

• 基础研究 •

胃癌组织和胃癌细胞株中 Claudin-6、CD44V6 的表达及其临床意义*

孟冬月¹,张俊会²,郭云岭³,李娜²,魏世平²,郭民英²

(1. 邢台医学高等专科学校第二附属医院病理科,河北邢台 054000;2. 邢台医学高等专科学校病理学教研室,河北邢台 054000;3. 邢台医学高等专科学校第二附属医院放疗科,河北邢台 054000)

摘要:目的 研究胃癌组织和胃癌细胞中 Claudin-6、CD44V6 蛋白的表达及其临床意义。方法 应用免疫组织化学及免疫细胞化学法检测 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白在正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜、胃腺癌组织及胃癌 MKN28、SGC7901、BGC823 细胞中的表达。结果 正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜及胃腺癌组织中, Claudin-6 的阳性表达率分别为 100.0%、65.0%、53.3%, 呈明显降低趋势($\chi^2=7.758, P<0.05$); CD44V6 的阳性表达率分别为 20.0%、45.0%、77.8%, 呈明显增高趋势($\chi^2=15.917, P<0.05$)。肿瘤侵犯浆膜层者 Claudin-6 蛋白的阳性表达率明显低于侵犯肌层及以内者($P<0.05$); 而其 CD44V6 蛋白的阳性表达率明显高于侵犯肌层及以内者($P<0.05$)。有淋巴结转移者 Claudin-6 蛋白的阳性表达率明显低于无淋巴结转移者($P<0.05$), 而其 CD44V6 蛋白的阳性表达率明显高于无淋巴结转移者($P<0.05$)。在不同性别、年龄、分化程度及有无脉管侵犯的患者中, Claudin-6 和 CD44V6 蛋白阳性表达率的差异均无统计学意义($P>0.05$)。Spearman 等级相关性分析显示, Claudin-6 与 CD44V6 表达呈负相关($r=-0.986, P<0.05$)。在 MKN28、SGC7901、BGC823 细胞中, Claudin-6 和 CD44V6 免疫染色强度的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 Claudin-6 及 CD44V6 在胃癌发生、发展中有一定作用, 检测 Claudin-6 及 CD44V6 的表达有助于判断胃癌患者的病情和预后。

关键词:胃肿瘤;肿瘤细胞,培养的;免疫组织化学;Claudin-6;CD44V6

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)02-0167-03

Expression and clinical significance of Claudin-6 and CD44V6 expression in gastric carcinoma tissues and cell lines*

Meng Dongyue¹, Zhang Junhui², Guo Yunling³, Li Na², Wei Shiping², Guo Mingying²

(1. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College; 2. Department of Pathology, Xingtai Medical College; 3. Department of Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital to Xingtai Medical College, Xingtai, Hebei 054000, China)

Abstract: Objective To study the expression and clinical significance of Claudin-6 and CD44V6 protein expression in gastric carcinoma tissues and cell lines. **Methods** Immunohistochemistry and immunocytochemistry were applied to assay the expression of Claudin-6 and CD44V6 protein in normal gastric mucosa, gastric mucosa with atypical hyperplasia, gastric adenocarcinoma tissues and gastric cancer MKN28, SGC7901, BGC823 cells. **Results** The positive expression rates of Claudin-6 in normal gastric mucosa, gastric mucosa with atypical hyperplasia and gastric adenocarcinoma tissues were 100.0%, 65.0% and 53.3%, respectively, with significantly decreasing trend($\chi^2=7.758, P<0.05$), and the positive expression rates of CD44V6 in tissues above were 20.0%, 45.0% and 77.8%, respectively, with obviously increasing trend($\chi^2=15.917, P<0.05$). In tissues with tumor invading serosa or lymph node metastasis, the positive expression rates of Claudin-6 protein were significantly lower than that invading less than muscle or without metastasis($P<0.05$), while those of CD44V6 protein were markedly higher($P<0.05$). Among different gender, age, differentiation degree and whether or not vascular invasion, differences of positive expression rates of Claudin-6 and CD44V6 were not statistically significant($P>0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that Claudin-6 and CD44V6 expression was negatively correlated($r=-0.986, P<0.05$). Differences of immunostaining intensities of Claudin-6 and CD44V6 among MKN28, SGC7901, BGC823 cells were not statistically significant($P>0.05$). **Conclusion** Claudin-6 and CD44V6 play a certain role in carcinogenesis and progression of gastric carcinoma, and detection of Claudin-6 and CD44V6 expression may be useful in estimating the condition and prognosis of patients with gastric carcinoma.

