

· 临床研究 ·

## Ezrin 及 CD44 蛋白在肝癌组织中的表达与意义

邱世云<sup>1</sup>, 周 婧<sup>2</sup>, 董浦江<sup>3</sup>

(1. 重庆市丰都县人民医院检验科 408200; 2. 重庆市第五人民医院普外科 400062;

3. 重庆医科大学附属第一医院老年科 400016)

**摘要:**目的 探讨 Ezrin、CD44 蛋白在肝癌组织中的表达与癌细胞转移的关系。方法 采用 Western blot 法检测 73 例肝癌组织和 23 例肝硬化组织的 Ezrin、CD44 蛋白表达情况。结果 Ezrin、CD44 蛋白在有转移肝癌组织中的表达水平明显高于无转移肝癌组织和肝硬化组织 ( $P < 0.01$ ); Ezrin 蛋白、CD44 蛋白在肝癌组织中的表达与 Edmondson 分级不相关 ( $P > 0.05$ )。结论 Ezrin、CD44 蛋白在肝癌组织中的表达与肝癌细胞的转移相关。

**关键词:** Ezrin 蛋白; CD44 蛋白; 肝肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.013

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)30-3162-02

## Expression and significance of ezrin and CD44 in liver cancer

Qiu Shiyun<sup>1</sup>, Zhou Jing<sup>2</sup>, Dong Pujiang<sup>3</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Fengdu County, Chongqing 408200, China;

2. Department of General Surgery, People's Five Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China;

3. Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the relationship between Ezrin, CD44 protein and cancer metasis in hepatoceular carcinoma. **Methods** The Western blot was carried out to detect the level of Ezrin and CD44 protein from 73 lever cancer and 23 cirrhosis. **Results** Higher expression of Ezrin and CD44 protein was found in liver cancer tissues of metastasis, compared to that in not metastasis and cirrhosis tissues ( $P < 0.01$ ). The level of Ezrin and CD44 protein expression in different pathological types were not significantly correlated to Edmondson stages of liver cancer ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The higher expression of Ezrin and CD44 protein may be correlated to the metastasis of liver cancer.

**Key words:** Ezrin protein; CD44 protein; liver neoplasms

肝癌是常见的一种消化道肿瘤,肝癌细胞转移是造成患者死亡的主要原因之一。研究与肿瘤细胞转移相关基因蛋白表达变化有重要的现实意义。Ezrin 与 CD44 蛋白在肿瘤细胞转移中的作用是一研究热点<sup>[1-2]</sup>。作者采用 Western blot 法测定 Ezrin 与 CD44 蛋白在肝癌组织中的表达,探讨其表达与肝癌细胞浸润、转移的关系,现报道如下。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 收集重庆医科大学附属第一医院、重庆市肿瘤医院近 1 年内手术样本。73 例肝癌患者年龄 28~73 岁,其中,男 67 例,女 6 例,均为原发性肝癌。样本取自癌组织边缘组织。术中见有肝内或肝周围淋巴结转移并经病理检查证实为转移性肝癌;肿瘤边界清晰,无明显侵袭现象为无转移肝癌者。73 例患者,其中 39 例有转移,34 例无转移。23 例肝硬化样本来自肝癌组织边缘 5 cm 外质地坚硬组织。按 Edmondson 法进行分级,根据肿瘤形态和分化程度分为 I~IV 级,其中 I 级 6 例,均无转移;II 级 26 例,12 例有转移,14 例无转移;III 级 34 例,20 例有转移,14 例无转移;IV 级 7 例,均有转移。以上样本均经病理检查核实。

**1.2 主要试剂与仪器** 兔抗人 Ezrin 抗体、鼠抗人 CD44 蛋白抗体、兔抗人  $\beta$ -actin 蛋白抗体(美国 Santa cruz 公司),电泳试剂盒(武汉博士德公司),发光试剂盒(武汉博士德公司),蛋白提取液(武汉博士德公司),图像分析系统(美国 BID-RAD 公司 Chemi DOCXRS)。

**1.3 肝癌组织蛋白提取液** 取液氮中保存的组织放入研钵,

滤纸吸干液体,加入液氮,碾磨至粉末,按 1 mg 组织粉末/15  $\mu$ L 蛋白提取液加入提取液,充分裂解后,12 000 r/min,离心 10 min,取上清液。用 Bradford 法测定提取液中蛋白含量,调节蛋白含量为 3 mg/ $\mu$ L。

