论著

文章编号:1000-5404(2011)14-1476-04

PPAR-γ和PTEN在肝细胞癌组织中的表达及预后价值

张 萌,何宏涛,周 烨,徐 卓,杨 涛,梁占强,彭 利 (050011 石家庄,河北医科大学第四医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 探讨人肝细胞癌组织中PPAR-γ和PTEN蛋白的表达及其临床意义。**方法** 应用免疫组织化学方法检测78例肝细胞癌及21例正常肝组织中PPAR-γ和PTEN蛋白的表达,分析其与肝细胞癌临床病理特征及预后的关系。**结果** 肝细胞癌组织中PPAR-γ蛋白的阳性表达率为51.3%,显著高于正常肝组织(19.0%,$P<0.05$),PTEN蛋白的高表达率为42.3%,显著低于正常肝组织(90.5%,$P<0.05$)。PPAR-γ蛋白的表达与肿瘤直径、门静脉癌栓及TNM分期有关($P<0.05$);PTEN蛋白的表达与肿瘤直径、门静脉癌栓、淋巴结转移及TNM分期有关($P<0.05$,$P<0.01$)。PPAR-γ与PTEN蛋白表达无明显相关性($r=-0.100$, $P=0.384$)。PTEN蛋白低表达患者术后生存率低于高表达患者($P=0.000$);PPAR-γ蛋白的表达与患者术后生存率无关($P=0.175$)。COX模型多因素分析结果显示,TNM分期是影响肝细胞癌预后的独立因素。**结论** 肝细胞癌组织中PPAR-γ和PTEN蛋白的表达水平与肝细胞癌的恶性生物学行为密切相关,PTEN有助于评价患者预后。

[关键词] 癌,肝细胞;免疫组织化学;PPAR-γ;PTEN

[中图法分类号] R730.2;R735.7;R341 [文献标志码] A

Expression and prognostic significance of PPAR-γ and PTEN protein in hepatocellular carcinoma

Zhang Meng, He Hongtao, Zhou Ye, Xu Zhuo, Yang Tao, Liang Zhanqiang, Peng Li (Department of Hepatobiliary Surgery, Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province, 050011, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR-γ) and phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN) protein in hepatocellular carcinoma (HCC), and to elucidate their clinical significance. **Methods** Immunohistochemical analysis was performed to detect the expression of PPAR-γ and PTEN protein in 78 specimens of HCC tissues and 21 specimens of normal hepatic tissues. The relationship of their expression with the clinicopathological characteristics and prognosis of HCC was analyzed. **Results** The positive expression rate of PPAR-γ (51.3%) in HCC tissues was significantly higher than that (19.0%) in normal hepatic tissues ($P<0.05$). The high expression rate of PTEN in HCC tissues (42.3%) was significantly lower than that (90.5%) in normal hepatic tissue ($P<0.05$). The PPAR-γ expression was correlated with tumor size and portal vein tumorous thrombus ($P<0.05$) as well as tumor-node-metastasis (TNM) stage ($P<0.01$). The PTEN expression was correlated with tumor size, portal vein tumorous thrombus, and invasion or lymph node metastasis ($P<0.05$) as well as TNM stage ($P<0.01$). No significant correlation was observed between PPAR-γ expression and PTEN expression in HCC tissues ($r=-0.100$, $P=0.384$). Patients with low PTEN expression had significantly worse postoperative survival than those with high PTEN expression ($P=0.000$, Log-rank test). However, PPAR-γ expression was not significantly correlated with the postoperative survival of HCC patients ($P=0.175$, Log-rank test). A multivariate analysis based on COX regression model demonstrated that TNM stage was an independent factor affecting prognosis of HCC. **Conclusion** The expression levels of PPAR-γ and PTEN protein are closely related to the malignant biological behavior of HCC. PTEN is helpful to evaluate prognosis.

