

β -连环素与原发性肝癌术后复发和转移的相关性

张志强, 李东良, 陈少华, 江艺, 程变巧, 范敬静, 马明

■背景资料

肝细胞癌(HCC)是我国常见的消化系统恶性肿瘤, 由于其恶性程度高、病情隐匿且易复发、转移等特点, 临床上治疗效果往往不理想。本文研究 β -连环素与原发性肝癌术后复发和转移的相关性, 为肝癌临床预后判断提供可能的指导意义。

张志强, 福建医科大学福总临床医学院肝胆内科 福建省福州市 350025

李东良, 程变巧, 范敬静, 马明, 中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆内科 福建省福州市 350025

陈少华, 江艺, 中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆外科 福建省福州市 350025

张志强, 硕士, 主要从事肝胆疾病方面的研究。

福建省自然科学基金资助项目, No. 2012J01399

作者贡献分布: 张志强与李东良对此文所作贡献均等; 此课题由李东良与张志强设计; 研究过程由张志强、李东良、程变巧、范敬静及马明操作完成; 本论文写作由张志强与李东良完成。

通讯作者: 李东良, 教授, 350025, 福建省福州市西二环156号, 福建医科大学福总临床医学院, 中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆内科。dongliangli@gmail.com

电话: 0591-22859128

收稿日期: 2012-03-04 修回日期: 2012-05-07

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-06-28

Correlation between β -catenin expression and recurrence and metastasis of primary hepatocellular carcinoma in patients after surgery

Zhi-Qiang Zhang, Dong-Liang Li, Shao-Hua Chen, Yi Jiang, Bian-Qiao Cheng, Jing-Jing Fan, Ming Ma

Zhi-Qiang Zhang, Department of Hepatobiliary Medicine, the Affiliated Clinical Medical College of Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Dong-Liang Li, Bian-Qiao Cheng, Jing-Jing Fan, Ming Ma, Department of Hepatobiliary Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Shao-Hua Chen, Yi Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2012J01399

Correspondence to: Dong-Liang Li, Professor, Clinical Medical College of Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University; Department of Hepatobiliary Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 Xierhuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. dongliangli@gmail.com

Received: 2012-03-04 Revised: 2012-05-07

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-06-28

Abstract

AIM: To examine the expression of β -catenin in hepatocellular carcinoma and to analyze its correlation with recurrence and metastasis of primary hepatocellular carcinoma in patients after surgery.

■同行评议者

姚鹏, 副教授, 中国人民解放军北京军区总医院全军肝病中心

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of β -catenin in tumor samples and matched tumor-adjacent tissue samples taken from patients who had recurrence and/or metastasis within one year after surgery for primary hepatocellular carcinoma and those had no recurrence or metastasis. The correlation between β -catenin expression and the clinicopathological characteristics of primary hepatocellular carcinoma was analyzed.

RESULTS: β -catenin was mainly distributed on the membrane of cells in tumor-adjacent tissue. The rate of aberrant expression of β -catenin was significantly higher in tumor tissue than in tumor-adjacent tissue (60% vs 15%, $\chi^2 = 17.28$, $P < 0.001$). There was no significant difference in the expression of β -catenin in tumor-adjacent normal tissue between patients with and without cirrhosis ($\chi^2 = 0.388$, $P = 0.533$). The rate of aberrant expression of β -catenin was significantly higher in primary hepatocellular carcinoma with recurrence and/or metastasis than in that without recurrence or metastasis (80.0% vs 40%, $\chi^2 = 6.667$, $P = 0.010$). Aberrant expression of β -catenin was not correlated with age, liver cirrhosis, tumor size or differentiation, but was associated with the recurrence and metastasis of primary hepatocellular carcinoma.

CONCLUSION: Aberrant expression of β -catenin is associated with the development, recurrence metastasis of primary hepatocellular carcinoma and may be used as a useful prognostic parameter to predict overall survival.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; β -catenin; Immunohistochemistry; Recurrence; Metastasis

Zhang ZQ, Li DL, Chen SH, Jiang Y, Cheng BQ, Fan JJ, Ma M. Correlation between β -catenin expression and recurrence and metastasis of primary hepatocellular carcinoma in patients after surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(18): 1662-1666

摘要

目的: 探讨 β -连环素在肝细胞癌(hepatic cell carcinoma, HCC)的表达及与肝癌术后复发、

转移的关系。

方法: 采用免疫组织化学方法对比观察手术前TNM分期相同, 术后1年内出现复发和/或转移的HCC与未出现复发和/或转移的HCC患者癌组织及癌旁组织中 β -连环素的表达及其与临床病理特征的关系。

