

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.011

· 临床研究 ·

肾细胞癌中埃兹蛋白与 CD44 的表达及其临床意义

谢宇¹, 范刚^{1△}, 黄招琴², 韩惟青¹(1. 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院暨湖南省肿瘤医院 泌尿外科, 湖南 长沙 410000; 2. 湖南师范大学 生命科学院, 湖南 长沙 410081)

[摘要] **目的:**分析埃兹蛋白(ezrin)与CD44在肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)中的表达情况及其临床意义。**方法:**选取2012年2月至2012年11月湖南省肿瘤医院泌尿外科收治的56例RCC患者的癌组织石蜡切片标本及17例癌旁组织标本,采用免疫组化技术检测标本中ezrin与CD44的表达情况,并分析两者表达的相关性及与RCC各临床病理指标的关系。**结果:**RCC中埃兹蛋白[60.7%(34/56) vs 29.4%(5/17), $P < 0.05$]与CD44蛋白[64.3%(36/56) vs 0(0/17), $P < 0.01$]表达水平明显高于癌旁组织。结合病理诊断结果研究发现,CD44蛋白和埃兹蛋白表达水平随RCC病理分级、临床分期的升高而升高($P < 0.05$);在肿瘤最大径 >7.0 cm的RCC组织中,埃兹蛋白的阳性表达率显著高于最大径 ≤ 7.0 cm的RCC组织($P < 0.05$),而CD44阳性表达率无显著差异($P > 0.05$)。不同性别的患者组织内埃兹蛋白、CD44的表达水平无显著差异($P > 0.05$)。Spearman分析结果表明,CD44与埃兹蛋白在RCC组织中的表达水平呈高度正相关($r = 0.427, P < 0.01$)。**结论:**埃兹蛋白与CD44在RCC组织中均呈高表达,两者表达呈正相关;埃兹蛋白与CD44在RCC的发生发展及浸润转移过程中扮演着重要角色。

[关键词] ezrin; CD44; 肾细胞癌; 免疫组织化学

[中图分类号] R737.11; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)06-0665-04

Expression and clinical significance of ezrin and CD44 in renal cell carcinoma

Xie Yu¹, Fan Gang^{1△}, Huang Zhaoqin², Han Weiqin¹(1. Department of Urinary Surgery, Hunan Provincial Tumor Hospital, Cancer Hospital Affiliated to Xiangya Medical College of Central South University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to analyze the expression at the protein level and clinic significance of ezrin and CD44 in renal cell carcinoma (RCC). **Methods:** Paraffin sections were prepared from renal cell carcinoma ($n = 56$) and adjacent tissue ($n = 17$) specimens collected from 56 RCC patients who were admitted to the Urology Department, Hunan Cancer Hospital between February 2012 and November 2012. Ezrin and CD44 proteins in these sections were assessed immunohistochemical staining. The correlation of ezrin and CD44 protein levels with the clinicopathological features of carcinoma lesions were analyzed. **Results:** Ezrin was detected in 60.7% (34/56) of RCC tissue specimens but in 29.4% (5/17) of the corresponding normal tissue specimens ($P < 0.05$). CD44 was detected in 64.3% (36/56) of RCC tissue specimens but in 0 out of 17 normal tissue specimens ($P < 0.001$). Both ezrin and CD44 proteins were correlated with the histological grade and clinical stage of RCC ($P < 0.05$). In addition, ezrin in tumors >7.0 cm was significantly higher than that in tumors ≤ 7.0 cm ($P < 0.05$) whereas CD44 was not significantly different between tumors >7.0 cm and tumors ≤ 7.0 cm ($P > 0.05$). The rates of both ezrin- and CD44-positive staining were not significantly different between specimens collected from male and female patients ($P > 0.05$). Ezrin was positively correlated with CD44 in RCC ($r = 0.427, P < 0.01$). **Conclusion:** Both ezrin and CD44 are positively correlated with the severity of renal cell carcinoma, indicating these two proteins may play an important part in the development and progression of RCC.

