文章编号:1000-5404(2014)22-2301-03

论著

E-cadherin在肝癌组织中的表达及其对肝癌患者预后的影响

黄建强[1],常瑞明[2],温立强[2],江志鹏[2],常建星[2] (510315 广州,南方医科大学中西医结合医院外二科[1];510288 广州,中山大学孙逸仙纪念医院急诊外科[2])

[摘要] **目的** 探讨E-cadherin在肝癌组织中的表达及其在肝癌预后评判方面的价值。**方法** 收集南方医科大学中西医结合医院外二科2005年1月至2009年6月接受肝脏手术的肝癌患者79例,男性69例,女性10例,年龄23~78(51.69±12.84)岁。用Western blot方法检测5对肝癌及癌旁组织中E-cadherin的蛋白水平。免疫组化技术检测79例肝癌组织中E-cadherin的蛋白表达水平,分析E-cadherin表达与组织学分级的相关性,并通过Kaplan-Meier方法和Log rank检验比较不同E-cadherin表达水平患者的预后。**结果** 在5对肝癌及癌旁组织中,有3例患者肝癌组织E-cadherin低表达。79例肝癌中有64例存在E-cadherin低表达,且肝癌组织中E-cadherin表达明显低于正常肝组织($P<0.01$)。肝癌中E-cadherin低表达与高的组织学分级相关($P=0.028$),且E-cadherin低表达组预后较中/高表达组差($P=0.040\ 9$)。**结论** 肝癌组织中E-cadherin低表达提示患者不良预后。

[关键词] 肝癌;肿瘤标志物;E-cadherin;预后
[中图法分类号] R730.43;R730.7;R735.7 [文献标志码] A

E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma and its effect on patients' prognosis and survival: report of 79 cases

Huang Jianqiang[1], Chang Ruiming[2], Wen Liqiang[2], Jiang Zhipeng[2], Chang Jianxing[2] ([1]Second Department of General Surgery, Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; [2]Department of Emergency, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510120, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of E-cadherin and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma (HCC) samples. **Methods** Seventy-nine HCC patients undergoing surgical resection in our department from January 2005 to June 2009 were enrolled in this study. They were 69 males and 10 females, at a mean age of 51.69±12.84 (ranging from 23 to 78). The protein levels of E-cadherin were detected in 5 paired specimens of HCC and para-carcinaoma tissues by Western blotting, and in all 79 HCC tissues by immunohistochemical assay. The correlation of E-cadherin status with histological grade was analyzed. In addition, Kaplan-Meier and Log rank methods were employed to compare the prognosis among the patients with different E-cadherin expression levels. **Results** Among 5 paired HCC and para-carcinoma tissues, 3 cases had low expression of E-cadherin in tumor tissues. Compared with normal liver tissues, the E-cadherin expression was significantly lower in the liver cancer tissues ($P<0.01$), and lower E-cadherin expression was associated with high histological grade ($P=0.028$). Sixty-four of 79 HCC patients (81.0%) showed low levels of E-cadherin. Lower E-cadherin expression was associated with poorer prognosis in HCC ($P=0.040\ 9$). **Conclusion** The protein level of E-cadherin is down-regulated in HCC, and its low level predicts poor prognosis.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; tumor marker; E-cadherin; prognosis

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (10151008901000135). Corresponding author: Chang Jianxing, E-mail: chang_jianxing@aliyun.com

[基金项目] 广东省自然科学基金(10151008901000135)
[通信作者] 常建星,E-mail:chang_jianxing@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1443.014.html(2014-08-21)

