文章编号:1000-5404(2008)22-2139-03

论著

肝细胞癌 cathepsin L 表达分析

晋 云,董家鸿 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 cathepsin L 蛋白在肝细胞癌中的表达及其与肿瘤临床病理特征的关系。**方法** 58 例肝细胞癌中病理分级高分化 18 例、中分化 18 例、低分化 22 例;临床分期Ⅰ+Ⅱ期 26 例、Ⅲ+Ⅳ期 32 例。采用免疫组织化学染色、RT-PCR 法检测 cathepsin L 表达,结合患者临床病理指标及预后进行分析。**结果** cathepsin L 表达阳性率为 72.4%(42/58),不同病理分级、临床分期及转移分组 cathepsin L 表达阳性率差异显著。cathepsin L mRNA 检出阳性率 65.5%(38/58),cathepsin L mRNA 的表达与肝细胞癌的病理分级、临床分期及淋巴转移有相关性。**结论** cathepsin L 在肝细胞癌的生长浸润、侵袭转移中发挥重要作用,可作为肝细胞癌预后判断的客观指标之一。

关键词:肝癌;组织蛋白酶;免疫组织化学;逆转录酶 PCR
中图法分类号:R394.3;R730.2;R735.7 **文献标识码**:A

Expression of cathepsin L in hepatocellular carcinoma

JIN Yun, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of cathepsin L in hepatocellular carcinoma and to analyze its relationship with clinical and pathological features. Methods Fifty-eight specimens of hepatocellular carcinoma were studied, including 18 well-differentiated, 18 moderately differentiated and 22 poorly differentiated. Classified by TNM clinical stage, 26 were in Ⅰ/Ⅱ stage and 32 in Ⅲ/Ⅳ stage. The expressions of cathepsin L were detected with immunohistochemistry and RT-PCR. Their relationship with the clinical and pathological features of hepatocellular carcinoma was analyzed. Results The positive rate of cathepsin L protein was 72.4% (42/58), and the expressions of cathepsin L protein were significantly different among the specimens of pathological grades of tumor, of TNM clinical stages and with/without metastasis. The positive rate of cathepsin L mRNA was 65.5% (38/58). The expression of cathepsin L mRNA in hepatocellular carcinoma was correlated with pathological grades of tumor, TNM clinical stages and lymph node metastasis. Conclusion Cathepsin L plays an important role in the occurrence of hepatocellular carcinoma for its correlation with infiltration and metastasis of hepatocellular carcinoma. Cathepsin L can be used as a useful marker for the prognosis of hepatocellular carcinoma patients.

Key words: hepatocellular carcinoma; cathepsin; immunohistochemistry; RT-PCR

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占我国原发性肝癌的 90% 以上,自 20 世纪 90 年代起,我国肝癌死亡率上升为癌症死亡的第 2 位,而且还有上升的趋势[1]。HCC 浸润和转移机制非常复杂,与多种癌基因和抑癌基因的表达调控及血管生成密切相关[2]。组织蛋白酶(cathepsin)是一种表达在细胞内,特别是溶酶体部分的一类蛋白酶,在直肠癌等肿瘤细胞中有高表达[3],但在 HCC 中的表达研究较少。本研究应用免疫组织化学染色和 RT-PCR 方法进行肝细胞癌中 cathepsin L 表达的检测,研究 cathepsin L 表达在 HCC 发生、发展和预后过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

cathepsin L 兔抗人抗体(Santa Cruz,美国),免疫组化染色试剂盒与 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术工程公司),显微照相及分析系统(Leica,德国)。

1.2 临床资料

收集 2004 年 1 月至 2006 年 12 月在我科手术切除的 HCC 标本 58 例(排除合并其他器官疾患的患者),其中男性 30 例,女性 28 例,年龄 36~68(50.9±9.2)岁,病理分级:高分化 18 例,中分化 18 例,低分化 22 例。临床分期Ⅰ~Ⅱ期 26 例,Ⅲ~

作者简介:晋 云,男,云南省昆明市人,博士,主治医师,主要从事肝癌防治方面的研究,现在成都军区昆明总医院肝胆外科工作。E-mail:colourcloud@126.com
通信作者:董家鸿,E-mail:dongjh301@163.com
收稿日期:2008-01-31;修回日期:2008-03-01

