

## 肾透明细胞癌患者肿瘤组织中 CD146 mRNA 的表达及意义

陈慧春 徐元宏

**摘要** 目的 探讨肾透明细胞癌(CCRCC)患者肿瘤组织中 CD146 mRNA 的表达及意义。方法 用 ELISA 法定量检测 CD146 蛋白含量及 Real-Time PCR 技术检测 102 例 CCRCC 患者肿瘤组织中 CD146 mRNA 的表达,并以 51 例肾脏良性病变患者手术正常肾组织作为对照。结果 发现存在转移的 CCRCC 患者,CD146 蛋白浓度与对照组比较差异有统计学意义( $F = 52.1, P < 0.01$ ),CD146 mRNA 的平均表达值( $0.0438 \pm 0.0024$ )明显高于原位 CCRCC 患者( $0.0382 \pm 0.0011, P = 0.018$ )和对照组患者( $0.0344 \pm 0.0010, P = 0.001$ )。结论 CD146 mRNA 表达上调与 CCRCC 的病理分级及淋巴结转移相关,有望成为评判 CCRCC 恶性程度、转移潜能及预后的一个新指标,为临床的干预性治疗提供可靠依据。

**关键词** CD146 mRNA;肾透明细胞癌;肿瘤组织

中图分类号 R 446.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1295-03

CD146 (也称为 MUC18、MCAM、Mel-CAM、S-Endo-1、PIH12 antigen)是一种跨膜糖蛋白,其最先在恶性黑色素瘤中被描述;并且表达于人类所有类型的血管内皮细胞的交界处。CD146 参与控制细胞间的黏附,同时也参与血管的新生<sup>[1-2]</sup>。在人类黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌和乳腺癌中,已被认为是预测肿瘤进展和转移形成的分子标志物<sup>[3-4]</sup>。该研究目的是了解 CD146 mRNA 在肾透明细胞癌(renal clear cell carcinoma, CCRCC)中的表达及其与临床病理参数之间的关系,探讨肿瘤组织中 CD146 mRNA 的表达与 CCRCC 的浸润及转移的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 2008 年 1 月~2012 年 1 月在安徽医科大学第一附属医院外科手术的肾细胞癌患者 102 例,其中男 68 例,女 34 例;年龄 31~82( $61.23 \pm 12.45$ )岁;51 例对照组患者来自外科手术的肾

脏良性病变患者正常肾组织,其中男 35 例,女 16 例;年龄 26~79( $56.12 \pm 12.29$ )岁。CCRCC 组和对照组之间年龄差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。CCRCC 和对照者都具有明确的病理诊断,其诊断、早期转移均符合《肾细胞癌诊断治疗指南》<sup>[5]</sup>。肿瘤的分级根据 Fuhrman 标准和 TMN 体系。

**1.2 检测方法** 于清晨取所有对象空腹静脉血,快速置于 2% EDTA 抗凝试管内并离心 5 min ( $4000 \text{ r/min}$ ),离心半径 12.60 cm,取上清液于  $-20^\circ\text{C}$  保存待测 CD146 蛋白含量;从患者的肿瘤组织和对照组织中提取总 RNA 用于 CD146 mRNA 基因的扩增和检测。

## 1.3 仪器和试剂

**1.3.1 仪器** 检测 CD146 蛋白含量,仪器用美国 BIO-RAD680 酶联免疫检测仪,严格按说明书操作;基因的扩增和检测使用瑞士 Roche 公司提供的 Lightcycler480II 检测系统。

**1.3.2 试剂** CD146 蛋白含量检测采用 ELISA 试剂盒(法国 BioCytex 公司);CD146 mRNA 基因的扩增和检测使用 RNeasy Mini 试剂盒(德国 Qiagen SA)按照操作说明书,从患者的肿瘤和对照组织中提取总 RNA。紫外分光光度计在 260 nm 下对提取的 RNA 做质量检测,RNA 标本保存在  $-80^\circ\text{C}$ 。1.0  $\mu\text{g}$  总 RNA 和试剂盒 Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (美国 Invitrogen 公司)用于合成 cDNA。

