论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0156-04

thy-1 与 c-kit 在肝癌中的表达与其分化程度的关系

程变巧,江 艺,李东良 (350025 福州,南京军区福州总医院肝病中心)

【摘要】 **目的** 探讨 thy-1 与 c-kit 在肝癌中表达能否作为预测肝癌发生、发展的指标。**方法** 免疫组化观察 50 例原发性肝癌及配对癌周组织中 thy-1 与 c-kit 的表达定位、与肝癌分化程度的关系及二者在肝癌中表达的相关性,ELISA 观察 53 例原发性肝癌外周血中二者表达的相关性。**结果** (1)免疫组织化学检测:thy-1 与 c-kit 均表达在细胞质,染色强度从癌周组织-高分化-中低分化肝癌中呈逐步增强趋势,在癌周组织中表达显著低于在肝癌组织中表达,组间比较差异显著(χ^2 = 17.761,27.656,P = 0.000);二者在肝癌中表达与其分化程度有关,在高分化肝癌中表达均低于在中低分化肝癌中表达,组间比较差异显著(χ^2 = 20.592,8.239,P = 0.000,0.041)。thy-1 与 c-kit 在肝癌中表达呈显著正相关(r = 0.333,P = 0.018),其中二者共阳性表达的 42 例肝癌标本中,高分化肝癌 15 例,中低分化肝癌 27 例,组间比较差异显著(χ^2 = 10.258,P = 0.023)。(2) ELISA 检测示 thy-1 与 c-kit 在肝癌外周血中表达呈显著正相关(r = 0.443,P = 0.001)。**结论** thy-1与 c-kit 在肝癌中的联合表达可作为肝癌发展及预后的指标。

【关键词】 thy-1;c-kit;肝癌;卵圆细胞;分化程度
【中图法分类号】 R394.2;R730.23;R735.7 【文献标志码】 A

Correlation of thy-1 and c-kit expressions with tumor differentiation in liver cancer

Cheng Bianqiao, Jiang Yi, Li Dongliang (Center of Hepatopathy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian Province, 350025, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate whether the expressions of thy-1 and c-kit in liver cancer could predict the incidence and development of liver cancer. **Methods** Immunohistochemistry was carried out to detect the expressions and locations of thy-1 and c-kit in 50 liver cancer samples (19 samples of well differentiation and 31 samples of moderate/poor differentiation) and peri-tmorous normal tissues, and the results were analyzed with tumor differentiation degree. ELISA was employed to measure the c-kit and thy-1 levels in the serum samples of 53 patients with identified primary liver cancer. The results was also analyzed. **Results** Positive staining of thy-1 and c-kit were mainly in the cytoplasm, and the staining intensity was increasing from peri-tumourous normal tissue to well-differentiated and then to poorly differentiated hepatocarcinoma. Higher expressions of thy-1 and c-kit were found in liver cancer samples than in peri-tumorous normal tissues, with significant difference (Chi square = 17.761, 27.656, P = 0.000). Their expressions were correlated with tumor differentiation, and higher in well-differentiated liver cancer than in poorly differentiated (Chi square = 20.592, 8.239, P = 0.000, 0.041). The expression of thy-1 had a positive relationship with that of c-kit in liver cancer tissue (r = 0.333, P = 0.018). In the 42 liver cancer tissues with co-expression of thy-1 and c-kit, there was 15 of well differentiation and 27 of poor differentiation (Chi square = 10.258, P = 0.023). ELISA also showed that a positive relationship was found in the serum expressions of thy-1 and c-kit (r = 0.443, P = 0.001). **Conclusion** Our results show that the co-expression of thy-1 and c-kit might be used as marker for development and prognosis of liver cancer.