Ⅳ期32例。有转移(包括局部淋巴结转移、门静脉癌栓、远处转移)28例。肿瘤直径 < 5 cm 25例,≥ 5 cm 33例。

1.3 免疫组织化学染色

标本用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,5 μm厚连续切片,进行免疫组织化学染色,一抗 cathepsin L(1∶300),以PBS液代替一抗设阴性对照。步骤如下:切片脱腊水化,3% H_2O_2 孵育10 min,0.01 mol/L PBS冲洗;血清封闭液室温孵育10 min,加一抗4 ℃过夜,37 ℃孵育30 min,0.01 mol/L PBS冲洗;加生物素化二抗工作液37 ℃孵育30 min;0.01 mol/L PBS冲洗;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液37 ℃孵育30 min;PBS冲洗后DAB显色,苏木精复染,中性树胶封片。

阳性判定标准:阴性(-):癌细胞无着色,或浅黄色阳性范围 < 25%;弱阳性(+):少数或局灶性癌细胞淡黄色反应,阳性范围25% ~50%;阳性(++):癌细胞较弥漫性黄色反应,阳性范围50% ~75%;强阳性(+++):癌细胞弥漫性棕黄色着色,阳性范围大于75% 。

1.4 cathepsin L mRNA检测

1.4.1 RT-PCR 取100 mg冰冻组织,常规方法提取总RNA,按TaKaRa一步法RNA PCR试剂盒提供方法进行RT-PCR检测。cathepsin L引物序列:上游5′-CCGTGAGCCTCTGT-TTCT-3′,下游5′-TTTGACGAGCCAATACTT-3′,扩增片段长度为583 bp。PCR条件:50 ℃逆转录45 min,94 ℃变性2 min,52 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min,循环32次,末次充分延伸10 min。

1.4.2 电泳 扩增产物加溴酚蓝指示剂,于1.5%琼脂糖凝胶上电泳,紫外透射仪下观察、照相。

1.4.3 内参照 以GAPDH扩增产量作为内参照,基因引物序列:上游5′-AATCCCATCACCATCTTCC-3′,下游5′-CATCA-CGCCACAGTTTCC-3′,扩增片断长度为382 bp。

1.4.4 cathepsin L mRNA阳性判断标准 RT-PCR产物电泳后在紫外灯照射下出现583 bp的条带。

1.5 统计学处理

结果以例数及百分率(%)表示,采用SPSS 12.0软件进行 χ^2 检验分析。

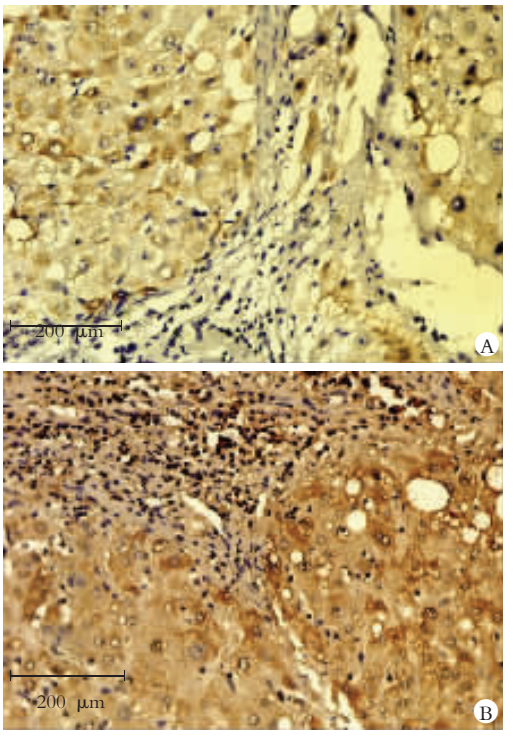
2 结果

2.1 肝细胞癌cathepsin L免疫组化染色结果

cathepsin L阳性染色主要位于肿瘤细胞细胞质中,为粗细不一的黄色或棕黄色颗粒,58例患者中42例为阳性,阳性率为72.4%。其中,弱阳性(+)7例,阳性(++)15例,强阳性20例(图1)。

