

乳腺良恶性肿瘤组织中 CD44 的表达及其与淋巴管生成的关系*

王倩, 劳淑贞, 朴金松, 高蔚樱, 赵凯, 张东辉, 谭小军, 罗凯

(广州医科大学附属肿瘤医院/广州医科大学肿瘤研究所, 广州 510095)

摘要:目的 研究细胞黏附分子 44(CD44)在乳腺良恶性肿瘤组织中的表达及其与淋巴管生成的关系,探讨其在鉴别诊断中的应用价值。方法 收集 2005~2015 年广州医科大学附属肿瘤医院乳腺肿瘤患者组织样品 75 例(均为女性)并分为良性肿瘤组、乳腺浸润性导管癌淋巴结转移组和未转移组,每组各 25 例。免疫组织化学法(IHC)检测 CD44 在各组患者肿瘤组织样品中的表达并以 CD44 作为淋巴管内皮细胞标记物比较各组样品中的淋巴管生成情况。生物信息分析验证研究结果。结果 在良性肿瘤组、乳腺浸润性导管癌淋巴结转移组和未转移组中,CD44 的 IHC 评分结果分别为 0.60 ± 0.82 , 3.16 ± 2.70 和 3.52 ± 2.47 , 乳腺浸润性导管癌淋巴结转移组和未转移组的 CD44 表达水平平均高于乳腺良性肿瘤组,差异具有统计学意义($F=13.52, P<0.0001$)。以 CD44 作为淋巴管内皮细胞特异性标记物可有效辅助三组样品的淋巴管生成计数。在乳腺良性肿瘤组、乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组和未伴淋巴结转移组中,淋巴管生成数分别为 4.08 ± 2.43 , 13.80 ± 13.54 和 12.72 ± 13.69 , 乳腺浸润性导管癌淋巴结转移组和未转移组的淋巴管生成数均高于乳腺良性肿瘤组,差异具有统计学意义($F=4.94, P=0.0097$)。生物信息分析结果也显示 CD44 在乳腺癌中的表达较正常乳腺增加。结论 乳腺癌的发生与 CD44 表达以及淋巴管的生成有关。CD44 有望成为乳腺良性肿瘤与乳腺癌的辅助鉴别诊断指标,同时其也可作为乳腺淋巴管内皮细胞的特异性标记物。

关键词:乳腺肿瘤;CD44;淋巴管生成;免疫组织化学

中图分类号:R737.9;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)04-016-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.005

Expression of CD44 in Benign and Malignant Breast Tumors and Its Relationship with Lymphangiogenesis

WANG Qian, LAO Shu-zhen, PIAO Jin-song,

GAO Wei-ying, ZHAO Kai, ZHANG Dong-hui, TAN Xiao-jun, LUO Kai

(Affiliated Cancer Hospital of Guangzhou Medical University/Institute of Oncology of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China)

Abstract: Objective To study the expression of CD44 in benign and malignant breast tumors and its relationship with lymphangiogenesis, and explore its application value in differential diagnosis. **Methods** 75 cases (all females) of breast tumor patients from Affiliated Cancer Hospital of Guangzhou Medical University were collected from 2005 to 2015. All patients were divided into benign tumor group, breast invasive ductal carcinoma with lymph node metastasis group and non-metastasis group, 25 cases in each group. Immunohistochemistry(IHC) was used to detect the expression of CD44 in tumor tissue samples of each group and the sample lymphangiogenesis in each group was compared used CD44 as a marker of lymphatic endothelial cells. Bioinformatics analysis was used to verify the study results. **Results** In the benign tumor group, breast invasive ductal carcinoma lymph node metastasis group and non-metastasis group, the IHC scores of CD44 were 0.60 ± 0.82 , 3.16 ± 2.70 and 3.52 ± 2.47 , respectively. The expression of CD44 in the lymph node metastasis group and the non-metastasis group of breast invasive ductal carcinoma was higher than that in the benign breast tumor group ($F=13.52, P<0.0001$). It could effectively assist lymphangiogenesis in all samples of three groups that used CD44 as a specific marker for lymphatic endothelial cells. In the benign breast tumor group, breast invasive ductal carcinoma with lymph node metastasis group and lymph node metastasis group, the number of lymphangiogenesis was 4.08 ± 2.43 , 13.80 ± 13.54 and 12.72 ± 13.69 , respectively. The number of lymphangiogenesis in the lymph node metastasis group and the non-metastasis group of the invasive ductal carcinoma of the breast were higher than those in the benign breast tumor group ($F=4.94, P=0.0097$). Bioinformatics analysis also showed that the expression of CD44 in breast cancer was higher than that in normal breast. **Conclusion**