肿瘤标志物是指在恶性肿瘤的发生和增殖过程中,肿瘤组织本身存在和分泌的或机体对肿瘤反应而产生的一类物质。它反映了肿瘤的存在和生长情况,对肿瘤的辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察、监测复发及预后评价具有一定价值,寻找灵敏度好、特异性高且能早期诊断的肿瘤标志物一直是人们努力的方向。表皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)是指具有极性的上皮细胞丧失上皮特性转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的细胞的过程。肿瘤细胞发生 EMT 后,细胞侵袭、转移能力增加。因此,EMT 在肿瘤进展过程中发挥重要作用。大量研究表明,EMT 标志分子可作为肿瘤预后标志物,在 EMT 众多标志分子中,钙粘蛋白 E-cadherin 被认为是 EMT 事件的核心分子,E-cadherin 丢失与各种肿瘤的进展和转移相关[1]。本研究探讨 E-cadherin 在肝癌组织中的表达情况及其在肝癌预后判断中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床标本及资料

收集南方医科大学中西医结合医院外二科 2005 年 1 月至 2009 年 6 月接受肝脏手术的肝癌患者 79 例,其中男性 69 例,女性 10 例,年龄 23~78(51.69±12.84)岁;肝血管瘤患者(正常肝)6 例,其中男性 3 例,女性 3 例,年龄 36~55(44.33±7.84)岁。肝癌、癌旁组织和正常肝是在伦理委员会批准以及患者知情同意情况下获取的。所收集的标本均为病理诊断明确为肝细胞肝癌患者的标本,且具有完整的随访资料、术前没有接受任何局部或全身治疗。

1.2 组织蛋白提取及 Western blot 分析

术后样本经生理盐水冲洗后保存至 -80 ℃冰箱。提取蛋白时,加入蛋白裂解液(购自博彩生物公司),用匀浆器裂解组织蛋白。每 25 μg 等份变性蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,然后将蛋白电转至 0.22 μm PVDF 膜(购自 Millipore 公司)。5% 脱脂牛奶封闭后用兔来源的抗 E-cadherin 和 GAPDH(购自 Cell Signaling Technology 公司)抗体 4 ℃孵育过夜。二抗室温孵育 1 h 后用超敏发光液(购自 Thermo 公司)检测。

1.3 免疫组化技术及评价

石蜡切片经烤片、梯度水化后用 3% 过氧化氢室温下阻断内源性过氧化物酶活性 15 min。10 mmol/L 枸橼酸盐(pH = 6.0)高压热修复 3 min,然后 5% 山羊血清室温下封闭 30 min。抗-E-cadherin 抗体 4 ℃孵育过夜。PBS 代替一抗作为阴性对照。二抗室温孵育 1 h 后用 DAB 染色。苏木精复染,脱水,最后封片。用 Image Pro Plus 软件对组织 E-cadherin 免疫组织化学染色结果进行光密度分析,测定每个高倍镜视野阳性细胞的积分光密度值。

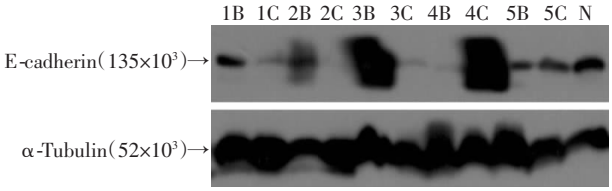
1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件。组间免疫组化染色强度比较用 Kruskal Wallis 检验,χ^2 检验用于关联分析,Kaplan-Meier 方法用于生存分析,Log rank 检验用于比较不同的生存曲线。

2 结果

2.1 Western blot 检测肝癌及癌旁组织中 E-cadherin 的表达

用 Western blot 技术检测 5 对肝癌及对应癌旁组织中 E-cadherin 分子的表达情况,结果见图 1。与癌旁组织相比,3 例患者肝癌组织中 E-cadherin 表达降低。提示肝癌组织中存在钙粘蛋白分子 E-cadherin 的低表达。

