

Twist、E-cadherin和 β -catenin在肝细胞肝癌中的表达及其与预后的关系*

车娜 赵秀兰 古强 孙涛 王星辉 张诗武 赵楠 杜静 孙保存

摘要 目的:探讨Twist、E-cadherin和 β -catenin在肝细胞肝癌复发与转移中的作用及与预后的相关性。方法:以石蜡包埋组织切片,免疫组化SP法染色分别检测97例肝细胞肝癌,其中复发与转移组49例,非复发与转移组48例Twist、E-cadherin和 β -catenin的表达情况。结果:复发、转移与性别、年龄无关($P=0.424$, $P=0.738$),与临床分期密切相关($P=0.000$)。复发与转移组Twist、 β -catenin表达高于无复发与转移组($P=0.000$; $P=0.000$),复发与转移组E-cadherin表达低于无复发与转移组($P=0.027$)。Twist、 β -catenin阳性组平均生存时间分别为(28.880 \pm 3.285)、(31.477 \pm 3.359)个月,中位生存时间分别为26、28个月,阴性组平均生存时间分别为(44.603 \pm 3.521)、(42.009 \pm 3.720)个月,中位生存时间分别为49、45个月, Twist、 β -catenin阳性组生存期较阴性组缩短差别具有统计学意义($P=0.002$, $P=0.029$)。E-cadherin阳性组平均生存时间为(44.514 \pm 3.447)个月,中位生存时间为49个月,阴性组为(29.110 \pm 3.581)个月,中位生存时间为25个月, E-cadherin阳性组生存时间较阴性组延长有统计学意义($P=0.002$)。结论: Twist、 β -catenin过度表达, E-cadherin表达缺失可能与HCC复发转移、不良生存预后存在相关性。

关键词 Twist E-cadherin β -catenin 复发与转移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.06.002

The Expression of Twist, E-cadherin and β -catenin in Hepatocellular Carcinoma and Its Correlation with Recurrence, Metastasis and Prognosis

CHE Na, ZHAO Xiulan, GU Qiang, SUN Tao, WANG Xinghui, ZHANG Shiwu, ZHAO Nan, DU Jing, SUN Baocun

Corresponding author: SUN Baocun, E-mail: sunbaocun@yahoo.com.cn

Department of Pathology, Cancer Institute and Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Grant support: The Key Research Program for Application Foundation & Leading Technique of Tianjin (08JCZDJC23500); Research Program for Application Foundation & Leading Technique of Tianjin (09JCYBJC12100); Tianjin Science and Technology Pillar Program (Sino-Swiss International Cooperation, 09ZCZDSF04400)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of Twist, β -catenin and E-cadherin on the recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with clinical prognosis. **Methods:** Immunohistochemical staining (SP) was conducted to detect the expression of Twist, β -catenin and E-cadherin in 97 hepatocellular carcinoma patients (49 with recurrence and metastasis and 48 without recurrence and metastasis). **Results:** The recurrence and metastasis of HCC were correlated with clinical stage ($P=0.000$), but were not correlated with sex or age ($P=0.424$, $P=0.738$). The abnormal expression of Twist and β -catenin in the recurrence and metastasis group was higher than that in the group without recurrence or metastasis ($P=0.000$, $P=0.000$). The positive ratio of E-cadherin in the recurrence and metastasis group was lower than that in the group without recurrence or metastasis ($P=0.027$). The mean survival was 28.880 \pm 3.285 months in patients with positive expression of Twist and 31.477 \pm 3.359 months in patients with positive expression of β -catenin. The median survival time of them was 26 and 28 months, respectively. The mean survival was 44.603 \pm 3.521 months in patients without Twist expression and 42.009 \pm 3.720 months in patients without β -catenin expression. The median survival time of them was 49 and 45 months, respectively. The survival of patients with positive expression of Twist and β -catenin was shorter than that in patients without expression of Twist and β -catenin ($P=0.002$, $P=0.029$). The mean survival time and median survival time of patients with Twist and β -catenin expression were 44.514 \pm 3.447 months and 49 months, respectively, significantly higher than those in patients without Twist and β -catenin expression ($P=0.002$), which were 29.110 \pm 3.581 months and 25 months, respectively. **Conclusion:** The overexpression of Twist and β -catenin as well as decreased expression of E-cadherin may play critical roles in the recurrence and metastasis of HCC and indicate poor prognosis.

