

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.19.004

CD44 相关亚型在裸鼠原位胃癌生长转移中的表达变化及机制

周 洲,高采平,邱春华,王 晗,李良平[△]
(四川省医学科学院/四川省人民医院消化内科,成都 610072)

[摘要] **目的** 通过循环肿瘤细胞(CTC)探讨 CD44 相关亚型(CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9)在裸鼠原位胃癌生长过程中表达水平的变化。**方法** 采用 SGC7901、MNK-45 两种胃癌细胞株分别构建裸鼠原位胃癌模型,于第 1、2、3、4 周分别收集裸鼠眼眶血,计数 CTC 数量,采用 RT-PCR 检测 CTC 中 CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9 表达水平变化。处死裸鼠后通过免疫组织化学及 Western blot 检测原位胃癌中 CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9 表达水平。**结果** 成功采用 SGC7901、MNK-45 两种细胞株构建了裸鼠原位胃癌模型,于第 1、2、3、4 周分别收集裸鼠眼眶血。在 SGC7901 组,随着时间进展,各组基因表达量逐渐升高,不同时间组之间,差异有统计学意义($F=461.547, P=0.000$),时间和各组基因表达量存在交互效应($F=10.386, P=0.000$),CD44v9 表达水平在各时间组均明显高于 CD44s、CD44v3、CD44v6。在 MNK-45 组,各组基因表达量在不同时间组之间差异有统计学意义($F=537.642, P=0.000$),时间和各组基因表达量存在交互效应($F=16.122, P=0.000$),CD44v9 表达水平在各时间组均明显高于 CD44s、CD44v3、CD44v6。免疫组织化学及 Western blot 均显示在两种胃癌细胞构建的原位胃癌模型中,CD44v9 表达水平最高。**结论** 随时间延长,CD44v9 在 CTC 中表达水平逐渐增高,在两种胃癌细胞构建的原位肿瘤中相对于其他 CD44 亚型表达水平最高。

[关键词] 胃肿瘤;CD44 亚型;循环肿瘤细胞

[中图法分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)19-2537-05

Expression change and mechanisms of CD44 - related subtypes in growth and metastasis of nude mice in situ gastric cancer

ZHOU Zhou,GAO Caiping,QIU Chunhua,WANG Han,LI Liangping[△]

(Department of Gastroenterology,Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital,Chengdu,Sichuan 610072,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the change of expression levels of CD44-related subtypes (CD44s, CD44v3, CD44v6, CD44v9) during the growth of nude mice in situ gastric cancer by circulating tumor cells (CTC). **Methods** SGC7901 and MNK-45 gastric cancer cell lines were used to construct the nude mice model of in situ gastric cancer. The nude mice orbit blood was collected at 1,2,3,4 weeks for counting CTC number. RT- qPCR was used to detect the expression of CD44s, CD44v3, CD44v6 and CD44v9. After killing the nude mice, the expression levels of CD44s, CD44v3, CD44v6 and CD44v9 in in situ gastric carcinoma were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The nude mice in situ gastric cancer model was successfully constructed by adopting SGC7901 and MNK-45 cell lines. The orbit blood of the nude mice was collected at 1,2,3,4 weeks. In the SGC7901 group, the expression level of gene in each group was gradually increased with time elapse, the difference among different time groups was statistically significant ($F=461.547, P=0.000$). There was an interaction effect between the time and the expression level of gene in each group ($F=10.386, P=0.000$). The expression level of CD44v9 at each time group was significantly higher than that of CD44s, CD44v3 and CD44v6. In the MNK-45 group, the expression level in each group had statistical difference among different time groups ($P=537.642, P=0.000$), and there was an interaction effect between the time and the gene expression level in each group ($F=16.122, P=0.000$), CD44v9 expression levels at each time group were significantly higher than CD44s, CD44v3 and CD44v6. The immunohistochemistry and Western-blot all showed that the CD44v9 expression level was the highest in the in situ gastric cancer model constructed by the two kinds of gastric cancer cells. **Conclusion** The expression level of CD44v9 in CTC is gradually increased with time elapse, and is the highest in the in situ tumors constructed by two kinds of gastric cancer cells compared with other CD44 subtype expression levels.