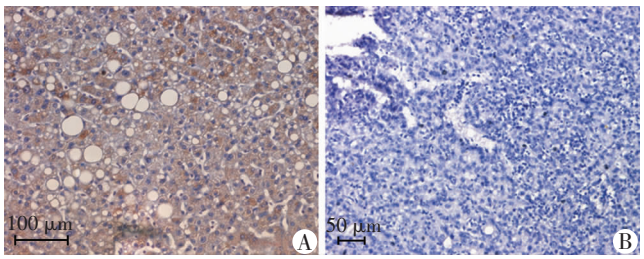


1~5:5 对肝癌及癌旁组织;B:癌旁组织;C:癌组织;N:正常肝组织

图 1 Western blot 检测 5 对肝癌及癌旁组织中 E-cadherin 的表达

2.2 免疫组化检测肝癌组织中 E-cadherin 的表达

用免疫组化技术检测正常肝组织及肝癌组织中 E-cadherin 的蛋白表达,见图 2。与正常肝组织相比,肝癌组织中 E-cadherin 的蛋白水平明显降低($P<0.01$);81.0%(64/79)的肝癌患者的 E-cadherin 蛋白低表达,见表 1。提示 E-cadherin 蛋白分子在肝癌中存在普遍低表达。



A:正常肝组织;B:肝细胞肝癌组织

图 2 正常肝组织及肝癌组织中 E-cadherin 免疫组化染色观察

表 1 正常肝组织及肝癌组织中 E-cadherin 免疫组化染色强度

肝组织	n	IHC 染色强度		
		低	中	高
正常肝组织	6	0	4	2
肝癌组织[a]	79	64	10	5

a:$P<0.01$,与正常肝组织比较

2.3 肝癌组织中 E-cadherin 表达与组织学分级相关

检测肝癌组织中 E-cadherin 蛋白表达水平的同时分析其对应的组织学分级。E-cadherin 阴性病例组织学 2、3 级较多,而 E-cadherin 阳性病例 1、2 级(尤其是 1 级)较多。将肝癌 E-cadherin 表达与组织学分级做相关分析,结果显示 E-cadherin 表达阴性组与表达阳性组间的组织学分级存在明显差异($\chi^2=7.126$,$P=0.028$;表 2)。即肝癌中 E-cadherin 低表达与高的组织学分级相关,E-cadherin 高表达与低的组织学分级相关。

表 2 E-cadherin 表达与肝细胞分级相关性分析(例)

E-cadherin 表达	组织学分级			合计
	1 级	2 级	3 级	
阴性	17	27	20	64
阳性[a]	9	5	1	15
合计	26	32	21	79

a:$P=0.028$,与表达阴性比较

2.4 E-cadherin 低表达患者生存预后比中/高表达患者差

按 E-cadherin 免疫组化染色强度将完成随访的 79 例肝癌患者分为低表达组和中、高表达组,比较各组术后存活时间和生存状态。Kaplan-Meier 生存分析显示 E-cadherin 低表达组患者预后明显较中、高表达组差($P=0.040\ 9$,图 3),低表达组患者中位生存时间为 16.0 个月,而中、高表达组患者中位生存时间为 27.0 个月。肝组织中 E-cadherin 低表达提示肝癌患者不良预后。

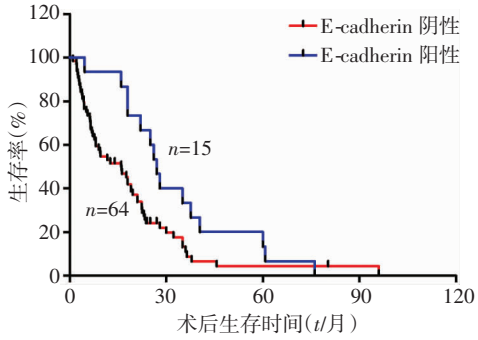


图 3 肝癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨论

肿瘤转移是肿瘤相关死亡最主要原因,发生肿瘤转移的患者其生存时间明显短于未发生转移者,表皮间质转化是肿瘤转移非常重要的机制之一,在肿瘤进展过程发挥重要作用。因此,表皮间质转化标志分子在肿瘤预后判断中的作用也成为研究的热点[2-4]。