The occurrence of breast cancer was associated with CD44 expression and lymphangiogenesis. CD44 is expected to be a

* 基金项目:国家自然科学基金(No. 81772825),广州市卫计委医药卫生科技项目(No. 20171A011320)。

作者简介:王倩(1980—),女,硕士,主治医师,乳腺肿瘤病理,E-mail:13798040957@163.com。

通讯作者:罗凯(1977—),男,博士,副主任技师,肿瘤靶向治疗耐药与分子靶向检测,E-mail:luokainan@126.com。

differential diagnosis marker of benign breast tumors and breast cancer, and it can also be used as a specific marker for breast lymphatic endothelial cells.

Keywords: breast neoplasm; CD44 protein; lymphangiogenesis; immunohistochemistry

乳腺癌是严重威胁女性健康的重要恶性肿瘤,在中国其发病率逐年升高且发病年龄呈现年轻化趋势,因此寻找新的鉴别诊断指标来尽早诊断乳腺癌对于乳腺癌的防治具有重要意义。同时,乳腺癌的侵袭转移是导致预后不良的重要因素,而淋巴转移是乳腺癌最重要的转移途径之一。相关研究^[1]表明乳腺癌的淋巴转移与淋巴管生成密切相关,所以检测淋巴管生成可有效预测乳腺癌淋巴转移状态。然而因缺乏淋巴管内皮细胞特异性标记物导致淋巴管生成与毛细血管在镜下难以区分,从而影响了准确的淋巴管生成检测^[2]。细胞黏附分子44 (cell adhesion molecule-44, CD44)是一种跨膜透明质酸受体,其不仅介导细胞间或细胞与基质间的黏附,而且其也参与了细胞间的信号传导^[3]。近来研究^[4,5]表明CD44参与调节了乳腺癌的发生与转移过程,同时其还参与了淋巴管内皮细胞的增殖过程。那么CD44是否可作为乳腺癌的鉴别诊断指标和淋巴管内皮细胞特异性标记物,目前相关研究较少。该研究拟采用免疫组织化学法检测CD44在乳腺癌和良性乳腺肿瘤的肿瘤组织和淋巴管上皮细胞中的表达情况,以探讨CD44在乳腺良恶性肿瘤发生发展中的作用以及其作为乳腺癌辅助鉴别诊断指标和淋巴管内皮细胞标记物的应用价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2005年1月~2015年12月广州医科大学附属肿瘤医院乳腺肿瘤患者存档蜡块75例,均为女性,平均年龄 46.30 ± 11.15 岁。其中乳腺良性肿瘤组(乳腺腺病与纤维腺瘤)25例,均为女性,平均年龄 34.32 ± 5.46 岁;乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组25例,均为女性,平均年龄 48.40 ± 10.85 岁;乳腺浸润性导管癌不伴淋巴结转移25例,均为女性,平均年龄 49.80 ± 8.41 岁。所有患者术前均未接受过化疗与放疗。

1.2 试剂和仪器 兔抗人CD44单克隆抗体购自上海基因公司,SP免疫组织化学试剂盒与DAB显色剂购自丹麦DAKO公司,显微镜购自德国徕卡公司。

1.3 实验方法

1.3.1 HE染色:石蜡切片65℃烤片1~2h,二甲苯和乙醇脱蜡至水,苏木素染色10 min,流水冲洗去余色,0.7 g/dl 盐酸乙醇分化5 s,流水冲洗15 min至切片变蓝,95 ml/dl 乙醇30 s,酒精性伊红染色30 s,95 ml/dl 乙醇30 s,95 ml/dl 乙醇30 s,无水乙醇30 s,无水乙醇30 s,石碳酸二甲苯30 s,

二甲苯30 s,中性树胶封片。

1.3.2 免疫组织化学染色:将厚5 μ m的石蜡切片附于防脱玻片上,65℃烤片1~2h,二甲苯和乙醇脱蜡至水;抗原修复:枸橼酸缓冲液,热修复20 min, PBS洗3次,每次5 min;3 ml/dl 双氧水,室温10 min, PBS洗3次,每次5 min;滴加山羊血清封闭液,室温20 min,甩去多余液体;切片滴加生物素化一抗,4℃过夜, PBS洗3次,每次5 min;切片滴加生物素化二抗,37℃20 min, PBS洗3次,每次5 min;切片滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃20 min, PBS洗3次,每次5 min;切片滴加DAB工作液,室温孵育5~10 min;用蒸馏水冲洗终止显色,苏木精复染;梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片胶封片;光学显微镜下进行图像分析。

