

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00517

原发性肾透明细胞癌根治术患者预后与 CD99 基因表达的关系及预后影响因素分析

曹廷虎¹, 王 蕾², 寇玉彬¹, 胡锦涛¹, 朱 军¹, 侯建国^{3*}

1. 上海中医药大学附属曙光医院宝山分院泌尿外科, 上海 201900
2. 江苏省张家港市中医医院检验科, 张家港 215600
3. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨影响原发性肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)根治术患者的预后与肿瘤转移相关基因 CD99 的关系及预后的影响因素。**方法** 应用半定量 RT-PCR 技术研究 CD99 基因在 ccRCC 组织和癌旁组织中的表达,通过随访调查患者的预后、生存时间及其危险因素,应用 Cox 风险回归模型分析获得影响预后的主要危险因素。**结果** 与对应癌旁组织相比,CD99 基因在 ccRCC 组织中表达上调的占 73.5%,差异有统计学意义($P=0.000$)。应用 Cox 风险回归模型分析发现:ccRCC 组织中 CD99 基因的高表达[HR=0.14, 95%CI(0.01, 2.15)]与根治术患者预后的生存时间无关;而患者年龄[HR=1.18, 95%CI(1.01, 1.38)]、TNM 分期[HR=51.91, 95%CI(4.31, 625.87)]、合并糖尿病[HR=59.94, 95%CI(2.21, 1 627)]和合并高血压[HR=47.72, 95%CI(1.37, 1 670)]是影响患者预后生存时间的主要危险因素。比较 TNM I 期和 II~IV 期两组患者的 1 年生存率和 2 年生存率(100.0% vs 60.0%, $P=0.004$; 93.8% vs 8.3%, $P=0.000$),差异有统计学意义。**结论** 肿瘤转移相关基因 CD99 的表达可能与 ccRCC 的预后无关,年龄、TNM 分期、合并糖尿病和合并高血压是影响患者预后生存时间的主要危险因素。

[关键词] CD99; 基因表达; 肾肿瘤; 透明细胞癌; 预后

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0517-04

Relationship between prognosis of patients with primary clear cell renal cell carcinoma after radical nephrectomy and expression of CD99 and analysis of prognostic factors

CAO Ting-hu¹, WANG Lei², KOU Yu-bin¹, HU Jin-xin¹, ZHU Jun¹, HOU Jian-guo^{3*}

1. Department of Urology, Baoshan Branch of Shanghai Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201900, China
2. Department of Clinical Diagnosis, Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang 215600, Jiangsu, China
3. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between prognosis of patients with primary clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) after radical nephrectomy and expression of tumor metastasis-associated gene CD99 and to analyze the prognostic factors of ccRCC patients. **Methods** Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to examine the expression of CD99 in primary ccRCC tissues and their corresponding adjacent tissues. The prognosis and risk factors of survival time of patients were studied by follow-up investigation, and the main risk factors were screened by Cox hazard regression model. **Results** Compared with the adjacent renal tissues, 73.5% ccRCC tissues had up-regulated CD99 expression, with significant difference found between the two groups ($P=0.000$). Cox hazard regression model showed that high CD99 expression in ccRCC tissues was not a survival risk factor of ccRCC patients after radical nephrectomy (HR=0.14, 95%CI[0.01, 2.15]); and age (HR=1.18, 95%CI[1.01, 1.38]), TNM stages (HR=51.91, 95%CI[4.31, 625.87]), diabetes (HR=59.94, 95%CI[2.21, 1 627]) and hypertension (HR=47.72, 95%CI[1.37, 1 670]) were the major risk factors for the survival of patients after radical nephrectomy. The 1-year and 2-year survival rates of ccRCC patients in TNM

[收稿日期] 2011-02-11 **[接受日期]** 2011-04-17

[基金项目] 上海市宝山区科学技术委员会基金(09-E-10). Supported by Fund of Science and Technology Committee of Shanghai Baoshan District(09-E-10).