【**Key words**】 thy-1;c-kit;liver cancer;oval cells;differentiated degree

Corresponding author: Jiang Yi, E-mail: jiangyi183@yahoo.com.cn

随着乙肝病毒感染人群的逐步增多,由此引发的肝癌的发生率也呈逐步上升趋势。研究表明,乙肝病毒感染引发肝癌与卵圆细胞的分化异常有关[1-3]。作为卵圆细胞的表面标记蛋白,有研究认为 thy-1$^+$ 和 c-kit$^+$ 的肝癌细胞裸鼠接种成瘤性明显大于 thy-1$^-$ 和 c-kit$^-$ 的肝癌细胞,初步显示出了肝癌干细胞的特性[4-8],但对二者在肝癌中的作用机制还少见相关文献报道。目前研究认为肿瘤干细胞在肿瘤的发生及预后等过程中起着决定性作用[9]。本研究旨在探讨 thy-1 和 c-kit 在肝癌组织和外周血清中的表达情况及

【通信作者】 江 艺,E-mail:jiangyi183@yahoo.com.cn

二者的相关性,能否作为预测肝癌发生、发展的指标。

1 资料与方法

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 标本来源 选取 2008 年 1 月至 2010 年 6 月本院外科手术切除的经病理检查证实的石蜡包埋原发性肝癌标本 50 例。其中高分化肝细胞性肝癌 19 例,中低分化性肝癌 31 例。肝切除标本 4 例,手术切除标本 46 例。男性 46 例,女性 4 例,年龄 34 ~ 76(51 ± 6)岁。均为乙肝病毒感染患者,且 HBsAg 阳性。标本均经 10% 甲醛固定、常规石蜡包埋,作 3 μm 连续切片待测。53 例 ELISA 原发性肝癌血清标本为肝胆外科及肝胆内科住院的乙肝感染的肝癌患者,年龄 28 ~ 62(35 ± 9)岁。以癌周 5 cm 外的组织为癌周对照组织。所有标本根据影像学及临床表现或既往手术切除标本病理证实。肝癌组织标本和血清标本均经南京军区福州总院学术伦理委员会批准和患者知情同意。

1.1.2 主要试剂 鼠抗 thy-1 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),鼠抗 c-kit 、即用型 S-P 试剂盒、20 × DAB 显色试剂盒(福州迈新生物有限公司),thy-1、c-kit ELISA 试剂盒(R&D 公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 组织切片在 60 ℃烤箱过夜。按照 S-P 试剂盒说明书进行。①常规脱蜡及水化:二甲苯Ⅰ 10 min-二甲苯Ⅱ 10 min-二甲苯Ⅲ 10 min-无水乙醇 10 min-0.95 乙醇5 min-0.9 乙醇 5 min-0.85 乙醇 5 min,水化 5 min。②抗原修复:组织浸于 0.1 mol/L 枸橼酸溶液(pH 6.0),微波炉进行抗原修复 2 min。③过氧化氢酶阻断剂:室温下孵育 10 min。④正常非免疫动物血清室温下封闭 10 min,加入 thy-1 和 c-kit(稀释浓度 1∶200),以 PBS 作为一抗作为阴性对照组,4 ℃孵育过夜。⑤加入相应的二抗室温下 10 min,链霉素抗生物素-过氧化物酶室温下孵育 10 min,后进行 DAB 显色,苏木精复染及中性树胶封片等。

1.2.2 ELISA 检测 按照说明书进行。分别设空白孔,标准品孔和样品孔。在酶标包被板上标准孔中加入稀释好的标准品 50 μl,样品孔中先加入 40 μl 样品稀释液,再加入 10 μl 样品,轻轻晃动混匀后 37 ℃温育 30 min。弃去液体,甩干后加入洗涤液,振荡 30 s,甩去液体,重复 5 次。每孔加入酶标试剂 50 μl,空白孔除外,轻晃混匀,37 ℃温育 30 min。弃去液体,甩干后加入洗涤液,振荡 30 s,甩去液体,重复 5 次。每孔依次加入显色剂 A 和 B 各 50 μl,轻晃混匀,37 ℃避光显色 10 min,取出酶标板,每孔加入终止液 50 μl,终止反应。上机检测,以空白孔调零,在 450 nm 波长下测量各孔 D(450)值。根据标准孔浓度和对应的 D(450)值计算标准回归方程,再根据样品的 D(450)值在回归方程上算出对应样品浓度。

