论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1484-04

抑癌基因maspin在肝癌中的蛋白表达与AFP的相关性和其临床意义

阎 雄

(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究抑癌基因maspin在肝癌中的蛋白表达与AFP的相关性,并讨论其在肝癌中的临床意义。方法:用免疫组织化学方法检测2004年3月~2005年12月我院肝胆外科30例肝癌病人和30例来源于外伤及非肝病患者的正常肝组织(Normal tissue,NT)、癌旁组织(Paratumor tissue,PT)和肝癌组织(Tumor tissue,TT)中maspin和AFP的蛋白表达,检测其面密度(Aeral density,AD)。结果:(1)在正常肝组织、癌旁组织和肝癌组织中maspin蛋白的面密度分别是20 712.48±1 826.28,7 347.40±441.16,85.68±19.81,而AFP蛋白的面密度分别是66.00±10.70,7 005.04±335.69,13 094.00±516.32,两者相比,差异有统计学意义($P<0.05$);(2)在正常肝组织、癌旁组织和肝癌组织中maspin和AFP的相关性比较,Perason系数=-0.9815,r为负值。结论:在正常肝组织、癌旁组织和肝癌组织中maspin的蛋白表达,呈逐渐下降的趋势,在正常肝组织表达最高,在癌旁组织中表达较低,而在肝癌组织中表达最低;而AFP的蛋白表达却正好相反;maspin蛋白和AFP蛋白呈负相关,maspin与肝癌的恶性程度呈负相关。因此maspin可以作为判断肝癌恶性程度的指标之一。

【关键词】抑癌基因maspin;原发性肝癌;AFP;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R446.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-07

The expression of cancer suppressor gene maspin in the HCC and its correlation with AFP and its clinical significance

YAN Xiong

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the protein expression of maspin in the HCC and its correlation with AFP, and to discuss its clincal significance. *Methods*: the protein expressions of maspin and AFP in the normal liver tissue(NT), paratumor tissue(PT) and liver tumor tissue(TT) were detected with immunohistochemistry and their area densities were measured. A total of

作者介绍:阎 雄(1964-)男,主治医师,博士,研究方向:肝胆疾病。

[11] Hong T M, Chen Y L, Wu Y Y, et al. Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(16): 4759-4768.

[12] Hervé M A, Buteau-Lozano H, Vassy R, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels[J]. Am J Pathol, 2008, 172(1): 167-178.

[13] Ling W, Dutta S K, Kojima T, et al. Neuropilin-1 Modulates p53/Caspases Axis to Promote Endothelial Cell Survival[J]. PLoS ONE, 2007, 2(11): e1161.

[14] Banerjee S, Mehta S, Haque I, et al. VEGF-A165 induces human aortic smooth muscle cell migration by activating neuropilin-1-VEGFR1-PI3K axis[J]. Biochemistry, 2008, 47(11): 3345-3351.

[15] Soker S, Takashima S, Miao H Q, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isform-specific receptor for vascular endothelial growth factor[J]. Cell, 1998, 92(6): 735-745.

[16] Miao H Q, Klagsbrun M. Neuropilin is a mediator of angiogenesis [J]. Cancer Metast Rev, 2000, 19(1-2): 29-37.

[17] Soker S, Fidder H, Neufeld G, et al. Characterization of novel vascular endothelial growth factor(VEGF) receptors on tumor ceils that bind VEGFI65 via its exon 7-encoded domain[J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5761-5767.

[18] Hervé M A, Buteau-Lozano H, Vassy R, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels[J]. Am J Pathol, 2008, 172(1): 167-178.

[19] Hsieh S H, Ying N W, Wu M H, et al. *Galectin-1, a novel* ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells[J]. Oncogene, 2008, [Epub ahead of print]

[20] Sulpice E, Plou ë t J, Berg é M, et al. Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity[J]. Blood, 2008, 111(4): 2036-2045.