[Key words] stomach neoplasms;CD44 subtype;circulating tumor cells

胃癌是实体肿瘤中最为常见的一种^[1]。影响胃癌治疗效果和死亡的主要原因是转移。临床上,很多胃癌患者在行根治性手术前已出现微转移,为术后转移和复发的直接原因。探讨与胃癌转移相关的因素,阐明其转移机制,控制转移,寻找预防和治疗的有效途径,是当前研究的重要方向。CD44 是由 20 个外显子编码,通过选择性剪接而产生 CD44 标准体(CD44s)和 CD44 变体(CD44v)^[2]。CD44s 由 CD44 外显子 1~5 及 16~20 组成。而 CD44 变体分为 CD44v1~v10,分别由对应的外显子 6~15 编码而成,这些外显子可以通过选择性剪接单个的或多个的和 CD44 的标准体组合进而可能产生数千种不同的 CD44 亚型,每种 CD44 亚型可能作用不同,因此,CD44 结构和功能都很复杂^[3]。CD44 标准体和亚型都与肿瘤转移密切相关,特别是 CD44v3、CD44v6、CD44v9。为了解在胃癌转移过程中,CD44s 及各亚型的表达水平、表达变化,用两种胃癌细胞构建原位胃癌模型,在肿瘤转移过程中,采用循环肿瘤细胞(CTC)实时监测 CD44 各亚型表达水平及变化过程,并采用免疫组织化学及 Western blot 了解原位胃癌中 CD44 各亚型表达水平,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 SGC-7901、MNK-45 胃癌细胞均购自中国科学院上海细胞库。4~6 周龄 BALB/c-nude 雌性裸鼠,体质量 18~20 g,购自中国科学院上海斯莱克实验动物中心。免疫组织化学 SP 检测试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。CD44s 引物、CD44v3 引物,CD44v6 引物,CD44v9 引物由上海生工公司合成。CTC 细胞提取磁珠 CELlection™ Epithelial Enrich 购自 Life Technologies 公司,单细胞 mRNA 反转录试剂盒 Single cell-to-Ct 购自 Ambion 公司,qPCR 试剂盒 SsoAdvanced SYBR 绿色荧光超级混合液购自 Biorad 公司。CD44v3、CD44v6、CD44v9 单克隆抗体及二抗均购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901、MNK-45 胃癌细胞均在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 裸鼠原位瘤模型的构建 取处于对数生长期的细胞制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^8 /mL。用注射器在每只裸鼠右侧肩胛部皮下注射细胞悬液 0.1 mL,注射后轻压 5 s。每组 2 只裸鼠。将裸鼠重新放回笼中观察,右侧肩胛部皮下出现米粒大小质硬结节为模型建立成功。2 周后,以颈椎脱臼法处死,小心剥取移植瘤,在培养液中分割成 1 mm×1 mm 的组织碎块。接下来建立原位胃癌移植模型,每组 10 只。用浓度为 2.5% 异氟烷诱导麻醉,待裸鼠镇痛后,用手术剪在裸鼠左上腹部做一约 1 cm 的横切口,暴露腹腔组织,小心分离将胃暴露出腹腔,用生物胶将 1 块

胃癌组织粘在裸鼠胃组织上。然后用 6.0 不可吸收外科缝线关闭腹腔。整个操作过程在超净工作台中完成。之后每天观察裸鼠状态,测量裸鼠体质量。8 周后,当裸鼠出现恶病质(表现为消瘦,腹水及精神萎靡),处死所有裸鼠,剖腹观察并统计原发肿瘤大小,转移灶位置及个数,同时对原发肿瘤进行称质量。分离转移瘤及原发灶,放入 10% 甲醛中固定,用于免疫组织化学检测。另取部分原发灶肿瘤组织保存于液氮罐中,用于 RT-PCR 及 Western blot 的检测。

