

• 论 著 •

实时荧光定量 PCR 检测 CD44v2 在膀胱及尿路上皮癌中的表达^{*}刘小荣¹, 王永翔^{2△}, 赵立明², 赵小东², 刘学军², 任玉林², 李少君²

(甘肃省第二人民医院: 1. 检验科; 2. 泌尿外科, 甘肃兰州 730050)

摘要:目的 探讨 CD44 变异体(CD44v)2 在膀胱及尿路上皮癌中的表达及其在膀胱及尿路上皮癌诊断中的价值。方法 选取膀胱及尿路上皮癌患者 70 例, 通过实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测, 从病理分期和临床分期两个方面对患者癌组织标本进行 CD44v2 表达情况的分析。另外, 收集 20 例正常膀胱黏膜组织标本作为对照。结果 CD44v2 在正常膀胱黏膜上皮无阳性表达, 拷贝数均小于 1×10^2 copies/mL。在 70 例膀胱及尿路上皮癌组织中的阳性表达率为 42.9%(30/70), Ct 值均小于 35, 基因拷贝数均大于 1×10^4 copies/mL。CD44v2 的表达在膀胱及尿路上皮癌不同 TNM 分期和病理分级间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 CD44v2 有助于膀胱及尿路上皮癌的早期评估。

关键词:膀胱及尿路癌; 实时荧光定量 PCR; CD44 变异体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)17-2478-02

The detection of CD44v2 expression by using real-time fluorescent quantitative PCR in bladder and urothelial carcinoma^{*}Liu Xiaorong¹, Wang Yongxiang^{2△}, Zhao Liming², Zhao Xiaodong², Liu Xuejun², Ren Yulin², Li Shaojun²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Urology, the Second

People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of CD44 variant 2(CD44v2) in bladder and urothelial carcinoma, and to study its significance in the diagnosis of human bladder and urothelial carcinoma. **Methods** Real-time fluorescent quantitative PCR was used to analyze the expression of CD44v2 protein in 70 bladder and urothelial carcinoma tissue samples from patients in different pathological and clinical stages. Meanwhile, 20 tissue samples of normal bladder mucosa were collected as controls. **Results** CD44v2 expression was negative in normal bladder and urothelial mucosa, the gene copies were less than 1×10^2 copies/mL, while the positive expression rate of CD44v2 was 42.9%(30/70), and Ct values were less than 35 and copy number was greater than 1×10^4 copies/mL. Positive expression rate was correlated with high pathological grades and TNM stages. **Conclusion** CD44v2 could be an useful indicator for the early assessment of bladder and urothelial carcinoma.

Key words: bladder and urothelial carcinoma; real-time fluorescent quantitative PCR; CD44 variant

CD44 最初被确认为一种淋巴细胞归巢受体和跨膜糖蛋白, 一般表达在胚胎干细胞^[1]。在淋巴细胞、成纤维细胞和增生的上皮细胞中都可检测到, 也可见于肿瘤细胞表面。CD44 及其变异体在肿瘤的发生和发展过程中起着重要的作用, 与乳腺癌、结肠癌、肾癌、胆管癌、前列腺癌等多种肿瘤的生长、侵袭和转移有密切联系^[2-4]。本文应用实时荧光定量 PCR 技术检测 CD44 变异体(CD44v)2 蛋白在膀胱及尿路上皮细胞癌中的表达, 旨在探讨 CD44v2 与膀胱及尿路上皮细胞癌发生、发展及复发之间的关系, 以及明确其临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院泌尿外科 2010 年 1 月至 2014 年 1 月膀胱部分切除或全切除手术患者 70 例。所有患者手术切除标本均经病理证实为膀胱及尿路上皮癌, 其中男 56 例、女 14 例, 年龄 29~83 岁, 平均 56 岁。根据国际抗癌协会(UTCC)制定的 TNM 分期标准, 对上述人群进行膀胱移行细胞癌临床分期如下: Tis~Ta 期 13 例, T₁ 期 24 例, T₂ 期 20 例, T₃ 期 9 例, T₄ 期 4 例; 病理 I 级 25 例, II 级 23 例, III 级 22 例; 初发组 49 例, 复发组 21 例; 单发组 49 例, 多发组 21 例。另外, 采集正常膀胱黏膜组织标本 20 例, 来自行经耻骨上前列腺摘除术的患者, 经病理检查证实为正常膀胱黏膜组织。