Key words: stomach neoplasms; tumor cells, cultured; immunohistochemistry; Claudin-6; CD44V6

紧密连接是细胞间的主要黏附形式之一,其完整性的丢失将直接影响细胞的营养摄取、增殖和迁移^[1]。Claudin 蛋白是构成紧密连接的主要骨架蛋白之一,近年来研究发现 Claudin 在多种癌组织中表达异常,推测 Claudin 的异常表达可能与恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[2-3],但是,关于 Claudin-6 在胃癌中的表达至今尚未见报道。本研究拟通过检测 Claudin-6 及

CD44V6 蛋白在正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜、胃腺癌组织及胃癌细胞株中的表达,探讨 Claudin-6 及 CD44V6 在胃癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料 全部病例均来自邢台市人民医院病理科 2008 年 2 月至 2009 年 11 月期间的存档石蜡包埋标本。手术

采集这些标本时,所有患者术前均未行放疗和化疗。胃腺癌 45 例,其中,男 33 例,女 12 例;年龄 41~78 岁;高、中分化腺癌 25 例,低分化腺癌 20 例;有淋巴结转移 27 例。胃黏膜不典型增生 40 例,其中,男 29 例,女 11 例;年龄 38~68 岁;轻度增生 12 例,中度增生 18 例,重度增生 10 例。在距病理组织边缘超过 5 cm 处取正常胃黏膜组织 10 例作为正常对照。胃癌 MKN28(高分化)、SGC-7901(中分化)、BGC823(低分化)细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院;抗 Claudin-6 抗体购于英国 Abcam 公司,抗 CD44V6 抗体和链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase,SP)试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法 所有标本均经 10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度为 4 μm,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后,行免疫组织化学染色。胃癌 MKN28、SGC-7901、BGC823 细胞常规培养于 RPMI 1640 培养基,置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱中培养,每日更换培养基;细胞爬片用丙酮固定 15 min,分别进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色和免洗细胞化学染色。二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)显色,苏木素复染,中性树胶封固。磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)代替第一抗体作阴性对照。

1.3 结果判定标准 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白定位于细胞

膜与细胞质,出现黄色至棕褐色颗粒为阳性表现。结果采用双人双盲光学显微镜观察,每例均随机观察 10 个高倍视野,采用半定量积分法判断结果,阳性着色强度:无色计为 0 分,淡黄色计为 1 分,棕黄色计为 2 分,棕褐色计为 3 分;阳性着色细胞数:≤10%计为 1 分,>10%~50%计为 2 分,>50%~100%计为 3 分。将着色强度与阳性细胞数百分比的分值相加,0~2 分为阴性(-),3 分为弱阳性(+),4 分为阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,计数资料用 χ^2 检验,采用 Spearman 等级相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Claudin-6 及 CD44V6 在不同病变胃组织中的表达 正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜及胃腺癌组织中,Claudin-6 的阳性表达率分别为 100.0%、65.0%、53.3%,呈明显降低趋势($\chi^2=7.758,P<0.05$),见图 1;CD44V6 的阳性表达率分别为 20.0%、45.0%、77.8%,呈明显升高趋势($\chi^2=15.917,P<0.05$),见图 2。在胃腺癌高、中分化及低分化组之间 Claudin-6 及 CD44V6 的阳性表达均无明显差异($\chi^2=1.004,P>0.05$; $\chi^2=1.969,P>0.05$)。Spearman 等级相关分析显示 Claudin-6 与 CD44V6 的表达呈负相关($r=-0.986,P<0.05$)。见表 1。