**1.3.3 CD146 基因的表达** CD146 基因上游引物为 5'-CCTGGAACGTCAACGGCAC-3',下游引物为 5'-GGGTGGTAAATTGACCAGCTCC-3',扩增产物为 177 bp。 $\beta$ -actin 基因上游引物为 5'-ACCGAGCGGGCTACAGC-3',下游引物为 5'-CTCATTGCCAATGGTGAT-3',扩增产物为 180 bp。PCR 总反应体积为 20  $\mu\text{l}$ ,100 ng 的引物和 12.5  $\mu\text{l}$  的 SYBR Green PCR 扩增预混试剂(德国 Qiagen SA)。PCR 反应条件如下:95  $^\circ\text{C}$  15 min;然后 94  $^\circ\text{C}$  15 s,58  $^\circ\text{C}$  35 s,72  $^\circ\text{C}$  35 s,循环 40 次;最后为 95  $^\circ\text{C}$  15 s,60  $^\circ\text{C}$  1 min,95  $^\circ\text{C}$  15 s。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 14.0 软件进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验、单因素方差分

2014-04-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171606);安徽省科技公共服务平台(编号:PT20081011)

作者单位:安徽医科大学附属第一医院检验科,合肥 230022

作者简介:陈慧春,女,硕士研究生,主管检验师;

徐元宏,男,教授,主任检验师,责任作者,E-mail:xyhong1964@163.com

析进行比较。

## 2 结果

**2.1 CD146 蛋白表达与临床因素的关系** CCRCC 患者 CD146 水平在对照组和 CCRCC 组中的变化与肿瘤组织是否转移有相关性。未转移组 CD146 浓度与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) 转移组 CD146 浓度与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 CD146 蛋白水平在对照组和 CCRCC 组中的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n  | CD146 ( $\mu\text{g/L}$ ) |
|-----------|----|---------------------------|
| 对照        | 51 | 67.98 $\pm$ 18.32         |
| CCRCC 未转移 | 76 | 91.68 $\pm$ 11.64         |
| CCRCC 转移  | 26 | 131.65 $\pm$ 24.83*       |
| F 值       |    | 52.1                      |
| P 值       |    | <0.01                     |

与对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 CD146 的表达水平与临床因素的关系** 102 例肾细胞癌患者及 51 例对照组患者中, CD146 基因表达与年龄和性别皆无关 ( $P > 0.05$ )。在 CCRCC 患者中, CD146 基因表达与肿瘤的 TNM 分期、肿瘤直径无关 ( $P > 0.05$ ) ,但与 Fuhrman 分级和术前转移相关 ( $P < 0.05$ ) ,见表 2。

**2.3 转移性 CCRCC 患者、原位 CCRCC 患者和对照组患者 CD146 基因的表达** 转移性 CCRCC 患者 CD146 基因表达平均值 (0.050 0  $\pm$  0.013 4) 显著高于原位 CCRCC 患者 (0.038 2  $\pm$  0.001 1) ( $F = 148.4$  ,  $P < 0.01$ ) 以及对照组 (0.034 4  $\pm$  0.006 1) ( $F = 1.44$  ,  $P < 0.01$ )。但是 原位 CCRCC 患者和对照组患者之间 CD146 基因的表达平均值差异无统计学意义 ( $F = 1.240$  ,  $P = 0.421$ )。

## 3 讨论

CCRCC 是肾细胞癌的主要类型<sup>[6]</sup>。传统的预后因素,如 TNM 分期和 Fuhrman 等级,已被证明在预测 CCRCC 患者早期复发中有着较大的局限性<sup>[7]</sup>。随着分子生物学和高通量检测方法的发展,使得一些新的生物标志物<sup>[8-12]</sup>得以应用于临床。

CD146 即白细胞分化抗原 146,作为一种细胞黏附分子,也被称为黑色素瘤细胞表面糖蛋白 MUC18 因子或细胞黏附分子 (cell adhesion molecules, MCAM),目前用于内皮细胞谱系标记。在人类的所有抗原中,CD146 蛋白是由 MCAM 基因编码