[作者简介] 曹廷虎, 硕士, 主治医师. E-mail: cgr70@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873409, E-mail: ghou@smmu.edu.cn

stage I were significantly higher than those in TNM stage II-IV, respectively (100.0% vs 60.0%, $P=0.004$; 93.8% vs 8.3%, $P=0.000$). **Conclusion** The expression of tumor metastasis-related gene CD99 may not be associated with the prognoses of ccRCC patients. Age, TNM stage, diabetes and hypertension are the major risk factors of prognosis after resection of ccRCC.

[Key words] CD99; gene expression; kidney neoplasms; clear cell carcinoma; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(5): 517-520]

肾细胞癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,约占成人恶性肿瘤的3%,肾肿瘤的95%^[1]。肾细胞癌对放疗与化疗均不敏感^[2]。根治性肾切除手术是早期肾癌及局部进展性肾癌首选的治疗手段,是目前唯一得到公认可能治愈肾癌的一种方法。约30%的肾细胞癌患者在就诊时或手术后可能已出现转移,转移性肾细胞癌患者的中位生存时间为8~12个月,肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)占肾细胞癌的60%~85%^[2-3]。Kim等^[4]对美国明尼苏达州 Mayo 诊所在1970年至2006年施行肾癌根治术的3 996名患者进行预后随访调查,结果发现29.1%的患者术后死亡,与生存者中位生存时间7.4年相比,死亡者的中位生存时间只有1.9年。Klatte等^[5]的研究也表明1 208例肾脏小实性肿瘤(肿瘤直径≤4 cm)中88%为肾细胞癌,已经发生转移的约7%,进一步分析发现肿瘤大小并不能预测小肾癌的转移风险和预后。目前还没有ccRCC早期诊断和预后预测的方法。CD99蛋白是由位于X和Y染色体短臂假染色体区(PAR)的MIC2基因编码的广泛存在于各种细胞内的跨膜蛋白,是一种与肿瘤相关的细胞黏附分子^[6]。多个研究表明CD99参与一系列细胞功能,如细胞间黏附、细胞形态的维持、细胞凋亡等,许多不同类型肿瘤均存在其异常表达或缺失^[7-9]。我们前期采用ccRCC患者原发癌和转移癌原代培养细胞进行cDNA微阵列分析,结果提示CD99可能与癌症发生和转移有关^[10]。本研究选择CD99基因,检测其在ccRCC组织和癌旁组织中的表达,探讨该基因与ccRCC患者术后的生存期是否相关,并寻找影响肾癌根治术患者预后的危险因素。

1 材料和方法

1.1 标本来源 肾癌组织标本取自第二军医大学长海医院泌尿外科2005年10月至2007年12月行肾癌根治术患者34例,其中男性18例,女性16例,年龄29~75岁,平均(53.6±12.6)岁。每例取癌及癌旁组织(距肿瘤切缘2 cm)标本各1份,切取标本后立即放入液氮冻存。所有标本经长海医院病理科检查证实均为ccRCC,19例为TNM I期,3例为

TNM II期,10例为TNM III期,2例为TNM IV期。

1.2 主要试剂 TRIzol试剂购自Invitrogen公司, RNA反转录试剂盒购自Promega公司, rTaq酶购自TaKaRa公司。其他分子生物学试剂购自上海生物工程技术有限公司。

1.3 半定量RT-PCR检测相关基因表达

1.3.1 总RNA提取与反转录 用TRIzol试剂盒(按说明书操作)提取ccRCC组织和正常肾组织总RNA。液氮冻存组织放入研钵研磨,加入TRIzol试剂进行匀浆,氯仿抽提,异丙醇沉淀,75%(V/V)乙醇清洗,干燥后,产物溶解于DEPC水中, DNase I消化残量基因组DNA。经分光光度计(ND-1000型,美国Nanodrop公司)测得组织RNA的光密度(D)值为0.147~1.416,总RNA(质量)浓度为1.059~10.204, D_{260}/D_{280} 为1.8~2.2,确定为没有mRNA降解。

1.3.2 反转录和PCR扩增 用RNA反转录试剂盒进行反转录(参照试剂盒说明书操作),扩增CD99基因,以β-actin作为内参照。以反转录产物为模板,利用40 μl体系进行PCR扩增^[11](Mastercycler 5331扩增仪,德国Eppendorf公司),反应条件:95℃预变性3 min, 95℃变性45 s, 58℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 22次循环,末次循环后72℃再延伸10 min;反应完毕后取反应产物6 μl加样,1.5%琼脂糖凝胶120 V电泳30 min,溴化乙啶染色,观察结果。