1.3.3 CD44免疫组织化学染色结果判读:CD44阳性结果判断标准为有棕黄色颗粒沉积,在良性乳腺肿瘤样品中CD44表达于乳腺上皮细胞中,在乳腺癌样品中CD44表达于癌细胞胞浆中。免疫组织化学评分由两部分组成,A为按细胞显色的程度记分:无显色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;B为按细胞显色的范围百分比记分: $<5\%$ 为0分, $5\% \sim 25\%$ 为1分, $26\% \sim 50\%$ 为2分, $>50\%$ 为3分。免疫组织化学最终评分结果为A得分乘以B得分。

1.3.4 淋巴管形态比较和生成数目计数:淋巴管形态的比较在显微镜下进行,由高年资病理医生负责观察。淋巴管生成数目计数方法:以CD44作为识别淋巴管内皮细胞的标记物,在100倍光镜下选出3个淋巴结最丰富的热点,由2名高年资病理医生在200倍光镜下盲法阅片,每个热点计数淋巴管5次,取均值。

1.3.5 生物信息学分析:在Oncomine数据库(<https://www.oncomine.org>)中分析CD44在正常乳腺组织和乳腺癌组织中的表达差异,用以验证该研究的实验结果。

1.4 统计学分析 计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数间的比较采用方差分析,其中组间两两比较采用LSD法分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三组乳腺肿瘤样品HE染色后的镜下形态特征观察 镜下可见良性乳腺肿瘤组中以乳腺纤维腺瘤及乳腺腺病为主,腺病中乳腺小叶终末导管和腺管增生,或者小叶增多,纤维腺瘤中可见增生的

腺上皮、肌上皮细胞及纤维性间质,间质可见玻璃样变,黏液样变性。乳腺浸润性导管癌淋巴结转移组与未转移组样品镜下形态特征无明显差异,均可见癌细胞排列呈索状、簇状、小梁状或实性,细胞形状各异,核大,胞浆丰富。

2.2 CD44在三组乳腺肿瘤样品中的表达 在乳腺良性肿瘤组中,有15例未见癌细胞CD44表达,仅10例可见癌细胞CD44弱阳性表达,CD44阳性表达率为40%,免疫组织化学评分结果为 0.60 ± 0.82 。在乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组和乳腺浸润性导管癌未伴淋巴结转移组中,CD44均呈强阳性表达,阳性表达率为100%,免疫组织化学评分结果分别为 3.16 ± 2.70 和 3.52 ± 2.47 。三组样品间CD44表达差异具有统计学意义($F=13.52, P<0.0001$)。其中乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组和未伴淋巴结转移组的CD44表达水平均较乳腺良性肿瘤组升高,差异具有统计学意义。乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组和未伴淋巴结转移组间CD44表达差异无统计学意义($F=0.24, P=0.6252$)。

2.3 三组乳腺肿瘤中的淋巴管生成情况 三组乳腺肿瘤组中,均可见CD44在淋巴管内皮细胞呈阳性表达,故以CD44作为淋巴管生成的特异性标记物计数三组样品中的淋巴管生成数。在乳腺良性肿瘤组、乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组和未伴淋巴结转移组中,淋巴管生成数分别为 4.08 ± 2.43 , 13.80 ± 13.54 和 12.72 ± 13.69 ,差异具有统计学意义($F=4.94, P=0.0097$)。乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组和未伴淋巴结转移组样品中的淋巴管生成数均较乳腺良性肿瘤组升高,差异具有统计学意义。而乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组和未伴淋巴结转移组间样品中的淋巴管生成数差异无统计学意义($F=0.08, P=0.7804$)。

2.4 生物信息学分析结果 利用Oncomine数据库分析CD44基因在多种肿瘤和相应正常组织中的表达情况可见,CD44在乳腺癌、脑肿瘤、结直肠癌、头颈肿瘤等多种肿瘤的癌组织中高表达。同时在TCGA(the cancer genome atlas)数据库的64例乳腺癌相关研究数据中,3例乳腺癌组织的CD44表达水平较61例正常乳腺组织增加,差异具有统计学意义($t=4.108, P=0.006$)。

3 讨论 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其防治工作对保护女性健康具有重要意义。然而肿瘤的发生是一个多因素参与、多阶段发展的长期过程,且在形态学上早期恶性肿瘤大多难以与良性肿瘤进行鉴别,因此寻找新的辅助鉴别诊断指标对于乳腺癌的早诊早治具有重要的实用价值。