[基金项目] 河北省普通高校强势特色学科建设基金(2005-52);河北省卫生厅资助课题(06142)

[通信作者] 彭 利,电话:(0311)86095340, E-mail: pengli72@sina.com

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; immunohistochemestry; PPAR-γ; PTEN

Supported by the Foundation of Strong Characteristic Discipline of Colleges and Universities of Hebei Province(2005-52) and the Project of Health Department of Hebei Province(06142). Corresponding author:Peng Li, Tel:86-311-86095340, E-mail: pengli72@sina.com

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ, PPAR-γ)与人类恶性肿瘤的关系及其配体的治疗作用正受到广泛的关注,研究发现,PPAR-γ 激动剂具有抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤血管生成,降低肿瘤侵袭力等作用[1],相关研究认为此类作用与 PPAR-γ 激活后通过多种途径调控癌基因和抑癌基因有密切关系,第 10 号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源物基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)有可能参与其中。我们的前期实验发现,PPAR-γ 激活后可上调肝癌 SMMC-7721 细胞中 PTEN 蛋白的表达[2]。本实验采用免疫组织化学方法联合检测肝细胞癌及正常肝组织中 PPAR-γ 和 PTEN 蛋白的表达,分析其与肝细胞癌临床病理特征及预后的关系,初步探讨它们在肝细胞癌中表达的意义及预后价值。

1 材料与方法

1.1 组织标本来源及一般资料

收集河北医科大学第四医院肝胆外科 2004 年 10 月至 2007 年 12 月间手术切除并经病理证实的随访资料完整的肝细胞癌标本 78 例。所有患者术前未经任何抗肿瘤治疗。其中男性 71 例,女性 7 例,年龄 30~73 岁,中位年龄 56 岁。标本切除离体立即固定于 10% 中性甲醛溶液,石蜡包埋。78 例肝细胞癌组织中,36 例直径≤5 cm,42 例直径 >5 cm;侵及邻近脏器或淋巴结转移共 12 例,未侵及邻近脏器或无淋巴结转移 66 例;有门静脉瘤栓 9 例,无门静脉瘤栓 69 例;66 例为单发肿瘤,12 例为肝内多发肿瘤。临床分期根据 TNM 分期,Ⅰ期 2 例,Ⅱ期 31 例,Ⅲ期 44 例,Ⅳ期 1 例。另取肝血管瘤患者之肝组织 21 例作为对照。由两位有经验病理医师进行病理组织学诊断。

1.2 主要试剂

PPAR-γ(E-8)鼠抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,PTEN 兔抗人单克隆抗体购自美国 Epitomics 公司。即用型非生物素免疫组化 EliVision™ super 检测试剂盒(KIT-9922)、即用型快捷免疫组化 MaxVision™2 试剂盒(KIT-5920)均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组织化学染色方法

采用免疫组织化学一步法(EliVision™ super 检测试剂盒)。切片均用 2% APES 处理,4 μm 连续切片。使用枸橼酸盐缓冲液抗原热修复。PPAR-γ 和 PTEN 抗体均以 1∶100 稀释。以 PBS 代替一抗作为阴性对照;以已知阳性的乳腺癌切片作为 PPAR-γ 的阳性对照;以已知阳性的甲状腺癌切片作为 PTEN 的阳性对照。

1.4 结果判定

根据阳性细胞所占比例并参照相关文献进行结果判定。每张切片观察 10 个高倍镜视野,每个高倍镜视野计数 100 个肿瘤细胞,综合判断阳性细胞染色数和染色强度。PPAR-γ 蛋白参照文献[3]判定标准,阳性细胞所占比例 <10% 者为阴性,≥10% 者为阳性。PTEN 参照文献[4]判定标准,阳性细胞 <30% 为低表达,≥30% 为高表达。

1.5 随访及统计学分析

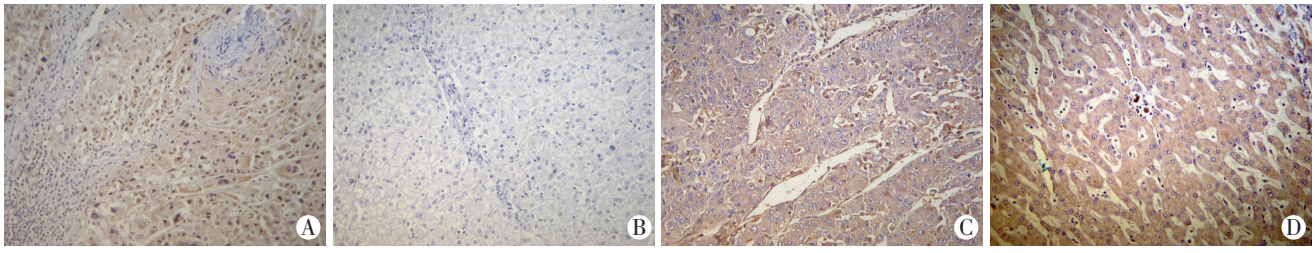
纳入本研究的所有病例有完整随访资料,研究自手术之日起,至本研究结束(2010-1-1)止,随访时间单位为月,研究终点(阳性结局)定义为患者因肝癌或相应并发症死亡,研究结束时仍未出现阳性结局者定为删失。随访时间 1.0~61.3 个月,中位随访时间为 26.1 个月。