1.4 调查随访 从2005年12月至2008年12月进行随访观察,观察时间为16~36个月。采用电话调查方式由专人进行电话随访,以患者死亡作为观察结局。对电话随访时无法联系的患者,根据截止日期后到门诊复查的记录定义其随访结局。

1.5 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,生存组和死亡组率的比较采用 χ^2 检验、秩和检验和Fisher确切概率法,两组生存率的比较采用log-rank检验,生存率的估计采用Kaplan-Meier法,生存数据采用Cox比例风险回归模型进行分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 CD99基因在ccRCC组织及癌旁组织中的表

达 共检测了 34 例 ccRCC 组织及癌旁组织中 CD99 基因的表达,发现与癌旁组织相比,在原发性 ccRCC 组织中有 25 例(73.5%)表达上调,而有 9 例(26.5%)表达下调,差异有统计学意义($P=0.000$)。

2.2 不同预后患者临床参数分析 对 34 例肾癌根治术患者进行随访,电话随访应答 20 例(58.8%),14 例回门诊复查时获得结果。34 名患者中有 22 例(64.7%)在随访截止日期前仍然存活,有 12 例(35.3%)患者因肿瘤复发或转移死亡;1 年生存率为 82.4%,2 年生存率为 57.1%。不同预后患者临床参数结果比较后显示死亡组平均生存中位时间为 11.5 个月,且平均年龄高于生存组($P=0.007$),两组患者的 TNM 分期构成不同($P=0.000$,表 1)。

表 1 不同预后患者临床参数比较

Tab 1 Comparison of clinical characteristics between patients with different prognoses

Characteristic	Survival	Death	P value
Case n (%)	22(64.7%)	12(35.3%)	
Survival time ^a t/month	26.5 (22.8, 30.3)	11.5 (7.3, 13.5)	0.000
Gender n			0.642
Male	11	7	
Female	11	5	
Age(year)	49.4±12.6	61.3±8.7	0.007
Smoking n (%)	2(9.1%)	4(33.3%)	0.154
Drinking n (%)	2(9.1%)	3(25.0%)	0.319
Diabetes n (%)	3(13.6%)	2(16.7%)	1.000
Hypertension n (%)	5(22.7%)	4(33.3%)	0.687
TNM stage n			0.000
I	18	1	
II	2	1	
III	2	8	
IV	0	2	
CD99 n			0.339
High expression	15	10	
Low expression	7	2	

^a: Data shown as median (QL, QU). QL: Lower quartile; QU: Upper quartile

2.3 影响肾癌根治术患者预后的多因素分析和不同 TNM 分期患者生存率比较 以 22 例生存的肾癌根治术患者为生存组和 12 例死亡的肾癌根治术患者为死亡组建立肾癌根治术患者预后 Cox 风险回归模型。纳入变量有性别、年龄、吸烟、饮酒、CD99 基因表达、TNM 分期、合并糖尿病和合并高血压。结果显示 ccRCC 组织中 CD99 基因的高表达[HR=0.14, 95%CI(0.01, 2.15)]不是影响患者预后的危险因素,而年龄[HR=1.18, 95%CI(1.01, 1.38)]、TNM 分期[HR=51.91, 95%CI(4.31, 625.87)]、合

并糖尿病[HR=59.94, 95%CI(2.21, 1 627)]和合并高血压[HR=47.72, 95%CI(1.37, 1 670)]是影响患者预后生存时间的主要危险因素。

比较 TNM I 期和 II~IV 期两组患者的 1 年生存率(100.0% vs 60.0%, $P=0.004$)、2 年生存率(93.8% vs 8.3%, $P=0.000$),两组生存率差异有统计学意义(图 1)。