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金(No. B2013-095)。Project supported by the Science Foundation of Health Bureau of Hunan Province(No. B2013-095)

[作者简介] 谢宇(1978-),男,湖南怀化人,博士,副主任医师,主要从事泌尿肿瘤生物治疗的临床研究,E-mail:xieyu420@sina.com。范刚(1986-),男,湖南邵阳人,硕士生,主要从事泌尿肿瘤生物治疗的临床研究,E-mail:1715840770@qq.com。△共同第一作者。

[通信作者] 谢宇(Xie Yu, corresponding author), E-mail:xieyu420@sina.com

[**Key words**] ezrin; CD44; renal cell carcinoma; immunohistochemical

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 665 - 668]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统肿瘤中的一种高发恶性肿瘤,肾癌细胞的浸润与转移是影响 RCC 预后的主要原因,其发生机制复杂,受多种因素影响^[1-2]。埃兹蛋白(ezrin)是细胞骨架蛋白 ERM(Ezrin/Radixin/Moesin)家族的一员,参与了细胞骨架和细胞膜的连接,是调控癌细胞黏附及侵袭能力的结构分子^[3-4]。CD44 是一种细胞表面穿膜蛋白,其可通过影响肿瘤细胞与正常细胞的异质性黏附促进肿瘤的侵袭和转移^[5]。近年来的研究^[6-7]结果显示,埃兹蛋白与 CD44 均参与了 RCC 的发生、侵袭与转移,然而两组蛋白在不同 RCC 病理分级及临床分期中的表达水平不尽一致,目前仍无两者在 RCC 中表达的相关性研究。本研究检测埃兹蛋白与 CD44 在 RCC 组织中的表达水平并分析其相关性,以期通过联合检测两者在 RCC 中的表达情况为肾脏肿瘤的治疗、预后判断提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本及主要试剂

选取 2012 年 2 月至 2012 年 11 月湖南省肿瘤医院泌尿外科手术切除的 RCC 组织 56 例、癌旁组织(距癌灶边缘 >1 cm 处,且肉眼观组织正常)17 例,经石蜡封存制成标本,标本经病理诊断为 RCC 或正常肾脏组织,符合选材要求。56 例患者术前均未接受相关抗肿瘤治疗,其中男性 36 例,女性 20 例;年龄 39 ~ 73 岁,中位年龄 51 岁。RCC 分期: I 期 18 例, II 期 15 例, III 期 14 例, IV 期 9 例。病理类型:透明细胞癌 51 例(51/56, 91.0%),肾乳头状腺癌 3 例(3/56, 5.4%),嫌色细胞癌 2 例(2/56, 3.6%)。一抗(鼠抗人埃兹蛋白单克隆抗体及鼠抗人 CD44 蛋白单克隆抗体)购于北京博奥森生物公司,二抗(生物素标记羊抗鼠/兔抗体)购于福州迈新生物技术有限公司。

1.2 免疫组织化学方法检测 RCC 组织中埃兹蛋白与 CD44 蛋白的表达

采用免疫组织化学 SP 法检测 RCC 组织中埃兹蛋白与 CD44 蛋白的表达情况。所有组织均经甲醛固定、石蜡包埋,组织切片连续切取 4 张 2 μm 厚度组织切片,一张进行 H-E 染色证实诊断,一张以 PBS 液代替一抗作为阴性对照,另两张分别进行埃兹蛋白与 CD44 蛋白免疫组化 DAB 显色。具体步骤依照试剂盒说明书进行操作。

1.3 免疫组织化学检测结果判定

埃兹蛋白表达于胞膜与胞质中,染色黄色或棕黄色为细胞表达阳性;CD44 表达于细胞膜,阳性为黄色或棕黄色染色。细胞着色率(阳性细胞数/肿瘤细胞数)≤10% 为结果阴性,着色率 >10% 为结果阳性。

1.4 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件分析,组间比较采用 Fisher 检验, Spearman 非参数相关分析评估两指标表达的相关性,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 埃兹蛋白与 CD44 在 RCC 组织中高表达

