

# CD44、CD133 在口腔黏膜组织癌变过程中的表达及其意义

熊倩, 刘秋虹, 石玉梅

上海市奉贤区奉城医院, 上海 201411

**摘要:** **目的** 探讨 CD44、CD133 在口腔黏膜组织癌变过程中的表达及其临床意义。 **方法** 回顾性分析 2015 年 2 月—2017 年 6 月奉城医院口腔科存档的蜡块标本 127 例, 其中良性组织 21 例(对照组), 口腔黏膜组织癌变患者 106 例(研究组)。应用免疫组化 SP 法检测各组织中 CD44 及 CD133 的阳性表达情况。比较两组标本中 CD44 和 CD133 阳性表达情况, 及口腔黏膜癌变组织中 CD44 和 CD133 阳性表达的相关性, 同时比较口腔黏膜癌变组织中 CD44 和 CD133 阳性表达与临床病理参数的关系。 **结果** 与对照组相比, 研究组患者病变组织中 CD44 的阳性表达率(69.81%)明显下降( $P < 0.05$ ), 而 CD133 的阳性表达率(72.64%)显著升高( $P < 0.05$ ); 口腔黏膜癌变组织中 CD44 的阳性表达率与 CD133 的阳性表达率呈负相关( $r = -0.725, P < 0.05$ ); 口腔黏膜癌变组织中 CD44 和 CD133 的阳性表达情况与患者的性别、年龄、吸烟史、饮酒史及病变位置无关( $P > 0.05$ ), 而与临床分期、淋巴结转移和分化程度具有相关性(CD44:  $\chi^2 = 4.352, 6.350, 8.545$ ; CD133:  $\chi^2 = 6.028, 4.977, 6.693$ )。 **结论** 口腔黏膜组织癌变组织中 CD44 低表达、CD133 高表达, 两指标可作为反映口腔黏膜组织癌变发生及发展的生物学指标。

**关键词:** CD44; CD133; 口腔黏膜; 口腔鳞状细胞癌

**中图分类号:** R739.85 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2018)12-1488-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.12.023

口腔颌面部的恶性肿瘤患者占恶性肿瘤的比例接近 10%, 口腔黏膜来源的恶性肿瘤类型主要包括口腔黏膜鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)、皮肤基底细胞癌、鳃裂癌和未分化癌等类型, 其中最常见的是 OSCC, 占到所有类型的 80% 左右<sup>[1-2]</sup>。OSCC 病情发展快, 侵袭性强, 影响舌头肌肉的活动性, 从而导致进食和吞咽困难, 早期出现颈淋巴结转移, 并且发生率高<sup>[3]</sup>。随着医学技术的发展, 对 OSCC 的认识不断深入, 目前临床上多采用综合序列治疗, 但是这种治疗方式并不能完全根除癌细胞, 在预后过程中, 极易出现复发和转移, 影响疗效<sup>[4]</sup>。有研究证实<sup>[5]</sup>, OSCC 患者发生淋巴结转移后 5 年生存率不足 50%, 而 OSCC 通常是由口腔潜在恶性病变(oral potentially malignant disorder, OPMD)发展来的, 对不同病变类型进行区分具有重要意义。近年来, 分子生物学的研究程度不断深入, 发现口腔黏膜上皮癌变的过程为多阶段和多因素等复杂病理过程, 导致尚未发现有效的预测和诊治方法, 如果可以对 OPMD 尽早进行检测, 才能有效防止其恶性转变, 降低癌变率和 OSCC 的发病率<sup>[4,6]</sup>。介导细胞黏附作用的细胞表面黏附因子的表达对于口腔黏膜癌的形成与发展具有重要作