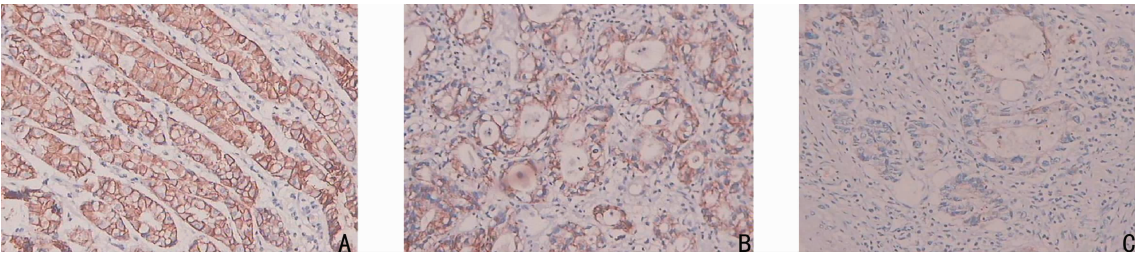


图 1 Claudin-6 在正常胃黏膜(A)、中度不典型增生胃黏膜(B)及胃低分化腺癌组织(C)中的表达 (×200)

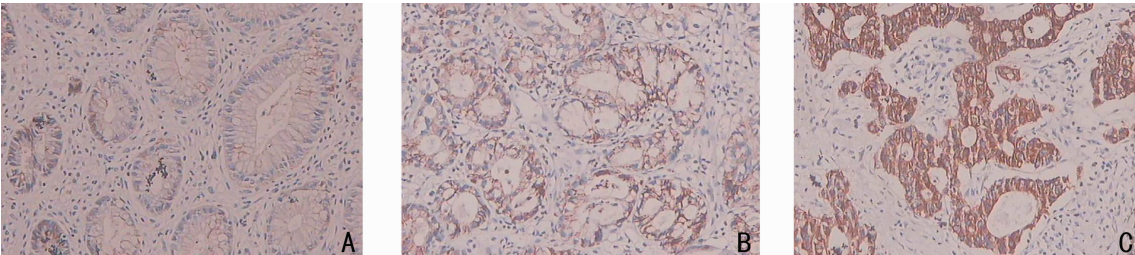


图 2 CD44V6 在正常胃黏膜(A)、中度不典型增生胃黏膜(B)及胃低分化腺癌组织(C)中的表达 (×200)

表 1 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白在不同病变胃组织中的表达

组别	n	Claudin-6 蛋白[n(%)]		CD44V6 蛋白[n(%)]	
		阳性	阴性	阳性	阴性
正常胃黏膜	10	10(100.0)	0(0.0)	2(20.0)	8(80.0)
不典型增生胃黏膜	40	26(65.0)	14(35.0)	18(45.0)	22(55.0)
轻度	12	9(75.0)	3(25.0)	4(33.3)	8(66.7)
中度	18	11(61.1)	7(38.9)	8(44.4)	10(55.6)
重度	10	6(60.0)	4(40.0)	6(60.0)	4(40.0)
胃腺癌	45	24(53.3)	21(46.7)	35(77.8)	10(22.2)
高、中分化	25	15(60.0)	10(40.0)	17(68.0)	8(32.0)
低分化	20	9(45.0)	11(55.0)	18(90.0)	2(10.0)