免疫组织化学检测结果(图 1)显示,埃兹蛋白定位于的细胞膜与细胞质中,CD44 定位于细胞膜上。在 RCC 组织中,埃兹蛋白蛋白阳性表达率显著高于癌旁组织[60.7% (34/56) vs 29.4% (5/17), $P < 0.05$]。CD44 蛋白在 RCC 组织中阳性表达率也显著高于癌旁组织[64.3% (36/56) vs 0 (0/17), $P < 0.01$]。

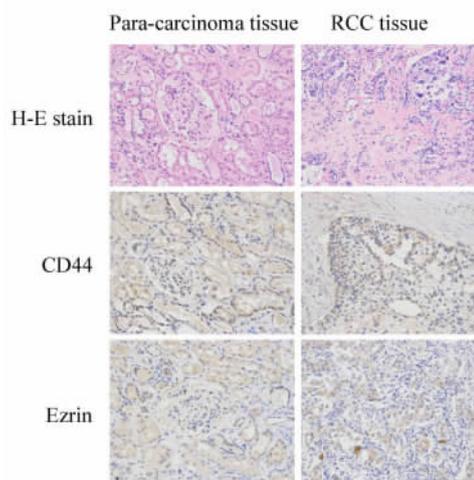


图 1 RCC 组织中埃兹蛋白与 CD44 表达高于癌旁组织(×200)
Fig. 1 Expression of ezrin protein and CD44 were higher in the RCC tissues than that in adjacent tissues (×200)

2.2 埃兹蛋白与 CD44 在 RCC 中的表达与临床病理特征的关系

RCC 中埃兹蛋白、CD44 蛋白的表达与临床病理特征分析结果(表 1)显示,两者阳性比率随着

RCC 临床分期及 Fuhrman 分级的升高而显著增高 ($P < 0.05$)。与肿瘤转移相关的 N 及 M 分期中, N1 期 RCC 组织内埃兹蛋白和 CD44 的阳性表达率显著高于 N0 期(均 $P < 0.05$); M1 期 RCC 组织内埃兹蛋白和 CD44 的阳性表达率显著高于 M0 期(均 $P < 0.05$)。在肿瘤最大径 > 7.0 cm 的 RCC 组织中,埃兹蛋白的阳性表达率显著高于最大径 ≤ 7.0 cm 的 RCC 组织($P < 0.05$),而 CD44 阳性表达率无显著差异($P > 0.05$)。不同性别的患者组织内埃兹蛋白、CD44 的表达水平无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 Ezrin 与 CD44 在 RCC 组织中的表达与临床病理特征的关系[$n(\%)$]

Tab. 1 Expression of ezrin and CD44 in renal cell carcinoma and it's correlation with clinicopathologic characteristics[$n(\%)$]

Group	n	Ezrin(+)	P	CD44(+)	P
AJCC staging					
I	18	6(33.3)	0.008	7(38.9)	0.016
II	15	10(66.7)		9(60.0)	
III	14	9(64.3)		12(85.7)	
IV	9	9(100.0)		8(88.9)	
Fuhrman grade					
I	22	8(36.4)	0.007	7(31.8)	0.000
II	20	14(70.0)		16(80.0)	
III	14	12(85.7)		13(92.9)	
Lymph node metastasis					
N0	40	20(55.0)	0.014	22(55.0)	0.031
N1	16	14(75.0)		14(87.5)	
Metastasis					
M0	49	27(55.1)	0.035	29(59.2)	0.042
M1	7	7(100.0)		7(100.0)	
Size (l/cm)					
> 7.0	15	13(86.7)	0.029	13(86.7)	0.057
≤ 7.0	41	21(51.2)		23(56.1)	
Gender					
Male	36	24(61.5)	0.262	25(69.4)	0.384
Female	20	10(58.8)		11(55.0)	

2.3 埃兹蛋白与 CD44 在 RCC 中的表达呈正相关 Spearman 秩相关分析结果显示,埃兹蛋白与 CD44 蛋白在 RCC 中表达呈高度相关($r = 0.427$,

$P < 0.01$) (表 3)。

表 2 Ezrin 与 CD44 蛋白在 RCC 中表达的相关性(n)
Tab. 2 Correlative analysis of ezrin and CD44 expression in renal cell carcinoma (n)