**1.4 Ezrin、CD44、 $\beta$ -actin 蛋白表达测定** 取上述组织液经 100 g/L SDS-PAGE 电泳后电转于 PVDS 膜,50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭,经一抗及二抗孵育后,化学发光法显色,图像分析系统拍摄并用 Quantity One 软件将特异条带灰度数字化,一式 3 份。计算 Ezrin、CD44 蛋白表达水平的相对值(Ezrin、CD44 蛋白表达系数),Ezrin、CD44 蛋白表达系数 = Ezrin、CD44 蛋白积分光密度/ $\beta$ -actin 蛋白积分光密度。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析处理,组间蛋白表达用  $t$  检验,蛋白表达相关性用 Spearman 分析,实验结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 Ezrin、CD44 蛋白在有转移、无转移肝癌和肝硬化组织中的表达** 如表 1 所示,Ezrin、CD44 蛋白在有转移的肝癌组织中的表达量明显高于无转移肝癌组织及肝硬化组织中的表达,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );无转移肝癌组织与肝硬化组织中的 Ezrin、CD44 蛋白表达比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );Western blot 法检测有转移肝癌组织、无转移肝癌组织和肝硬化组织中 Ezrin、CD44 蛋白表达的部分结果,见图 1。

**2.2 Ezrin、CD44 蛋白表达与 Edmondson 法分级的关系** 如表 2 所示。I 级肝癌组织的 Ezrin、CD44 蛋白表达与 II 级、III

级未转移肝癌组织的表达比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );IV级肝癌组织的 Ezrin、CD44 蛋白表达与 II 级、III 级有转移肝癌组织的表达比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 Ezrin、CD44 蛋白表达系数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Ezrin	CD44
有转移肝癌	39	1.19 ± 0.20*#	1.97 ± 0.25*#
无转移肝癌	34	0.31 ± 0.13 <sup>+</sup>	0.68 ± 0.17 <sup>+</sup>
肝硬化	23	0.26 ± 0.11	0.61 ± 0.20

\*:  $P < 0.01$ , 与无转移肝癌组比较; #:  $P < 0.01$ , 与肝硬化组比较; <sup>+</sup>:  $P > 0.01$ , 与肝硬化组比较。

表 2 Ezrin、CD44 蛋白表达与 Edmondson 法分级的关系( $\bar{x} \pm s$ )

蛋白	I 级		II 级		III 级	IV 级
	无转移	有转移	无转移	有转移	无转移	有转移
Ezrin	0.32 ± 0.08#	1.08 ± 0.15	0.30 ± 0.12	1.15 ± 0.21	0.33 ± 0.11	1.22 ± 0.20*
CD44	0.68 ± 0.16#	2.06 ± 0.26	0.70 ± 0.19	1.89 ± 0.25	0.69 ± 0.17	1.97 ± 0.27*

#:  $P > 0.05$ , 与 II 级、III 级未转移肝癌组织比较; \*:  $P > 0.05$ , 与 II 级、III 级有转移肝癌组织比较。

2.3 Ezrin、CD44 蛋白在肝癌组织中表达量的相关性分析

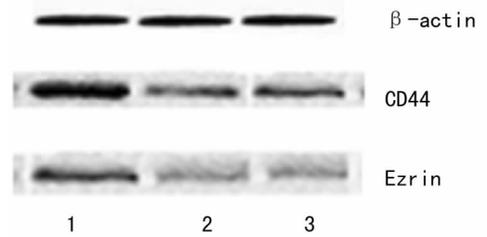
以低于蛋白表达系数均数 3 个标准差者为低表达,在此数值以上者为高表达。73 例肝癌组织中 Ezrin 与 CD44 蛋白表达同是高表达 31 例,同为低表达 29 例,高低表达不同 13 例。Spearman 分析结果显示,在肝癌组织中,Ezrin、CD44 蛋白表达量之间有显著的相关性( $r = 0.8322, P < 0.05$ )。