2.2 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白与胃腺癌患者临床生物学行为的关系 经 χ^2 检验和四格表校正 χ^2 检验,肿瘤侵及浆膜层者 Claudin-6 蛋白的阳性表达率明显低于侵及肌层及以内者($P<0.05$);而其 CD44V6 蛋白的阳性表达率明显高于侵及肌层及以内者($P<0.05$)。有淋巴结转移者 Claudin-6 蛋白的阳性表达率明显低于无淋巴结转移者($P<0.05$),而其 CD44V6 蛋白的阳性表达率明显高于无淋巴结转移者($P<0.05$)。在不同性别、年龄、分化程度及有无脉管侵犯的患者中,Claudin-6 和 CD44V6 蛋白阳性表达率的差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.3 不同胃癌细胞株中 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白的表达 细胞爬片固定后,SP 染色显示, MKN28、SGC-7901、BGC823 细胞中 Claudin-6 与 CD44V6 蛋白的阳性表达均定位在细胞膜

和细胞质中,在不同细胞株之间,二者免疫染色强度的差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白与胃腺癌患者临床生物学行为的关系[n(%)]

组别	n	Claudin-6 蛋白			CD44V6 蛋白		
		阳性	阴性	P	阳性	阴性	P
年龄(岁)							
<50	11	5(45.5)	6(54.5)	0.547	7(63.6)	4(36.4)	0.378
≥50	34	19(55.9)	15(44.1)		28(82.4)	6(17.6)	
性别							
男	33	16(48.5)	17(51.5)	0.280	26(78.8)	7(21.2)	1.000
女	12	8(66.7)	4(33.3)		9(75.0)	3(25.0)	
浸润深度							
肌层及以内	12	10(83.3)	2(16.7)	0.015	5(41.7)	7(58.3)	0.002
浆膜	33	14(42.4)	19(57.6)		30(90.9)	3(9.1)	
淋巴结转移							
无	18	15(83.3)	3(16.7)	0.001	10(55.6)	8(44.4)	0.010
有	27	9(33.3)	18(66.7)		25(92.6)	2(7.4)	
脉管侵犯							
无	35	20(57.1)	15(42.9)	0.549	26(74.3)	9(25.7)	0.533
有	10	4(40.0)	6(60.0)		9(90.0)	1(10.0)	

3 讨 论

Claudin 蛋白是细胞间紧密连接的骨架蛋白之一,并参与细胞间的信号转导,Claudin 蛋白的异常表达在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用。许多肿瘤发生时,Claudin 蛋白的表达水平明显下降。Michl 等^[4]向实验组模型鼠的静脉内注入 Claudin-4 低表达的胰腺癌细胞,结果发现,与对照组相比,肿瘤细胞的肺转移率明显增加,从而认为 Claudin-4 低表达能增强胰腺癌细胞的侵袭性;Kominsky 等^[5]发现 Claudin-7 表达下调的乳腺癌细胞恶性程度较高;Hoevel 等^[6]认为 Claudin-1 在肿瘤细胞中的重新表达可促进肿瘤细胞的凋亡。本研究发现,在正常胃黏膜、非典型增生胃黏膜及胃腺癌组织中,Claudin-6 蛋白的阳性表达呈降低趋势,肿瘤侵及浆膜层者 Claudin-6 蛋白的阳性表达率明显低于侵及肌层及以内者;而其 CD44V6 蛋白的阳性表达率明显高于侵及肌层及以内者。有淋巴结转移者 Claudin-6 蛋白的阳性表达率明显低于无淋巴结转移者。Claudin-6 蛋白在胃癌组织中的低表达提示 Claudin-6 可能作为抑癌基因不仅参与了胃癌的发生,而且还参与了胃癌的进展、侵袭和转移,这与以上的研究结果相似。

CD44 蛋白是位于人类第 11 号染色体短臂上基因所编码的黏附分子,是一种整合膜糖蛋白,能与细胞基质中的纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、I 型胶原和透明质酸分子以及骨架蛋白相结合,引起细胞形态和游动性改变。CD44V6 是最早被发现的含有变异型外显子 V6 编码序列的 CD44 分子,其表达可改变肿瘤细胞表面黏附分子的构成和功能,是近年来受到密切关注的在肿瘤细胞浸润和转移过程中可能发挥重大作用的因子^[7-8]。许多研究表明,CD44V6 的过表达与多种人体恶性肿瘤的发生、发展、侵袭转移和不良预后密切相关,是判断肿瘤生