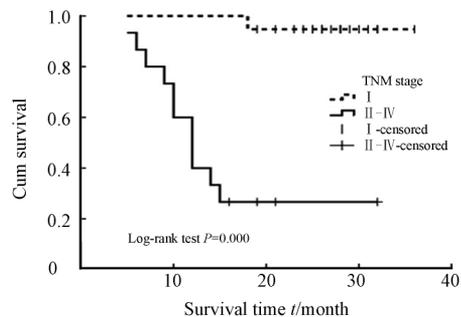


图 1 不同 TNM 分期患者 ccRCC 根治术后的生存曲线

Fig 1 Survival curves for clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) patients at different TNM stages after radical nephrectomy

3 讨论

我们利用前期所作的原位 ccRCC 与转移性癌的 3 组基因芯片,筛选出在转移癌中表达上调 3 倍以上的人类肿瘤相关基因 CD99,通过半定量 RT-PCR 方法检测发现 CD99 基因在癌及癌旁组织中的表达水平差异有统计学意义($P<0.05$),推断 CD99 基因可能与 ccRCC 的发生、发展有关^[10-11]。CD99 基因是人类肿瘤转移相关基因,其翻译的蛋白是一个相对分子质量为 32 000 的糖基化跨膜蛋白,在大多数细胞表面表达。检测基因 CD99 对 Ewing 肉瘤、原发性神经外胚瘤、淋巴母细胞瘤、横纹肌肉瘤和软骨肉瘤等间叶组织肿瘤的诊断有重要意义^[12-15]。CD99 在 ccRCC 中表达的研究,尤其与 ccRCC 患者术后的预后研究较少。为验证 CD99 基因是否与 ccRCC 根治术后患者的预后相关以及探讨影响 ccRCC 根治术后患者预后的影响因素,本研究通过对 34 例 ccRCC 组织及癌旁组织中的 CD99 基因表达水平进行检测,并进行预后随访调查,结果显示,与癌旁组织相比,CD99 基因在癌组织中明显上调($P=0.000$),这提示可能与肾癌的发生相关,经进一步的 Cox 风险回归模型分析发现:年龄[HR=1.18, 95%CI(1.01, 1.38)]、TNM 分期[HR=51.91, 95%CI(4.31, 625.87)]、合并糖尿病[HR=59.94, 95%CI(2.21, 1627)]和合并高血压[HR=

47.72,95%CI(1.37,1 670)]是影响患者预后生存时间的主要危险因素,控制以上因素后发现 CD99 基因的表达与 ccRCC 患者的预后无关[HR=0.14,95%CI(0.01,2.15)]。最近的研究表明 CD99 基因与 ccRCC 发生的相关性可能不是体现在其基因的表达水平,而是 CD99 基因的选择性剪切异构体形式与 ccRCC 的转移相关,尤其 CD99 III 为一种新型选择性剪接异构体,且 CD99 II、CD99 III 的表达可能与 ccRCC 的转移进展有关^[16]。

美国最近的一项研究表明肾细胞癌根治术后 10 年生存率与 TNM 分期密切相关,pT1a、pT1b、pT2a、pT2b、pT3a、pT3b、pT3c 和 pT4 的 10 年生存率分别为 96%、80%、66%、55%、36%、26%、25% 和 12%^[4]。本研究发现 TNM 分期[HR=51.91,95%CI(4.31,625.87)]影响患者的预后生存时间,TNM I 期 1 年生存率和 2 年生存率高于 TNM II~IV 期患者的生存率(100.0% vs 60.0%, $P=0.004$;93.8% vs 8.3%, $P=0.000$),表明 TNM 临床分期是 ccRCC 患者预后及术后生存时间的一个重要指标。Chow 等^[17]的前瞻性研究已证实糖尿病和高血压是男性肾癌发病的危险因素,但目前国内外尚未见其与肾癌预后的关系研究。本研究发现糖尿病[HR=59.94,95%CI(2.21,1 627)]和高血压[HR=47.72,95%CI(1.37,1 670)]显著影响 ccRCC 患者术后的生存时间,但 95%CI 范围较宽可能与样本例数较少有关,需进一步扩大样本量证实。

本研究应用半定量 RT-PCR 技术检测了人类肿瘤相关基因 CD99 在 ccRCC 组织中的表达并通过患者术后的生存时间的调查,经 Cox 风险回归模型分析发现 CD99 基因的上调与患者术后的预后生存时间无关,而年龄、TNM 分期、合并糖尿病和合并高血压是影响患者预后生存时间的主要危险因素。

