

KAI1/CD82 及 CD44v6 在人喉鳞癌病变过程中的表达及意义

周明琦, 孙建松*

摘要 目的 探讨肿瘤转移抑制基因 KAI1/CD82、细胞黏附分子 CD44v6 在人喉鳞状细胞癌(LSCC)、癌前病变、息肉以及正常黏膜中的表达。方法 应用免疫组化法检测 64 例 LSCC、21 例喉癌前病变、15 例喉息肉和 15 例正常喉黏膜组织中 KAI1/CD82、CD44v6 蛋白的表达水平。结果 ① KAI1/CD82 蛋白在正常喉黏膜及喉息肉组织中呈高表达,喉癌前病变及 LSCC 组织中呈低表达,阳性表达率分别为 86.67% (13/15)、80.00% (12/15)、38.10% (8/21)、37.50% (24/64),正常喉黏膜与 LSCC 两者之间比较差异有统计学

意义($P < 0.05$)。② CD44v6 蛋白在正常喉黏膜及喉息肉中呈低表达,在喉癌前病变及 LSCC 组织中呈高表达,阳性表达率分别为 26.67% (4/15)、33.33% (5/15)、80.95% (17/21)、75.00% (48/64),正常喉黏膜与 LSCC 两者之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ① KAI1/CD82 表达下调、缺失及 CD44v6 表达上调与 LSCC 的发生、发展相关。② 联合检测 KAI1/CD82 和 CD44v6 可为 LSCC 的早期诊断提供临床依据。

关键词 喉鳞状细胞癌;KAI1/CD82;CD44v6;免疫组织化学中图分类号 R 739.65

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0808-04

2015-03-02 接收

基金项目:贵州省科技联合基金项目(编号:黔科合 LS 字[2012]031 号)

作者单位:贵州省人民医院耳鼻咽喉头颈外科 贵阳 550002

作者简介:周明琦,女,副主任医师,副教授,硕士;

孙建松,男,副主任医师,副教授,硕士,责任作者,E-mail: sjsent@sina.com

* 对本文具有同等贡献

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)的形成和演变是一个多步骤且极其复杂的过程,是由多种因素、多种基因共同作用的结果;及时有效地发现和检测肿瘤标志物,研究其在肿瘤组织及非肿瘤组织中的分布和表达情况十分必要。

Association study of PRKAG2 gene polymorphism and clinical features of atopic dermatitis

Fang Ling, Wu Yanyan, Liu Longdan, et al

(Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the associations of PRKAG2 gene polymorphism with the phenotypic traits of atopic dermatitis in the Chinese Han population. **Methods** A total of 4 480 AD patients and 12 319 controls were selected from our previous atopic dermatitis GWAS in the Chinese Han population using Illumina Human 610 chips and Sequenom MassArray. Our research using case-control, case-case studies, and the SPSS 20.0 statistical analysis was used to compare the distribution of genotype frequency in patients and controls, then compared the correlation of alleles and genotype with the clinical phenotype. **Results** The frequency genotype GG, GA of SNP PRKAG2(rs17173197) was statistically significant between the case group and control group ($P < 0.05$). Analyses of the genetic model revealed that the most suitable model describing the association of rs17173197 polymorphism with atopic dermatitis was recessive model ($P < 0.05$). Stratified analyses showed that G allele frequency distribution of rs17173197 polymorphism was associated with south patients, familial atopic dermatitis, concomitant xerosis ($P < 0.05$). However, we failed to observe any significant association of the risk allele G of rs17173197 with other subphenotype in atopic dermatitis. **Conclusion** Our study is the first one to validate that the risk allele G of PRKAG2 (rs17173197) confers risk for southern area, concomitant xerosis and familial atopic dermatitis.