物学行为及预后的重要指标^[9-10]。本研究结果显示:在胃腺癌组织中的 CD44V6 表达率明显高于其在非典型增生胃黏膜及正常胃黏膜中的表达率,这与国、内外研究结果一致^[11-13]。同时随着肿瘤细胞浸润深度的增加、淋巴结转移,CD44V6 阳性表达率显著升高,但与年龄、性别及有无脉管侵犯无关。这提示 CD44V6 不但与胃癌的发生、发展密切相关,而且在胃癌的临床进展和转移过程中均发挥了重要作用。这与 Okayama 等^[14]和于海英等^[15]的研究相符。

本研究对不同分化程度的 3 株胃癌细胞株进行免疫细胞化学检测,结果显示 3 株胃癌细胞中 Claudin-6 与 CD44V6 蛋白均呈阳性表达,但免疫染色强度无明显差别;对 45 例不同分化程度的胃腺癌组织进行免疫组织化学检测,结果显示胃腺癌组织中,高、中分化及低分化组间 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白的阳性表达率也无明显差异,与细胞染色结果一致。这表明 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白的表达与肿瘤的分化程度无关。

Spearman 等级相关分析显示 Claudin-6 与 CD44V6 的表达呈负相关,提示 Claudin-6 异常表达可能破坏细胞间紧密连接的结构和功能,使肿瘤细胞失去黏附而易于浸润;CD44V6 阳性表达可赋予肿瘤细胞更强的运动能力,二者不是两个独立的过程,而是具有相关性。因此,检测胃癌组织中 Claudin-6 及 CD44V6 蛋白的表达有助于判断胃癌患者的病情程度和预后,但其具体的作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Karl M,Maria SB. Functional analysis of tight junctions [J]. Methods,2003,30(3):228-234.

[2] Swisshelm K,Macek R,Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis[J]. Adv Drug Deliv Rev,2005,57(6):919-928.

[3] Morin PJ. Claudin proteins in human cancer:promising new targets for diagnosis and therapy[J]. Cancer Res, 2005,65(21):9603-9606.

[4] Michl P,Barth C,Buchholz M,et al. Claudin4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer[J]. Cancer Res,2003,63(19):6265-6271.

[5] Kominsky SL,Argani P,Korz D,et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast [J]. Oncogene, 2003, 22 (13): 2021-2033.

[6] Hoevel T,Macek R,Swisshelm K,et al. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids[J]. Int J Cancer,2004,108(3):374-383.

[7] Xin Y,Grace A,Gallagher MM,et al. CD44V6 in gastric carcinoma;a marker of tumor progression[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol,2001,9(2):138-142.

[8] Yamaguchi A,Goi T,Yu J,et al. Expression of CD44V6 in advanced gastric cancer and its relationship to hematogenous metastasis and long-term prognosis[J]. J Surg Oncol,2002,79(4):230-235.

[9] JOOM, Lee HK, Kang YK. Expression (下转第 173 页)

