

肝细胞肝癌NTS的表达与炎症微环境形成和肿瘤上皮间质转化及预后的相关性研究*

刘芃芃^{①②} 陈永孜^③ 任秀宝^② 李 慧^② 应国光^③ 陈可欣^④ 于津浦^{①②}

摘要 目的:利用免疫组织化学染色法(IHC)检测肝细胞肝癌(HCC)中神经降压素(NTS)的表达,并探讨HCC中NTS/IL-8通路的激活与炎症微环境形成和肿瘤上皮间质转化(EMT)及临床预后的关系。**方法:**收集本院2007年11月至2009年7月期间进行部分肝切除术后确诊为肝细胞癌(HCC)、随访资料完整的肝癌患者64例。采用IHC法检测肝癌及相应癌旁正常组织中NTS,多种炎症因子和EMT相关蛋白的表达情况,包括IL-8、VEGF、MMP-9、CD68、E-cadherin、 β -Catenin和Vimentin的表达水平,并比较不同NTS表达对HCC患者总生存时间(OS)的影响。**结果:**NTS在HCC中表达率为17.19%(11/64),NTS阳性HCC标本中IL-8阳性率较NTS阴性标本明显增加(90.91% vs. 41.17%),二者表达呈正相关($R^2=0.298, P=0.006$)。NTS和IL-8双阳性(NTS⁺IL-8⁺)HCC标本中,VEGF和MMP-9表达显著增加。同时,NTS⁺IL-8⁺HCC细胞EMT特征明显,表现为E-Cadherin表达降低和Vimentin表达升高。在肿瘤中NTS和IL-8共表达与患者的临床疗效呈正相关,术后NTS⁺IL-8⁺HCC患者的死亡率比非NTS和IL-8共表达的患者高2.5倍($P=0.022$)。NTS⁺IL-8⁺HCC患者的OS显著缩短[(24.65 $\pm$ 4.45)个月 vs. (75.79 $\pm$ 16.32)个月, $P=0.013$],而死亡风险明显升高,其预期危险比(HR)为3.457。**结论:**在部分HCC中存在NTS/IL-8炎症通路的异常活化,NTS的高表达与炎症微环境形成和肿瘤EMT与肝癌患者预后较差密切相关。

关键词 HCC NTS 炎症微环境 EMT 预后

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20130576

Expression of NTS in hepatocellular carcinoma (HCC) is associated with the formation of inflammatory microenvironment, more epithelial mesenchymal transition in cancer, and worse prognosis

Pengpeng LIU^{1,2}, Yongzi CHEN³, Xiubao REN², Hui LI², Guoguang YING³, Kexin CHEN⁴, Jinpu YU^{1,2}

Correspondence to: Jinpu YU; E-mail: jinpu_yu@yahoo.com.cn

¹TMUCIH-JnJ joint laboratory, ²Department of Biotechnology, ³Laboratory of Cancer Cell Biology, ⁴Department of Epidemiology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, Tianjin 300060, China.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81272360).

Abstract Objective: This work aims determine the expression of the neurotensin (NTS) gene in hepatocellular carcinoma (HCC) subgrouping using immunohistochemical staining (IHC) as well as to evaluate the correlation between the activation of NTS/IL-8 pathway in HCC and inflammatory response in microenvironment and epithelial mesenchymal transition (EMT) in cancer and in the prognosis of patients. **Methods:** Tumor tissues and corresponding adjacent normal tissue were collected from 64 cases of HCC patients. The expression levels of NTS protein and multiple inflammation and EMT-related proteins, including IL-8, VEGF, MMP9, CD68, E-Cadherin, β -Catenin, and Vimentin, were examined in 64 cases of paraffin-embedded HCC tissues using the immunohistochemistry (IHC) staining method. The clinical outcome and overall survival (OS) among 64 cases of HCC patients were compared. **Results:** We found that the frequency of NTS-expressing tissues among all HCC samples was 17.19% (11/64). Significantly increased IL-8 protein was confirmed in 90.91% of NTS⁺ HCC samples and was positively correlated with the levels of NTS protein in cancer tissues ($P=0.036$), which implied the dysfunctional activation of NTS/IL-8 pathway in HCC. The levels of VEGF and MMP9 were significantly correlated with the co-expression of NTS and IL-8 in HCC. Evident features of EMT, including decreased membrane expression of E-Cadherin and increased accumulation of cytoplasmic β -Catenin and Vimentin, were found in NTS⁺IL-8⁺ samples. The co-expression of NTS and IL-8 in cancer was significantly correlated with the clinical outcomes of patients, as the mortality rate of NTS⁺IL-8⁺ HCC patients is 2.5-fold higher than that of others after surgery ($P=0.022$).