Key words single-nucleotide variants; susceptibility gene; subphenotype; dermatitis; atopic

KAI1/CD82 基因是一种肿瘤转移抑制基因,属于 4 次跨膜超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)。CD44v6 是一种肿瘤转移基因,是分布极为广泛的细胞跨膜蛋白,属于细胞表面的黏附分子。目前,有关 KAI1/CD82 和 CD44v6 在人喉组织中的表达及分布情况及其与 LSCC 的相关性研究尚未见报道。该研究通过检测 KAI1/CD82 和 CD44v6 在人喉不同组织中的表达及其分析与 LSCC 病变发展的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取贵州省人民医院耳鼻咽喉头颈外科 2006 年 11 月~2009 年 11 月手术切除的 LSCC 标本 64 例。患者术前均未行放射和化学治疗,均无远处转移,病例资料完整。其中男 59 例,女 5 例;年龄 37~72 岁,中位年龄 52.8 岁。喉癌的分类根据国际抗癌联盟(UICC)2002 年 TNM 标准进行分期,按肿瘤分化程度分为 3 级;喉癌前病变(laryngeal precancerous lesion, LPL)按 2005 年 WHO 关于头颈部肿瘤的分类^[1]进行诊断。另外,分别选 LPL 21 例,其中喉非典型增生 I 级、II 级、III 级各为 7 例;喉息肉(polyp of larynx, LP)和癌旁切缘正常喉黏膜(normal laryngeal mucosa, NLM)标本各 15 例(均经病理证实)。随访时间 36~87 个月,平均 54 个月。随访 3 年以上 58 例,失访 6 例,随访率 90.63%;5 年以上 53 例,失访 11 例,随访率 82.81%。

1.2 主要试剂和实验方法 KAI1/CD82 鼠抗人单克隆抗体(Rs-1470R)和 CD44v6 鼠抗人单克隆抗体(Rs-2507R)及 Envision 二抗试剂盒(Rs-1036R)均购自上海瑞齐生物技术开发有限公司。所有蜡块切片,厚度 4 μm 。免疫组织化学染色采用 Envision 法,按试剂盒说明进行操作,以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知结肠癌阳性切片作阳性对照。

1.3 KAI1/CD82 及 CD44v6 的阳性判断标准 显微镜下观察免疫组化染色后的病理切片,用低倍镜($\times 100$)和高倍镜($\times 400$)观察全片,KAI1/CD82 及 CD44v6 阳性染色为在细胞膜或细胞质内出现棕黄色颗粒。参考 Schindl et al^[2]报道的方法,综合染色强度和阳性细胞数所占比例进行半定量处理。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。两组间的计数资料比较应用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法进行统计学处理;相关关系用 Spearman 相关性检验分析。

2 结果

2.1 KAI1/CD82 在喉不同病变组织中的表达情况

KAI1/CD82 主要定位于细胞膜或细胞质,呈棕褐色或棕黄色。正常喉组织中 KAI1/CD82 蛋白阳性颗粒主要位于喉鳞状细胞的细胞膜和细胞质,而肿瘤组织中呈连续片状分布在细胞膜或细胞质,少量弥散于细胞膜中,并逐渐减少甚至缺失。KAI1/CD82 在 NLM、LP、LPL 和 LSCC 4 种组织中有不同程度的阳性表达,阳性表达率分别为 86.67% (13/15)、80.00% (12/15)、38.10% (8/21)、37.50% (24/64),且表达强度呈递减趋势,其中 NLM 与 LP、LP 与 LPL、LP 与 LSCC 以及 LPL 与 LSCC 之间经 χ^2 检验,差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.536, 0.227, 0.428, 0.024$)。在 NLM 与 LPL、NLM 与 LSCC 之间经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2 = 1.685, 2.529, P < 0.05$)。在 NLM 和 LP 有较强的阳性表达,LPL 和 LSCC 则表达较弱或仅有少量散在阳性表达。见表 1、图 1。

表 1 KAI1/CD82 及 CD44v6 在喉不同组织中表达情况[n(%)]