CD44是一种细胞膜表面的跨膜糖蛋白,其编码基因位于11号染色体上,由20个外显子构成,其中10个外显子为组成型外显子,另外10个外显子为变异性拼接外显子^[6]。CD44基因可编码标准型CD44蛋白(standard form, CD44s)和变异型CD44蛋白(variant form, CD44v),其中CD44s蛋白仅由组成型外显子编码,而CD44v蛋白则由组成型外显子和变异性拼接外显子共同编码,且两种外显子的具体组合形式多样可转录产生多个CD44v蛋白亚型。

CD44最初被发现作为细胞黏附分子介导了淋巴细胞的归巢与迁移。近年研究表明,CD44在乳腺癌、胃肠道肿瘤和泌尿系统肿瘤等恶性肿瘤中表达增加。Wang等^[4]检测了921例乳腺癌患者的CD44表达水平发现与健康对照组相比乳腺癌的CD44表达水平明显增加。2003年Al-Hajj首次利用CD44作为标记物自乳腺癌细胞中成功分离了乳腺癌干细胞,自此CD44作为重要标记物之一被广泛用于乳腺癌干细胞的分离、鉴定和机制研究^[7]。Senel等^[8]发现CD44在正常胃黏膜中不表达,但在45%的胃癌肿瘤组织中表达且CD44高表达的患者其生存期更短。以上研究结果表明CD44参与了乳腺癌等多种肿瘤的发生并与预后不良相关。在该研究中发现乳腺癌患者不仅在CD44的阳性率上高于良性乳腺肿瘤患者而且CD44的表达水平也显著升高,同时生物信息学分析也显示出同样的结果。提示CD44不仅参与乳腺癌的发生而且可以作为乳腺癌与良性乳腺肿瘤的鉴别诊断指标。

Lu等^[9]定量分析了2177例胃癌患者中CD44v6的表达,发现CD44v6与淋巴结远处转移有关,与淋巴管、血管侵犯、生成有关。Liu等^[10]利用免疫组织化学方法检测了109例宫颈鳞状细胞癌CD44v3和血管内皮生长因子的表达,发现CD44v3在中度和低度分化的宫颈鳞状细胞癌中广泛分布且与淋巴结转移和肿瘤栓子的形成相关,提示CD44v3与宫颈鳞状细胞癌的转移相关。以上研究结果提示CD44参与调节了肿瘤的转移侵袭,但在不同肿瘤中参与转移侵袭调节的CD44亚型有所不同。在该研究中,CD44在乳腺浸润性导管癌伴淋巴结转移组和未伴淋巴结转移组中的表达差异无统计学意义,与部分相关研究报道结果不一致。分析其原因可能有二:一为该研究使用的CD44抗体为通用型抗体仅能检测CD44的总表达量而不能区分具体亚型,但与乳腺癌转移相关的CD44仅为部分特定亚型;二为不同亚型乳腺癌的转移相关分子谱有差别。

恶性肿瘤的淋巴转移是一个主动的过程,在肿瘤发展到一定阶段时会异常分泌一些因子促进肿瘤周边淋巴管的新生,而新生的淋巴管则会促进肿瘤的转移^[2]。但是由于缺少特异的淋巴管内皮细胞标记物导致恶性肿瘤经淋巴道转移相关研究滞后于经新生血管转移的相关研究。D2-40 和 Podoplanin 等是新近发现的淋巴管特异性标记物,可由于部分标记物与血管内皮细胞存在一定的交叉反应或具有组织特异性,故仍需继续寻找新的淋巴管内皮细胞标记物^[11]。近来研究表明,CD44 等黏附分子参与了淋巴管内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成等淋巴管新生过程。Karunamuni 等^[12]研究发现成人心脏有一个广泛的淋巴系统,CD44 可作为该淋巴网络的标记物。张文彩等^[5]研究发现体外培养的淋巴管内皮细胞表达 CD44 分子且 CD44 参与了淋巴管内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成等淋巴管新生过程。以上研究表明 CD44 是淋巴管新生过程中的重要分子并有望成为部分组织器官内淋巴系统的特异性标记物。在该研究中,以 CD44 作为乳腺的淋巴管内皮细胞特异性标记物可有效辅助病理医生在镜下识别淋巴管并进行计数,通过计数发现在乳腺癌中淋巴管的生成明显增加,提示乳腺癌的发生发展与淋巴管的生成相关。该结果与相关报道相符,表明以 CD44 作为淋巴管内皮细胞特异性标记物来辅助淋巴管生成计数可取得与其他淋巴管内皮细胞特异性标记物相同的效果。因此 CD44 在乳腺中可作为淋巴管内皮细胞特异性的标记物。同时以 CD44 作为乳腺淋巴管内皮细胞标记物还具有在鉴别诊断乳腺癌的同时无需另外染色就可实现淋巴管生成检测的优点,更加经济并省时、省力。