(责任编辑:关蕴良)

30 patients with HCC and 30 patients without HCC in our Department of Hepatobiliary Surgery were as samples from March, 2004 to December, 2005. *Results*: (1)The area densities (AD)of maspin protein in the NT, PT and TT were 20 712.48 ± 1 826.28, 7 347.40 ± 441.16, 85.68 ± 19.81 respectively, but the area densities of AFP protein were 66.00 ± 10.70, 7 005.04 ± 335.69, 13 094.00 ± 516.32 respectively; the comparion of two was $P<0.05$; (2)the correlation of maspin and AFP in the NT, PT and TT were compared, the Perason modulus was-0.9815, and r was negative. *Conclusion*: The protein expression of maspin had the degressive trend in the NT, PT and TT, there was the hightest expression of the maspin protein in the NT while the lowest expression in the TT. But the expression of AFP protein was reverse on the beam. There was the negative correlation between maspin protein and AFP protein. And there was also the negative relativity between maspin protein and the megalative grade of HCC. So maspin may be one of the indicators for the malignant degree of HCC.

【Key words】 Maspin; HCC; AFP; Immunohistochemistry

Maspin基因是通过消减杂交技术在正常人的乳腺上皮细胞的mRNA水平上发现的，是serpin超家族的一贯新成员。1994年，Zou等首先报道通过对乳腺癌细胞株MDA-MB-435的稳定转染，maspin再表达可明显抑制体内外肿瘤细胞的生长、侵润和转移。随后，大量的体内外实验证实maspin在肺癌、胰腺癌、前列腺癌和乳癌中均能抑制肿瘤血管生存、肿瘤细胞的生长、侵润和转移。然而，maspin基因在正常肝组织以及发病率、转移率和死亡率都高的肝癌组织、癌旁组织中是否有的表达研究较少，对maspin基因与AFP基因的相关性及临床意义的研究鲜有报道。本试验采用免疫组织化学方法检测正常肝组织、肝癌组织和癌旁组织中maspin和AFP的蛋白表达，比较其面密度，说明相关性和临床意义。

1 资料和方法

1.1 一般资料

病例共30例，男性22例，女性8例，平均年龄48.2岁(28～72岁)，平均血清AFP 2 277.98 ng/ml(5～33 967.50 ng/ml)，乙肝三对阳性20例，阴性10例，肝功child A级25例，child B级5例，child C级0例；B-us和CT：肝右叶18例，左叶12例；肿块大小：24例<5.0 cm，5.0 cm<4例<10.0 cm，2例>10.0 cm；门静脉癌栓3例。UICC的TNM分期：Ⅰ期18例，Ⅱ期7例，Ⅲ期3例，Ⅳ期2例。正常肝组织30例，来源于外伤及非肝病患者。所有病人均为我院2004年3月～2005年12月肝胆外科病人，术前均未行化疗和放疗。

1.2 方法

标本的收取和免疫组织化学SP着色法。正常肝组织、肝癌组织及癌旁组织各取0.2 cm × 0.4 cm × 0.4 cm大小，但癌旁组织距肝癌组织3.0 cm，用4%的多聚甲醛固定，石蜡包埋，连续切片。SP试剂盒及兔抗人maspin抗体（H-130）和兔抗人AFP抗体(C-3)购于美国Santa Cruz 公司。免疫组织化学染色：用胰酶抗原修复，滴加兔抗人maspin抗体(1∶100)和兔抗人AFP抗体(1∶100)，PBS冲洗，DAB显色。

1.3 结果判断

免疫组织化学结果采用北航CM2000B真彩色病理影象多媒体分析软件，进行图象分析。对图象中免疫组织化学阳性信号进行面密度值。计算公式如下：

$$面密度(AD)=\frac{目标面积}{统计场面积}\times 100\%。$$

1.4 统计学处理

实验数据用$\bar{x}\pm s$表示，应用SAS9.1软件包进行数据处理，两组组间面密度差异比较采用t检验，$P<0.05$被认为有统计意义。Pearson相关系数r分析maspin蛋与AFP蛋白的相关性，当r为负值时，呈负相关；r为正值时，呈正相关。

