

· 基础研究 ·

CD109在口腔鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

侯德强¹, 白宁¹, 魏子程¹, 程洋², 刘彦魁³, 汤根兄^{4*}

¹江南大学附属医院口腔科, 江苏 无锡 214000; ²江南大学无锡医学院公共卫生与预防医学系, 江苏 无锡 214000; ³江南大学附属医院病理科, 江苏 无锡 214000; ⁴南京医科大学附属儿童医院口腔科, 江苏 南京 210008

[摘要] 目的: 研究白细胞分化抗原109(cluster of differentiation 109, CD109)在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中的表达并探讨其与患者临床特征及预后的关系。方法: 采用实时定量PCR和免疫组织化学法检测OSCC组织中CD109 mRNA和蛋白的表达; 结合临床病理资料分析CD109表达与临床特征及患者预后的关系。结果: 在OSCC组织中, CD109的mRNA和蛋白表达水平明显高于癌旁组织($P < 0.05$); CD109表达与淋巴结转移($P=0.019$)、远处转移($P=0.007$)和美国癌症联合委员会癌症分期($P=0.031$)相关; 多因素分析证实CD109表达水平是OSCC患者的独立预后因素($P < 0.001$); 与CD109低或无表达的OSCC患者相比, CD109高表达的OSCC患者总生存期更短($P=0.004$)。结论: CD109是影响患者预后的独立危险因素, 可能成为判断OSCC预后的肿瘤标志物。

[关键词] CD109; 口腔鳞状细胞癌; 预后; 组织芯片

[中图分类号] R739.81

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)03-339-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20210305

Expression and clinical significance of CD109 in oral squamous cell carcinoma

HOU Deqiang¹, BAI Ning¹, WEI Zicheng¹, CHENG Yang², LIU Yankui³, TANG Genxiong^{4*}

¹Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214000; ²Department of Public Health and Preventive Medicine, Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214000; ³Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214000; ⁴Department of Stomatology, the Affiliated Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression of CD109 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its influence on clinical characteristics and prognosis. **Methods:** The expression of CD109 mRNA and protein in OSCC tissues were detected by real-time quantitative PCR and immunohistochemistry respectively. The relationships between CD109 expression and clinical characteristics and prognosis were analyzed according to clinicopathological data. **Results:** The mRNA and protein expression levels of CD109 in OSCC tissues were significantly higher than those in paracancerous oral tissues. CD109 expression was associated with lymph node metastasis ($P=0.019$), distant metastasis ($P=0.007$) and cancer stage according to American Joint Committee ($P=0.031$). Multivariate analysis confirmed that CD109 expression was an independent prognostic factor for OSCC patients ($P < 0.001$). OSCC patients with high CD109 expression had a poor overall survival compared with patients with low or none CD109 expression ($P=0.004$). **Conclusion:** CD109 is an independent risk factor affecting the prognosis of OSCC patients, and may be an important marker to predict the prognosis of OSCC.

[Key words] CD109; oral squamous cell carcinoma; prognosis; tissue microarray

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(03): 339-343]

[基金项目] 无锡市卫健委科研项目(MS201909); 太湖高层次人才(双百中青年医疗卫生拔尖人才)(BJ2020056)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 13813808983@139.com

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 约60%的患者发生局部复发, 5年生存率较差^[1]。临床亟需可用于OSCC诊断和治疗的特异性预后标志物。白细

胞分化抗原 109 (cluster of differentiation 109, CD109) 是一种糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白, 属于 α 2-巨球蛋白/补体家族的成员。CD109 是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的协同受体, 可调节 TGF- β 受体的内吞和降解, 从而抑制 TGF- β 信号通路^[2]。CD109 对 TGF- β 信号通路的调节很可能影响肿瘤的发生发展^[3]。本研究通过检测口腔组织中 CD109 的表达, 探究 CD109 表达对 OSCC 患者临床病理特征和预后的关系, 为 OSCC 预后提供新的生物标志物。

1 材料和方法

1.1 材料

口腔组织取自 2014 年 1 月—2017 年 12 月在江南大学附属医院口腔科接受手术或活检的 118 例患者。口腔组织标本包括 OSCC 组织 118 例, 癌旁组织 32 例。样本采集前患者均未接受放化疗。男 76 例, 女 42 例, 中位年龄 34.5 岁 (范围 39~74 岁)。临床资料来源于患者病历, 根据第 8 期美国癌症联合委员会 (Alternate Joint Communications Center, AJCC) 癌症分期手册确定 OSCC 的疾病临床分期。本研究通过江南大学附属医院伦理委员会的批准, 并获得所有患者的书面同意。