用, 具有代表性的黏附因子为 CD44 和 CD133, 对于肿瘤细胞的转移、复发过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。本研究通过检测肿瘤组织中 CD44 和 CD133 表达, 研究其临床意义, 为临床口腔黏膜癌变的预防和治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 回顾性分析 2015 年 2 月—2017 年 6 月上海市奉贤区奉城医院口腔科存档的蜡块标本 127 例, 其中良性患者 21 例, 口腔黏膜组织癌变患者 106 例。纳入标准: ①患者的临床资料完整; ②经患者及其家属同意, 并签订知情同意书。排除标准: ①合并心、肝、肾等重大脏器病变患者; ②精神意识障碍患者; ③处于特殊时期患者, 如哺乳期或妊娠期; ④合并其他类型肿瘤患者。口腔黏膜癌标本为研究组, 其中男 62 例, 女 44 例; 年龄 27~72 岁, 平均(45.23±3.15)岁; 吸烟史 52 例; 饮酒史 63 例; 病变位置: 舌 24 例, 唇 31 例, 颊 37 例, 腭 14 例; 临床分期: I~II 期 60 例, III~IV 期 46 例; 有淋巴结转移 36 例, 无淋巴结转移 70 例; 分化程度: 高分化 29 例, 中分化 35 例, 低分化 42 例。良性患者为对照组, 其中男 12 例, 女 9 例; 年龄 26~70 岁, 平均(45.08±3.23)岁; 吸烟史 11 例; 饮酒史 13 例。两组患者年龄、性别、烟酒史差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 具有可比性。所有研究过程均符合医院医

**基金项目:** 上海市卫生局科研课题计划项目(No. 20152142)

**作者简介:** 熊倩(1975-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事病理诊断工作。

学伦理委员会的相关规定。

1.2 方法

1.2.1 实验材料 CD44 兔抗人多克隆抗体和 CD133 鼠抗人单克隆抗体分别购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司和德国 Miltenyi Biotechnology 公司,二氨基联苯胺显色剂及载玻片购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2.2 检测方法 所有样本均置于 4% 的甲醛溶液中固定,常规脱水后使用石蜡进行包埋和切片。应用免疫组化 SP 法检测各组织中 CD44 及 CD133 的阳性表达情况。首先,将石蜡标本切成 5 μm 的连续切片,并平铺在有 APES 的载玻片上,烤箱中加热 4 h,温度设置为 60 ℃,进行常规的脱蜡,应用 3% 双氧水 30 ml 孵育 10 min,从而消除内源性过氧化物酶活性;其次使用 0.01 mol/L pH=6.0 的柠檬酸盐缓冲液加热修复抗原,待温度降至室温 30 min 后,加入 0.01 mol/L 的 PBS 溶液冲洗三次,每次 5 min;第三步,在标本中加入 5% 的正常山羊血清,在 37 ℃ 下封闭 40 min,然后滴加一抗,在 4 ℃ 冰箱中过夜反应;第四步,在 37 ℃ 条件下,依次滴加生物素标记的二抗工作液和辣根酶标记链酶卵白素液,分别反应 30 min;第五步,使用二氨基联苯胺显色,再用苏木精复染,最后进行常规的脱水、透明和封片。研究中阴性对照为空白 PBS 液。

1.3 评价标准<sup>[4]</sup> 应用光学显微镜(×400)观察组织标本中阳性细胞数目,每个视野中平均观察 100 个细胞,CD44 阳性表达着色呈红色,CD133 阳性表达着色呈棕黄色,其中细胞膜呈红色和细胞浆呈棕黄色则判定为双阳性细胞,研究结果由两名专业病理科医生独立进行判定,并采用半定量积分法。CD44 染色强度共分为 4 级:0 分,无着色;1 分,淡粉色;2 分,粉色;3 分,红色。CD133 染色强度共分为 4 级:0 分,无着色;1 分,淡黄色;2 分,棕黄色;3 分,红棕色。另外结合阳性细胞占的比例,具体分级为:0 分,阳性细胞比例为 0%;1 分,阳性细胞比例介于 0 和 1/3 之间;2 分,阳性细胞比例介于 1/3 和 2/3;3 分,阳性细胞比例不低于 2/3。将两种标准相乘的结果作为评价的最终标准,其中 0 分,为(-);1~3 分,为(+);4~6 分,为(++);7~9 分,为(+++)。其中(-)为阴性,其它的类型为阳性。

1.4 观察指标 比较两组标本中 CD44 和 CD133 阳性表达情况,及口腔黏膜癌变组织中 CD44 和 CD133 阳性表达的相关性,同时比较口腔黏膜癌变组织中 CD44 和 CD133 阳性表达与临床病理参数的关系。

1.5 统计学方法 研究中的数据均应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,CD44 和 CD133 的阳性表达情况