1.2.3 表达强度判断标准 原发性肝癌组织和癌周组织中阳性细胞检测参照 Fromowitz 等[10]的评分标准,随即选取 5 个高倍视野(×400)计数肿瘤细胞总数和阳性细胞数,得出阳性细胞百分率,当肝癌组织中存在不同分化程度的区域时,选择同一肿瘤组织切片中占优势分化程度的肿瘤区域进行计数统计[11],阳性细胞率≤0.25 记为 0 分,0.26 ~ 0.5 为 1 分,0.51 ~ 0.75 为 2 分,>0.75 为 3 分;再按多数阳性细胞呈现的染色强度予以记分:无显色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将上述两项得分相加 0 分判为“ - ”,1 ~ 2 分判为“ + ”,3 ~ 4 分判为“ ++ ”,5 ~ 6 分判为“ +++ ”。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,不同组表达强度差异用等级资料非参数检验,同一表达强度组间比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法,组间比较采用 Spearman 等级相关分析法。

2 结果

2.1 thy-1 及 c-kit 在肝癌中的表达情况

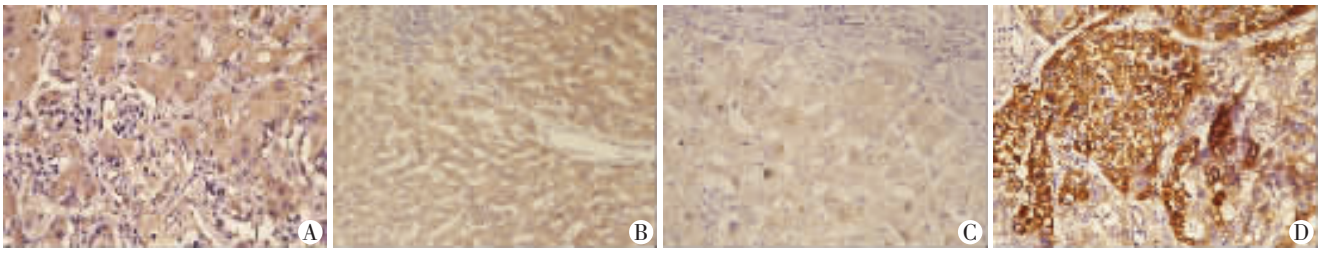
thy-1 及 c-kit 都主要表达于细胞质。二者的染色强度从癌周组织-高分化肝癌-中低分化肝癌组织呈现逐步加强趋势。thy-1 在 0.50(25/50)的癌周组织有不同程度的表达,而肝癌组织中的表达为 0.88(44/50),差异有显著统计学意义(χ^2 = 17.761, P = 0.000)。c-kit 在癌周组织中的阳性率为 0.40(20/50),肝癌组织中的阳性率为 0.88(44/50),差异有统计学意义(χ^2 = 27.656, P = 0.000)。见图 1,表 1。

表 1 thy-1 及 c-kit 在肝癌及癌周组织中的表达

组织	c-kit				χ^2	P	thy-1				χ^2	P
	-	+	++	+++			-	+	++	+++		
癌周	30	10	5	5			25	10	8	7		
肝癌	6	14	21	9	27.656	0.000	6	16	19	9	17.761	0.000

2.2 c-kit 及 thy-1 在肝癌中的表达与其分化程度的比较

c-kit 在高分化肝癌中的阳性率为 0.789(15/19),在中低分化肝癌中的阳性率为 0.935(29/31),差异有显著统计学意义(χ^2 = 20.592, P = 0.000)。thy-1 在高分化肝癌中阳性表达为 0.789 (15/19),在中低分化肝癌中的阳性率为 0.935 (29/31),差异有统计学意义(χ^2 = 8.239, P = 0.041)。见表 2。



A:thy-1 在中低分化肝癌中强表达(×200);B:thy-1 在癌周组织中弱表达(×100);C:c-kit 在癌周组织中弱表达 (×200);D:c-kit 在中低分化肝癌中强表达 (×200)

图 1 免疫组织化学检测 thy-1 与 c-kit 在肝癌中的表达 (S-P)

表2 thy-1及c-kit在高中低分化肝癌中的表达

组织	c-kit				χ^2	P	thy				χ^2	P
	−	+	++	+++			−	+	++	+++		
高	4	11	4	0			4	8	3	4		
中低	2	3	17	9	20.592	0.000	2	7	17	5	8.239	0.041