- J Biol Chem, 2010, 285(9): 6563-6572.
- [5] Endogenous H, Breast CA. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(6): 530-542.
 - [6] Chong KY, Subramanian A, Mokbel K, et al. The prognostic significance of the insulin-like growth factor-1 ligand and receptor expression in breast cancer tissue[J]. Surg Oncol, 2011, 104(3): 228-235.
 - [7] Fu P, Ibusuki M, Yamamoto Y, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor gene expression is associated with survival in breast cancer; a comprehensive analysis of gene copy number, mRNA and protein expression[J]. Breast cancer Res Treat, 2011, 130(1): 307-317.
 - [8] Mukohara T, Shimada H, Ogasawara N, et al. Sensitivity of breast cancer cell lines to the novel insulin-like growth factor-1 receptor(IGF-1R) inhibitor NVP-AEW541 is dependent on the level of IRS-1 expression[J]. Cancer Lett, 2009, 282(1): 14-24.
 - [9] Miki H, Uehara N, Kimura A, et al. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells[J]. Int J Oncol, 2012, 40(4): 1020-1028.
 - [10] Bae S, Lee EM, Cha HJ, et al. Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Cells, 2011, 32(3): 243-249.
 - [11] Sareen D, Darjatmoko SR, Albert DM, et al. Mitochondria, Calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer [J]. Mol Pharmacol, 2007, 72(6): 1466-1475.
 - [12] Alkhalaf M, El-Mowafy A, Renno W, et al. Resveratrol-induced apoptosis in human breast Cancer cells is mediated primarily through the caspase-3-dependent pathway [J]. Arch Med Res, 2008, 39(2): 162-168.
 - [13] Tang FY, Yc S, Chen NC, et al. Resveratrol inhibits migration and invasion of human breast-cancer cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52(6): 683-691.
 - [14] Singh N, Nigam M, Ranjan V, et al. Resveratrol as an adjunct therapy in cyclophosphamide-treated MCF-7 cells and breast tumor explants[J]. Cancer Sci, 2011, 102(5): 1059-1067.
 - [15] Levi F, Pasche C, Lucchini F, et al. Resveratrol and breast Cancer risk[J]. Eur J Cancer Prev, 2005, 14(2): 139-142.
 - [16] Bratton MR, Duong BN, Elliott S, et al. Regulation of ER-alpha-mediated transcription of Bcl-2 by PI3K-AKT crosstalk; implications for breast Cancer cell survival[J]. Int J Oncol, 2010, 37(3): 541-550.
 - [17] Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer [J]. J Clin Invest, 2010, 120(7): 2406-2413.
 - [18] Wang Y, Zhou D, Phung S, et al. SGK3 is an estrogen-inducible kinase promoting estrogen-mediated survival of breast Cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(1): 72-82.
 - [19] Ma JC, Sawai H, Matsuo Y, et al. IGF-1 mediates PTEN suppression and enhances cell invasion and proliferation via activation of the IGF-1/PI3K/AKT signaling pathway in pancreatic Cancer cells[J]. J Surg Res, 2010, 160(1): 90-101.

(收稿日期: 2012-10-22 修回日期: 2012-11-26)

(上接第 169 页)

- of E-cadherin, betacatenin, CD44s and CD44V6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis [J]. Anticancer Res, 2003, 2(2B): 1581-1589.
- [10] 谷化平. 环氧酶-2 和 CD44V6 蛋白在宫颈鳞癌中表达及临床意义[J]. 生命科学研究, 2008, 12(1): 87-90.
 - [11] 米建强, 张朝晖, 沈铭昌. 胃癌及癌前病变组织中 CD44V6 表达的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(2): 156-158.
 - [12] 张大伟, 张锦红. CD44V6 在胃癌胃镜标本和术后标本中的表达及与胃癌生物学行为的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(6): 610-615.
 - [13] Carvalho R, Milne AN, Polak M, et al. A novel region of amplification at 11p12-13 in gastric cancer, revealed by representational difference analysis, is associated with overexpression of CD44V6, especially in early-onset gastric carcinomas[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2006, 45(10): 967-975.
 - [14] Okayama H, Kumamoto K, Saitou K, et al. CD44V6, MMP-7 and nuclear Cdx 2 are significant biomarkers for prediction of lymph node metastasis in primary gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2009(22): 745-755.
 - [15] 于海英, 刘畅, 高凤兰, 等. 胃癌组织中 MMP-9、CD44V6 和 VEGF 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(26): 78-79.

(收稿日期: 2012-08-13 修回日期: 2012-12-04)