2.2 cathepsin L表达与肝细胞癌临床病理关系

男性患者与女性患者cathepsin L表达阳性率分别为73.3%和71.4%,组间比较无显著差异($P>0.05$);< 50岁组29例肝癌中22例阳性,阳性率为75.9%,与≥ 50岁组无统计学差异($P>0.05$)。肿瘤直径分组统计结果无显著差异($P>0.05$)。不同病理分级统计中结果差异较大($P<0.01$),高分化肝癌、中分化肝癌和低分化肝癌的阳性率分别为22.2%、88.9%和100%,χ^2 检验结果提示不同分化肝癌阳性率有显著差异。临床分期不同,肝癌cathepsin L表达阳性率也有显著差异($P<0.01$)。转移的28例肝癌中27例cathepsin L表达阳性,显著高于未转移肝癌组($P<0.05$,表1)。



A:阳性表达; B:强阳性表达

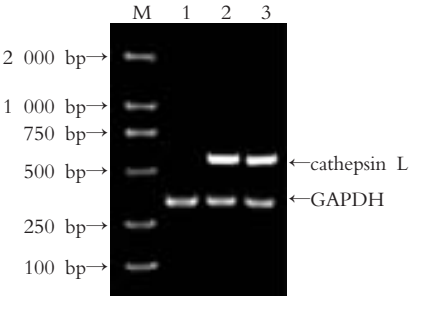
图1 肝细胞癌 cathepsin L 表达

表1 cathepsin L表达与肝细胞癌临床病理关系

项目	分类	n	蛋白表达阳性例数	cathepsin L阳性率(%)	χ^2值	P值
性别	男	30	22	73.3	0.026	>0.05
	女	28	20	71.4		
年龄	<50岁	29	22	75.9	0.345	>0.05
	≥50岁	29	20	69.0		
肿瘤直径	≥5.0 cm	25	18	72.0	0.004	>0.05
	<5.0 cm	33	24	72.7		
病理分级	高分化	18	4	22.2	33.526	<0.01
	中分化	18	16	88.9		
	低分化	22	22	100.0		
临床分期	Ⅰ-Ⅱ	26	11	42.3	21.382	<0.01
	Ⅲ-Ⅳ	32	31	96.9		
转移	+	28	27	96.4	15.628	<0.01
	-	30	15	50.0		

2.3 cathepsin L mRNA检测结果及与肿瘤临床病理特征的关系

58例肝细胞癌中38例(65.5%)表达阳性,不同临床分期、肿瘤病理分级及淋巴结远处转移cathepsin L mRNA检测结果显著不同(图2,表2)。



M: 标准; 1:阴性病例标本; 2、3:阳性病例标本

图2 肝细胞癌 cathepsin L 转录水平

表 2　cathepsin L mRNA 阳性与肝细胞癌临床病理关系

项目	分类	n	cathepsin L mRNA 表达阳性例数	阳性率(%)	χ^2值	P 值
性别	男	30	20	66.7	0.327	>0.05
	女	28	18	64.3		
年龄	<50 岁	29	19	65.5	1.000	>0.05
	≥50 岁	29	19	65.5		
肿瘤直径	≥5.0 cm	25	17	68.0	0.120	>0.05
	<5.0 cm	33	21	63.6		
病理分级	高分化	18	4	22.2	24.020	<0.01
	中分化	18	13	72.2		
	低分化	22	21	95.5		
临床分期	Ⅰ-Ⅱ	26	10	38.5	15.269	<0.01
	Ⅲ-Ⅳ	32	28	87.5		
转移	+	28	24	85.7	9.774	<0.01
	−	30	14	46.7		

3　讨论

在恶性肿瘤侵袭转移过程中,对基底膜的侵袭是其中的关键步骤,因为转移的过程中癌细胞需多次穿过基底膜和细胞外基质进入血管或淋巴管,到达远隔部位的肿瘤细胞再次穿过内皮基底膜进入基质,形成转移癌[4,5]。癌细胞中具有的多种蛋白水解酶参与此过程,如基质金属蛋白酶,丝氨酸蛋白水解酶(尿激酶、纤溶酶)及半胱氨酸蛋白酶(组织蛋白酶 B、D、L)等[6,7]。