用百分率(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验;两种蛋白的表达相关性采 Spearman 秩相关分析。检验标准设置为  $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 两组 CD44 和 CD133 的阳性表达情况 研究组患者病变组织中 CD44 阳性表达率明显低于对照组,而 CD133 的阳性表达率明显高于对照组,且差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1 和表 2。

表 1 两组患者组织中 CD44 阳性表达情况

组别	例数	CD44 的表达情况(例)				阳性表达例数 (率,%)
		-	+	++	+++	
对照组	21	1	1	3	16	20(95.24)
研究组	106	32	28	17	29	74(69.81)
$\chi^2$ 值						5.892
$P$ 值						0.015

表 2 两组患者组织中 CD133 阳性表达情况

组别	例数	CD133 的表达情况(例)				阳性表达例数 (率,%)
		-	+	++	+++	
对照组	21	16	3	1	1	5(23.81)
研究组	106	29	28	20	29	77(72.64)
$\chi^2$ 值						18.269
$P$ 值						0.000

2.2 病变组织中 CD44 和 CD133 的阳性表达情况的相关性 应用 Spearman 秩相关性分析发现,口腔黏膜癌变组织中 CD44 的阳性表达率与 CD133 的阳性表达率呈负相关( $r=-0.725,P=0.027$ )。

2.3 病变组织中 CD44 和 CD133 的阳性表达情况与临床病理参数的关系 口腔黏膜癌变组织中 CD44 和 CD133 的阳性表达情况与患者的性别、年龄、吸烟史、饮酒史及病变位置无关( $P>0.05$ ),而与临床分期、淋巴结转移和分化程度具有相关性( $P<0.05$ ),见表 3。

表 3 病变组织中 CD44 和 CD133 的阳性表达情况与临床病理参数的关系

临床病理参数	例数	CD44			CD133		
		阳性例数(率,%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值	阳性例数(率,%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
性别							
男	62	40(64.52)	1.987	0.159	45(72.58)	0.000	0.987
女	44	34(77.28)			32(72.72)		
年龄(岁)							
<50	58	39(67.24)	0.401	0.526	44(75.86)	0.669	0.414
≥50	48	35(72.92)			33(68.75)		
吸烟史							
有	52	35(67.31)	0.304	0.582	36(69.23)	0.598	0.440
无	54	39(72.22)			41(75.93)		
饮酒史							

续表 3

临床病理参数	例数	CD44			CD133		
		阳性例数(率,%)	$\chi^2$ 值	P 值	阳性例数(率,%)	$\chi^2$ 值	P 值
有	63	42(66.67)	0.729	0.393	45(71.43)	0.566	0.452
无	43	32(74.42)			32(74.42)		
病变位置							
舌	24	15(62.50)	1.188	0.756	17(70.83)	0.333	0.954
唇	31	24(77.42)			22(70.97)		
颊	37	26(70.27)			27(72.97)		
腭	14	9(64.29)			11(78.57)		
临床分期							
I~II 期	46	37(80.43)	4.352	0.037	38(63.33)	6.028	0.014
III~IV 期	60	37(61.67)			39(84.78)		
淋巴转移							
有	70	45(64.29)	6.350	0.012	31(86.11)	4.977	0.026
无	36	29(80.56)			46(65.71)		
分化程度							
高分化	29	25(86.21)	8.545	0.014	18(62.07)	6.693	0.034
中分化	35	26(74.29)			25(71.43)		
低分化	42	23(54.76)			37(88.10)		

3 讨 论

OSCC 是临床上常见的口腔颌面部恶性肿瘤,生长速度快,破坏性强,容易发生浸润和淋巴结转移,甚至出现远处转移,OSCC 预后效果差,因此尽早发现并进行准确的诊断和治疗对于提高 OSCC 患者的生存率具有至关重要的作用,研究其癌变机制对于降低 OSCC 的发病率意义重大<sup>[1,7-8]</sup>。恶性肿瘤细胞之间及细胞与基质之间的黏附性发生异常,致使肿瘤细胞脱落,向远方转移,并侵袭周围组织。近年来,肿瘤干细胞理论成为治疗肿瘤复发和转移的热点之一,研究发现,CD44 和 CD133 可以作为肺癌、头颈部鳞癌及大肠癌等多种恶性肿瘤的肿瘤干细胞标记物<sup>[4,9]</sup>。