钙粘蛋白 E-cadherin 是表皮间质转化事件的核心分子。大量研究[5-6]表明:E-cadherin 在多种实体肿瘤中存在普遍低表达,包括胃癌、乳腺癌、黑色素瘤、口腔鳞状细胞癌。肿瘤中 E-cadherin 低表达与侵袭、转移相关,导致不良预后[7]。Snail、Slung、ZEB1(zinc-finger E-box binding homeobox 1)、Twist 等转录因子可直接抑制 E-cadherin 的转录;多种信号转导途径(如 Ras/Raf、PI3K/AKT)可活化不同的核内转录因子,最终抑制 E-cadherin 的表达[8]。本研究首先检测了 5 对肝癌及癌旁组织中 E-cadherin 的蛋白表达情况。发现有 3 例患者肝癌组织比其相应癌旁组织 E-cadherin 表达低,且低于正常肝组织(阳性对照)。提示"肝癌组织中 E-cadherin 低表达"这一现象在临床样本中是存在的。本研究后续检测了 79 例肝癌患者肝癌组织中 E-cadherin 的表达水平,发现与正常肝组织相比,约 81.0% 肝癌中 E-cadherin 表达明显降低。研究提示肝癌组织 E-cadherin 普遍为低表达,同时发现 E-cadherin 低表达组肝癌患者预后明显较中、高表达组差。我们同时分析了肝癌组织 E-cadherin 表达与组织学分级之间的关系,结果提示肝癌组织 E-cadherin 低表达与高的组织学分级相关。另有研究[9]发现门静脉癌栓患者肝癌组织中 E-cadherin 表达较无门静脉癌栓者低,且 TNM Ⅲ期患者较 Ⅰ/Ⅱ期患者肝癌组织低表达 E-cadherin 分子,提示 E-cadherin 与患者门静脉癌栓、TNM 分期等临床特征密切相关。郭晓东等[10]研究报道 E-cadherin 蛋白表达是影响肝细胞肝癌患者肝移植术后肝癌复发的独立预后因素之一。这些研究结果均提示 E-cadherin 低表达与肝癌差的组织学分级以及复发、转移相关。结合我们的研究结果,我们推测 E-cadherin 低表达的肝癌患者预后不良可能与其增加肝癌的复发和转移风险相关。

综上所述,肝癌患者存在 E-cadherin 低表达现象,肝癌组织 E-cadherin 表达水平可作为患者预后潜在的评价指标。

参考文献:

[1] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442-454.
[2] Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, *et al*. Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer[J]. Oncol Rep, 2013, 29(5): 1763-1768.
[3] Karihtala P, Auvinen P, Kauppila S, *et al*. Vimentin, zeb1 and Sip1 are up-regulated in triple-negative and basal-like breast cancers: association with an aggressive tumour phenotype[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 138(1): 81-90.
[4] Yamada S, Fuchs B C, Fujii T, *et al*. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis of pancreatic cancer[J]. Surgery, 2013, 154(5): 946-954.
[5] Margineanu E, Cotrutz C E, Cotrutz C. Correlation between E-cadherin abnormal expressions in different types of cancer and the process of metastasis[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2008, 112(2): 432-436.
[6] Luo S L, Xie Y G, Li Z, *et al*. E-cadherin expression and prognosis of oral cancer: a meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2014, 35(6): 5533-5537.
[7] Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, *et al*. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach[J]. Anticancer Res, 2008, 28(6A): 3815-3826.
[8] Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 15-33.
[9] 李裕明, 韩克强, 郑璐, 等. 上皮间质转化标志物 E-cadherin 和 Vimentin 在原发性肝癌中的表达及其临床意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(4): 279-284.
[10] 郭晓东, 孟繁平, 熊璐. 肝细胞肝癌 E-Cadherin 蛋白的表达及其对判断肝癌肝移植疗效的意义[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(8): 1469-1471, 1488.

(**收稿**:2014-05-01;**修回**:2014-05-12)
(编辑 汪勤俭)