TRIzol 试剂、SuperScript IV First-Strand 试剂盒、SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒 (Thermo 公司, 美国), 兔抗人 CD109 多克隆抗体 (Abcam 公司, 英国), Histostain 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶 (streptavidin-peroxidase, SP) 免疫组化染色试剂盒和苏木素染料 (北京中杉金桥生物科技有限公司), 二氨基联苯胺 (武汉纯度生物科技有限公司)。引物由南京金斯瑞生物有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

使用 TRIzol 试剂提取冷冻组织中的总 RNA, 使用 SuperScript IV First-Strand 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒和 ABI Prism 7500HT 序列检测系统进行定量扩增。引物序列如下: CD109 上游 5'-AAGCCAGTGAAAGGAGAC-GTA-3', 下游 5'-CCAGGGGAAGATAGATCCAGG-3', GAPDH 上游 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3', 下游 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'。以 GAPDH 为参照基因, 计算 CD109 mRNA 相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。以上实验重复 3 次。

1.2.2 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色

组织芯片 (tissue microarrays, TMA) 由江南大学附属口腔医院病理科制作。所有组织标本均采用 10% 中性缓冲福尔马林溶液固定, 常规石蜡包埋。从供体蜡块中收取组织芯柱 (直径 2 mm), 并将其置于石蜡中, 制成新的组织包埋块, 4 μ m 切片。采用 SP 法对口腔 TMA 样本进行 IHC 染色, 一抗使用兔抗人 CD109 多克隆抗体 (1:200), 详细步骤参见 Histostain SP 免疫组化染色试剂盒说明书。IHC 染色结果由两名病理医生在双盲情况下评估。根据 CD109 染色强度对样本组织中的细胞染色进行评分, 分别为 0 分 (阴性)、1 分 (弱阳性)、2 分 (中阳性)、3 分 (强阳性)。最终染色评分 = [3 \times 强染色百分比 + 2 \times 中度染色百分比 + 1 \times 弱染色百分比] \times 100。最终染色评分范围从 0 (无染色) 到 300 (100% 细胞染色强阳性)。根据 OSCC 患者的生存预后情况, 使用 Xtile 软件 (<http://www.tissuearray.org>) 将 CD109 表达情况分为高表达和低或无表达, 计算出 cutoff 值为 115。

1.3 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 18.0 统计软件包进行分析。计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组独立研究组间均数的比较采用成组 *t* 检验。对例数和率的比较采用 Pearson 卡方检验计算 CD109 与临床病理特征的相关性。采用 Kaplan Meier 法分析累计生存率。建立 Cox 比例风险回归模型, 进行单因素和多因素分析, 先进行单因素分析, 对 $P < 0.01$ 的因素再进行多因素分析, 确定预后因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD109 mRNA 在 OSCC 组织中高表达

采用 qRT-PCR 检测 25 例 OSCC 组织及对应癌旁组织中 CD109 mRNA 的表达水平。结果显示, OSCC 组织中 CD109 mRNA 的表达量显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 CD109 蛋白在 OSCC 组织中高表达

IHC 检测 CD109 蛋白在 OSCC 组织和口腔癌旁组织中的表达。结果显示, 定位于细胞膜的 CD109 在 OSCC 组织中高表达 (图 2), OSCC 组织中 CD109 的高表达率为 59.32% (70/118), 高于癌旁组织 (18.75%, 6/32) (表 1)。

2.3 OSCC 中 CD109 表达与临床特征的相关性

分析 OSCC 组织中 CD109 表达与病理参数的相

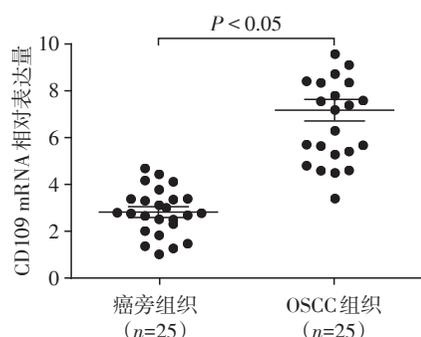


图1 CD109 mRNA在OSCC组织及癌旁组织中的表达
Figure 1 Expression of CD109 mRNA in OSCC tissues and paracancerous tissues