结果: 癌组织 β -连环素细胞膜表达降低, 异常表达率达60%(24/40), 明显高于癌旁肝组织15%(6/40), 两组相比具有统计学意义($\chi^2 = 17.28, P < 0.001$); 而在癌旁组织中无论是否伴有肝硬化, β -连环素表达无差异($\chi^2 = 0.388, P = 0.533$); β -连环素在复发和转移HCC患者中的异常表达率高达80.0%(16/20), 明显高于未发生复发或转移组40.0%(8/20), 两组相比具有统计学意义($\chi^2 = 6.667, P = 0.010$); β -连环素异常表达与患者年龄、肿瘤大小、分化程度及是否伴有肝硬化均无明显相关性($P > 0.05$), 但与肿瘤的复发和转移有关($P < 0.05$)。

结论: β -连环素的异常表达可能与HCC的发生及术后复发、转移有关。有可能作为HCC恶性程度及预后判断的预测指标。

关键词: 原发性肝细胞癌; β -连环素; 免疫组织化学; 复发; 转移

张志强, 李东良, 陈少华, 江艺, 程变巧, 范敬静, 马明. β -连环素与原发性肝癌术后复发和转移的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(18): 1662-1666
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1662.asp

0 引言

肝癌是一个隐匿性疾病, 不少患者在初次诊断时往往已经发生浸润或转移, 即便是一些还能手术切除的患者, 也很容易发生复发和转移。因而针对肿瘤复发、转移后的治疗成为了延长患者带瘤生存时间的关键因素^[1,2]。肿瘤细胞脱离原发病灶和运动能力增强是肿瘤发生转移的先决条件。 β -连环素是Wnt通路中的关键分子, 是一种多功能蛋白, 在细胞连接处作为一种细胞骨架蛋白, 他的稳定性对Wnt信号转导起重要作用。已有研究显示 β -连环素在原发性肝细胞癌(hepatic cell carcinoma, HCC)中具有异常表达^[3], 但其与肝癌的复发和转移的关系尚不明确。本研究采用免疫组织化学方法对比观察 β -连环素在出现转移与未发生转移的原发性肝癌患者癌组织及癌旁组织中的表达, 进一步探讨 β -连环素异常表达与肝癌恶性分化、侵袭、转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆外科2010-05/2011-01行手术切除, 并在1年的观察随访中发生肝癌复发或转移的原发性HCC患者的石蜡组织标本20例, 另外, 随机选取同期行手术治疗, 随访1年未复发和/或转移的原发性HCC患者的石蜡组织标本20例, 两组患者术前肿瘤TNM分期无差异, 对照观察 β -连环素在两组患者癌及癌旁组织的表达差异。所有患者术前均未接受介入栓塞化疗及其他治疗。

1.2 方法

1.2.1 β -连环素的免疫组织化学法(Elivison二步法)检测: 临床手术切除标本后用常规10%甲醛固定, 石蜡包埋, 制成3 μ m连续切片后, 分别脱蜡、脱水, 微波炉内抗原热修复90 s暴露抗原, 3%双氧水室温下孵育10 min, 阻断内源性过氧化物酶活性; 室温下放入0.05% Tween20(pH 7.0)10 min, 滴加鼠抗人 β -连环素单克隆抗体(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)(1:150), 室温下1 h, 以PBS冲洗3 \times 3 min, 再次放入0.05% Tween20(pH 7.0)2 h, 滴加增强剂20 min; 加生物素化抗兔二抗(即用型第2代免疫组织化学Elivision plus广谱试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司)室温下30 min, PBS冲洗, DBA显色剂显色5-20 min, 苏木精复染, 饱和碳酸锂30 s, 在95%-100%酒精脱水, 吹干, 封片, 镜下观察, 照相。对照设置: PBS代替一抗作为阴性对照进行同步染色。

1.2.2 结果判定: β -连环素阳性产物主要分布在正常肝组织的肝细胞膜上, 为粗细一致的棕黄色颗粒, 在细胞质可有微量表达, 细胞核无表达。判断标准按Maruyama等^[4]方法, 高倍镜($\times 400$)下每个视野计数100个细胞, 每张切片数5个视野, 观察细胞膜、细胞质、细胞核的表达情况, 当细胞膜阳性细胞率 $< 5\%$ 记为阴性(-), 表达率为5%-24%时为弱阳性(+), 表达25%-50%时为阳性(++), $> 50\%$ 为强阳性(+++). 当细胞膜上阴性及弱阳性表达和/或出现胞质阳性表达率 $> 10\%$ 及细胞核阳性表达时均判定为异常表达。