Keywords Twist; E-cadherin; β -catenin; Recurrence and metastasis

作者单位:天津医科大学病理教研室(天津市300070);天津医科大学附属肿瘤医院(天津市300060)

* 本文课题受天津市科技支撑项目(编号:09ZCZDSF04400),天津市自然科学基金项目资助(编号:08JCZDJC 23500和09JCYBJC12100)

通讯作者:孙保存 sunbaocun@yahoo.com.cn

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床最常见的恶性肿瘤之一,位居恶性肿瘤发生率的第5位^[1]和死亡率的第3位。肝癌的复发、转移与预后密切相关。近来研究报道上皮-间充质转变(EMT)在转移中发挥重要作用, Twist通过下调E-cadherin促进EMT的发生。E-cadherin作为重要的上皮细胞粘附分子,与 β -catenin结合形成复合体,与上皮细胞的粘附密切相关,细胞的去连接将赋予细胞运动能力,这也被认为是肿瘤细胞转移的分子基础。本研究以人肝细胞肝癌为对象,通过免疫组化染色观察分析Twist、E-cadherin和 β -catenin的表达,综合分析三者与术后复发、转移和预后的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本

选取天津医科大学附属肿瘤医院、总医院2001年2月~2005年11月经手术切除并经病理诊断为HCC随访资料完整的患者97例,复发与转移组49例,无复发与转移者48例。

1.2 免疫组化染色

1.2.1 主要试剂与方法 兔抗人Twist多克隆抗体(产品编号:sc-15393)、鼠抗人 β -catenin单克隆抗体(产品编号sc-7963)、兔抗人E-cadherin多克隆抗体(产品编号:sc-7870)均购自Santa Cruz公司,及PV6000通用二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验步骤:5 μ m连续切片常规脱蜡水化,3% H₂O₂灭活内源性过氧化物酶30min,0.01mol枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波热修复20min,正常血清室温下封闭30min,滴加一抗4℃冰箱过夜,次日晨恢复至室温,PBS冲洗,滴加相应的二抗,DAB显色,苏木素浅染细胞核,脱水透明,中性树胶封片。Twist、 β -catenin、E-cadherin采用乳腺癌组织作阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 用Mattern积分法^[2]染色指数来评定染色结果

阳性细胞百分率:每例标本选择10个含有阳性细胞的高倍视野($\times 400$)分别计数100个肿瘤细胞,取其平均值计算阳性细胞百分率。0为无阳性细胞;1为阳性细胞 $\leq 25\%$;2为阳性细胞 $\leq 50\%$;3为阳性细胞 $> 50\%$ 。染色强度:0为阴性;1为浅黄色;2为深黄色;3为棕黄色。染色指数为阳性细胞百分率和染色强度之和,最小值0,最大值6。阳性表达指数 > 3 定为免疫组化染色阳性; ≤ 3 定为阴性。

1.3 统计学方法

用SPSS 13.0统计软件包进行分析,各指标阳性表达指数不符合正态分布,采用两样本比较的秩和检验(Mann-whitney U法),生存分析采用Kaplan-Meier法估计生存时间,对数秩和检验

(Log-rank test)比较生存时间的差别。计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复发转移与临床因素关系

97例肝癌患者中,男性82例,女性15例,最大年龄84,最小年龄23,临床I期6例,II期47例,III期6例,IV期38例。复发与转移组49例,平均生存时间为(26.423 \pm 3.279)个月,中位生存时间为21个月,无复发与转移48例,平均生存时间(46.75 \pm 3.325)个月,中位生存时间为56个月(Log-rank生存分析 $P=0.000$),复发与转移与临床分期密切相关($\chi^2=41.399$, $P=0.000$),与性别、年龄无关($\chi^2=0.639$, $P=0.424$; $\chi^2=0.112$, $P=0.738$)。