2.3 c-kit及thy-1在肝癌中表达相关性分析

免疫组化检测示50例肝癌标本中，thy-1与c-kit二者共阳性者42例，共阴性4例。thy-1阳性而c-kit阴性者2例，thy-1阴性而c-kit阳性者2例。二者在肝癌中表达呈显著正相关（$r=0.333$，$P=0.018$）。在高分化肝癌中二者共阳性者15例，在中低分化肝癌肿中二者共阳性者27例，组间比较（$\chi^2=10.258$，$P=0.023$）。为了进一步了解二者在临床中的关系，ELISA检测53例肝癌血清标本，thy-1表达为（3.694±2.961）U/ml，c-kit为（3.235±2.118）U/ml，二者呈显著正相关（$r=0.443$，$P=0.001$）。

3 讨论

并非所有肿瘤细胞都有成瘤的能力，只有极少数具有癌细胞和干细胞的特征，它们通过自我更新和多向分化决定着肿瘤的发生、发展、侵袭和早期转移以及术后复发等生物学行为，这就是肿瘤干细胞学说[12]。目前对肝癌的研究认为肝癌干细胞有两种来源：一种为肝干细胞分化受阻学说，一种为成熟肝细胞去分化学说。而多数学者更倾向于前一种学说。卵圆细胞是肝干细胞，在一定诱癌剂的作用下可分化为肝癌干细胞。卵圆细胞有多种表面标记蛋白，包括胆管上皮细胞角蛋白CK7、CK8、CK14、CK18、CK19，功能性蛋白标记物甲胎蛋白AFP和γ-谷氨酰转肽酶，以及常见干细胞标记，如CD34、thy-1、c-kit。目前对肝癌干细胞的研究认为thy-1、c-kit初步具有肝癌干细胞的生物学特性，但二者与肝癌发生、发展的关系以及对肝癌预后的评估还少见相关文献报道。

thy-1是一种细胞表面糖蛋白分子，相对分子质量为（20～30）×10^3，主要参与细胞与细胞或细胞与基质之间的相互作用[13]。Thy-1主要表达在骨髓间充质干细胞[14]、肾脏干细胞表面[15]，以及其他造血干细胞表面，常作为各种干细胞的表面标记蛋白。Thy-1作为卵圆细胞的表面标记蛋白，认为$CD45^-/Thy\text{-}1^+$的肝癌细胞成瘤性明显高于对应细胞亚群，同时$Thy\text{-}1^+CD44^+$肝癌细胞较$Thy\text{-}1^+CD44^-$肝癌细胞表现出更高的早期侵袭、转移行为[16-17]。c-kit基因位于人染色体4q12-13，属于原癌基因，其受体分布于细胞表面，结构类似于粒-巨核细胞集落刺激因子和血小板源生长因子受体，是干细胞因子受体[18]。本研究运用免疫组织化学检测thy-1及c-kit在50例原发性肝癌组织中的表达，发现thy-1和c-kit在肝癌中的染色强度0.88（44/50）显著高于癌周正常组织中的染色强度0.40～0.50[（20～25）/50]，且在高分化中的染色强度0.789（15/19）有显著弱于在中低分化肝癌中的染色强度0.935（29/31）。这与文献[19]结果一致，这说明thy-1和c-kit的升高表达与肝癌的分化程度呈显著正相关。肿瘤的发生是一个复杂的多基因多步骤的过程，往往一个基因的突变或失活还不足以引起肿瘤的发生，因此进行多基因多位点的研究是肿瘤治疗的关键。本课题对thy-1与c-kit在肝癌中表达的相关性研究发现，二者在肝癌中的表达显示出明显的正相关（$r=0.333$，$P=0.018$），且二者在中低分化肝癌中的共表达显著高于在高分化肝癌中的共表达。从血清学角度进一步研究二者表达与肝癌的关系（$r=0.443$，$P=0.001$），得出与组织学相同的结果。可初步认为thy-1与c-kit的表达可联合作为预测肝癌发生、发展以及预后的指标。

本研究从组织学和血清学角度发现thy-1与c-kit在肝癌中的强阳性以及在高分化肝癌中的表达显著低于在中低分化中的表达，且二者呈显著正相关关系，表明二者可共同作为预测肝癌发生的指标。但是了解肝癌发生的机制不能仅凭几个基因的改变，还需要研究更多的基因与肝癌的关系。其次，肝癌的治疗不理想归根于肿瘤干细胞的存在，只有了解后者的生物学机制并采取合适的靶向治疗才是肝癌治疗的基础。

参考文献：

[1] Hsia C C, Evarts R P, Nakatsukasa H, *et al*. Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 1992, 16(6): 1327-1333.