1.2.3 收集裸鼠眼眶血采集 CTC 于造模后第 2、3、4 周从裸鼠眼眶静脉丛采血。左手拇指及食指轻轻压迫动物的颈部两侧,使眶后静脉丛充血。右手持续接 7 号针头的 1 mL 注射器由眼角刺入,针头斜面先向眼球,刺入后再转 180°使斜面对着眼眶后界。当感到有阻力时即停止推进,同时,将针退出约 0.1~0.5 mm,边退边抽。每次采血量每只约 0.2~0.3 mL。通过免疫磁珠富集法(试剂盒:CELlection™ Epithelial Enrich)收集裸鼠 CTC 富集液,将筛选的细胞液在显微平台下进行形态学筛选,共筛选了 3 个循环肿瘤组织。筛选标准:(1)细胞呈圆形、椭圆形或长形,长径大于 10 μm;(2)光镜下可见完整细胞形态及细胞核;(3)核浆比失常。将选定的 CTC 在单细胞挑取台上细针挑取收集,以备单细胞 RT-qPCR 分析。

1.2.4 RT-qPCR 检测 CD44 mRNA 水平表达的变化 收集后的 CTC 行单细胞 RT-qPCR,检测 CTC CD44 各亚型(CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9)表达差异。Single cell-to-Ct 试剂盒提取 3 个细胞的总 RNA,反转录合成 cDNA,并以 CD44 各亚型及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)对应引物进行预扩增。预扩增后产物 2 μL 加入 25 μL 含对应引物的 SsoAdvanced SYBR 绿色荧光超级混合液进行 qPCR,采用 SYBR 绿色荧光标记法检测 PCR 产物。检测各基因表达水平,以 GAPDH 为内参照。RT-qPCR 结果采用仪器自带软件分析,根据标准曲线计算基因拷贝数。记录各实验组荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数即 Ct 值,以 GAPDH 为内参,计算目的 mRNA 的相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。所有引物序列由上海生工生物工程有限公司合成,引物的设计根据 GenBank 的基因序列、用 Primer5.0 软件设计,引物序列见表 1。

1.2.5 免疫组织化学检测 CD44 各亚型蛋白的表达 分离得到的肿瘤组织包埋、固定、石蜡切片、脱蜡,3% H₂O₂ 室温孵育 30 min,热修复抗原,滴加正常山羊封闭液封闭,加入一抗兔抗人 CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9 单克隆抗体,湿盒 4℃ 中过夜,次日加入二抗鼠抗兔抗体,湿盒中 37℃、30 min、DAB 显色,常规乙醇梯度脱水、透明、封片,显微镜观察并记录。阳性反应为细胞质内出现棕黄色颗粒。

1.2.6 Western blot 检测 CD44 各亚型蛋白的表

达 提取原位胃癌组织的总蛋白并定量,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,调节电压,分离胶120 V,基层胶 60 V,以染料的前沿迁移至凝胶的底部为标准终止电泳。恒定电流 70 mA 转膜 1 h。5%脱脂奶粉封闭膜,一抗孵育 4 ℃ 摇床过夜,加二抗 37 ℃ 孵育 1 h,增强化学发光法显色,显影定影,冲洗胶片,对条带进行灰度分析。