2 结 果

2.1 正常肝组织、癌旁组织、肝癌组织中maspin和AFP免疫组织化学

在正常肝组织中maspin的蛋白表达呈强阳性，在癌旁组织中的表达呈弱阳性，而在肝癌组织中几乎无表达；AFP蛋白在正常肝组织、癌旁组织、肝癌组织的表达却正好相反，在正常肝组织中AFP几乎不表达，在癌旁组织中的表达呈弱阳性，而在肝癌组织中的表达呈强阳性，结果见图1~6。

2.2 正常肝组织、癌旁组织、肝癌组织中maspin和AFP蛋白的面密度($\bar{x}\pm s$)分析

见表1。

2.3 正常肝组织、癌旁组织、肝癌组织中maspin和AFP蛋白的相关性分析

见表2。

3 讨 论

maspin基因是mRNA水平上也发现抑癌基因[1]。

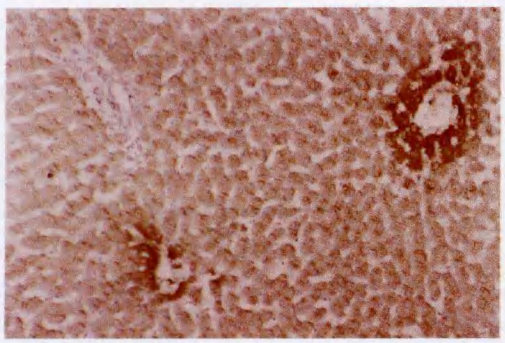


图1 免疫组织化学显示正常肝组织的maspin蛋白表达(40×)

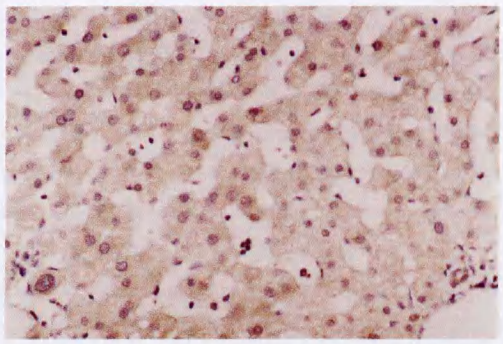


图2 免疫组织化学显示癌旁组织的maspin蛋白表达(40×)

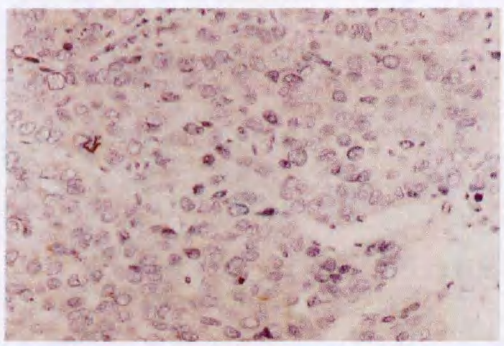


图3 免疫组织化学显示肝癌组织的maspin蛋白表达(40×)

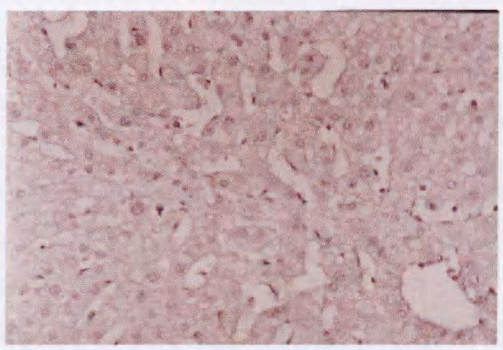


图4 免疫组织化学显示正常肝组织的AFP蛋白表达(40×)