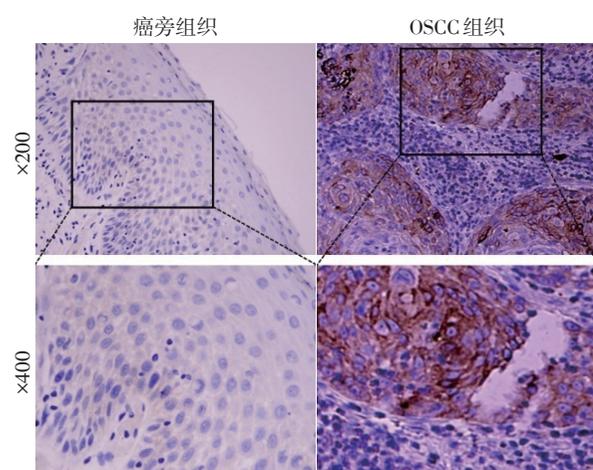


图2 OSCC组织及癌旁组织中CD109蛋白的表达(IHC)
Figure 2 CD109 protein expression in OSCC tissues and paracancerous tissues(IHC)

表1 CD109在OSCC组织及癌旁组织中的表达
Table 1 CD109 expressions in OSCC tissues and paracancerous tissues [n(%)]

分组	例数	CD109表达	
		低或无表达	高表达
癌旁组织	32	26(81.25)	6(18.75)
OSCC组织	118	48(40.68)	70(59.32)

关性。CD109表达水平与淋巴结转移($\chi^2=7.968, P=0.019$)、远处转移($\chi^2=6.681, P=0.007$)和AJCC分期($\chi^2=4.189, P=0.031$)显著相关,而与性别、年龄、吸烟、分化程度或肿瘤大小无相关性(表2)。

2.4 OSCC中CD109表达与患者预后的关系

进行单因素和多因素分析以确定OSCC患者的预后因素。单因素分析显示,CD109表达($P < 0.001$)、肿瘤大小($P=0.041$)、淋巴结转移($P < 0.001$)、远处转移($P=0.018$)和AJCC分期($P < 0.001$)与OSCC患者的总生存期显著相关。多因素分析显示CD109高表达(HR: 1.182, 95% CI: 1.325~

表2 CD109表达与OSCC患者临床病理特征的关系
Table 2 Relationships between CD109 expression level and clinicopathological characteristics of OSCC patients

分组	例数	CD109表达[n(%)]		χ^2 值	P值
		低或无表达 (n=48)	高表达 (n=70)		
性别				0.001	0.974
男	76	31(40.79)	45(59.21)		
女	42	17(40.48)	25(59.52)		
年龄				0.974	0.324
≥60岁	63	23(36.51)	40(63.49)		
<60岁	55	25(45.45)	30(54.55)		
吸烟				0.047	0.491
是	38	16(42.11)	22(57.89)		
否	80	32(40.00)	48(60.00)		
分化程度				1.007	0.604
高	85	36(42.35)	49(57.65)		
中	28	11(39.29)	17(60.71)		
低	5	1(20.00)	4(80.00)		
肿瘤大小				0.433	0.805
T1	71	29(40.85)	42(59.15)		
T2	43	18(41.86)	25(58.14)		
T3	4	1(25.00)	3(75.00)		
淋巴结转移				7.968	0.019
N0	87	42(48.28)	45(51.72)		
N1	17	3(17.65)	14(82.35)		
N2	14	3(21.43)	11(78.57)		
远处转移				6.681	0.007
M0	109	48(44.04)	61(55.96)		
M1	9	0(0)	9(100.00)		
AJCC分期				4.189	0.031
0+ I + II	73	35(47.95)	38(52.05)		
III+IV	45	13(28.89)	32(71.11)		

2.574, $P < 0.001$)、淋巴结转移(HR: 1.308, 95% CI: 1.147~1.718, $P=0.015$)和AJCC分期(HR: 1.136, 95% CI: 1.028~1.360, $P=0.032$)是OSCC患者的独立预后因素(表3)。Kaplan-Meier生存曲线证实CD109高表达与较短的总生存期相关(图3)。

3 讨论

CD109是一种锚定糖基磷脂酰肌醇的细胞表面糖蛋白,最初是通过针对原始淋巴/髓系KG1a的单克隆抗体检测到的细胞表面抗原^[4]。研究表明,CD109表达于CD34⁺骨髓单核细胞、间充质干细胞、T淋巴母细胞、凝血酶激活的血小板、白血病原巨核