3 讨论

Ezrin 为膜-细胞骨架连接蛋白,相对分子质量为  $81 \times 10^3$ ,属于 ERM 家族成员之一。其主要定位于细胞膜内侧,通过其 C 端、N 端氨基酸残基形成的结构域分别同细胞骨架肌动蛋白和胞膜发生作用<sup>[3]</sup>。在生理水平下,Ezrin 蛋白在细胞中有休眠和激活两种状态,当该蛋白 N 端与 C 端分子间的相互作用形成头尾相连的折叠状态时为失活状态;而当 C 端的苏氨酸磷酸化或 N 端与磷脂酰肌醇二磷酸盐的结合时呈活化状态<sup>[4]</sup>。Ezrin 蛋白的过表达不仅影响肿瘤转移的某个环节,而且可能参与肿瘤转移的多个环节,如从原发灶脱落、侵入周边组织、侵入脉管系统、穿过基膜、选择性地靶向器官增殖形成转移灶等。对此,国内外均有报道证实,Yu 等<sup>[5]</sup>采用基因芯片技术研究骨肉瘤及横纹肌肉瘤中发现 Ezrin 蛋白的过表达与肿瘤侵袭、转移相关。Shen 等<sup>[6]</sup>发现 Ezrin 蛋白可作为骨髓瘤转移的有效指标;Zhang 等<sup>[7]</sup>发现 Ezrin 蛋白的过表达与肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移呈正相关,下调 Ezrin 蛋白的表达抑制高转移潜能细胞系的侵袭能力。

细胞表面分子 CD44 蛋白与肿瘤转移之间的密切关系,已经为国内外大量实验所证实<sup>[8-10]</sup>。CD44 分子可以介导肿瘤细胞迁移、侵袭,并且是跨细胞信号转导的重要环节。

有研究者发现,Ezrin 蛋白与 CD44、Met 产物(肝细胞生长因子受体)这些膜受体蛋白分子在调节肿瘤侵袭与转移中具有复杂的相互作用,它们可形成复合体调节肿瘤侵袭与转移。Bonilha 等<sup>[11]</sup>发现 CD44 分子过表达可激活 Ezrin 蛋白的功能,从而可导致肿瘤细胞系转移能力的增强。Chai 等<sup>[12]</sup>用免疫组织化学方法研究食管鳞状细胞癌发现,有淋巴转移的瘤细胞中 Ezrin、CD44v6 的阳性表达率显著高于无淋巴转移的瘤细胞,CD44v6 阳性表达的瘤细胞中 Ezrin 的表达显著高于



1: 转移肝癌组织; 2: 无转移肝癌组织; 3: 肝硬化组织。

图 1 Ezrin、CD44 蛋白表达情况

CD44v6 阴性表达瘤细胞。表明 Ezrin、CD44v6 在瘤细胞中的高表达与肿瘤的侵袭、转移有关。而有关 Ezrin、CD44 蛋白相互作用促进肝癌转移的研究鲜见报道。本研究结果显示在转移性肝癌组织中 Ezrin 与 CD44 蛋白的表达显著高于无转移肝癌组织,该两蛋白表达与病理分级无关,两蛋白在肝癌组织中的表达量相关。表明 Ezrin、CD44 蛋白在肝癌组织中的高表达与肝癌细胞的侵袭、转移有关,该两蛋白对促进肝癌细胞转移有协同作用。

总之,肝癌组织中 Ezrin、CD44 蛋白的高表达在肝癌细胞的侵袭、转移中起重要作用,联合检测 Ezrin 和 CD44 蛋白表达对更深入地了解肿瘤侵袭和转移的机制以及为临床观察肿瘤患者预后、转移提供可能的参考指标,同时也有可能为肿瘤分子靶向治疗和开发新药物找到另一个突破点<sup>[13-14]</sup>。

参考文献:

[1] Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF, et al. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERN superfamily[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2006, 44(4): 231-248.

[2] Bonilha VL, Rayborn ME, Saotome I, et al. Microvilli defects in retinas of ezrin knockout mice[J]. Exp Eye Res, 2006, 82(4): 720-729.

[3] Martin TA, Harrison G, Mansel RF, et al. The role of the cd44/ezrin complex in cancer metastasis[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2003, 46(2): 165-186.

[4] Rasmussen M, Alexander RT, Darborg BV, et al. Osmotic cell shrinkage activates ezrin/radixin/moesin(ERM) proteins: activation mechanisms and physiological implications[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(1): 197-212.