Ezrin	CD44(+)	CD44(-)	r	P
+	28	6	0.427	< 0.01
-	9	13		

3 讨论

肿瘤细胞的侵袭转移是肾细胞癌治疗失败,并最终导致患者死亡的主要原因。癌组织的侵袭转移是一个多信号通道介导的复杂、多步骤的过程^[8-9]。组织癌变后,癌变细胞表面所带负电荷密度会明显增高,从而使细胞间存在的静电排斥力升高,一定程度上促使了肿瘤细胞彼此游离^[10]。更重要的是,当癌变发生后,正常细胞间存在的调控细胞黏附作用的细胞因子表达程度会明显异常,细胞间的黏附作用减少,癌细胞从原发部位脱落,结合并降解基底膜;脱落的癌细胞可通过阿米巴运动进入血管、淋巴管;肿瘤细胞在流速缓慢的地方可附着于管壁内皮细胞,穿出组织管道,从而在管道周围形成转移灶^[11-12]。近年来研究^[13-14]发现,埃兹蛋白可参与细胞形态学的调控,调节信号转导,参与细胞黏附、细胞吞噬,以及抑制血管内皮细胞的扩增和血管生成。埃兹蛋白作为一个多功能的分子,在肿瘤的发生发展、浸润和转移中起着重要作用。CD44 是分布广泛于细胞表面的跨膜糖蛋白,是重要的黏附分子,与肿瘤浸润转移关系密切。研究认为 CD44 基因在许多肿瘤中均有异常表达,与许多恶性肿瘤的发生、发展、浸润、转移有关。

本研究发现埃兹蛋白、CD44 在肾癌组织中表达阳性率明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。临床所采用的肾癌 AJCC 分期主要依照肿瘤进展程度进行划分,本研究发现埃兹蛋白、CD44 的表达水平随着分期的增高而上升($P < 0.05$)。亚组分析淋巴结转移及远处器官转移结果也表明,无淋巴结转移的肿瘤与存在有区域淋巴结转移的肿瘤之间、无远处脏器转移的肿瘤与远处脏器转移阳性的肿瘤之间其埃兹蛋白、CD44 的表达水平均存在有显著差异($P < 0.05$),这提示埃兹蛋白、CD44 的表达与 RCC 的侵袭转移有着密切的关系。

肿瘤大小与肿瘤侵袭危险性及治疗的预后存在

有相关性。本研究发现,最大径 >7.0 cm 的肿瘤埃兹蛋白表达阳性率明显高于最大径 ≤7.0 cm 的组织。尽管两组组织的 CD44 表达水平差异无统计学意义($P=0.057$),但直径 >7.0cm 的组织中 CD44 阳性率数值上仍明显高于直径 ≤7.0 cm 的组织(86.7% vs 56.1%)。

恶性肿瘤的侵袭转移往往是有多个相关基因共同作用的结果。研究^[15-16]认为,CD44/埃兹蛋白复合物与肿瘤的恶性转移有着高度的相关性。CD44、埃兹蛋白与细胞骨架之间存在着某种连接,这种连接不仅参与了细胞形态学的调控,更重要的是还参与了细胞与细胞间的跨膜信号转导,介导细胞生理功能的调控。在肿瘤发生发展过程中,CD44/埃兹蛋白的表达异常时可导致细胞的异常分离、运动、黏附,进而引起肿瘤的侵袭转移^[17-18]。本课题组前期研究^[19]发现,CD44 蛋白与埃兹蛋白在膀胱移行细胞癌中表达呈显著正相关,两者可能存在着协同作用,共同促进膀胱肿瘤的发生和进展,推测在 RCC 中可能也存在着相关作用机制,介导着肾癌的侵袭转移。

本研究发现,在 RCC 中 CD44 蛋白与埃兹蛋白的表达程度呈高度相关性($r=0.427, P<0.01$)。Martin 等^[20]指出,埃兹蛋白可直接与 CD44 分子的细胞质部分发生作用,影响细胞骨架蛋白的构相和分布,从而改变肿瘤细胞的运动能力,而 CD44 的上调能够使埃兹蛋白功能活化,参与肿瘤的增殖和转移。基于以上研究结果,推测 CD44/埃兹蛋白复合物协同促进肿瘤侵袭转移的作用机制可能同样也存在于肾癌的发生与进展过程中。