1.2 仪器与试剂 API7500 实时荧光定量 PCR 仪, 主要试剂

购自北京索奥生物医药科技有限公司, 包括核酸提取液 B、Taq 酶系、CD44v2 PCR Mix、CD44v2 阳性质控品、阴性质控品。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 取约 50 mg 膀胱黏膜组织转移至 1.5 mL 干净离心管中, 加 1 mL 生理盐水混匀, 用研磨器研制成匀浆, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀加 50 μ L 核酸提取液, 充分混匀, 100 $^{\circ}$ C 处理 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清 4 μ L 做 PCR 反应。

1.3.2 PCR 扩增 从试剂盒中取出 CD44v2 PCR Mix、Taq 酶, 室温融化并振荡混匀后, 10 000 r/min 离心 10 s。CD44v2 引物序列为, 正向: ATC ACC GAC AGC ACA GAC AGA AT; 反向: AAC CAT GAA AAC CAA TCC CAG G。测试反应体系配置为: CD44v2 PCR Mix 24 μ L, Taq 酶系 2 μ L, 然后向各管中分别加入 4 μ L 处理后样品或 CD44v2 阳性定量标准品(使用前用阴性质控品梯度稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍, 拷贝数分别为 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 copies/mL)或阴性质控品。设置反应体系为 30 μ L, 样品名称, 标记荧光基团种类(报告基团为 FAM, 淬灭基团为 TAMRA)和循环条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 然后 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s 共 40 个循环。

1.4 统计学处理 用 SPSS13.0 软件, 样本阳性率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

^{*} 基金项目: 兰州市科技计划资助项目(2012-1-3)。 作者简介: 刘小荣, 女, 主管检验医师, 主要从事病原生物学与免疫学研究。 \triangle 通讯作者, E-mail: gswyongxiang@126.com。

2 结 果

2.1 总体情况 标准曲线 $r=0.99$, 阳性循环阈值(Ct 值)为 35, 基因拷贝数为 1×10^4 copies/mL。CD44v2 在正常膀胱及尿路上皮细胞中不表达, 在 70 例膀胱及尿路上皮癌组织标本中有 30 例为阳性表达, 阳性率为 42.9%。

2.2 CD44v2 表达与膀胱及尿路上皮细胞癌发生、发展及其复发之间的关系 (1)CD44v2 表达与 TNM 分期的关系: 浅表性癌(Tis~T₁ 期)与浸润性癌(T₂~T₄ 期)比较, 阳性表达率的差异有统计学意义($P=0.01<0.05$)。 (2)CD44v2 表达与世界卫生组织(WHO)病理分级的关系: CD44v2 阳性表达率随病理分级增加而升高, 高分化膀胱及尿路上皮癌(Ⅰ级)与低分化膀胱及尿路上皮癌(Ⅱ~Ⅲ级)比较, 差异有统计学意义($P=0.04<0.05$)。 (3)CD44v2 蛋白表达与复发间的关系: 初发与复发患者间肿瘤组织 CD44v2 表达的阳性率比较, 差异无统计学意义($P=0.33>0.05$)。 (4)CD44v2 蛋白与肿瘤数量的关系: 肿瘤单发与多发患者肿瘤组织 CD44v2 表达的阳性率比较, 差异无统计学意义($P=0.69>0.05$)。见表 1。

表 1 CD44v2 蛋白表达与 TNM 分期、病理分级、复发及肿瘤数的关系(n)

项目	n	CD44v2 表达	
		阴性	阳性
TNM 分期			
Tis~Ta	13	10	3
T ₁	24	16	8
T ₂	20	8	12
T ₃	9	4	5
T ₄	4	2	2
病理分级			
I 级	25	18	7
II 级	23	14	9
III 级	22	7	15
临床分期			
初发	49	26	23
复发	21	13	8
肿瘤数量			
单发	49	27	22
多发	21	12	9

3 讨 论

肿瘤的生长依赖于肿瘤细胞与宿主组织外基质之间的相互作用。CD44 是一种蛋白形式的细胞表面黏附因子, 参与细胞-细胞、细胞-基质之间的特异性粘连过程^[5]。人类 CD44 基因位于 11 号染色体短臂(11p13)上, 长约 92 kb, 至少有 21 个外显子, 根据编码蛋白的表达方式分为 2 型: 其中 10 个固定外显子位于基因两端, 每端各 5 个, 转录时固定表达, 其转录片段存在于所有 CD44 蛋白中, 称为标准型 CD44 基因(CD44s); 在固定的外显子中间有 6~15 个外显子仅表达于核 RNA 的剪接体中, 转录时只存在于一定的 CD44 转录子中, 不固定的表达, 称为 CD44v 基因, 主要包括 CD44v1~10^[6-7]。

