	
poor	2	5	2	

1.2 常规组织学观察

石蜡组织块连续切片,分别行 HE 染色和免疫组织化学染色。HE 切片双盲法重新读片,并按高度分化、中度分化和低度分化进行分级^[4]。

1.3 免疫组织化学

1.3.1 主要试剂 一抗为鼠抗人 CD44v6 糖蛋白的 IgG1 单抗,购自 R&D 公司(由北京中山公司提

供),工作稀释度为 1:300;LSAB Kit 购自 DAKO 公司。

1.3.2 免疫组化染色 采用结合微波脱交联的 LSAB 法;抗体供应商提供切片,设立阳性和阴性对照。

1.3.3 结果观察与测算 免疫组化切片与 HE 切片对照观察免疫组化染色的组织学特征。随机选择 5 个有代表性的高倍视野($\times 400$):①参照阳性对照,双盲法评估染色反应强度并分级记录。②用测试网格计数各视野的 CD44v6 阳性细胞和上皮细胞数,合计后求出每例的阳性标记指数(positive index, PI=阳性细胞总数/上皮细胞总数)。

1.4 统计分析

用 SPSS 统计软件对结果进行秩和检验和 Spearman 等级相关分析,检验水准取双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 常规组织学观察

双盲法重新读片结果与原病理诊断基本一致;无转移口腔鳞癌原发组织、转移癌原发组织和转移组织的分化程度无明显的区别($P > 0.2$)(表 2)。

表 2 CD44v6 蛋白免疫组化染色半定量评估结果

Table 2 Semi-quantitative evaluation of CD44v6 positive staining

Group	n	Intensity of staining			
		+	++	+++	++++
Pm	7	1	1	4	1
L	10	3	4	1	2
Pnm	10	1	4	4	1
N	4	0	0	4	0

2.2 免疫组化染色的组织学特征

①CD44v6 在正常口腔粘膜上皮的基底层、基底上层、棘层细胞胞膜表达,构成清晰完整的细胞轮廓,不同部位口腔粘膜上皮的阳性反应模式基本一致;角化层或表层细胞以及炎症细胞等间质成分均未见阳性染色(图 1)。②在口腔鳞癌原发组织中,CD44v6 在癌旁上皮的表达与正常上皮类似;而在肿瘤组织的阳性表达呈异质性,并与分化有关。

高分化鳞癌组织的阳性细胞主要位于癌巢外周栅栏状排列,向癌巢中央阳性表达渐趋减弱,癌巢中央及其周围的细胞基本呈阴性反应;阳性反应产物沿胞膜分布,呈纤细线状、串珠样,有时出现断裂;低分化鳞癌组织的阳性细胞则弥散分布,阳性反应产物呈细小颗粒状散布于胞膜和胞膜内外两侧部位(图2)③在口腔鳞癌转移组织中,CD44v6阳性染色仅限于肿瘤细胞,阳性表达的异质性更为明显。阳性反应产物的形态与其原发组织类似(图3)。



图1 CD44v6在正常口腔粘膜上皮中的表达(LSAB法,×40)

Fig. 1 Expression of CD44v6 in normal epithelia of oral tissues



图2 CD44v6在口腔鳞癌原发组织中的表达(LSAB法,×100)

Fig. 2 Expression of CD44v6 in primary tissues of oral SCC

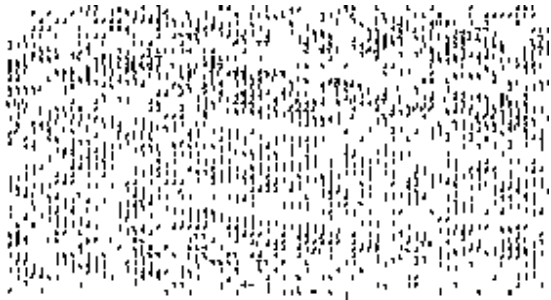


图3 CD44v6在口腔鳞癌转移组织中的表达(LSAB法,×400)

Fig. 3 Expression of CD44v6 in metastatic tissues of oral SCC

2.3 CD44v6阳性染色反应强度分析

口腔鳞癌原发组织和转移组织的CD44v6蛋白染色反应强度无显著的改变($P > 0.6$)、二者与正常组织也无明显的改变($P > 0.3$)(表2)。

2.4 CD44v6阳性细胞数(PI)的分析

未转移口腔鳞癌原发组织、转移癌原发组织的PI值均小于正常组织($P < 0.01$, $P < 0.001$),但二者无显著差异($P > 0.05$);转移癌转移组织的PI值小于正常组织($P < 0.001$)和其原发组织($P < 0.001$)(表3)。

表3 口腔鳞癌组织CD44v6的PI值
Table 3 CD44v6 positive index of oral SCC

Group	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>M</i>
Pm	7	0.59±0.20	0.61
L	10	0.39±0.14	0.39
Pnm	10	0.79±0.15	0.82
N	4	0.94±0.02	0.93

2.5 反应强度、PI值与分化程度的关系分析

将表1、2、3的结果进行Spearman等级相关分析,发现反应强度与分化程度无关($r_s = 0.3676$, $P > 0.05$),也与PI值无关($r_s = 0.3117$, $P > 0.05$);但PI值与分化程度有关($r_s = 0.7119$, $P = 0.001$)。