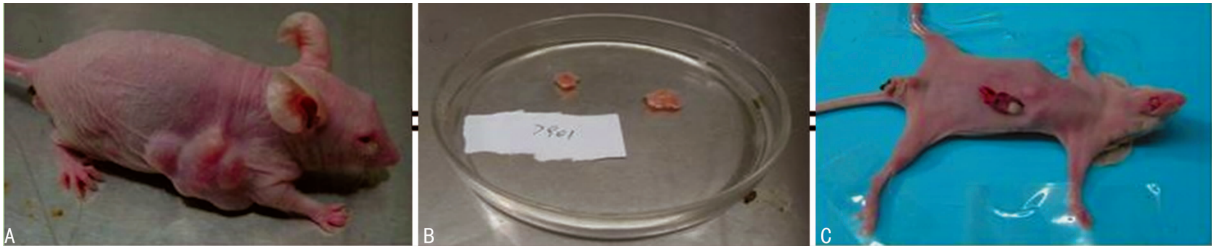
表 1 RT-qPCR 引物模板

基因	方向	引物序列
GAPDH	正向	5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3'
	反向	5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'
CD44s	正向	5'-CCTTTGATGGACCAATTACCATAAC-3'
	反向	5'-TCAGGATTCGTTCTGTATTCTCCT-3'
CD44v3	正向	5'-CGTCTTCAAATACCATCTCAGCA-3'
	反向	5'-ATCTTCATCATCAATGCCTGA-3'
CD44v6	正向	5'-GGCAACAGATGGCATGAGGG-3'
	反向	5'-AGTGGTATGGGACCCCCACTGGGG-3'
CD44v9	正向	5'-TTCTCTACATCACATGAAGGC-3'
	反向	5'-GCTTGATGTCAGAGTAGAAGT-3'

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较方差齐者采用最小显著差异(LSD)方法,方差不齐者采用 DunnettT3 法。非正态分布计量资料采用平均秩和,最小值-最大值表示,采用 Kruskal-Wallis 检验,组间多重比较采用 All pairwise 法。计数资料采用例数和率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 裸鼠一般生存情况分析 SGC-7901 组细胞及 MNK-45 组细胞均成功构建皮下移植瘤,小心剥取移植瘤,在培养液中分割成 1 mm×1 mm 的组织碎块,分别建立原位胃癌移植模型,每组 10 只。两组裸鼠均成功构建原位胃癌模型,见图 1。SGC7901 组在观察第 2 周 1 只裸鼠发生死亡,在第 4 周有 2 只裸鼠发生死亡,其余裸鼠均顺利采集 CTC。MNK-45 组在第 2 周有 2 只裸鼠发生死亡,第 3、4 周分别有 1 只裸鼠发生死亡,其余裸鼠均顺利采集 CTC。



A:裸鼠皮下移植瘤;B:剥取移植瘤;C:构建原位胃癌模型。

图 1 裸鼠造模情况

2.2 CTC 计数变化 于造模后第 1、2、3、4 周从裸鼠眼眶静脉丛采血。通过免疫磁珠富集法收集裸鼠 CTC 富集液,将筛选的细胞液在显微平台下进行形态学筛选,筛选标准如前所述,计数 CTC,两组原位胃癌 CTC 细胞数随时间延长递增,见图 2。