cathepsin L 基因定位于 9q21-22,其蛋白在内质网中以前酶原的形式被合成,它包括 1 个信号序列、1 个前肽和 1 个酶的催化反应区。信号序列能让组织蛋白酶定位到高尔基体,并在此被高甘露糖碳水化合物糖基化,转化为 cathepsin L 酶原。这些碳水化合物可与 2 个 6 磷酸甘露糖受体中的 1 个结合,然后复合物被转运至前溶酶体中,此处的酸性环境可使酶和受体复合物分离并促进酶的激活,形成成熟的 cathepsin L[8]。cathepsin L 主要功能是降解蛋白,水解某些前体蛋白(酶原和激素原)生成其活性形式,或激活其他蛋白水解酶系统,从而参与机体的多种生理活动,如抗原递呈,激素前体活化、精子和卵子的发生、骨基质的降解、角质细胞分化、毛囊循环作用、中枢神经系统的成熟和发育等[9]。cathepsin L 的过表达与多种病理过程有关,如肾小球肾炎、骨质疏松症、类风湿性关节炎、肿瘤的侵袭和转移等[10],以多种机制参与调控肿瘤侵袭转移的过程[11,12]。

本研究采用免疫组化方法检测了 58 例 HCC 组织,42 例为 cathepsin L 阳性,占 72.4%,分组统计表明,cathepsin L 阳性表达率随 HCC 病理分级、临床分期增高而增高,提示 cathepsin L 蛋白的表达与 HCC 的恶性程度有关,可判断 HCC 的预后,转移组和未转移组的实验结果也佐证了以上结论。RT-PCR 结果显示,cathepsin L mRNA 阳性表达与肝癌分级、分期有关,肿瘤浸润程度较深、分化较差,cathepsin L mRNA 的水平就越高;有淋巴结转移的 cathepsin L mRNA 水平明显高于无转移组,说明 cathepsin L 与肝癌的转移潜力密切相关,参与了 HCC 的淋巴转移及远处转移过程。提示 cathepsin L 在 HCC 的生长浸润、侵袭转移中发挥重要作用,可作为 HCC 预后判断的客观指标之一。

参考文献:

[1] 焦　杨, 班克臣, 曹　骥, 等. 肝细胞癌组织中 β-Catenin 的表达与第三外显子突变的关系[J]. 癌症, 2007, 26(10): 1085 - 1089.

[2] Machida T, Takahashi T, Itoh T, *et al*. Reactive lymphoid hyperplasia of the liver: a case report and review of literature[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(40): 5403 - 5407.

[3] Hirakawa H, Pierce R A, Bingol-Karakoc G, *et al*. Cathepsin S deficiency confers protection from neonatal hyperoxia-induced lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(8): 778 - 785.

[4] Tang H, Li H, Lei S M, *et al*. Tissue specificity of a baculovirus-expressed, basement membrane-degrading protease in larvae of Heliothis virescens[J]. Tissue Cell, 2007, 39(6): 431 - 443.

[5] 赵守魁, 范正军, 王艳瑛, 等. 肝细胞癌组织中脆性组氨酸三联体和 Survivin 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(3): 557 - 560.

[6] Wootz H, Weber E, Korhonen L, *et al*. Altered distribution and levels of cathepsinD and cystatins in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice: possible roles in motor neuron survival [J]. Neuroscience, 2006, 143(2): 419 - 430.

[7] Castino R, Bellio N, Nicotra G, *et al*. Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(9): 1305 - 1316.

[8] Goulet B, Sansregret L, Leduy L, *et al*. Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(9): 899 - 907.

[9] Hook V Y. Unique neuronal functions of cathepsin L and cathepsin B in secretory vesicles: biosynthesis of peptides in neurotransmission and neurodegenerative disease[J]. Biol Chem, 2006, 387(10 - 11): 1429 - 1439.

[10] Lang T H, Willinger U, Holzer G. Soluble cathepsin-L: a marker of bone resorption and bone density[J]. J Lab Clin Med, 2004, 144(3): 163 - 166.

[11] Jagodic M, Vrhovec I, Borstnar S, *et al*. Prognostic and predictive value of cathepsins D and L in operable breast cancer patients[J]. Neoplasma, 2005, 52(1): 1 - 9.

[12] Niedergethmann M, Wostbrock B, Sturm J W, *et al*. Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma[J]. Pancreas, 2004, 29(3): 204 - 211.

(编辑　栗　嘉)