计数资料阳性率之间的比较采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率计算法;相关分析采用 Spearman 相关分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 生存曲线,并经 Log-rank 检验。多因素分析采用 COX 模型。采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。

2 结果

2.1 PPAR-γ 和 PTEN 蛋白在肝细胞癌组织中的表达

PPAR-γ 蛋白阳性染色集中于细胞核,少数为胞核、胞质均着色,呈棕黄色至深棕色粗颗粒状;PTEN 蛋白以细胞质内出现棕黄色或棕褐色细颗粒为阳性(图 1)。PPAR-γ 蛋白在肝细胞癌组织中的阳性表达率为 51.3%,21 例正常肝组织中的阳性表达率为 19.0%,差异有统计学意义($P<0.05$)。PTEN 蛋白在肝细胞癌组织中的高表达率为 42.3%,在正常肝组织中的高表达率为 90.5%,差异有统计学意义($P<0.05$)。



A: PPAR-γ 在肝细胞癌中阳性表达;B:PPAR-γ 在正常肝组织中阴性表达;C: PTEN 在肝细胞癌中低表达;D:PTEN 在正常肝组织中高表达

图 1 PPAR-γ 和 PTEN 蛋白在不同组织中的表达 (IHC ×200)

2.2 PPAR-γ和PTEN蛋白在肝细胞癌组织中表达的相关性

PPAR-γ与PTEN蛋白在肝细胞癌组织中的表达无明显相关性($r = -0.100$, $P = 0.384$)。

2.3 PPAR-γ和PTEN蛋白在肝细胞癌组织中的表达与临床病理特征的关系

PPAR-γ蛋白的表达水平与肿瘤直径、门静脉癌栓、TNM分期有关($P<0.05$, $P<0.01$)。PPAR-γ蛋白表达在患者年龄、性别、肿瘤数目、有否转移各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

PTEN蛋白的表达水平与肿瘤直径、门静脉癌栓、淋巴结转移、TNM分期有关($P<0.05$, $P<0.01$),分期越晚高表达率越低。PTEN蛋白表达在患者年龄、性别、肿瘤数目各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 PPAR-γ和PTEN蛋白在肝细胞癌中的表达与临床病理特征的关系[例数(%)]

临床病理特征	例	PPAR-γ				PTEN			
		阳性	阴性	χ^2	P	低表达	高表达	χ^2	P
年龄(岁)				0.847	0.433			0.000	1.000
≤50	19	8(42.1)	11(57.9)			11(57.9)	8(42.1)		
>50	59	32(54.2)	27(45.8)			34(57.6)	25(42.4)		
性别				0.000	1.000			0.000	1.000
男	71	36(50.7)	35(49.3)			41(57.7)	30(42.3)		
女	7	4(57.1)	3(42.9)			4(57.1)	3(42.9)		
肿瘤直径				8.621	0.006			20.171	0.000
≤5 cm	36	12(33.3)	24(66.7)			11(30.6)	25(69.4)		
>5 cm	42	28(66.7)	14(33.3)			34(81.0)	8(19.0)		
肿瘤数目				3.193	0.116			1.492	0.341
单发	66	31(47.0)	35(53.0)			40(60.6)	26(39.4)		
多发	12	9(75.0)	3(25.0)			5(41.7)	7(58.3)		
门静脉癌栓				4.183	0.041			5.630	0.018
有	9	8(88.9)	1(11.1)			9(100.0)	0(0)		
无	69	32(46.4)	37(53.6)			36(52.2)	33(47.8)		
淋巴结转移				0.525	0.541			10.400	0.001
有	12	5(41.7)	7(58.3)			12(100.0)	0(0)		
无	66	35(53.0)	31(47.0)			33(50.0)	33(50.0)		
TNM分期				12.398	0.002			26.901	0.000
Ⅰ	2	1(50.0)	1(50.0)			0(0)	2(100.0)		
Ⅱ	31	9(29.0)	22(71.0)			8(25.8)	23(74.2)		
Ⅲ	44	30(68.2)	14(31.8)			36(81.8)	8(18.2)		
Ⅳ	1	0(0)	1(100.0)			1(100.0)	0(0)		