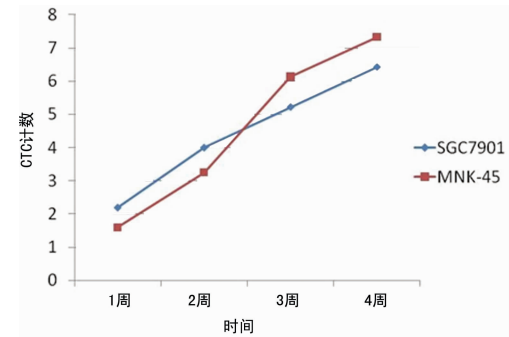


图 2 裸鼠 CTC 计数水平

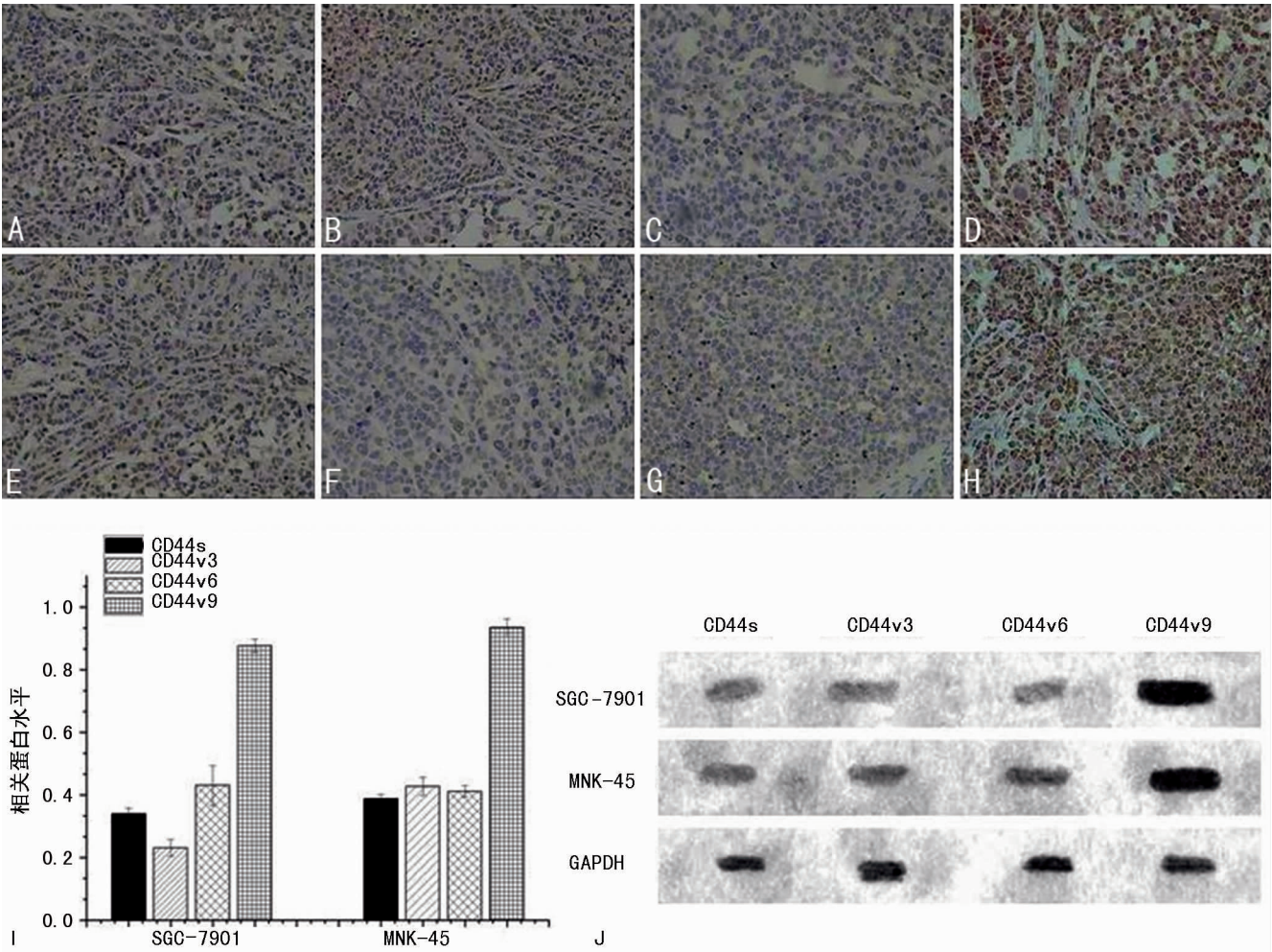
2.3 CD44 各亚型表达水平差异 采用 RT-qPCR 检测 CTC 细胞中 CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9 表达水平变化。在 SGC-7901 组,随着时间进展,各组基因表达量逐渐升高,不同时间组之间差异有统计学意

义($F = 461.547, P = 0.000$), CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9 均如此,时间和各组基因表达量存在交互效应,差异有统计学意义($F = 10.386, P = 0.000$)。在 MNK-45 组,研究结果与 SGC-7901 组相似,随着时间进展,各组基因表达量逐渐升高,不同时间组之间差异有统计学意义($F = 537.642, P = 0.000$), CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9 均如此,时间和各组基因表达量存在交互效应,差异有统计学意义($F = 16.122, P = 0.000$)。SGC-7901 组和 MNK-45 组 CD44v9 表达水平在各时间均明显高于 CD44s、CD44v3、CD44v6,见表 2。

2.4 免疫组织化学及 Western blot 了解 CD44 各亚型表达差异 将两组裸鼠处死后,分离原位胃癌组织,采用免疫组织化学检测 CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9 在原位胃癌中的表达水平。在两组细胞构建的原位胃癌中,CD44v9 表达水平最高,细胞质中可见明显棕黄色颗粒,呈强阳性,且主要集中在细胞膜,明显高于 CD44s、CD44v3、CD44v6 表达水平。Western blot 结果,在 SGC-7901 组中,CD44v9 蛋白表达水平

表 2 各 CD44 亚型随时间表达差异($\bar{x}\pm s$)