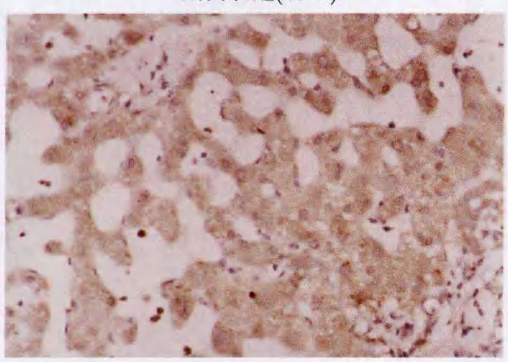


图5 免疫组织化学显示癌组织的AFP蛋白表达(40×)

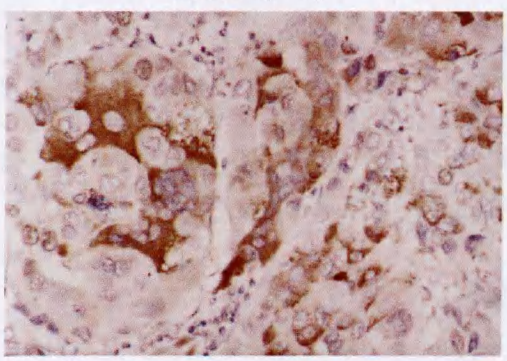


图6 免疫组织化学显示肝癌组织的AFP蛋白表达(40×)

表1 正常肝组织、癌旁组织、肝癌组织中maspin 和AFP蛋白的面密度(AD)($\bar{x}\pm s$)分析

	maspin	AFP
正常肝组织▲	20 712.48 ± 1 826.28	66.00 ± 10.70
癌旁组织▲	7 347.40 ± 441.16	7 005.04 ± 335.69
肝癌组织▲	85.68 ± 19.81	13 094.00 ± 516.32

注：◆AD值扩大了10 000.00倍；▲$P<0.05$，在相应的NT、PT和TT组中maspin与AFP比较

表2 正常肝组织、癌旁组织、肝癌组织中maspin和AFP蛋白的相关性分析

	maspin	AFP
maspin	1.000 0	−0.981 5
		<0.000 1
AFP	−0.981 5	1.000 0
	<0.000 1	

注：Pearson=−0.9815，r为负值，maspin与AFP呈负相关

maspin 的cDNA序列包含2 584碱基,编码42kD蛋白质(含376氨基酸),与丝氨酸蛋白酶抑制剂,或serpins,具有广泛的序列同源性。maspin的-COOH端附近有一个活性位点环(Reactive site loop,RSL),该区域在 serpin家族中高度保守[2];活性中心的NH_2端有一绞链区(Hinge region),这一模序对肿瘤抑制因子serpin有重要作用,其变异可影响serpin的抑制作用的发挥。maspin基因位于染色体18q21.3-q23位点上,其在P_1位点(P_1 site)有一个精氨酸残基;maspin的蛋白序列具有高度的保守。maspin在正常的上皮组织中有表达,其中有乳腺、前列腺、胎盘、睾丸、大肠、小肠、舌、胸腺、表皮角化细胞[3,4]。