综上所述,乳腺癌的发生发展与 CD44 表达增高以及淋巴管的生成有关。同时 CD44 可作为乳腺癌与乳腺良性肿瘤的辅助鉴别诊断指标和乳腺淋巴管内皮细胞的特异性标记物,具有良好的应用价值。

参考文献:

- [1] 岳喜成,李靖,安程程,等. 乳腺癌中高水平乙酰肝素酶促进肿瘤微血管和微淋巴管生成[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2016,25(2):125-129.
Yue XC, Li J, An CC, et al. High level of heparinase promotes the formation of tumor microvascular and lymphatic vessels in breast cancer[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2016, 25(2): 125-129.
- [2] 赵云霞,马琳,蔡兆根. 乳腺癌中 VEGF-D/VEGFR-3 与淋巴管生成的关系及临床意义探讨[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2015,24(1):85-89.
Zhao YX, Ma L, Cai ZG. Relation between VEGF-D/VEGFR-3 and lymphangiogenesis in breast cancer and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2015, 24(1): 85-89.
- [3] 邓世群,赵世元,张帮献. 黏附分子 CD44 和 ICAM-1 在肺炎支原体感染 BALB/c 小鼠体内表达及相关机制[J]. 现代检验医学杂志,2018,33(1):91-94.
Deng SQ, Zhao SY, Zhang BX. Expression of adhesion molecules CD44 and ICAM-1 in *Mycoplasma Pneumoniae* infected BALB/c mice and the related mechanisms[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(1): 91-94.
- [4] Wang M, Ji S, Shao G, et al. Effect of exosome biomarkers for diagnosis and prognosis of breast cancer patients[J]. Clinical & Translational Oncology, 2018, 20(7): 906-911.
- [5] 张文彩,谭玉珍,王海杰. 血小板内皮细胞黏附分子 1、细胞间黏附分子 3 和 CD44 在体外淋巴管新生中的作用[J]. 解剖学报,2005,36(1):94-98.
Zhang WC, Tan YZ, Wang HJ. Effects of endothelial adhesion molecule PECAM-1, ICAM-3 and CD44 on lymphangiogenesis in vitro[J]. Acta Anatomica Sinica, 2005, 36(1): 94-98.
- [6] 申辉,罗赤苗. CD44 与乳腺癌的相关研究进展[J]. 内江科技,2015,36(12):115-117.
Shen H, Luo CM. Advances in research on CD44 and breast cancer[J]. Neijiang Science & Technology, 2015, 36(12): 115-117.
- [7] 邹利霞. 乳腺癌干细胞研究进展[J]. 肿瘤学杂志,2014,20(9):724-729.
Zou LX. Research advance on breast cancer stem cells[J]. Journal of Chinese Oncology, 2014, 20(9): 724-729.
- [8] Senel F, Kokenek Unal TD, Karaman H, et al. Prognostic value of cancer stem cell markers CD44 and ALDH1/2 in gastric cancer cases[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(9): 2527-2531.
- [9] Lu L, Huang F, Zhao Z, et al. CD44v6: A metastasis-associated biomarker in patients with gastric cancer?: A comprehensive meta-analysis with heterogeneity analysis[J]. Medicine, 2016, 95(50): e5603.
- [10] Liu YQ, Li HF, Han JJ, et al. CD44v3 and VEGF-C expression and its relationship with lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the uterine cervix[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(12): 5049-5053.
- [11] 赵迎春,李勇,朱永云,等. 乳腺癌淋巴管生成与前哨淋巴结状态的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,2013,29(9):949-952.
Zhao YC, Li Y, Zhu YY, et al. Relationship between tumor lymphangiogenesis and metastasis of sentinel lymph nodes in breast cancer patients[J]. Chin J Clin Exp Pathol, 2013, 29(9): 949-952.
- [12] Karunamuni G, Yang K, Doughman YQ, et al. Expression of lymphatic markers during avian and mouse cardiogenesis[J]. Anat Rec(Hoboken), 2010, 293(2): 259-270.

收稿日期:2017-06-27

修回日期:2018-07-17