时间	SGC-7901				MNK-45			
	CD44s	CD44v3	CD44v6	CD44v9	CD44s	CD44v3	CD44v6	CD44v9
1 周	0.171±0.034	0.154±0.045	0.158±0.051	0.176±0.046	0.162±0.034	0.183±0.025	0.198±0.043	0.206±0.058
2 周	0.269±0.058	0.234±0.098	0.239±0.033	0.482±0.064	0.296±0.026	0.344±0.037	0.291±0.099	0.424±0.036
3 周	0.385±0.084	0.396±0.067	0.455±0.042	0.753±0.045	0.396±0.049	0.413±0.039	0.440±0.043	0.772±0.040
4 周	0.628±0.083	0.737±0.097	0.690±0.017	0.929±0.042	0.573±0.071	0.659±0.061	0.701±0.011	0.896±0.017



A:SGC-7901 CD44s 表达水平(免疫组织化学×200);B:SGC- 7901 CD44v3 表达水平(免疫组织化学×200);C:SGC- 7901 CD44v6 表达水平(免疫组织化学×200);D:SGC-7901 CD44v9 表达水平(免疫组织化学×200);E:MNK-45 CD44s 表达水平(免疫组织化学×200);F:MNK-45 CD44v3 表达水平(免疫组织化学×200);G:MNK-45 CD44v6 表达水平(免疫组织化学×200);H:MNK-45 CD44v9 表达水平(免疫组织化学×200);I,J:Western blot 检测胃癌中蛋白质的表达量

图 4 CD44 各亚型表达差异

明显高于 CD44s、CD44v3、CD44v6 组 ($F=13.486$, $P<0.05$)。在 MNK-45 组,CD44v9 蛋白表达水平也明显高于 CD44s、CD44v3、CD44v6 组 ($F=10.578$, $P<0.05$),见图 4。

3 讨 论

在我国胃癌是一种发病率高、恶性程度高、预后不良的恶性肿瘤。长期以来,临床手术切除及辅助性放疗、化疗技术的应用并没有带来满意的生存率^[4]。

CD44 是黏附分子家族成员,在胃癌转移中有重要作用。SAKAKURA 等^[5]通过对一系列胃癌细胞

系的研究,及多种与胃癌干细胞相关的表面分子标记物的筛选,提出 CD44 具有作为胃癌干细胞表面分子标记物的可能。CD44 的结构和功能非常复杂,目前研究多集中在 CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9。在卵巢癌中,研究发现 CD44v6 的表达在复发性肿瘤比原发性要高,尤其在腹腔的转移癌,CD44v6 的表达和临床病理参数及肿瘤进展相关,干扰 CD44v6 则降低了肿瘤细胞的黏附及迁移能力^[6]。在结直肠癌中,也有研究发现 CD44v6 的表达和间质表型及较差的预后相关^[7]。CD44v9 在结肠癌的肿瘤干细胞发挥重要作

用,影响结肠癌的肿瘤侵袭、转移,并且 CD44v9 在一些肿瘤中被作为肿瘤干细胞的分子标记物^[8]。在胃癌中,HIRATA 等^[9]研究了 88 例胃癌标本发现,CD44v9 在复发性的胃癌中高表达,认为 CD44v9 是监测胃癌复发的有效指标。MIMA 等^[10]在肝癌中研究发现 CD44s 能通过调节 TGF- β 介导的间质表型进而影响肝癌细胞的侵袭、转移和预后,并认为 CD44s 的高表达是肝癌潜在的治疗靶点。但是,并非所有的研究都支持 CD44 的高表达与肿瘤转移相关。在前列腺癌中,LAZARI 等^[11]在研究了 135 例前列腺癌患者标本发现,CD44s 的低表达和前列腺癌的侵袭能力相关;在舌癌中,也有发现 CD44s 的低表达与舌癌肿瘤细胞的侵袭能力相关,并认为它是临床相关的预后指标^[12]。