2.4 PPAR-γ和PTEN蛋白在肝细胞癌组织中的表达与预后

Kaplan-Meier生存曲线及Log-rank检验显示:PTEN蛋白低表达组患者术后生存率明显低于高表达组($P = 0.000$)。PPAR-γ蛋白表达水平与肝细胞癌患者预后无关($P = 0.175$)。将肝细胞癌患者的性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤数目、门静脉癌栓、淋巴结转移、TNM分期及PPAR-γ和PTEN蛋白的表达水平因素纳入COX模型,结果显示TNM分期是影响肝细胞癌预后的独立因素。见表2、3。

表2 78例肝细胞癌中PPAR-γ和PTEN蛋白的表达与患者生存率的关系

组别	例	生存率(%)			生存期	95% *CI*	*P*
		1年	3年	5年	($\bar{x}\pm s$,月)		
PPAR-γ							0.175
阴性	38	63.2	57.3	42.3	35.32±4.24	27.00~43.63	
阳性	40	72.5	34.2	14.9	26.95±2.43	22.18~31.71	
PTEN							0.000
低表达	45	51.1	31.0	6.9	21.17±2.51	16.25~26.08	
高表达	33	90.9	62.0	52.0	44.28±3.62	37.18~51.38	

表3 78例肝细胞癌患者预后的COX多因素分析

因素	χ^2	*P*	*RR*	95% *CI*
年龄	2.189	0.139	0.598	0.303~1.182
性别	1.123	0.289	0.478	0.122~1.872
肿瘤直径	0.054	0.816	1.197	0.264~5.427
肿瘤数目	0.079	0.778	0.876	0.350~2.193
门静脉癌栓	1.386	0.239	0.597	0.253~1.409
淋巴结转移	0.456	0.500	0.729	0.291~1.826
TNM分期	3.909	0.048	4.299	1.013~18.249
PPAR-γ	0.566	0.452	0.731	0.322~1.656
PTEN	0.003	0.959	1.023	0.425~2.464

3 讨论

近年来研究发现,PPAR-γ在多种肿瘤组织如乳腺癌、睾丸癌、胰腺癌和肺癌中表达上调。本实验结果显示,PPAR-γ蛋白在肝细胞癌组织中的阳性表达率明显升高,此结论与Schaefer[5]及国内学者郭鸣雷等[6]研究结果相符合。本实验同时发现,PPAR-γ蛋白在肿瘤直径>5 cm组、门静脉癌栓组的阳性表达率显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),并且与TNM分期有关($P<0.01$),提示PPAR-γ蛋白的阳性表达与肝细胞癌的发生、发展、侵袭、转移有密切关系。但是经Kaplan-Meier生存分析显示PPAR-γ蛋白的表达变化与肝癌患者预后无关。

另外一些研究却得出相反的结论:Jiang[7]和Watkins等[8]分别报道PPAR-γ在乳腺癌组织中的表达显著低于正常乳腺组织,提示PPAR-γ可能起到阻止乳腺癌发展的作用;Jiang等指出乳腺癌局部复发或死亡患者的PPAR-γ mRNA水平明显低于无瘤生存患者,说明PPAR-γ低水平表达提示不良预后。Suzuki等[9]对乳腺癌的免疫组化研究发现,PPAR-γ蛋白主要在分化良好和雌激素受体(ER)阳性的乳腺癌组织中表达,并指出PPAR-γ蛋白阳性表达是ER阳性的乳腺癌患者较好的独立预后因子。同时有研究表明PPAR-γ在甲状腺癌、宫颈癌、食管癌及肺癌等组织中的表达低

于正常组织,并与食管癌和肺癌的不良预后有关[10-11]。

我们推测,两种相反的研究结果表明,PPAR-γ在恶性肿瘤中的表达具有组织特异性,不同恶性肿瘤组织中PPAR-γ的作用可能不同,对患者预后的影响也会不同。Lehrke等[12]也认为,目前简单地将PPAR-γ定义为癌基因或抑癌基因尚缺乏有力的依据,需要更进一步的临床和实验证据支持。