[5] Yu Y, Khan J, Khanna C, et al. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer Ezrin and the developmental homeoprotein six-1 as key metastatic(下转第 3166 页)

Ⅲ、Ⅳ期的大肠癌患者 5 年生存率明显低于 I、II 患者<sup>[13]</sup>, Hpa 和 VEGF-C 在Ⅲ、Ⅳ期大肠癌患者的阳性表达率明显高于 TNM I、II 期;在生存期小于 5 年大肠癌中的阳性表达率明显高于大于等于 5 年组( $P < 0.01$ )。提示 Hpa 和 VEGF-C 高表达的大肠癌患者肿瘤细胞侵袭和转移的能力越强,预后越差。

#### 参考文献:

[1] 刘宝善. 大肠肛门肿瘤学[M]. 成都:四川科学技术出版社,2002;8-14.

[2] Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, et al. Towards a pan-european consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(17):2212-2221.

[3] Yoo PS, Lopez-Soler RI, Hulett MD, et al. Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2006, 6(2):202-207.

[4] Freeman C, Handorf BJ, Baker RT, et al. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis[J]. *Nat Med*, 1999, 5(7):803-809.

[5] Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice[J]. *Science*, 1997, 276(10):1423-1425.

[6] Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer breast[J]. *Cancer Res Treat*, 2001, 66(2):159-164.

[7] Kawakami M, Furuhashi T, Kimura Y, et al. Quantification of vascular endothelial growth factor-C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer[J]. *Surgery*, 2003, 133(3):300-

308.

[8] Nakashima T, Kondoh S, Kitoh H, et al. Vascular endothelial growth factor-c in human gallbladder cancer and its relationship to lymph node metastasis[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(1):33-39.

[9] Eccles SA. Heparanase: breaking down barriers in tumors [J]. *Nat Med*, 1999, 5(7):735-736.

[10] El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, et al. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(11):1299-1305.

[11] Elkin M, Cohen I, Zcharia E, et al. Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12):8821-8826.

[12] Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, et al. Role of vascular endothelial growth factor-C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(7):1823-1829.

[13] Eggert A, Ikegaki N, Kwiat KJ. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(14):1900-1908.

[14] Ueda M, Terai Y, Yamashita Y. Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(5):335-343.

[15] O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 54(3):295-308.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-05-17)

(上接第 3163 页)

regulators[J]. *Nat Med*, 2004, 10(2):175-186.

[6] Shen XD, Shen Z, Zheng SE, et al. Expression of Ezrin correlates with lung metastasis in Chinese patients with osteosarcoma[J]. *Clin Invest*, 2009, 32(12):2007-2012.

[7] Zhang Y, Hu MY, Wu WZ, et al. The membrane-cytoskeleton organizer Ezrin is necessary for hepatocellular carcinoma cell growth and invasiveness[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132(11):685-698.

[8] Panta H, Sherman L, Peter A, et al. CD44: From adhesion molecules to signaling regulators[J]. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2003, 10(1):33-45.

[9] 王翠芳, 欧阳振, 马延超, 等. 骨肉瘤组织中 COX-mRNA、CD44 mRNA 和蛋白表达及其两者相关性[J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(8):1088-1089.

[10] 水若鸿, 陆洪芳, 李雄增, 等. T 细胞淋巴瘤 1 和 CD44 蛋白在 Burkitt 淋巴瘤中的表达及其诊断价值[J]. *中华病*

理学杂志, 2009, 38(11):745-748.

[11] Bonilha VL, Rayborn ME, Saotome I, et al. Microvilli defects in retinas of Ezrin knockout mice[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(4):720-729.

[12] Chai LX, Sun KL, Guo LP, et al. Expression of Ezrin and CD4v6 in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. *Zhonghua Zhongliu Zazi*, 2007, 29(9):685-688.

[13] Liu AM, Xu MZ, Chen J, et al. Targeting YAP and Hippo signaling pathway in liver cancer[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2010, 14(8):855-868.

[14] Mi Z, Guo H, Markovic J, et al. Characterization of osteopontin binding kinetics in MDA-MB231 breast and SK-Hep-1 liver cancer cells[J]. *J Cancer Sci Ther*, 2009, 1(1):47-51.

(收稿日期:2012-03-27 修回日期:2012-05-28)