2.2 Twist、E-cadherin、 β -catenin表达情况

2.2.1 Twist表达情况 Twist阳性表达产物呈棕黄色,主要定位于细胞浆和细胞核,呈弥漫分布。阳性表达染色指数在复发、转移组与无复发、转移两组间差别有统计学意义,转移与复发组高于无转移与复发组($Z=-3.619$, $P=0.000$)(表1,图1)。

表1 肝癌Twist、E-cadherin、 β -catenin阳性表达指数比较
Table 1 Positive expression of Twist, E-cadherin and β -catenin in hepatocellular carcinoma

项目	平均秩次		Z	P值
	复发与转移(+) (n=49)	复发与转移(-) (n=48)		
Twist	58.98	38.81	-3.619	0.000
E-cadherin	42.91	55.22	-2.205	0.027
β -catenin	59.62	38.16	-3.838	0.000

2.2.2 E-cadherin表达情况 阳性表达产物主要表达于肝癌的细胞膜上,呈棕黄色,复发与转移组E-cadherin部分细胞表达缺失,E-cadherin的阳性表达指数低于无复发与转移组($Z=-2.205$, $P=0.027$)(表1,图2)。

2.2.3 β -catenin表达情况 β -catenin在正常上皮细胞呈阳性表达,表达产物呈棕黄色,定位于细胞膜。本研究发现许多肝癌细胞质、细胞核表达,呈弥漫或局限分布,我们视为异常表达,并且发现复发、转移组与非复发、转移组 β -catenin异常表达染色指数差别有统计学意义,复发与转移组高于非复发与转移组($Z=-3.838$, $P=0.000$)(表1,图3)。

2.3 Twist、E-cadherin和 β -catenin与生存预后的关系

经Kaplan-Meier生存分析和对数秩和检验(Log-rank test)结果显示:Twist、 β -catenin阳性组的平均生存时间分别为(28.880 \pm 3.285)个月、(31.477 \pm

3.359)个月,中位生存时间分别为26、28个月,阴性组平均生存时间为 (44.603 ± 3.521) 、 (42.009 ± 3.720) 个月,中位生存时间分别49、45个月, Twist、 β -catenin阳性组生存期比阴性组缩短差异有统计学意义($P=0.002$, $P=0.029$), E-cadherin阳性组平均生存时间为 (44.514 ± 3.447) 个月,中位生存时间为49个月,阴性组为 (29.110 ± 3.581) 个月,中位生存时间为25个月, E-cadherin阴性组生存时间比阳性组缩短有统计学意义($P=0.002$)。

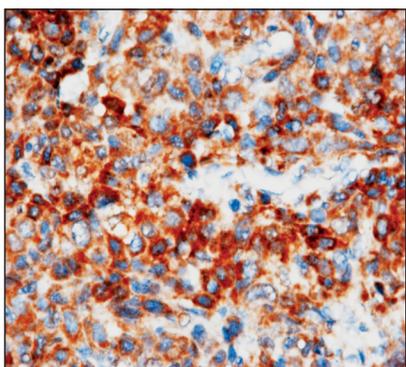


图1 Twist在HCC组织内细胞浆阳性表达 ($\times 400$)

Figure 1 Twist was positively expressed in the cytoplasm of HCC cells

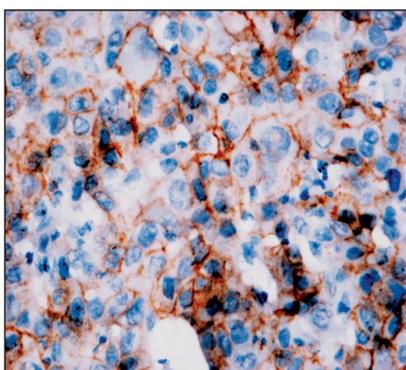


图2 E-cadherin在HCC组织内细胞膜阳性表达 ($\times 400$)