[2] Hsia C C, Thorgeirsson S S, Tabor E. Expression of hepatitis B surface and core antigens and transforming growth factor-alpha in "oval cells" of the liver in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Med Virol, 1994, 43(3): 216-221.

[3] 王艳军，梁慧芳，陈孝平，等. 乙型肝炎病毒X基因诱导卵圆细胞恶性转化的研究[J]. 中华外科杂志，2009，47(18)：1410-1414.

[4] Yang Z F, Ho D W, Ng M N, *et al*. Significance of $CD90^+$ cancer stem cells in human liver cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(2): 153-166.

[5] 王阁，索金友，邓婧，等. 原发性肝癌不同病理组织类型中肝干细胞的起源分析[J]. 第三军医大学学报，2006，28(2)：114-116.

[6] Lee E S, Han E M, Kim Y S, *et al*. Occurrence of $c\text{-kit}^+$ tumor cells in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(1): 31-36.

[7] 周思朗，李鹏，曹漫明，等. 大鼠肝癌干细胞生物学行为研究[J]. 中华肝脏病杂志，2006，14(5)：364-366.

[8] 颜政，方驰华，高鹏. 人原发肝细胞癌干细胞表面标志的初步研究[J]. 南方医科大学学报，2006，26(9)：1304-1306.

[9] 卞修武. 对肿瘤研究前沿之肿瘤干细胞的几点认识[J]. 第三军医大学学报，2008，30(11)：995-997.

[10] Fromowitz F B, Viola M V, Chao S, *et al*. ras p21 expression in the progression of breast cancer[J]. Hum Pathol, 1987, 18(12): 1268-1275.

[11] Jawhari A, Jordan S, Poole S, *et al*. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship

with patient survival[J]. Gastroenterology, 1997, 112(1): 46-54.
[12] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al*. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
[13] Rege T A, Hagood J S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis[J]. FASEB J, 2006, 20(8): 1045-1054.
[14] 刘东宁，阴正勤，吴楠，等. Long-Evans大鼠骨髓间充质干细胞分离培养及生物学特性研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(15)：1441-1443.
[15] 卫静，袁发焕，周剑峰，等. BMP-7基因修饰的骨髓间充质干细胞在小鼠肾脏内的表达[J]. 第三军医大学学报，2008，30(10)：906-909.
[16] Yang Z F, Ngai P, Ho D W, *et al*. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer[J]. Hepatology, 2008, 47(3): 919-928.
[17] 陈晋峰，张力建，赵爱莲，等. Thy-1肿瘤标记物在肺癌组织中的异常表达及其对肺癌患者预后的影响[J]. 中华医学杂志，2005，85(27)：1921-1925.
[18] Mansuroglu T, Baumhoer D, Dudas J, *et al*. Expression of stem cell factor receptor c-kit in human nontumoral and tumoral hepatic cells[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009, 21(10): 1206-1211.
[19] Ceafalan L, Vidulescu C, Radu E, *et al*. Expression of stem cell markers on fetal and tumoral human liver cells in primary culture[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2005, 109(1): 96-104.