CD44,又称为吞噬细胞糖蛋白 1、Hermes 抗原、Ⅲ型细胞外基质受体,主要分布在淋巴细胞、成纤维细胞、红细胞、上皮细胞等<sup>[6]</sup>。CD44 是一组细胞表面跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区和胞浆尾部组成,定位于 11 号染色体的短臂上,全长 50 kb,至少包含 20 个外显子,最初是牛津大学的病理实验室于 1992 年发现其变异体基因能够诊断人体癌组织的发展,之后又发现 CD44 变异体参与多种类型肿瘤细胞的生长与转移<sup>[1,10-11]</sup>。CD133,又称 AC133 和 Prominin-1,最早发现于多种干细胞中,具有强大的迁移、侵袭及克隆能力,相对分子量为 1.2×10<sup>4</sup>,人 CD133 抗原是 5 次跨膜糖蛋白,在多种实体肿瘤干细胞中均有表达,如结直肠癌、乳腺癌和肝癌等,CD133 是肿瘤干细胞的表面特异

标记分子,与患者的预后效果密切相关<sup>[6,12-13]</sup>。研究组患者病变组织中 CD44 的阳性表达率明显低于对照组( $P<0.05$ ),正常口腔黏膜组织中 CD44 广泛表达,发挥激活细胞间黏附、转化及运动的作用,但是口腔黏膜组织癌变组织中 CD44 阳性表达水平下降,对于上皮细胞分化等影响降低,加速上皮细胞出现异常,提高恶变率<sup>[14]</sup>。另外口腔癌变的发生受到局部刺激因子导致的基因损伤影响,CD44 阳性细胞保证上皮结构的完整性,一旦阳性表达水平下降,降低细胞间黏附作用,增生细胞突破基底膜并浸润结缔组织,破坏上皮细胞的完整性,致使上皮细胞异常增生,增加细胞间隙,损伤组织,提高细胞的恶变率<sup>[4]</sup>。而研究组患者病变组织中 CD133 的阳性表达率明显高于对照组( $P<0.05$ ),CD133 细胞为口腔黏膜干细胞,能够不断更新、增殖、分化,在足够长的时间内保证细胞恶性转化,因此 CD133 的阳性表达水平越高,发生恶变的机率越大。肿瘤干细胞无限增殖、不断更新,是致使肿瘤发生于发展的根源,按照肿瘤干细胞假说,CD133 阳性表达保证肿瘤长期增殖,同时有研究发现,CD133 的阳性细胞参与细胞的免疫逃逸、信号转导、药物耐受、放化疗抵抗等多种机制,另外 CD133 主要在膜突出部表达,可能通过酪氨酸残基磷酸化作用而产生级联效应<sup>[11,13,15]</sup>。同时,相关性结果发现,口腔黏膜癌变组织中 CD44 的阳性表达率与 CD133 的阳性表达率呈负相关( $P<0.05$ ),CD133 通过活化 Wnt 信号通路激活 LEF/TCF/ $\beta$ -catenin 级联反应,从而进一步使得下游基因表达水平紊乱,其中有 CD44<sup>[16]</sup>。口腔黏膜癌变分化病理分期越高,分化程度也低,并且伴随淋巴结转移,则 CD44 阳性表达率下降,而 CD133 的阳性表达率升高,这对于评估口腔黏膜癌变的病情发展及预后效果具有重要作用。

综上所述,口腔黏膜组织癌变组织中 CD44 低表达、CD133 高表达,两指标可以反映口腔黏膜癌的发生、发展,可以作为临床上辅助诊断口腔黏膜癌的重要生物学指标,但是二者的作用机制尚未清楚,需要进一步深入研究。

参考文献

[1] 赵莉,穆森,齐迹,等. CD44v5 及 CD44v7 在口腔鳞状细胞癌组织中的表达及意义[J]. 口腔医学,2013,33(4):221-224.  
[2] 田臻,郭伟,张伟国,等. CD44v6 在不同生物学行为的口腔癌中的表达[J]. 上海口腔医学,2002,11(4):353-355.  
[3] 农晓琳,徐铭竹,李昊,等. CXCR4 CD44 CD133 表达在舌鳞状细胞癌患者生存分析中的价值[J]. 中国肿瘤临床,2013,40(14):832-837.  
[4] 祁佳佳,孙艳,袁昌青,等. CD44 和 CD133 在口腔潜在恶性病变和