Zou等首先报道在侵润和转移性乳腺癌细胞株中maspin 的表达下调。Maass等检测45例原发性乳腺癌病人maspin的表达,在乳癌的标本中没有maspin基因的表达,然而64%的正常乳腺组织中检测到maspin mRNA 的表达[5]。同时他们对一组大量的乳腺组织标本进行深入研究表明在正常乳腺和乳腺纤维囊性变的组织中,肌上皮细胞和上皮细胞表达了最高的maspin水平,而在一系列原位导管癌、浸润癌和乳腺癌淋巴结转移的标本中,发现 maspin的表达在这3个不同的阶段达呈进行性下降趋势[5],提示maspin基因的表达对乳腺肿瘤的发生、发展及转移的形成有影响。Zhang等用组织芯片技术检测maspin蛋白在各种正常组织和肿瘤样本中的表达情况,其中包括肝组织,证明 maspin的表达水平在正常组织中呈高水平;并且和良性组织相比,越是肿瘤晚期的组织,其maspin染色的强度越弱[6,7]。Chen等研究证实maspin蛋白在良性前列腺组织中高表达, 而在前列腺癌中低表达, 随着前列腺癌的恶性程度增加,maspin的表达随之下降,并且在Ⅳ、Ⅴ期前列腺癌中maspin表达缺失,说明在前列腺癌的发展和侵袭中起重要作用[8]。因此检测maspin的表达可以预测肿瘤的病变程度。Machtens等用免疫组化法对84例局限型前列腺癌根治术后的患者行64月的随访发现,maspin阴性或表达下调的患者中58%发生了局部复发或转移,而在maspin稳定表达的患者中仅有18%发生了局部复发或转移[9],提示maspin可以作为肿瘤预后的指标之一。

本实验检测maspin和AFP蛋白在正常肝组织、癌旁组织和肝癌组织中的免疫组化面密度。显示在正常肝组织、癌旁组织和肝癌组织中maspin蛋白的免疫组化面密度呈下降的趋势,两两相比较,$P<0.05$;而在正常肝组织、癌旁组织和肝癌组织中AFP蛋白的免疫组化面密度呈上升的趋势,两两相比较,$P<0.05$;并且在正常肝组织、癌旁组织和肝癌组织中maspin和AFP蛋白,两两相比较,$P<0.05$,有显著性差异;而且两者相关性比较,Pearson系数=-0.981 5,r为负值,说明maspin和AFP呈现负相关。即肝癌的恶性程度越高,maspin蛋白的表达越低,而AFP蛋白的表达则越高。因此,结果提示:

(1)maspin基因可能是一种抑癌基因,在转录水平的表达下降,可能是该基因在肿瘤组织中抑癌作用下降的原因之一;

(2)癌旁组织作为癌组织和正常组织之间的过渡阶段, 在肿瘤的发生发展过程中有重要的意义,既具有癌组织的某些特征,又具有正常组织的某些特征,应认识到癌旁组织的特殊作用,因此外科手术应将有癌变倾向的癌组织彻底切除;

(3)maspin蛋白可望作为临床上判断肝癌恶性程度高低的指标之一。

参 考 文 献

[1] Zou Z,Anisowicz A,Hendrix M J,et al. Maspin,a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epthelial cells [J]. Science,1994,263(5146):526-529.

[2] Schnerider S S,Schick C,Fish K E,et al. A serine proteinase inhitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995,92(8):3147-3151.

[3] Pemberton P A,Tipton A R,Pavloff N,et al. Maspin is an intracellular serpin that partition into secretory vesicles and is present at the cell surface[J]. J Histochem Cytochem,1997,45(7):1697-1706.

[4] Katz A B,Taichman L B. A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture[J]. J Invest Dermatol,1999,112 (5):818-821.

[5] Maass N,Hojo T,Rosel F,et al. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis[J]. Clin biochem,2001,34(4):303-307.

[6] Zhang W,Zhang M.Tissue microarray analysis of maspin expression and its reverse correlation with mutant p53 in various tumors[J]. Int J Oncol,2002,20(6):1145-1150.

[7] 阎 雄, 姚臻祥.Maspin/pEFIRES-N表达载体的构建与应用[J]. 第三军医大学学报,2005,27(22):2205-2208.

[8] Chen Z,Fan Z,McNeal J E,et al. Hepsin and maspin are inversely expressed in laser capture microdissectioned prostate cancer [J]. J Urol,2003,169(4):1316-1319.

[9] Machtens S,Serth J,Bokemeyer C,et al. Expression of the p53 and maspin protern in primary prostate cancer:correlation with clincal features[J]. Int J cancer,2001,95(5):337-342.

(责任编辑:冉明会)