[参考文献]

[1] Cohen H T,McGovern F J. Renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med,2005,353:2477-2490.
 [2] Garcia J A,Rini B I. Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma[J]. CA Cancer J Clin,2007,57:112-125.
 [3] Liou L S,Shi T,Duan Z H,Sadhukhan P,Der S D,Novick A A, et al. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma[J]. BMC Urol,2004,4:9.
 [4] Kim S P,Alt A L,Weight C J,Costello B A,Cheville J C,Lohse C, et al. Independent Validation of the 2010 American Joint Committee on Cancer TNM Classification for Renal Cell Carcinoma:Results From a Large, Single Institution Cohort[J]. J Urol,2011. [Epub ahead of print]
 [5] Klatt T,Patard J J,de Martino M,Bensalah K,Verhoest G,de

la Taille A, et al. Tumor size does not predict risk of metastatic disease or prognosis of small renal cell carcinomas[J]. J Urol, 2008,179:1719-1726.
 [6] Lee J H,Kim S H,Wang L H,Choi Y L,Kim Y C,Kim J H, et al. Clinical significance of CD99 down-regulation in gastric adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res,2007,13:2584-2591.
 [7] Bernard G,Zoccola D,Deckert M,Breitmayer J P,Aussel C, Bernard A. The E2 molecule (CD99) specifically triggers homotypic aggregation of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes. [J]. J Immunol, 1995,154:26-32.
 [8] Kim S H,Choi E Y,Shin Y K,Kim T J,Chung D H,Chang S I, et al. Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype through downregulation of CD99 (Mic2)[J]. Blood, 1998,92:4287-4295.
 [9] Bernard G,Breitmayer J P,de Matteis M,Trampont P,Hofman P,Senik A, et al. Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/CD99[J]. J Immunol,1997,158:2543-2550.
 [10] Tan X,Zhai Y,Chang W,Hou J,He S,Lin L, et al. Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma [J]. Int J Cancer,2008,123:1080-1088.
 [11] 曹廷虎,侯建国,常文军,翟羽佳,林丽萍,顾春英,等. 原发性肾透明细胞癌中转移相关基因 CD99、FKBP5 和 FLJ13576 的基因表达[J]. 第二军医大学学报,2009,30:360-363.
 Cao T H,Hou J G,Chang W J,Zhai Y J,Lin L P,Gu C Y, et al. Expression of metastasis-associated molecules CD99, FKBP5,FLJ13576 in primary clear cell renal cell carcinoma[J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2009,30:360-363.
 [12] Kim S H,Shin Y K,Lee I S,Bae Y M,Sohn H W,Suh Y H, et al. Viral latent membrane protein 1 (LMP-1)-induced CD99 down-regulation in B cells leads to the generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype[J]. Blood,2000,95: 294-300.
 [13] Granter S R,Renshaw A A,Fletcher C D,Bhan A K,Rosenberg A E. CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma[J]. Hum Pathol,1996,27:1273-1276.
 [14] Choi Y L,Chi J G,Suh Y L. CD99 immunoreactivity in ependymoma[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol,2001,9:125-129.
 [15] Scotlandi K,Perdichizzi S,Bernard G,Nicoletti G,Nanni P, Lollini P L, et al. Targeting CD99 in association with doxorubicin;an effective combined treatment for Ewing's sarcoma[J]. Eur J Cancer,2006,42:91-96.
 [16] 林丽萍,武旗,常文军,侯建国,张宏伟,谭晓洁,等. 肾透明细胞癌转移相关的 CD99 选择性剪接异构体的筛选[J]. 第二军医大学学报,2009,30:355-359.
 Lin L P,Wu Q,Chang W J,Hou J G,Zhang H W,Tian X J, et al. Identification of metastasis-associated alternatively spliced variants of CD99 in clear cell renal cell carcinoma tissues[J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2009,30:355-359.
 [17] Chow W H,Gridley G,Fraumeni J F Jr,Järnholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men[J]. N Engl J Med,2000,343:1305-1311.