统计学处理 采用SPSS13.0 for Windows统计软件包进行, 采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 β -连环素在癌旁肝组织和癌组织中的表达 癌旁肝组织中 β -连环素蛋白主要在细胞膜上表达, 细胞膜阳性表达率为85.0%(34/40, 图1)。无

■研发前沿

β -连环素是Wnt通路中关键分子, 是一种多功能蛋白, 在细胞连接处作为一种细胞骨架蛋白, 他的稳定性对Wnt信号转导起重要作用。已有研究显示 β -连环素在原发性HCC中具有异常表达, 但其与肝癌的复发和转移的关系尚不明确。

■相关报道

曾建平等研究发现 β -catenin的异常表达与肝癌的进展和转移有关, 其机制可能是通过激活cyclin D1基因的表达, 促使肝细胞增殖和恶性转化而实现。

■应用要点

本研究所得结果对于预测肝癌术后是否出现复发、转移可能有重要的临床指导意义。

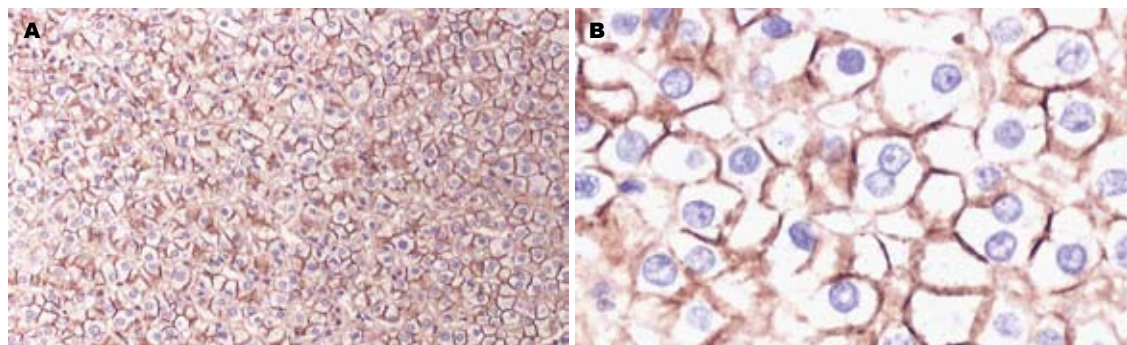


图1 Power Vision™染色检测β-连环素在癌旁组织细胞膜的表达. A: 100倍; B: 400倍.

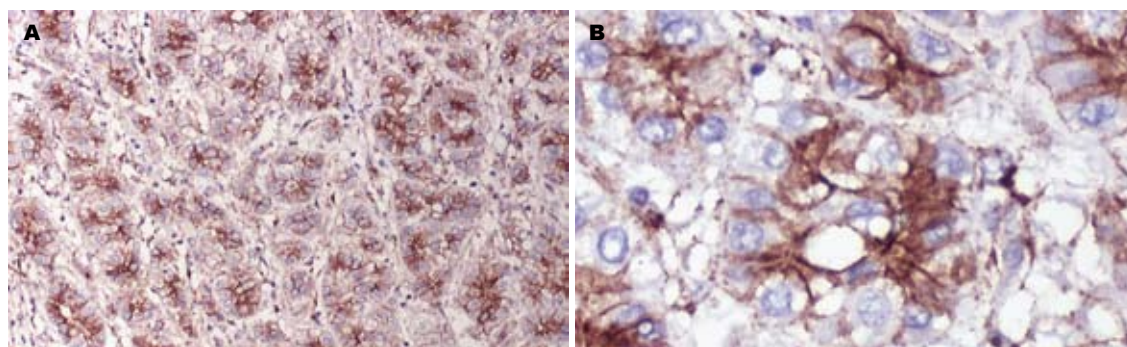


图2 Power Vision™染色检测β-连环素在未复发或/和转移患者肝癌组织中的表达. A: 100倍; B: 400倍.