埃兹蛋白作为一个多功能的分子,在肾脏肿瘤的发生、发展、侵袭和转移中起着重要作用。CD44 也参与了与 RCC 侵袭转移的调控。埃兹蛋白与 CD44 协同作用可能在 RCC 的发生、发展及侵袭转移过程中扮演着重要角色,两者可作为 RCC 侵袭转移的肿瘤标志物,为肾脏肿瘤的治疗、预后判断提供指导。

[参 考 文 献]

[1] Manola J, Royston P, Elson P, et al. Prognostic model for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma: Results from the international kidney cancer working group [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(16): 5443-5450.

[2] White NMA, Khella HWZ, Grigull J, et al. miRNA profiling in metastatic renal cell carcinoma reveals a tumour-suppressor effect for miR-215 [J]. Bri J Cancer, 2011, 105(11): 1741-1749.

[3] Chiappetta C, Leopizzi M, Censi F, et al. Correlation of the

Rac1/RhoA pathway with ezrin expression in osteosarcoma [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2014, 22(3):162-170.

[4] Xie JJ, Zhang FR, Tao LH, et al. Expression of ezrin in human embryonic, fetal, and normal adult tissues [J]. J Histochem Cytochem, 2011, 59(11): 1001-1008.

[5] Tsuruoka S, Matsuo K, Ishikawa A, et al. Prognostic significance of CD44v3 and CD44 in oral squamous cell carcinoma of the tongue [J]. Oral Med Path, 2011, 15(4): 107-112.

[6] 龙慧民, 陈赐龄. 细胞黏附分子 CD44 的变异表达与肾癌的关系 [J]. 中华外科杂志, 1998, 36(12): 738-740.

[7] 齐小康, 李响, 周广臣, 等. Ezrin 在 RCC 中的表达及其意义 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2011, 16(1): 50-52.

[8] Banumathy G, Cairns P. Signaling pathways in renal cell carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(7): 658-664.

[9] Sakurai T, Kudo M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis [J]. Oncology, 2011, 81(Suppl 1): 24-29.

[10] 黄裕兵, 刘革力, 龙银江, 等. 弱碱性消癌液抑制乳腺癌细胞生长、转移并介导其消亡 [J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 2013, 29(8): 740-750.

[11] Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion [J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(1): 87-96.

[12] Liu T, Lin B, Qin J. Carcinoma-associated fibroblasts promoted tumor spheroid invasion on a microfluidic 3D co-culture device [J]. Lab Chip, 2010, 10(13): 1671-1677.

[13] Liu C, Kelnar K, Liu B, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44 [J]. Nat Med, 2011, 17(2): 211-215.

[14] Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, et al. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer [J]. Pathol Int, 2012, 62(2): 112-119.

[15] Wu G, Sun X, Yuan H, et al. Ezrin gene expression and protein production in the CD44⁺ subpopulation of SCC-9 cells in a malignant oral cancer cell line in vitro [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2013, 71(3): e151-e157.

[16] Babina IS, McSherry EA, Donatello S, et al. A novel mechanism of regulating breast cancer cell migration via palmitoylation-dependent alterations in the lipid raft affiliation of CD44 [J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(1): R19.

[17] Hefler LA, Concin N, Mincham D, et al. The prognostic value of immunohistochemically detected CD44v3 and CD44 expression in patients with surgically staged vulvar carcinoma [J]. Cancer, 2002, 94(1): 125-130.

[18] Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(7): 1271-1277.

[19] 谢宇, 金霞, 吴胜其, 等. Ezrin, CD44 在膀胱移行细胞癌的表达与意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(7): 1373-1375.

[20] Martin TA, Harrison G, Mansel RE, et al. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2003, 46(2): 165-186.

[收稿日期] 2014-06-25 [修回日期] 2014-10-27

[本文编辑] 黄静怡