作者单位: ①天津医科大学肿瘤医院强生联合实验室, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津医科大学肿瘤医院, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室 (天津市075000); ②生物技术研究室; ③肿瘤细胞生物学实验室; ④流行病学研究室

*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:81272360)资助

通信作者: 于津浦 jinpu_yu@yahoo.com.cn

Accordingly, the OS of NTS⁺IL-8⁺ HCC patients significantly decreased (24.65 ± 4.45 m vs. 75.79 ± 16.32 m, $P=0.013$), and these patients are at a higher risk of death at an expected hazard ratio (HR) of 3.457. **Conclusion:** The NTS/IL-8 pathway is dysfunctionally activated in a subgroup of HCC samples. Highly expressed NTS is associated with increased inflammatory response in microenvironment, enhanced EMT in cancer, and worse prognosis in HCC patients.

Keywords: HCC, NTS, inflammatory microenvironment, EMT, prognosis

肝细胞肝癌(HCC)是一种常见的恶性肿瘤^[1],是亚洲和非洲国家死亡的最常见原因之一。我国每年死于肝癌约11万人,占全世界肝癌死亡人数的45%^[2]。近年来,尽管HCC诊疗技术得到明显改善,但对患者预后并无显著改善。近年来,越来越多的研究表明炎症在HCC的发生和发展中发挥重要的调节作用^[3],而炎症微环境在促进肿瘤侵袭和转移中发挥的作用也受到越来越多的关注。慢性炎症可以通过诱导上皮间质转化(EMT)促进肿瘤侵袭转移,在结肠癌和乳腺癌中已被证实^[4]。同时,NTS/IL-8炎症通路活化介导的炎症反应也已经被证实发生在结肠癌的发生和转移中发挥关键作用^[5]。在本研究前期工作中,通过生物信息学的挖掘,发现HCC中NTS高表达与炎症基因表达增加密切相关。因此本研究通过免疫组织化学方法验证HCC中是否存在NTS的异位表达和NTS/IL-8通路活化,并探讨其在HCC侵袭转移中的作用和对临床预后的预测意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集天津市肿瘤医院肝胆肿瘤科从2007年11月至2009年7月经部分肝切除手术治疗的肝细胞肝癌患者,共64例。其中,男性58例标本女性6例,年龄35~71岁,平均年龄54.44岁。患者均经病理诊断为肝细胞肝癌,术前未接受其他化放疗。其中,组织学分级为I级4例,II级36例,III级24例,临床分期为I期8例,II期44例,III期12例。术后随访时间为20~40个月。

1.1.2 试剂 鼠抗人VEGF单克隆抗体、兔抗人基质金属蛋白酶9多克隆抗体(MMP-9)、鼠抗人 β -连接素单克隆抗体(β -catenin)、鼠抗人上皮性钙黏附蛋白单克隆抗体(E-Cadherin)、鼠抗波形蛋白单克隆抗体(Vimentin)、CD68、通用型抗鼠/兔二步法检测试剂盒、抗体稀释液、DAB显色试剂盒、均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Neurotensin(NTS)IL-8购自美国Enzo Life Sciences公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测蛋白表达 切片经常规脱蜡、抗原修复、去内源性过氧化物酶及牛血清白蛋白封闭后,每个样品滴加50 μ L的单克隆抗体分别为NTS、IL-8、VEGF、MMP-9、CD68、E-Cadherin、 β -Catenin和

Vimentin单克隆抗体4℃过夜,二抗37℃孵育30 min, DAB显色,苏木精复染。对照设置:PBS替代一抗作为阴性对照。酒精梯度脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.2.2 结果评定标准 阳性细胞为细胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒,其中NTS、IL-8、VEGF、MMP-9和Vimentin着色于细胞质,E-Cadherin着色于细胞膜,CD68和 β -catenin着色于细胞质和细胞膜。每例标本在显微镜下随机选择10个高倍镜视野($\times 400$),每个视野计数100个细胞。采用双评分半定量法进行评价,细胞染色阳性率(PR)是在HCC样品中染色的阳性细胞的比例,其范围从0到3,分别代表 $\leq 10\%$ 、 $11\% \sim 30\%$ 、 $31\% \sim 60\%$ 和 $>60\%$ 。同样,着色强弱范围从0到3,分别代表无着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色。这两种计分相加, <4 被定义为低表达或不表达, ≥ 4 被定义为高表达。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析,阳性率的比较采用 χ^2 检验及Pearson相关性分析,两指标表达相互关系用Spearman秩相关检测。64例癌组织根据性别、年龄、HBV感染的状态、既往的吸烟史和饮酒史、临床分期及预后被分成不同亚组,采用Kaplan-Meier法确定累积生存率,使用Log-rank检验期进行肝癌患者不同的蛋白标记物和总生存时间(OS)之间的单因素分析。采用Cox比例风险模型进行多因素分析,筛选影响预后的独立因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NTS与IL-8表达相关性