项目	n	KAI1/CD8 表达		CD44V6 表达	
		+	-	+	-
NLM	15	13 (86.67)	2 (13.33)	4 (26.67)	11 (73.33)
LP	15	12 (80.00)	3 (20.00)	5 (33.33)	10 (66.67)
LPL	21	8 (38.10)	13 (61.90)	17 (80.95)	4 (19.05)
LSCC	64	24 (37.50)	40 (62.50)	48 (75.00)	16 (25.00)

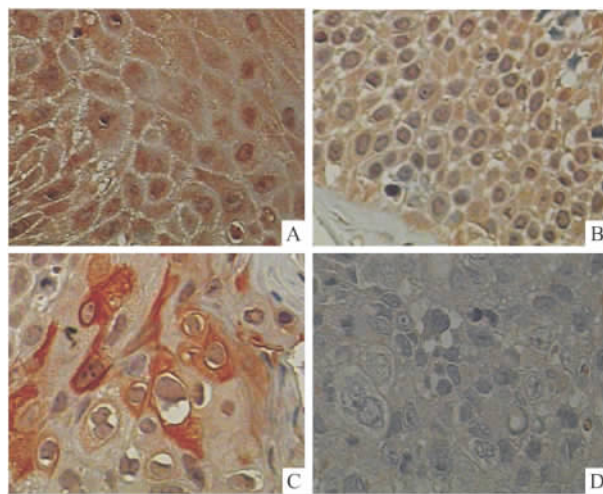


图 1 KAI1/CD82 在喉不同组织中的表达 LDP $\times 400$
A: NLM; B: LP; C: LPL; D: LSCC

2.2 CD44v6 在喉不同病变组织中的表达水平

CD44v6 主要表达于细胞膜或细胞质,呈棕黄色或棕

黄色,未见细胞核染色。结果显示 CD44v6 蛋白在正常鳞状上皮的基底细胞、棘细胞层和近棘细胞层表达,在 LSCC 细胞中,CD44v6 蛋白阳性呈片状,广泛分布在癌巢中。CD44v6 在 NLM、LP、LPL 和 LSCC 组织中有不同程度的阳性表达,其阳性表达率分别为 26.67% (4/15),33.33% (5/15),80.95% (17/21),75.00% (48/64),表达强度呈递增趋势,其中 NLM 与 LP、LPL 与 LSCC 之间相比,经 χ^2 检验,其差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 0.159, 0.745$),在 NLM 与 LPL、NLM 与 LSCC、LP 与 LPL 以及 LP 与 LSCC 之间相比,经 χ^2 检验,差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 10.609, 12.619, 2.922, 9.555, P < 0.05$)。NLM 和 LP 中则表达较弱或仅有少量散在阳性表达,LPL 和 LSCC 中有较强的阳性表达。见表 1、图 2。