Figure 2 E-cadherin was positively expressed in the membrane of HCC cells

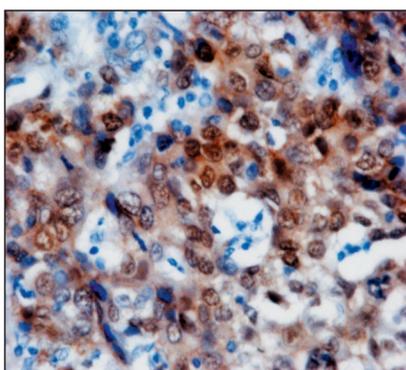


图3 β -catenin在HCC组织内细胞核、细胞浆阳性表达 ($\times 400$)

Figure 3 β -catenin was positively expressed in the cell nucleus and cytoplasm of HCC cells

3 讨论

Twist作为一种碱性螺旋-环-螺旋(Basic helix

loop helix, bHLH)转录因子,它可能通过直接与E-box位点结合的方式下调E-cadherin,也可能通过抑制某些调节因子的活性下调E-cadherin。E-cadherin作为重要的钙离子依赖性的上皮粘附分子,其表达下调或缺失,癌细胞间粘附力下降或缺失,容易从原发灶脱落分离,有利于癌细胞侵袭性生长和远处转移。

Yang等^[3]发现Twist作为新的E-cadherin抑制物能诱导EMT的发生,在对侵袭性小叶乳腺癌研究中发现,抑制Twist基因的表达能够减少体内肿瘤转移的潜在可能。一些研究小组在妊娠滋养细胞肿瘤^[4]、口腔鳞状细胞肿瘤^[5]和膀胱癌^[6]中也发现了Twist高表达, E-cadherin低表达与肿瘤的转移有关。本实验也发现,在复发与转移组Twist呈高表达, E-cadherin呈低表达($P<0.05$),与报道的结果一致^[4-6]。

β -catenin基因(CTNNB1)是一种原癌基因,位于3p2b,编码蛋白分子量为92kD, β -catenin分子一部分与E-cadherin结合维持细胞的粘附功能,其余部分在Wnt经典信号途径中起着枢纽作用,在无Wnt信号时,细胞浆内 β -catenin与AXIN、APC和GSK3 β 、CKI α 结合形成复合物。GSK3 β /CKI α 能使 β -catenin磷酸化,然后磷酸化的 β -catenin能被E3泛素连接酶的 β 2TrCp识别泛素化并被酶蛋白体降解,使胞浆内 β -catenin保持稳定的较低水平^[7],维持正常的生长发育。当Wnt蛋白与细胞膜上共同受体Fz蛋白及LRP5/6结合,将活化信号传递至细胞内,抑制复合物对 β -catenin的磷酸化降解,未降解的 β -catenin与APC亲和力下降,细胞浆内游离 β -catenin水平升高,聚积进入细胞核与细胞核内Tcf/Lef结合,形成 β -catenin-Tcf/Lef复合物开启靶基因如c-myc和cyclinD1等的转录^[8]从而影响细胞的增殖分化凋亡等行为,开启基质金属蛋白酶MMP2、MMP3、MMP7、MMP9等的转录影响肿瘤的侵袭与转移^[9]。E-cadherin蛋白是维持上皮细胞之间相互连接的最重要的粘附分子之一,它与 β -catenin组成E-cadherin/catenin复合物介导细胞与细胞之间的粘附,保持组织结构的完整性。Elzagheid等^[10]研究发现 β -catenin的核表达作为进展期大肠癌一个不良的预后因素。

本实验研究发现,复发与转移组E-cadherin表达下调, β -catenin出现细胞质与细胞核的异常表达增高,这与Huiping^[11]得出的结论相一致。可能由于E-cadherin减少, β -catenin的细胞膜功能丧失和数量减少,导致上皮细胞间的粘附能力下降或丧失,从而使癌细胞的浸润和转移能力增加。同时 β -catenin细胞膜失去依托固定作用, β -catenin细胞浆、细胞核出现高表达,这与文献报道 β -catenin在胞质累积后入