表3 单变量和多变量分析检测OSCC患者总生存期的预后因素

Table 3 Univariate and multivariable analysis of prognostic factors for overall survival in OSCC patients

因素	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P值	HR	95%CI	P值
CD109表达						
高表达 vs. 低或无表达	1.894	1.843~2.576	<0.001	1.812	1.325~2.574	<0.001
性别						
男性 vs. 女性	1.214	0.841~1.598	0.422	—	—	—
年龄(岁)						
<60 vs. ≥60	1.145	0.807~1.436	0.513	—	—	—
吸烟						
是 vs. 否	0.549	0.326~1.023	0.082	—	—	—
分化程度						
高 vs. 中+低	1.158	0.884~1.417	0.326	—	—	—
肿瘤大小						
T1+T2 vs. T3	1.375	1.031~1.659	0.041	—	—	—
淋巴结转移						
N0 vs. N1+N2	1.523	1.232~1.875	<0.001	1.308	1.147~1.718	0.015
远处转移						
M0 vs. M1	1.817	1.140~2.934	0.018	—	—	—
AJCC分期						
0+ I + II vs. III+IV	1.358	1.236~1.457	<0.001	1.136	1.028~1.360	0.032

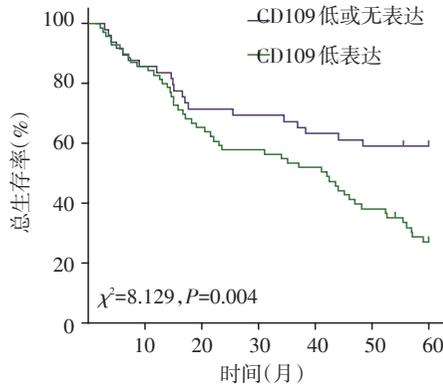


图3 CD109表达与OSCC患者总体生存率的关系

Figure 3 The relationship between CD109 expression and overall survival rate of OSCC patients

细胞和内皮细胞,但在新鲜外周血白细胞和正常骨髓白细胞中不表达^[5-6]。研究还显示,CD109携带双等位基因血小板特异性同种异体抗原Gov,与血小板输注困难、输注后紫癜和新生儿同种免疫性血小板减少有关^[5]。

癌变是一个多阶段过程,基因、蛋白质及其他分子在该过程中发生了一系列变化,可作为有临床价值的肿瘤分子标志。癌细胞特异性膜蛋白被认为是最合适的生物标志物,有助于了解肿瘤进展、开发诊断工具和确定新治疗靶点。除乳腺、泪腺、

唾液腺的肌上皮细胞、前列腺基底细胞和支气管上皮外,CD109在大多数正常的人体组织低表达或不表达^[7],而在许多类型的肿瘤中高表达,如肺癌^[8]、移行细胞癌^[9]、胰腺癌^[10]、恶性黑色素瘤^[11]、食管鳞状细胞癌^[12]等。因此,CD109是具有潜在研究价值的肿瘤分子标志物。

本研究结果表明,OSCC组织中CD109 mRNA和蛋白表达水平均显著高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Hagiwara等^[13]在OSCC和癌前病变中观察到CD109的高表达,提示CD109在预测癌前病变向口腔癌转变中的作用,但并未分析CD109表达与其他病理特征和患者预后的关系。同样,Dong等^[14]发现CD109在膀胱鳞状细胞癌和腺癌中表达,但在腺癌或正常胆囊组织中不表达。与腺癌、大细胞癌和小细胞癌相比,CD109在肺鳞状细胞癌中表达更为频繁^[15]。CD109在体外正向调控乳腺癌细胞的增殖,三阴性乳腺癌中CD109蛋白表达明显高于非三阴性乳腺癌^[16]。以上证据表明CD109在肿瘤癌变过程中发挥了重要作用,但在肿瘤进展过程中发挥的作用及机制仍需进一步探究。本研究分析了118例OSCC组织及其相关临床资料,以探讨CD109表达与临床病理特征之间的关系。研究结果显示CD109的表达与淋巴结转移、远处转移和