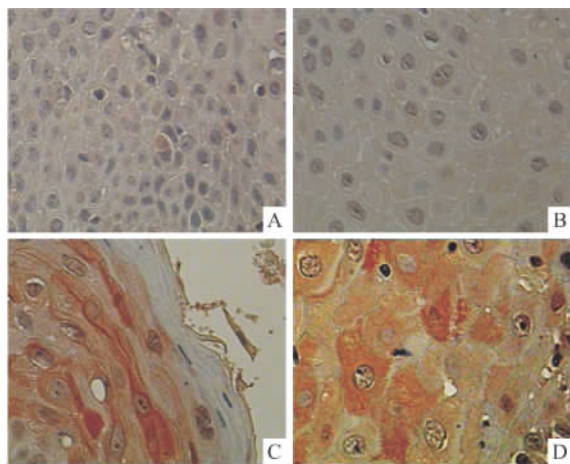


图2 CD44v6 在喉不同组织中的表达 LDP × 400
A: NLM; B: LP; C: LPL; D: LSCC

3 讨论

KAI1 基因,中文名为“抗癌 1 号”,是 1995 年 Dong et al^[3] 从前列腺癌中分离得到的特异性肿瘤转移抑制基因,其基因定位于 11 号染色体短臂上 (11p11.2)。KAI1/CD82 编码产物为一种细胞膜糖蛋白,参与细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间的反应^[4],其作用机制是通过与肿瘤细胞表面的黏附受体结合,封闭该受体,阻断肿瘤细胞黏附。KAI1/CD82 广泛分布于人体正常组织和肿瘤组织的细胞膜上,与其他跨膜成员蛋白、整联蛋白结合共同促进细胞的各种功能,包括信号传送、黏附、增殖、运动、分化、转移抑制等^[5]。研究^[6]显示,跨膜糖蛋白 KAI1/CD82 是一种转移抑制因子,涉及细胞融合作

用、黏附、迁移到凋亡、细胞形态学改变的生物学过程,其下调与许多肿瘤发生、发展、转移密切相关。本研究通过免疫组化半定量法检测 KAI1/CD82 在喉不同组织中的表达,结果显示其在 NLM、LP、LPL 和 LSCC 组织中有不同的阳性率,其阳性表达率呈逐渐降低趋势。在 NLM 组织中较 LSCC 组织有较强的阳性表达,与 Miyazaki et al^[7] 对食管组织的研究结果相似,提示喉可能是 KAI1/CD82 较高表达的组织器官之一,KAI1/CD82 作为肿瘤转移抑制基因,其功能失活或降低可能与 LSCC 的发生、发展密切相关。本研究同时观察到喉非典型增生组织中 KAI1/CD82 蛋白表达较 NLM 明显下调。喉非典型增生组织中 KAI1/CD82 表达水平与 LSCC 发生的相关性值得系统地深入研究。

CD44v6 最初是用单克隆抗体技术确定的黏附分子^[8],是一组由单一基因所编码的具有高度特异性的细胞表面跨膜糖蛋白,其基因定位于 11 号染色体短臂上 (11p13)。CD44v6 是一种分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白,属于细胞表面黏附分子,主要在上皮源性细胞及肿瘤细胞中表达,介导细胞与细胞及细胞外基质之间的黏附作用,与肿瘤细胞对周围基质的黏附能力有关^[9]。近年来研究^[10]表明,CD44v6 在某些肿瘤细胞和部分人体正常组织中高表达,并在肿瘤的发生发展、侵袭和转移等方面发挥关键作用。此外,Kawano et al^[11]认为头颈部恶性肿瘤中均有 CD44v6 蛋白异常表达,其与肿瘤的发生、侵袭和转移过程相关。本研究表明 CD44v6 在 NLM、LP、LPL 和 LSCC 组织中有不同的阳性率,其阳性表达呈逐渐升高趋势。在 LSCC 组织中的表达显著高于 NLM 组织,与杨立华等^[12]研究一致,提示其可能参与了 LSCC 的浸润和转移过程。

KAI1/CD82 和 CD44v6 均是位于人 11 号染色体短臂不同位点的基因,其表达产物均为跨膜糖蛋白,功能均涉及细胞与细胞及细胞与间质的作用。KAI1/CD82 阻断肿瘤细胞的黏附而抑制转移,CD44v6 促进肿瘤细胞的黏附而促进浸润和转移。本研究显示 KAI1/CD82 和 CD44v6 两者在喉不同组织中的表达的关系,提示了多因素参与 LSCC 的发生和发展转移过程。研究这两类蛋白联合表达与人 LSCC 的关系,对揭示 LSCC 发生、发展及浸润转移的机制有重要意义,为该病的早期诊断提供临床依据,但两者是否有必然的联系有待进一步研究。

