

· 论 著 ·

实时荧光定量 PCR 检测 CD44v8 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, 兰州 730000)

摘要:目的 探讨 CD44v8 在膀胱及尿路上皮癌的临床诊断价值。方法 收集实验组患者膀胱及尿路上皮癌患者 75 例, 采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)从病理和临床分期 2 个方面对 CD44v8 进行定量分析。对照组 20 例患者为正常膀胱黏膜组织。结果 CD44v8 蛋白在对照组膀胱黏膜上皮无表达, 拷贝数小于 1×10^2 拷贝/毫升。75 例膀胱及尿路上皮癌患者阳性表达 26 例(34.7%), CT 值均小于 35, 基因拷贝数均大于 1×10^4 拷贝/毫升。阳性表达率与肿瘤病理分级、肿瘤分期(TNM)相关, 与肿瘤复发和数量无相关性。结论 CD44v8 可作为判断膀胱及尿路上皮癌分级、分期的参考指标, 具有临床诊断意义。

关键词: 上皮癌; 膀胱; 尿路; 实时荧光定量 PCR; CD44v8 蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)19-2687-03

The detection of the expression of CD44v8 with RT-PCR in bladder and urothelial carcinoma^{*}

LIU Xiaorong¹, WANG Yongxiang^{2△}, ZHAO Liming², ZHAN 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 730000, China)

Abstract: Objective To explore the expression of CD44v8 protein in human bladder and urothelial carcinoma, as well as the value in diagnosis of human bladder and urothelial carcinoma. Methods RT-PCR was used to analysis the expression of CD44v8 protein in 75 patients with bladder and urothelial carcinoma in the pathological stage and clinical stage and 20 subjects of normal bladder mucosa were collected as control. Results CD44v8 protein was negative in all normal bladder and urothelial mucosa, the copy number was less than 1×10^2 copy/mL; 26 cases of bladder and urothelial carcinoma was positive, and the positive rate of CD44v8 was 34.7%, and Ct values were less than 35 and copy number was greater than 1×10^4 copy/mL. Positive rate was correlated with high pathological grades and TNM stages, but no significant difference was observed in recurrence of tumor. Conclusion CD44v8 could be useful indicator for the assessment of pathological grades and TNM stages of bladder and urothelial carcinoma.

Key words: carcinoma; bladder; urothelial carcinoma; RT-PCR; CD44v8 protein

侵袭和转移是恶性肿瘤最本质的特征, 其与很多因素相关, 目前对恶性肿瘤各种因子的研究已成为热点^[1]。CD44 分子通过与细胞外基质中的透明质酸、胶原蛋白、血管内皮细胞等黏附, 致使肿瘤细胞具有很强的生长及转移能力, 在肿瘤的发生、发展中起重要的作用。近年来研究发现 CD44 与多种肿瘤的复发、浸润、转移有关^[2-4]。本研究应用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术检测 CD44v8 蛋白在膀胱及尿路上皮细胞癌中的表达, 探讨 CD44v8 与膀胱尿路上皮细胞癌病理分级、临床分期、复发的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 75 例膀胱尿路上皮细胞癌标本选自 2010 年 1 月至 2014 年 6 月该院泌尿外科手术切除且经病理确诊患者(实验组), 男 59 例, 女 16 例, 年龄 28~86 岁, 平均年龄 57 岁。根据国际抗癌协会(UICC)制定的肿瘤分期(TNM)标准: Tis-a 期 14 例, T1 期 25 例, T2 期 21 例, T3 期 10 例, T4 期 5 例; 病理 I 级 27 例, II 级 25 例, III 级 23 例; 初发组 51 例, 复发组 24 例; 单发组 51 例, 多发组 24 例。20 例对照组患者膀胱尿路上皮细胞组织均取自经耻骨上前列腺摘除术, 经病理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。核酸提取液 B, 逆转录酶, Taq 酶系, CD44v8 PCRMIX, CD44v8 阳性

质控品, 阴性质控品, 均由北京索奥生物医药科技有限公司提供。

1.3 方法 (1)DNA 提取: 选取约 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, 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(DNA), 充分混匀, 100 $^{\circ}$ C 处理 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 4 μ L 做 PCR 反应。(2)PCR 扩增: 从试剂盒中取出 CD44v8 PCR MIX、Taq 酶系, 室温融化并振荡混匀, 10 000 r/min 离心 10 s。参考北京索奥生物医药科技试剂盒说明书提取膀胱尿路上皮癌患者总 RNA, 利用逆转录酶进行反转录, 合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。CD44v8 引物序列上游为: 5'-TGG ACT CCA GTC ATA GTA TAA CGC-3'; 下游为: 5'-GGT CCT GTC CTG TCC AAA TC-3', 测试反应体系配置为: CD44v8 PCR MIX 24 μ L, 逆转录酶 4 μ L, Taq 酶系 2 μ L。向设定的 N 个 PCR 反应管中分别加入 26 μ L 反应体系, 向每管中加入处理后的样品或 CD44 v8 阳性定量标准品(使用前用阴性质控品梯度稀释 10、100、1 000 倍, 记为 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 拷贝/毫升)和阴性质控品 4 μ L, 10 000 r/min 瞬时离心 3 s。将各反应管放入定量 PCR 反应槽内, 按对应顺序设置阴性质控品、阳性定量标准品及未知标本, 并设置反应体系 30 μ L, 样品名称, 标记荧光基团种类