AJCC分期显著相关,CD109高表达在发生淋巴结转移、远处转移或AJCC(Ⅲ+Ⅳ)期患者中更为常见。这些结果表明CD109可能参与了OSCC的转移。

目前关于CD109表达对癌症患者预后影响的研究结果存在矛盾。在黏液纤维肉瘤、软组织肉瘤和肝细胞癌中,CD109高表达与较差的预后相关^[3,17]。此外,在弥漫大B细胞淋巴瘤患者中,CD109高表达与1年生存率低显著相关^[18],而CD109在移行细胞癌患者中的表达与较好的预后相关^[10]。本研究单因素Cox回归分析显示CD109表达、肿瘤大小、淋巴结状态、远处转移、AJCC分期与OSCC患者生存期相关。多因素分析进一步证实CD109表达、淋巴结转移、AJCC分期是影响OSCC患者预后的独立因素。Kaplan-Meier生存曲线证明了CD109水平高预示着较短的总生存期。以上结果表明,CD109表达水平与OSCC患者预后密切相关。

综上所述,本研究证明了CD109在OSCC组织中高表达,且CD109高表达的OSCC患者预后较差,证实了CD109与OSCC的发生发展及预后有一定相关性。CD109有望成为新的OSCC预后标志物,但其在OSCC中的作用机制仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 袁毅,韩筱,薛明飞,等. 毛蕊花苷通过上调Max蛋白抑制口腔鳞癌细胞的迁移和侵袭[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(1):32-36,93
- [2] LI Y, LOUIS H, GAOL J, et al. Role of TGF- β co-receptor CD109 in extracellular matrix production of smooth muscle cells[J]. *Arc Car Dis Sup*, 2018, 10(2):247-248
- [3] EMORI M, TSUKAHARA T, MURATA K, et al. Prognostic impact of CD109 expression in myxofibrosarcoma[J]. *J Surg Oncol*, 2015, 111(8):975-979
- [4] ZHANG H, CARNEVALE G, POLESE B, et al. CD109 restrains activation of cutaneous IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells by commensal microbiota [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(2):391-405.e5
- [5] SONG G, FENG T, ZHAO R, et al. CD109 regulates the inflammatory response and is required for the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(12):1632-1641
- [6] MII S, HOSHINO A, ENOMOTO A, et al. CD109 deficiency induces osteopenia with an osteoporosis-like phenotype *in vivo* [J]. *Genes Cells*, 2018, 23(7):590-598
- [7] HATSUZAWA Y, YAMAGUCHI K, TAKANASHI T, et al. CD109 promotes the tumorigenic ability and metastatic motility of pancreatic ductal adenocarcinoma cells [J]. *Pancreatol*, 2020, 20(3):493-500
- [8] CHUANG C H, GREENSIDE P G, ROGERS Z N, et al. Molecular definition of a metastatic lung cancer state reveals a targetable CD109-Janus kinase-stat axis [J]. *Nat Med*, 2017, 23(3):291-300
- [9] HAGIKURA M, MURAKUMO Y, HASEGAWA M, et al. Correlation of pathological grade and tumor stage of urothelial carcinomas with CD109 expression [J]. *Pathol Int*, 2010, 60(11):735-743
- [10] HAUN R, FAN C, MACKINTOSH S, et al. CD109 overexpression in pancreatic cancer identified by cell-surface glycoprotein capture [J]. *J Pro Bio*, 2014(suppl 10):1-6
- [11] OHSHIMA Y, YAJIMA I, KUMASAKA M Y, et al. CD109 expression levels in malignant melanoma [J]. *J Dermatol Sci*, 2010, 57(2):140-142
- [12] DONG F, LIU F, YAN S, et al. Elevated expression of CD109 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21(4):1273-1275
- [13] HAGIWARA S, MURAKUMO Y, SATO T, et al. Up-regulation of CD109 expression is associated with carcinogenesis of the squamous epithelium of the oral cavity [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(10):1916-1923
- [14] DONG F, LU C, CHEN X, et al. CD109 is a novel marker for squamous cell/adenosquamous carcinomas of the gallbladder [J]. *Diagn Pathol*, 2015, 10(1):137
- [15] TAKI T, SHIRAKI Y, ENOMOTO A, et al. CD109 regulates *in vivo* tumor invasion in lung adenocarcinoma through TGF- β signaling [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(12):4616-4628
- [16] TAO J, LI H, LI Q, et al. CD109 is a potential target for triple-negative breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(12):12083-12090
- [17] ZONG G J, XU Z W, ZHANG S S, et al. CD109 mediates cell survival in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(8):2303-2314
- [18] YOKOYAMA M, ICHINOE M, OKINA S, et al. CD109, a negative regulator of TGF- β signaling, is a putative risk marker in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Int J Hematol*, 2017, 105(5):614-622

[收稿日期] 2020-09-03