尽管 CD44 在很多细胞的进程,包括细胞增殖、分化、运动等方面发挥重要作用,关于 CD44 变异体和标准体在肿瘤中发挥的作用却众说纷纭,观点不一,各个研究报道也不一致甚至互相矛盾。CD44v 与 CD44s 可能发挥完全不同的作用,若将 CD44 作为一个整体研究时,可能造成遗漏转移过程中的重要基因转型,妨碍对肿瘤转移机制的研究。因此,在研究 CD44 时,不能将 CD44 作为单一的整体分子而要具体细分进行研究。实际上,到目前为止,尚少见系统性的在胃癌转移过程中研究 CD44 各亚型动态变化的报道。

本研究采用两种胃癌细胞系构建原位胃癌模型,收集在原位胃癌生长过程中 CTC,动态监测 CD44s、CD44v3、CD44v6、CD44v9 在胃癌生长转移过程中的表达变化。结果表明,CD44v9 在两种胃癌细胞的造模模型中均随时间表现出明显升高,明显高于 CD44s、CD44v3、CD44v6 的表达水平,差异有统计学意义。并且进一步原位胃癌免疫组织化学及 Western blot 也表明,CD44v9 表达水平在原位胃癌中最高,和 HIRAGA 等^[12]研究结果一致。表明在胃癌转移模型中,CD44v9 表达水平随时间推移均高于其他 CD44 亚型,可能在肿瘤转移中起主导作用。

CD44 与胃癌转移是目前研究的热点,靶向 CD44 可能成为治疗胃癌的新途径。但既往研究将 CD44 作为一个整体,静态地在肿瘤组织中研究 CD44 表型具有很大局限性。本研究表明 CD44v9 在胃癌生长及转移过程中起主导作用,为胃癌的转移机制及靶向治疗奠定基础。

参考文献

[1] LAKS S, MEYERS MO, KIM HJ. Surveillance for Gas-

tric Cancer[J]. Surg Clin North Am, 2017, 97(2): 317-331.

[2] ZHANG M, WANG Y, FANG T, et al. Common polymorphisms in CD44 gene and susceptibility to cancer: A systematic review and meta-analysis of 45 studies[J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 76021-76035.

[3] CORTES-DERICKS L, SCHMID R A. CD44 and its ligand hyaluronan as potential biomarkers in malignant pleural mesothelioma: evidence and perspectives[J]. Respir Res, 2017, 18(1): 58.

[4] AHMAD S A, XIA B T, BAILEY C E, et al. An update on gastric cancer[J]. Curr Probl Surg, 2016, 53(10): 449-490.

[5] SAKAKURA C, HAGIWARA A, NAKANISHI M, et al. Differential gene expression profiles of gastric cancer cells established from primary tumour and malignant ascites[J]. Br J Cancer, 2002, 87(10): 1153-1161.

[6] ZHANG H F, HU P, FANG S Q. Understanding the role of CD44V6 in ovarian cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(2): 1989-1992.

[7] ZHAO L H, LIN Q L, WEI J, et al. CD44v6 expression in patients with stage II or stage III sporadic colorectal cancer is superior to CD44 expression for predicting progression[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1): 692-701.

[8] SEISHIMA R, OKABAYASHI K, NAGANO O, et al. Sulfasalazine, a therapeutic agent for ulcerative colitis, inhibits the growth of CD44v9(+) cancer stem cells in ulcerative colitis-related cancer[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2016, 40(4): 487-493.

[9] HIRATA K, SUZUKI H, IMAEDA H, et al. CD44 variant 9 expression in primary early gastric cancer as a predictive marker for recurrence[J]. Br J Cancer, 2013, 109(2): 379-386.

[10] MIMA K, OKABE H, ISHIMOTO T, et al. CD44s regulates the TGF-beta-mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2012, 72(13): 3414-3423.

[11] LAZARI P, POULIAS H, GAKIOPOULOU H, et al. Differential immunohistochemical expression of CD44s, E-cadherin and beta-catenin among hyperplastic and neoplastic lesions of the prostate gland[J]. Urol Int, 2013, 90(1): 109-116.

[12] HIRAGA T, NAKAMURA H. Comparable roles of CD44v8-10 and CD44s in the development of bone metastases in a mouse model[J]. Oncol Lett, 2016, 12(4): 2962-2969.