^{*} 基金项目: 兰州市科技计划项目资助(2012-1-37)。

作者简介: 刘小荣, 女, 主管检验医师, 主要从事病原微生物、免疫学研究。 △ 通讯作者, E-mail: gswyongxiang@126.com。

(报告基因为 FAM,淬灭基因为 TAMRA)和循环条件:95 ℃ 30 s,然后95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。

1.4 结果判读 (1)标准曲线: $r=0.99$,阳性 CT ≤ 35 ,基因拷贝数为 1×10^4 拷贝/毫升。(2)各待测反应管曲线图:分别绘制 TNM 分期 CD44v8 蛋白荧光定量 PCR 曲线图;WHO 病理分级 CD44v8 蛋白荧光定量 PCR 曲线图;临床分期 CD44v8 蛋白荧光定量 PCR 曲线图;肿瘤数量 CD44v8 蛋白荧光定量 PCR 曲线图,根据相关标准进行结果判断。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料组间比较使用方差分析和 t 检验,两样本率的比较应用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD44v8 在 2 组患者中的表达结果比较 CD44v8 蛋白在对照组正常膀胱及尿路上皮细胞中不表达,在实验组膀胱及尿路上皮癌的阳性表达 26 例,阳性率 34.7%。

2.2 CD44v8 与实验组膀胱尿路上皮癌 TNM 分期的关系 CD44v8 蛋白阳性表达率随 TNM 分期增加而升高,Tis-a 期 3 例(21.4%),T1 期 7 例(30.4%),T2 期 8 例(40.0%),T3 期 5 例(50.0%),T4 期 3 例(37.5%),浅表性(Tis-a~T1)与浸润性(T2~T4)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.3 CD44v8 与实验组膀胱尿路上皮癌病理分级的关系 CD44v8 蛋白表达随病理分级增加而升高,I 级 4 例(14.8%),II 级 9 例(36%),III 级 13 例(56.5%),高分化膀胱尿路上皮癌(I 级)与低分化膀胱尿路上皮癌(II、III 级)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.4 CD44v8 与膀胱尿路上皮癌复发的关系 CD44v8 蛋白在 51 例原发性膀胱尿路上皮癌中 17 例表达(33%),24 例复发性膀胱尿路上皮癌中 9 例表达(37%),两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 CD44v8 蛋白表达与 TNM 分期、病理分级、复发及肿瘤数量的相关性

项目	n	CD44v8 阳性表达值(CT 值≤35)	
		阴性(n)	阳性(n)
TNM 分期			
Tis-a	14	11	3
T1	23	16	7
T2	20	12	8
T3	10	5	5
T4	8	5	3
WHO 分级			
I 级	27	23	4
II 级	25	16	9
III 级	23	10	13
临床分期			
初发	51	34	17
复发	24	15	9
肿瘤数量			
单发	51	33	18
多发	24	16	8

2.5 CD44v8 与膀胱尿路上皮癌数量的关系 CD44v8 蛋白在 51 例单发膀胱尿路上皮癌中 18 例表达(35.2%),24 例多发膀胱尿路上皮癌中 8 例表达(33%),两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

3 讨 论

大量研究表明,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、侵袭和转移有着密切的联系^[5-6]。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,人类 CD44 基因位于 11 号染色体短臂上。目前已发现 CD44mRNA 至少由 20 个外显子组成,完整基因组在染色体上大约跨越 50 kb^[7-8]。CD44 基因的外显子按表达方式分为 2 种:一种是组成型外显子,另一种是 V 区变异型外显子。组成型外显子共有 10 个,其转录片段存在于所有 CD44 转录子中,仅含组成型外显子的转录子称为标准型 CD44(CD44s)^[9]。V 区变异型外显子也有 10 个,在基因组上位于第 5 和第 6 个组成型外显子之间,在染色体 DNA 上跨越 25 kb。含有 V 区外显子的 CD44 转录子统称为拼接变异体(CD44V)。