PTEN在诱导细胞周期阻滞和凋亡以及细胞黏附、迁移、分化等诸方面均起了至关重要的作用。人体多种正常组织中均存在PTEN的表达,但在相应的肿瘤组织中表达降低或缺失。日本学者Tachibana等[13]采用免疫组化的方法检测97例人食管鳞癌标本,发现PTEN蛋白在晚期食管癌患者肿瘤组织中表达下调并且与病理分期和预后明显相关。本实验检测果显示:PTEN蛋白在肝细胞癌组织中的表达水平显著低于正常肝组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。结合患者的临床病理指标研究发现,PTEN蛋白在肿瘤直径>5 cm组、门静脉癌栓组、淋巴结转移组的表达水平显著降低;TNM分期越晚其高表达率越低,说明PTEN蛋白的低水平表达与肝细胞癌的侵袭、转移及临床分期有密切联系。Kaplan-Meier生存分析显示肝细胞癌患者中PTEN蛋白高表达组生存期明显长于低表达组,差异有统计学意义($\chi^2=13.764$, $P=0.000$),提示PTEN蛋白的表达水平有助于预后的判断。

本实验经COX模型多因素分析显示,PPAR-γ及PTEN蛋白表达的水平并不是影响肝细胞癌患者预后的独立因素,说明肝细胞癌的恶性生物学行为是一个多基因、多步骤、多阶段的复杂过程,单一指标对患者的预后价值有限。COX模型中仅TNM分期可以独立预测肝细胞癌患者的预后,与临床实际相符合,但其对应的P值接近$\alpha=0.05$检验水准,我们认为这可能与实验的样本量偏少有关。

Han等[14]研究发现,在人类非小细胞肺癌细胞株中,PPAR-γ激动剂罗格列酮可通过激活PPAR-γ直接上调PTEN的表达,并通过阻断PI3K/Akt信号通路发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用。Gao等[15]对肝癌细胞株的研究也得出相一致的结果。但本实验发现PTEN与PPAR-γ在肝细胞癌组织中的表达无明显相关性。我们认为这可能与PPAR-γ蛋白尚未被配体激活,无法引发PTEN的表达变化有关。PPAR-γ激动剂的抑瘤机制及PTEN在其中发挥的作用尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] Krishnan A, Nair S A, Pillai M R. Biology of PPAR gamma in cancer: a critical review on existing lacunae[J]. Curr Mol Med, 2007, 7(6): 532-540.

[2] 张萌, 彭利, 苗战军, 等. 罗格列酮对肝癌SMMC-7721细胞VEGF蛋白表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(3): 298-301.

[3] Chang T H, Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 1129-1138.

[4] Hamada K, Sasaki T, Koni P A, *et al*. The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis[J]. Genes Dev, 2005, 19(17): 2054-2065.

[5] Schaefer K L, Wada K, Takahashi H, *et al*. Peroxisome proliferators-activated receptor gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2251-2259.

[6] 郭鸣雷, 李锦军, 李宏年, 等. 过氧化物酶体增殖激活性受体γ(PPARγ)在肝癌组织中的差异性表达[J]. 肿瘤, 2005, 25(5): 413-415.

[7] Jiang W G, Douglas-Jones A, Mansel R E. Expression of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) and the PPAR-gamma co-activator, PGC-1, in human breast cancer correlates with clinical outcomes[J]. Int J Cancer, 2003, 106(5): 752-757.

[8] Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel R E, *et al*. The localisation and reduction of nuclear staining of PPARgamma and PGC-1 in human breast cancer[J]. Oncol Rep, 2004, 12(2): 483-488.

[9] Suzuki T, Hayashi S, Miki Y, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(1): 233-250.

[10] Aldred M A, Morrison C, Gimm O, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently downregulated in a diversity of sporadic nonmedullary thyroid carcinomas[J]. Oncogene, 2003, 22(22): 3412-3416.

[11] Jung T I, Baek W K, Suh S I, *et al*. Down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 2005, 97(2): 365-373.

[12] Lehrke M, Lazar M A. The many faces of PPARgamma[J]. Cell, 2005, 123(6): 993-999.

[13] Tachibana M, Shibakita M, Ohno S, *et al*. Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer, 2002, 94 (7): 1955-1960.

[14] Han S, Roman J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(2): 430-437.

[15] Cao L Q, Chen X L, Wang Q, *et al*. Upregulation of PTEN involved in rosiglitazone-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(6): 879-887.

(**收稿**:2011-01-12;**修回**:2011-02-14)

(编辑 王小宴)