CD44s 蛋白是存在于多种组织细胞的表面糖蛋白, 而 CD44v 蛋白主要存在于发育成熟阶段的组织器官细胞表面^[8]。近年来, 国内外学者通过基因水平、蛋白水平两个方面检测尿液中 CD44, 从而对膀胱肿瘤的分化、浸润、数量、转移、复发及预后作了大量的研究。目前关注较多的主要是 CD44s、CD44v2、CD44v6、CD44v8~10 对膀胱肿瘤的诊断。CD44s 及

CD44v 的异常表达, 与膀胱及尿路上皮癌的发生、发展有着密切的联系, 但目前仍未得出统一的结论, 多数学者认为 CD44s 表达缺失同时伴有 CD44v 表达增高与肿瘤分化程度较差、分期较晚有显著关系^[9], CD44s 在膀胱尿路上皮癌中持续表达, 但在分化差的浸润性癌中表达下降。但也有研究认为膀胱尿路上皮癌组织和正常膀胱黏膜组织中都有 CD44s 和 CD44v2 蛋白的表达, 结果是 CD44v2 与肿瘤的分级、分期无关, 认为 CD44v2 不能作为诊断膀胱癌的一个指标^[10]。而本研究应用实时荧光定量 PCR 方法检测了人正常膀胱黏膜及膀胱尿路上皮癌组织中 CD44v2 蛋白的表达, 探讨了 CD44v2 阳性表达与病理分级、临床分期、肿瘤数量及复发的关系, 结果 CD44v2 蛋白在正常膀胱黏膜上皮无表达, 拷贝数小于 1×10^2 copies/mL。在 70 例膀胱及尿路上皮癌中阳性表达是 30 例(42.9%), Ct 值均小于 35, 基因拷贝数均大于 1×10^4 copies/mL。CD44v2 的表达在不同膀胱及尿路上皮癌 TNM 分期和病理分级间有明显差异, CD44v2 有助于对膀胱及尿路上皮癌的早期诊断, 可作为一个参考指标^[11]。

参考文献

[1] 薛珺, 姜书传, 黄后宝. CD44s 和 CD44v10 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义[J]. 皖南医学院学报, 2009, 28(5): 322-324.

[2] Lee SM, Lee KE, Chang HJ, et al. Prognostic significance of CD44s expression in biliary tract cancers[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(4): 1155-1160.

[3] Kuncová J, Urban M, Mandys V. Expression of CD44s and CD44v6 in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: comparison with tumour grade, proliferative activity and p53 immunoreactivity of tumour cells[J]. APMIS, 2007, 115(11): 1194-1205.

[4] Golshani R, Lopez L, Estrella V, et al. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder Cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 483-491.

[5] 叶修彬, 熊礼生, 章曙光, 等. CD44s 和 CD15 在前列腺癌组织中的表达及其意义[J]. 实用临床医学, 2006, 7(12): 13-15.

[6] Kuncová J, Kostrouch Z, Viale M, et al. Expression of CD44v6 correlates with cell proliferation and cellular atypia in urothelial carcinoma cell lines 5637 and HT1197[J]. Folia Biol (Praha), 2005, 51(1): 3-11.

[7] Sauter A, Kloft C, Gronau S, et al. Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Int J Oncol, 2007, 30(4): 927-935.

[8] Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, et al. Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck Cancer[J]. Am J Otolaryngol, 2005, 26(5): 308-313.

[9] Prigozhina NL, Zhong L, Hunter EA, et al. Plasma membrane assays and three-compartment image cytometry for high content screening[J]. Assay Drug Dev Technol, 2007, 5(1): 29-48.

[10] Wang SJ, Wong G, de Heer AM, et al. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression[J]. Laryngoscope, 2009, 119(8): 1518-1530.

[11] 王永翔, 赵立明, 赵小东, 等. 膀胱尿路上皮癌 CD44v2 的表达及临床意义[J]. 国际泌尿系统杂志, 2012, 32(6): 743-746.