表 2 CD146 表达水平与临床因素的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目         | n   | CD146                 | P 值   | F 值   |
|------------|-----|-----------------------|-------|-------|
| CCRCC 组    | 102 | 0.041 3 $\pm$ 0.013 1 |       |       |
| 性别         |     |                       | 0.676 | 1.12  |
| 男          | 68  | 0.042 3 $\pm$ 0.013 5 |       |       |
| 女          | 34  | 0.039 6 $\pm$ 0.014 3 |       |       |
| 年龄(岁)      |     |                       | 0.144 | 1.51  |
| $\leq 60$  | 42  | 0.035 9 $\pm$ 0.013 4 |       |       |
| $> 60$     | 60  | 0.043 1 $\pm$ 0.010 9 |       |       |
| TNM 分期     |     |                       | 0.237 | 1.27  |
| T1         | 39  | 0.035 4 $\pm$ 0.012 8 |       |       |
| T2         | 16  | 0.038 1 $\pm$ 0.014 1 |       |       |
| T3         | 47  | 0.044 2 $\pm$ 0.013 5 |       |       |
| Fuhrman 分级 |     |                       | 0.000 | 32.55 |
| G1         | 24  | 0.027 5 $\pm$ 0.005 1 |       |       |
| G2         | 37  | 0.037 1 $\pm$ 0.008 0 |       |       |
| G3         | 26  | 0.049 2 $\pm$ 0.012 3 |       |       |
| G4         | 15  | 0.060 9 $\pm$ 0.003 2 |       |       |
| 肿瘤直径 (cm)  |     |                       | 0.549 | 1.74  |
| $< 4$      | 49  | 0.039 8 $\pm$ 0.011 0 |       |       |
| $\geq 4$   | 53  | 0.041 2 $\pm$ 0.014 5 |       |       |
| 术前是否转移     |     |                       | 0.003 | 148.4 |
| 未转移        | 76  | 0.038 2 $\pm$ 0.001 1 |       |       |
| 转移         | 26  | 0.050 0 $\pm$ 0.013 4 |       |       |
| 对照组        | 51  | 0.034 4 $\pm$ 0.006 1 |       |       |
| 性别         |     |                       | 0.162 | 2.01  |
| 男          | 36  | 0.033 2 $\pm$ 0.006 1 |       |       |
| 女          | 15  | 0.035 9 $\pm$ 0.004 3 |       |       |
| 年龄(岁)      |     |                       | 0.391 | 1.44  |
| $\leq 60$  | 38  | 0.034 1 $\pm$ 0.006 5 |       |       |
| $> 60$     | 13  | 0.033 9 $\pm$ 0.007 8 |       |       |

的一种细胞与细胞或细胞外基质的黏附分子;参与血管的新生,同时也参与控制细胞间的黏附。目前人类研究领域对其功能仍知之甚少,但已经有研究<sup>[13]</sup>表明是与肌动蛋白细胞骨架相关的内皮连接部分;是由 5 个免疫球蛋白结构域,一个跨膜结构域和胞质区组成的免疫球蛋白超家族的成员。可以活化人类 T 细胞、内皮祖细胞(如成血管细胞和骨髓间充质干细胞);不仅是对鸡胚脾脏和胸腺的表达,更强烈表达于血管内皮细胞与平滑肌。高水平的 CD146 基因表达与黑色素瘤患者预后的相关性在肿瘤组织中首先被发现。同时,CD146 基因高表达的前列腺癌、卵巢癌和乳腺癌患者的预后均较差。CD146 参与多种生理功能和病理过程如白细胞与内皮细胞黏附、免疫识别及肿瘤转移等在促进细胞间联系、维持组织形态、调节细胞生长和信号转导等多方面发挥重要的作用<sup>[14]</sup>。CD146 参与新血管的生成,为肿瘤的生长和转移提供必要的营养。CD146 阳性的肿瘤血管内皮与肿瘤细胞上的 CD146 配体结合,并能相互作用形成细胞簇,使血管堵塞并

黏附于血管内皮,进一步介导肿瘤细胞侵入周围组织,继而促进肿瘤的生长。

本研究显示不同性别和年龄样本中 CD146 基因表达没有显著性差异。但是,在 Fuhrman 等级不同的患者中,CD146 蛋白含量较对照组显著增高;CD146 基因表达差异有统计学意义,肿瘤分化越差,CD146 基因表达越高。此外,转移性 CCRCC 患者具有显著的 CD146 基因的高表达。高 TNM 分期和较大肿瘤体积的患者中,CD146 基因的表达高于低 TNM 分期和较小肿瘤体积的患者,然而,差异无统计学意义。原位 CCRCC 患者和对照组患者之间,CD146 基因的表达平均值差异也无统计学意义。这可能是由于相当一部分的肿瘤体积较小、无症状的原位 CCRCC 患者是在临床上偶然被发现的。因此还需扩大样本数量进一步进行临床研究。