表1 β-连环素在HCC及癌旁肝组织中的表达

	<i>n</i>	表达情况		χ^2 值	<i>P</i> 值
		正常表达(<i>n</i>)	异常表达(<i>n</i>)		
癌旁组织					
无肝硬化	18	16	2	0.388	0.533
伴肝硬化	22	18	4		
癌组织	40	16	24	17.28	<0.01

肝硬化组和伴有肝硬化组均有少数标本癌旁组织检出β-连环素异常表达,但两组相比无明显差异($\chi^2 = 0.388$, $P = 0.533$).而癌组织β-连环素细胞膜表达率降低,异常表达率达60.0%(24/40),明显高于癌旁肝组织15.0%(6/40)($\chi^2 = 17.28$, $P < 0.001$,表1).

2.2 β-连环素在未复发或/和转移患者肝癌组织中的表达 在未出现复发或转移的患者中,癌组织β-连环素异常表达率40.0%(8/20).主要为细胞膜表达缺失,同时6例患者伴有细胞质异常表达,5例伴细胞核异常表达(图2).而本组患者癌旁肝组织β-连环素异常表达率为10.0%(2/20),两者比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.80$, $P = 0.028$).

2.3 β-连环素在复发和转移患者癌组织中的表达 在出现复发或/和转移的患者中,癌组织β-连环素异常表达率高达80.0%(16/20),同时12例患者

伴有细胞质异常表达,10例伴有细胞核异常表达(图3).本组患者癌旁肝组织β-连环素异常表达率为20.0%(4/20),两者比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.40$, $P = 0.000$).与未发生复发或转移组相比也具有统计学意义(80% vs 40%, $\chi^2 = 6.667$, $P = 0.010$,表2).

2.4 β-连环素与HCC患者临床病理特征的关系 β-连环素异常表达与患者年龄、肿瘤大小、分化程度及是否伴有肝硬化均无明显相关性,但与肿瘤的复发和转移有关($P < 0.05$,表2).

3 讨论

β-连环素是胞质内糖蛋白,基因位于人染色体3q21,分子量为92 kDa,是一种重要的细胞黏附分子和细胞骨架成分,同时β-连环素参与Wnt信号^[5]通路.他介导APC/β-连环素/Tcf/lef-1构成

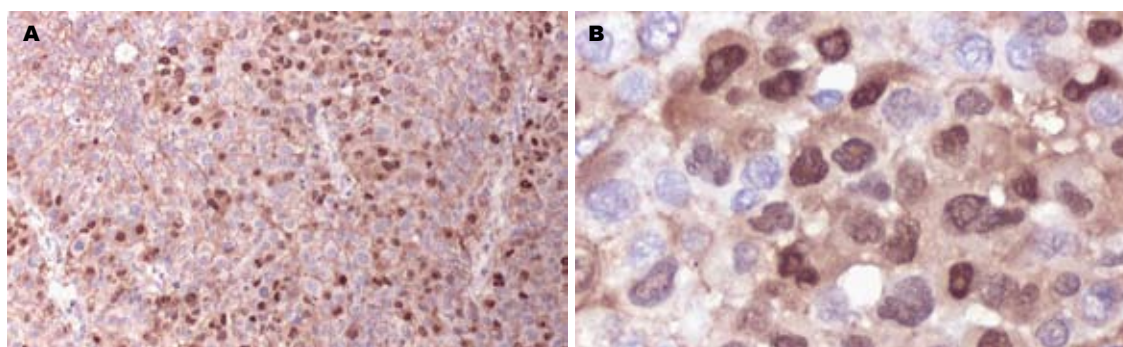


图 3 Power VisionTM染色检测 β -连环素在复发和转移患者癌组织中的表达. A: 100倍; B: 400倍.

■同行评价

本文探讨了 β -连环素与原发性肝癌术后复发和转移的相关性,具有一定的临床参考价值和意义.

表 2 癌组织 β -连环素表达与HCC患者临床病理特征的关系

	<i>n</i>	β -连环素		χ^2 值	<i>P</i> 值
		正常表达(<i>n</i>)	异常表达(<i>n</i>)		
年龄(岁)					
<45岁	16	6	10	0.2730	0.601
≥ 45 岁	24	11	13		
伴肝硬化					
无	18	8	10	0.0510	0.822
有	22	9	13		
肿瘤大小					
<5 cm	23	11	12	0.0628	0.428
≥ 5 cm	17	6	11		
分化程度					
高中分化	21	11	10	1.7660	0.184
中低分化	19	6	13		
复发转移					
无	20	12	8	6.6670	0.010
有	20	4	16		