参考文献

- [1] Barnes L, Tse L L Y, Hunt J L et al. Tumours of the hypopharynx,

- larynx and trachea [J]//Barnes L ,Eveson J W ,Reichart P ,et al. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours [J]. Lyon:IARC 2005:140 – 5.
- [2] Schindl M ,Bachtiary B ,Dreier B ,et al. Impact of human papillomavirus infection on the expression of the KAI1 metastasis suppressor protein in invasive cervical cancer [J]. *Cancer Lett* ,2001 , 162(2) :261 – 6.
- [3] Dong J T ,Lamb P W ,Rinker-Schaeffer C W ,et al. KAI1 , a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. [J] *Science* ,1995 268(5212) :884 – 6.
- [4] Ono M , Handa K ,Withers D A , et al. Glycosylation effect on membrane domain(GEM) involved in cell adhesion and motility:a preliminary note on functional alpha3 ,alpha5-CD82 glycosylation complex in IdID 14 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2000 279(3) :744 – 50.
- [5] Ruseva Z ,Geiger P X , Hutzler P , et al. Tumor suppressor KAI1 affects integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer cell adhesion , motility and proliferation [J]. *Exp Cell Res* ,2009 ,315 (10) : 1759 – 71.
- [6] Tonoli H ,Barrett J C. CD82 metastasis suppressor gene:a potential target for new therapeutics [J]. *Trends Mol Med* ,2005 ,11(12) : 563 – 70.
- [7] Miyazaki T , Kato H , Shitara Y , et al. Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer* 2000 89(5) :955 – 62.
- [8] Haynes B F , Telen M J , Hale L P , et al. CD44:A molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation [J]. *Immunol Today* ,1989 ,10(12) :423 – 8.
- [9] Li D M ,Li S S ,Zhang Y H , et al. Expression of human chorionic gonadotropin ,CD44v6 and CD44v4/5 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *World J Gastroenterol* 2005 ,11(47) :7401 – 4.
- [10] Winder T , Ning Y , Yang D , et al. Germline polymorphisms in genes involved in the CD44 signaling pathway are associated with clinical outcome in localized gastric adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer* 2011 ,129(5) :1096 – 104.
- [11] 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 – 13.
- [12] 杨立华 ,尚小龄 ,赵秀芳 ,等. OPN ,CD44v6 ,MMP-6 与 LSCC 远处转移的相关性研究 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志* 2012 , 26(21) :989 – 92.

Expression and significance of KAI1/CD82 and CD44v6 in human laryngeal squamous cell carcinoma

Zhou Mingqi ,Sun Jiansong

(Dept of Otolaryngology Head and Neck Surgery ,The People's Hospital of guizhou Province ,Guiyang 550002)

Abstract Objective To study the expression of metastatic suppressor gene (KAI1/CD82) and cell adhesion molecules(CD44v6) in human laryngeal squamous cell carcinoma(LSCC) ,precancerous lesion ,polyps and normal mucosa. **Methods** Immunohistochemical technique (Envision) was used to detect the expression of KAI1/CD82 protein and CD44v6 protein in 64 cases of LSCC ,21 cases of laryngeal precancerous lesion(LPL) ,15 cases of polyp of larynx(LP) and 15 cases of normal laryngeal mucosa(NLM). **Results** The result turned out to be as follows:① KAI1/CD82 protein was highly expressed in NLM and LP and lowly expressed in LPL and LSCC ,the positive rates of KAI1/CD82 protein expression were 86.67% (13/15) ,80.00% (12/15) ,38.10% (8/21) and 37.50% (24/64) ,respectively. There was statistically significant difference in NLM and LSCC. ② CD44v6 protein was lowly expressed in NLM and LP and highly expressed in LPL and LSCC ,the positive rates of CD44v6 protein expression were 26.67% (4/15) ,33.33% (5/15) ,80.95% (17/21) and 75.00% (48/64) ,respectively. There was statistically significant difference in NLM and LSCC. **Conclusion** ① The down-regulation or deletion of KAI1/CD82 and the up-regulation of CD44v6 are related to carcinogenesis ,development of LSCC. ② The combined detection of KAI1/CD82 and CD44v6 may provide clinical basis for the early diagnosis of LSCC.

Key words laryngeal squamous cell carcinoma; KAI1/CD82;CD44v6;immunohistochemistry