近年来,众多学者通过基因水平、蛋白水平 2 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。

通过对恶性肿瘤组织中各种 CD44 分子的检测结果表明,许多类型的肿瘤均有不同程度的 CD44 分子表达^[10]。CD44s 和 CD44v 的异常表达,与膀胱尿路上皮癌的发生、发展有着密切的联系,但目前仍未得出统一的结论。多数学者的研究结果显示,CD44s 表达缺失同时伴有 CD44v 表达增高,与肿瘤分化程度较差、分期较晚显著相关。有关研究报道,同时检测组织和尿脱落细胞中 CD44 的表达,CD44v8~10 与膀胱尿路上皮癌的进展相关,在浸润性膀胱尿路上皮癌患者的尿脱落细胞中升高^[11-14]。本研究应用实时荧光定 PCR 方法检测正常膀胱黏膜及膀胱尿路上皮癌组织中 CD44v8 蛋白的表达,探讨 CD44v8 阳性表达与病理分级、临床分期、肿瘤数量及复发的关系,结果表明,阳性表达随膀胱尿路上皮癌的分级、分期增加而升高,但与膀胱尿路上皮癌的数量、复发无关。CD44v8 蛋白可作为判断膀胱尿路上皮癌分化程度、临床分期的参考指标。

参考文献

[1] 王永翔,赵立明,赵小东,等.膀胱尿路上皮细胞癌 CD44s 和 CD44v8 蛋白的表达及临床意义[J].临床泌尿外科杂志,2010,25(2):116-119.

[2] 王颖智,Yang CX,刘鹭雯,等.实时荧光定量 PCR 检测 CD44 和 RHAMM 在胃肠肿瘤中的表达研究[J].检验医学,2008,23(4):338-343.

[3] 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.

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

[5] 盛亚琳.细胞粘附分子 CD44 与肿瘤关系的研究进展[J].实用医技杂志,2008,15(7):926-928. (下转第 2691 页)

分析可有效辅助诊断 β -珠蛋白生成障碍性贫血。脐带血 Hb 电泳组分分析不仅可鉴定母血污染,利用 Hb A 截断值也可有效进行初步筛查,降低产前诊断的漏检率。对无条件开展基因诊断的基层医院,可应用脐血 Hb 电泳初步筛选可疑患者,并做进一步检测。

参考文献

- [1] Giordano PC. Newborn screening for hemoglobinopathies using capillary electrophoresis [J]. *Methods Mol Biol*, 2013,919(23):131-145.
- [2] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China [J]. *Clin Genet*, 2010,78(2):139-148.
- [3] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南 [M]. 北京:人民军医出版社,2011.
- [4] Kazazian HH. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990 [J]. *Semin Hematol*, 1990,27(3):209-228.
- [5] Srivorakun H, Fucharoen G, Sae-Ung N, et al. Analysis of fetal blood using capillary electrophoresis system: a simple method for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases [J]. *Eur J Haematol*, 2009,83(1):57-65.
- [6] 郭浩, 杜丽, 唐斌, 等. 脐血血红蛋白电泳在新生儿地中海贫血筛查中的应用 [J]. *实用医学杂志*, 2014, 30 (12): 1953-1955.

- [7] 李继慧, 张炬光, 邓国生. 应用脐带血电泳筛查新生儿 α -地中海贫血 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2010,18(8):75.
- [8] Lin L, Chen DN, Guo J, et al. Development of a capillary zone electrophoresis method for rapid determination of human globin chains in α and β -thalassemia subjects [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2015,55(1):62-67.
- [9] Prajantasen T, Fucharoen S, Fucharoen G. High resolution melting analytical platform for rapid prenatal and postnatal diagnosis of β -thalassemia common among Southeast Asian population [J]. *Clin Chim Acta*, 2015,441(441):56-62.
- [10] Prajantasen T, Fucharoen S, Fucharoen G, et al. Prenatal and post-natal screening of β -thalassemia and hemoglobin E genes in Thailand using denaturing high performance liquid chromatography [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40 (4): 3173-3179.
- [11] Ho SS, Chong SS, Koay ES, et al. Microsatellite markers within $^{-SEA}$ breakpoints for prenatal diagnosis of HbBarts hydrops fetalis [J]. *Clin Chem*, 2007,53(2):173-179.
- [12] Kho SL, Chua KH, George E, et al. A novel gap-PCR with high resolution melting analysis for the detection of α -thalassaemia Southeast Asian and Filipino β -thalassaemia deletion [J]. *Sci Rep*, 2015,5(2):137-139.

(收稿日期:2016-03-11 修回日期:2016-05-21)

(上接第 2688 页)

- [6] 周刚, 邱大卫, 秦大江, 等. 二重荧光定量 RT-PCR 检测胰腺癌患者 CD44v6 基因的表达 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011,32(18):2051-2054.
- [7] 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.
- [8] 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]. *AP-MIS*, 2007,115(11):1194-1205.
- [9] 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.
- [10] 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.

- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Golshani R, LuisLopez, Estrolla V, et al. Hyalu- tonic acid synthase-I expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44 [J]. *Cancer Res*, 2008,68(2):483-491.
- [14] Rupp U, Schoendorf-Holland E, Eichbaum M, et al. Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study [J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2007,18(4):477-485.

(收稿日期:2016-03-02 修回日期:2016-05-24)