的Wnt信号传导通路,与胚胎发育和肿瘤有关.近年来研究发现 β -连环素蛋白在乳腺癌^[6]、胃癌^[7]、结肠癌^[8]、喉癌^[9]、结直肠癌^[10]、慢性髓性白血病^[11]、食管鳞状细胞癌^[12]、HCC^[3]、胆道肿瘤^[13]等都出现不同程度的异常表达,并且 β -连环素异常表达与肿瘤细胞的分化程度有关,高、中分化HCC β -连环素主要在细胞膜和/或细胞质表达,而核表达见于中、低分化肝癌^[14].Calvisi等^[15]在实验中证实,在肝癌增殖性强、肿瘤体积较大等的恶性程度高的癌组织中, β -连环素在胞质和/或核内聚集的程度也更明显.Suzuki等^[16]研究发现分化低的癌细胞,细胞质和细胞核内 β -连环素表达显著增加,周围分化高的癌细胞中, β -连环素表达主要位于细胞膜上.这种由周边高分化癌的 β -连环素膜定位到逐渐变成低分化癌的 β -连环素细胞质和/或核定位,显示了肝癌细胞去分化的过程.相比之下,对正常

肝组织的研究发现 β -连环素表达于细胞膜上,细胞质内有弱表达,无核内表达.

β -连环素与HCC复发和/或转移的相关性研究较少,其与HCC复发及转移的关系尚不明确.本研究采用免疫组织化学方法对比观察了 β -连环素在出现复发和/或转移与未发生复发、转移的原发性肝癌患者癌组织及癌旁组织中的表达,进一步探讨 β -连环素异常表达与肝癌复发、转移的关系.结果显示癌组织 β -连环素细胞膜表达降低,异常表达率明显高于癌旁肝组织;并且 β -连环素的异常表达与肿瘤的复发和转移有密切关系.发生复发和/或转移的HCC患者癌组织 β -连环素的异常表达明显高于未发生复发和/或转移的患者,且细胞核阳性表达较常见,提示 β -连环素可能在肝癌的复发和转移中发挥着重要的生物学作用.可以作为一个预后判断的良好指标.

4 参考文献

- 1 吴孟超. 原发性肝癌的诊断及治疗进展. 中国医学科学院学报 2008; 30: 363-365
- 2 汤钊猷. 肝癌转移复发的基础与临床. 上海: 上海科技教育出版社, 2003; 1
- 3 Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Nakamura Y. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res* 1998; 58: 2524-2527
- 4 Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000; 59: 302-309
- 5 Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci* 2003; 94: 225-229
- 6 何艳姣, 乔超, 刘朝霞, 俞进, 李光. 乳腺癌中 β -catenin、cyclinD1、c-myc表达及意义. 首都医科大学学报 2011; 32: 549-552
- 7 Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg* 2002; 89: 236-244
- 8 Horst D, Reu S, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. The intratumoral distribution of nuclear beta-catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer* 2009; 115: 2063-2070
- 9 牟江洪, 向德兵, 肖华亮, 林俐. β -catenin与VEGF-C和-D在结直肠癌中的表达及其相关性. 世界华人消化杂志 2011; 19: 636-639
- 10 薛令军, 李培梅, 孙瑜宁, 张恩东, 刘艳, 孙彩波, 刘新义, 孙文海. β -连环素和P65在喉癌中的表达及其临床意义. 中国耳鼻喉颅底外科杂志 2011; 17: 11-17
- 11 邹外一, 许多荣, 苏畅, 陈媚, 陈运贤, 李娟, 罗绍凯. 慢性髓性白血病患者 β -catenin的表达及其临床意义. 中国病理生理杂志 2010; 26: 709-712
- 12 马红, 陈晓, 马海梅, 尼加提·热合木, 蒲红伟. E-cadherin、 β -catenin和CathepsinD在食管鳞状细胞癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1757-1762
- 13 乔岐禄, 温泉, 赵建勋, 刘玉树. β -catenin与cyclinD1在胆道肿瘤中的表达及临床意义. 中国现代医学杂志 2007; 17: 134-137
- 14 Wong CM, Fan ST, Ng IO. beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 2001; 92: 136-145
- 15 Calvisi DF, Ladu S, Factor VM, Thorgeirsson SS. Activation of beta-catenin provides proliferative and invasive advantages in c-myc/TGF- α hepatocarcinogenesis promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis* 2004; 25: 901-908
- 16 Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 994-1000

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。