3 讨论

3.1 CD44v6与肿瘤的淋巴转移有关

研究发现,粘附分子CD44v4-7和CD44v6-7是参与介导实验性肿瘤和部分人类恶性肿瘤淋巴道转移的重要因子之一,被认为是转移性异构体(metastatic variant)^[2];而CD44v3-10则主要在角朊细胞起源的组织中表达,被认为是角朊细胞型异构体(keratinocyte form)^[3],因此CD44v6可能与角朊细胞起源的恶性肿瘤的侵袭和转移有密切的联系。作为角朊细胞来源的口腔鳞癌,淋巴道转移是其主要的转移途径,了解CD44v6在口腔鳞癌原发和转移组织中的表达,将有助于了解口腔恶性肿瘤转移的机理。

3.2 CD44v6在口腔鳞癌转移过程中下行表达

本研究观察到,CD44v6蛋白在正常口腔粘膜

上皮的基底层、基底上层、棘层细胞胞膜表达,而角化层或表层细胞以及炎症细胞等间质成分均未见阳性染色,说明了 CD44v6 蛋白基本在角朊细胞中表达,这一结果与以前的报道相近^[4]。在口腔鳞癌原发组织中,癌旁上皮的 CD44v6 蛋白表达与正常上皮类似;肿瘤细胞的 CD44v6 蛋白表达则呈异质性,CD44v6 阳性细胞分布与鳞癌组织分化程度有关;CD44v6 蛋白表达的量减少,在高分化鳞癌组织表现为沿胞膜分布的阳性反应产物呈纤细的线状、串珠状,甚至出现断裂,在低分化鳞癌组织阳性反应产物则呈细小颗粒状散布于胞膜和胞膜内外两侧。在口腔鳞癌转移淋巴组织中,CD44v6 蛋白表达只见于转移的肿瘤上皮细胞,阳性反应产物在细胞的分布与其原发组织类似。上述 CD44v6 表达特征在以前的研究报道未见详细描述^[5,6]。本研究还发现,口腔鳞癌原发组织和转移组织的 CD44v6 阳性细胞数(PI 值)较正常组织依次降低。因此,本研究从免疫组化染色特点和定量计数两方面,揭示了 CD44v6 蛋白在口腔鳞癌转移过程中以下行调节(down-regulation)方式表达。

3.3 CD44v6 表达在口腔鳞癌转移中的意义

CD44 粘附分子的配体是广泛分布的透明质酸盐(hyaluronan)、胶原和纤维连接蛋白(fibronectin)。CD44 分子通过与这些配体的结合来调节细胞-基质间的异嗜粘附(heterophilic adhesion)和细胞迁移等功能^[1]。目前了解到,肿瘤细胞穿透上皮下和内皮下基底膜是肿瘤侵袭和转移的关键步骤之一,上行表达(up-regulation)的 CD44 分子通过介导肿瘤细胞加强与基底膜的粘附而有助于肿瘤的侵袭和转移^[1],因而成为影响食道癌、宫颈癌等部分恶性肿瘤预后的重要因素^[7,8]。但本研究却发现,CD44v6 分子在口腔鳞癌转移过程中以下行调节方式表达;Hudson 等^[9]也发现口腔鳞癌细胞系出现 CD44v6 表达的丧失;而 Piffko 等观察到 CD44v5、v6 在口腔鳞癌发生发展过程中并无明显改变,CD44v6 与口腔鳞癌的预后无关^[5,9]。在皮肤肿瘤中,CD44v6 表达随鳞癌的去分化(dedifferentiation)而减少;CD44v6 的表达与基底细胞癌的增殖活性负相关^[10,11]。这些结果提示,CD44v6 分子在鳞癌组织中的表达及其在转移中的作用,可能具有器官的特异性并与肿瘤类型有关,因而目前还不能确定 CD44v6 是口腔鳞癌转移的普适标记物(general marker)和预后的指标。

参 考 文 献

- 1 李存玺,章静波. 细胞粘附机理与癌细胞侵袭转移. 见:高进主编. 癌的侵袭与转移——基础研究与临床. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995. 129
- 2 Rudy W, Hofmann M, Schwartz-Albiez R, *et al*. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants; each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 1993, 53: 1262
- 3 Haggerty J G, Bretton R H, Milstone L M. Identification and characterization of a cell surface proteoglycan on keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1992 99: 473
- 4 Shklar G. Microscopic pathology of oral cancer. In: Shklar G(ed). *Oral Cancer: the diagnosis, therapy, management and rehabilitation of the oral cancer patient*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1984. 9~19
- 5 Herold-Mende G, Seiter S, Born A L, *et al*. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol*, 1996, 179: 66
- 6 Piffko J, Bankfalvi A, Klauke K, *et al*. Unaltered strong immunohistochemical expression of CD44-V6 and -V5 isoforms during development and progression of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 1996, 25: 502
- 7 Roge G D, Myers R B, Brown D, *et al*. CD44 expression in dysplasia epithelium and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*, 1996, 69: 254
- 8 Shimabukuro K, Toyamo-Sorimachi N, Ozaki Y, *et al*. The expression patterns of standard and variant CD44 molecules in normal uterine cervix and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 1997, 64: 26
- 9 Hudson D L, Speight P M, Watt F M. Altered expression of CD44 isoform in squamous cell-carcinomas and cell lines derived from them. *Int J Cancer*, 1996 66: 457
- 10 Simon J C, Heider K H, Dietrich A, *et al*. Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur J Cancer*, 1996, 32A: 1394
- 11 Seelentag W K, Gunthert U, Savemaslanin P, *et al*. CD44 standard and variant isoforms expression in human epidermal skin tumor is not correlated with tumor aggressiveness but down-regulation during proliferation and tumor de-differentiation. *Int J Cancer*, 1996, 69: 218

(1997-11-03 收稿 1998-03-02 修回)