核、激活多基因(包括EMC蛋白纤维粘连素、基质金属蛋白酶等)的转录^[9],使肿瘤具有更强的侵袭和转移能力有关相一致。

实验研究表明可能由于Twist结合E-box,导致E-cadherin下调,细胞粘附力下降,细胞更易复发与转移,与E-cadherin结合的 β -catenin的膜表达减少,细胞浆聚积,然后进入细胞核后启动基质金属蛋白酶(MMP2,MMP9)等基因的转录,从而促进肝癌的侵袭、转移、复发,影响病人的生存预后,所以Twist、E-cadherin、 β -catenin为肿瘤的治疗提供了新的靶点。

参考文献

- 1 Kuper H, Ye W, Broome U, et al. The risk of liver and bile duct cancer in patients with chronic viral hepatitis, alcoholism, or cirrhosis [J]. Hepatology, 2001, 34(4 Pt 1): 714-718.
- 2 Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling[J]. Nature, 2000, 406(6795): 536-540
- 3 Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. Cell, 2004, 117(7): 927-939
- 4 胡建功,敖亚洲,李 民,等.妊娠滋养细胞肿瘤中E-cadherin的表达研究[J].中国肿瘤临床,2005,32(3):176-177.
- 5 张剑明,张 威,高 平,等.上皮钙粘蛋白在口腔鳞状细胞癌组织中的表达与临床预后的相关性探讨[J].中国肿瘤临床,2006,33(22): 1271-1273.
- 6 Zhang Z, Xie D, Li X, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer[J]. Hum Pathol, 2007,38(4): 598-606.
- 7 Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators[J]. Oncogene,2006, 25(57): 7469-7481.
- 8 He B, Barg RN, You L, et al. Wnt signaling in stem cells and non-small-cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2005, 7(1): 54- 60.
- 9 Pongracz JE, Stockley RA. Wnt signalling in lung development and diseases[J]. Respir Res, 2006, 7: 15.
- 10 Elzagheid A, Buhmeida A, Korkeila E, et al. Nuclear beta-catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma [J].World J Gastroenterol, 2008, 14(24): 3866-3871.
- 11 Huiping C, Kristjansdottir S, Jonasson JG, et al. Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2001, 1: 16.

(2009-10-08收稿)

(2009-11-20修回)

(郑莉校对)

《中国肿瘤临床》编辑部诚聘审稿专家

《中国肿瘤临床》系中国科协主管,中国抗癌协会主办,天津市肿瘤医院、肿瘤研究所承办与出版的全国性期刊。创刊于1963年3月,是全国创刊最早的肿瘤学术刊物,有着悠久的学术和人文底蕴。40多年来,期刊始终严格遵循求实、求精、求快的办刊原则,体现引导创新、关注前沿、突出临床、讲求实用的办刊特色,不断缩短刊期,于2004年改为半月刊。目前稿件来源更加丰富,数量和质量不断提高。为了缩短稿件的平均周转时间,保证文章的时效性,本刊编辑部决定扩大审稿专家的规模,特向全国公开招聘优秀审稿专家,以适应期刊的发展。

凡符合以下条件者,请下载并填写表格(下载网址:www.cjco.cn),同时将您的个人简历一起通过电子邮件发送到编辑部邮箱(cjco@cjco.cn、cjcotj@sina.com),务必详细说明您擅长审阅的专业范围。

审稿专家的基本条件:1)热爱审稿工作。2)具有副高及以上职称,或者已获博士学位的中级职称人员。3)能够及时审阅稿件,并按时寄回编辑部。

您的材料经审核录用后,您将会收到我刊向您颁发的审稿专家证书。同时,您将享受以下待遇:1)您撰写的论文免收处理费。2)您推荐的论文只送一审,您的意见可以作为编委会定稿讨论的参考。3)每期赠送杂志一册。