### 参考文献

- [1] Bardin N, Anfosso F, Masse J M, et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion [J]. *Blood*, 2001, 98(13): 3677-84.
- [2] Yan X, Lin Y, Yang D, et al. A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth [J]. *Blood* 2003, 102(1): 184-91.
- [3] Wu G J, Fu P, Chiang C F, et al. Increased expression of MUC18 correlates with the metastatic progression of mouse prostate adenocarcinoma in the TRAMP model [J]. *J Urol* 2005, 173(5): 1778-83.
- [4] Aldovini D, Demichelis F, Dogliani C, et al. M-CAM expression as marker of poor prognosis in epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Cancer* 2006, 119(8): 1920-6.
- [5] 马建辉,何志嵩. 肾细胞癌诊断治疗指南(2011年第1版) [K]. <http://www.docin.com/p-380622413.html&key=肾腺癌怎么治>.
- [6] Zabou G, Imbert A M, Jacquemier J, et al. CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines [J]. *Breast Cancer Res* 2009, 11(1): R1.
- [7] Finley D S, Pantuck A J, Belldegrun A S. Tumor biology and prognostic factors in renal cell carcinoma [J]. *Oncologist* 2011, 16 Suppl 2: 4-13.
- [8] Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? [J]. *Br J Cancer* 2010, 103(11): 1698-705.
- [9] Phuoc N B, Ehara H, Gotoh T, et al. Prognostic value of the co-expression of carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor in patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Oncol Rep* 2008, 20(3): 525-30.
- [10] Pertia A, Nikoleishvili D, Trsintsadze O, et al. Loss of p27 (Kip1) CDKI is a predictor of poor recurrence-free and cancer-specific survival in patients with renal cancer [J]. *Int Urol Nephrol* 2007, 39(2): 381-7.
- [11] Dirim A, Haberal A N, Goren M R, et al. VEGF, COX-2, and PCNA expression in renal cell carcinoma subtypes and their prognostic value [J]. *Int Urol Nephrol*, 2008, 40(4): 861-8.
- [12] Li G, Feng G, Gentil-Perret A, et al. Serum carbonic anhydrase 9 level is associated with post operative recurrence of conventional renal cell cancer [J]. *J Urol* 2008, 180(2): 510-3.
- [13] Bardin N, Anfosso F, Masse J M, et al. Identification of CD146; as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion [J]. *Blood* 2001, 98(13): 3677-84.
- [14] Ouhtit A, Gaur R L, Abd Elmageed Z Y, et al. Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146 [J]. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1795(2): 130-6.

## Expression and significance of CD146 mRNA in renal clear cell carcinoma

Chen Huichun, Xu Yuanhong

(Dept of Clinical Laboratories, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore renal clear cell carcinoma (CCRCC) expression and significance of CD146 mRNA in tumor tissue of patients with. **Methods** ELISA method for quantitative detection was used for CD146 protein and real-time PCR technique for the detection of CCRCC in 102 (CCRCC) expression in tumor tissue of patients with CD146 mRNA, and 51 cases of renal patients with non tumor tissues as control. **Results** Found metastasis in patients with CCRCC, the CD146 protein concentration was statistically significant compared with the control group ( $F = 52.1, P < 0.01$ ), the average expression of CD146 mRNA value ( $0.0438 \pm 0.0024$ ) was significantly higher than that of in situ CCRCC patients ( $0.0382 \pm 0.0011, P = 0.018$ ) and control group ( $0.0344 \pm 0.0010, P = 0.001$ ). **Conclusion** Pathological grading and lymph node up regulation of CD146 mRNA expression in renal cell carcinoma and metastasis, is expected to become a new index, evaluation of malignant degree of CCRCC metastasis and prognosis, and provide a reliable basis for the intervention of clinical treatment.

**Key words** CD146 mRNA; renal clear cell carcinoma; tumor tissue