（收稿：2010-08-04 修回：2010-10-21）
（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2011)02-0159-01

个案与短篇

鼻内镜辅助低温等离子腺样体消融术与传统腺样体刮除术82例临床分析

肖 斌，何 芸，李 洁，於建东，古金碧，张朝梅 （402260 重庆，重庆市江津区中心医院耳鼻喉科）

【关键词】 低温等离子消融；腺样体；鼻内镜
【中图法分类号】 R767.05 【文献标志码】 B

儿童腺样体肥大导致鼻咽部狭窄，同时还可引起分泌性中耳炎及听力障碍和儿童阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征，治疗不当可影响儿童智力和面部正常发育。随着对儿童腺样体肥大危害认识的加深和更科学更微创的低温等离子消融设备的出现[1]，以往传统的腺样体刮除术由于操作盲目、易残留及损伤周围组织[2-3]，已逐渐被新的手术方式所取代。我院2007年12月至2009年12月共收治82例腺样体肥大患者，应用鼻内镜辅助低温等离子腺样体消融术与传统腺样体刮除术进行治疗，疗效较好，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者82例，其中男性49例，女性33例，年龄2~15岁，平均5.7岁。腺样体肥大伴扁桃体肥大者79例，单纯腺样体肥大者3例，其中腺样体及扁桃体肥大伴渗出性中耳炎者5例。症状主要为鼻塞、张口呼吸、打鼾，伴渗出性中耳炎者有听力下降。术前均经鼻咽侧位片、鼻内镜证实腺样体肥大Ⅰ~Ⅲ度[4-5]；伴渗出性中耳炎者鼓室积液双侧1例，单侧4例，这5例行纯音测听均显示传导性聋；声导抗测试鼓室曲线呈B型4例，C型1例，镫骨肌反射消失。

1.2 手术方法

采用Stryker（美国）30°、70°内镜及摄像、显像系统，低温等离子用DNR（长沙 Oushi）。手术采用气管插管静脉复合麻醉。根据病情先用低温等离子行扁桃体切除术。患者取侧卧位，上Davis开口器，以腺样体切除器及腺样体刮匙经口腔行腺样体刮除术，压迫止血。再由同一术者经双侧鼻腔分别插入导尿管，向前、上提拉悬雍垂，以30°、70°内镜显露鼻咽部，吸尽腺样体表面及后鼻孔处的分泌物后，辨认是否有残余的腺样体及咽鼓管圆枕、咽隐窝、咽鼓管咽口、咽鼓管腭、咽鼔等解剖结构的损伤，再以低温等离子消融残余的腺样体（使用0.1~0.40 mhs能量级，插入深度2~5 mm，作用2~5 s，见腺样体组织发白、体积缩小即可，如未达到减容目的可重复1~2次）[1,6]。本组中有79例同时行了扁桃体切除术，伴分泌性中耳炎患者均未行鼓膜切开置管术。

2 结果

腺样体刮除术后立即用鼻窦内窥镜检查，发现82例中79例有鼻后孔部腺样体残留，68例邻近咽鼓管圆枕处腺样体有残留，未见咽鼓管咽口和咽鼓管圆枕损伤。再经鼻内镜引导下行残留腺样体低温等离子消融后无残留和出血。82例均随诊半年以上，无1例发生术后并发症，无1例需再手术，未见复发者。患者鼻塞、张口呼吸、打鼾症状消失，分泌性中耳炎者听力均改善，平均听力提高25 dB。

3 讨论

据Havas等[2-3]报道传统的腺样体刮除术由于操作盲目，容易导致腺样体残留或邻近结构误伤，出血。为克服手术的盲目性，近几年，各种新型腺样体手术方式不断涌现，包刮经鼻内镜电动负压切割切除，鼻内镜辅助经鼻腔等离子消融术，以及本研究介绍的鼻内镜辅助经口腔腺样体等离子消融术。本组病例全部先以腺样体切除器及腺样体刮匙经口腔行腺样体刮除术，压迫止血后由同一术者采用鼻内镜辅助经口腔入路检查处理残余腺样体。本组病例在传统的腺样体刮除术后内镜检查发现82例中79例有鼻后孔部腺样体残留，68例邻近咽鼓管圆枕处腺样体有残留，未见咽鼓管咽口和咽鼓管圆枕损伤。原因考虑为鼻后孔部、邻近咽鼓管圆枕处刮匙难以达到，同时非直观性操作术者怕损伤咽鼓管圆枕及咽鼓管咽口所致。经口腔

【通信作者】 肖 斌，电话：(023)47538622，E-mail：xb548781@163.com

（下转168页）