64例HCC患者肝癌组织NTS表达阳性率为17.19%(11/64)(图1A),主要分布在细胞质,呈棕黄色颗粒。在11例NTS⁺标本中NTS平均PR为50.00% $\pm$ 11.62%,平均染色强度为 2.91 ± 0.3 。IL-8表达阳性率为54.69%(35/64)(图1B),主要分布于细胞质,呈棕黄色颗粒。在NTS⁺标本中IL-8高表达的HCC组织阳性率是90.91%(10/11),而在53例NTS⁻标本中IL-8高表达的组织阳性率仅为47.17%(25/53)($P=0.006$),这提示NTS⁺HCC标本中IL-8表达率显著升高。同时比较NTS⁺HCC标本和NTS⁻HCC标本中IL-8蛋白表达量,发现11例NTS⁺标本中IL-8平均PR为50.91% $\pm$

13.57%, 显著高于 53 例 NTS⁻HCC 标本中 IL-8 的平均 PR31.42%±29.39% ($P=0.036$), 且 NTS 和 IL-8 蛋白表达量之间呈正相关($R^2=0.298$, $P<0.05$, 图 1C), 提示在 NTS⁺HCC 标本中 NTS⁺HCC 标本中 IL-8 表达显著增加, 即存在 NTS/IL-8 炎症通路的异常活化。

2.2 NTS 与炎症相关蛋白 VEGF、MMP-9 和 CD68 表达相关性

HCC 标本中, VEGF 的阳性率为 48.44% (31/64) (图 2A), MMP-9 的阳性率为 45.31% (29/64) (图 2B)。MMP9 在 NTS⁺样品中的平均 PR 为 (49.09±25.57)%, 显著高于在 NTS⁻样品中的 (23.58±26.13)% ($P=0.004$)。相反, VEGF 在 NTS⁺和 NTS⁻样本的平均 PR 间的差异不显著, 分别为 (46.36±32.95)% 和 (32.55±29.19)% ($P=0.167$)。然而, VEGF 在 NTS⁺IL-8⁺HCC 样本的表达显著高于其他 HCC 样本, 分别为 (55.00±30.27)% 和 (31.02±28.92)% ($P=0.020$)。同时, 可观察到 NTS⁺IL-8⁺HCC 样本中存在明显的 CD68⁺TAMs 浸润(图 2C)。这些结果表明, NTS/IL-8 通路活化有利于肿瘤微环境中多种炎症因子释放和 TAMs 的募集, 促进 HCC 炎症微环境的形成。

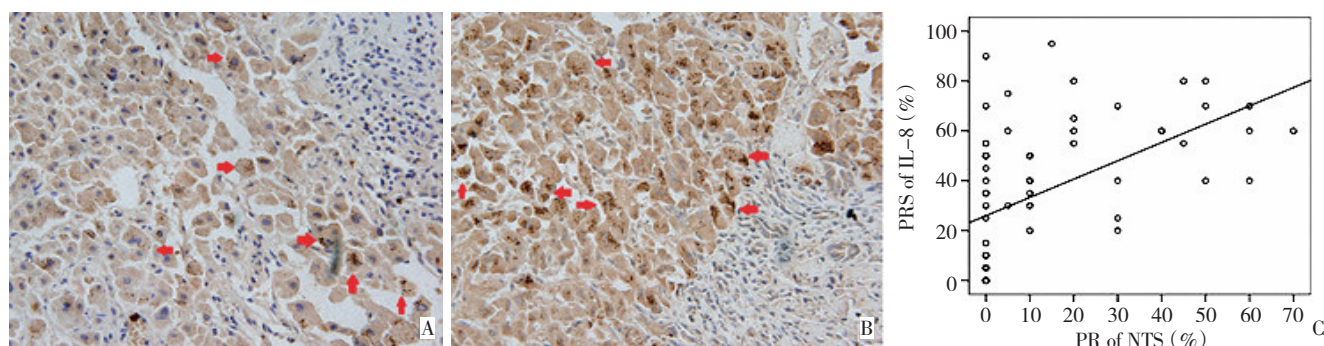
2.3 NTS 与 EMT 相关蛋白 E-cadherin、 β -Catenin 和 Vimentin 表达相关性

在 NTS⁺IL-8⁺肝癌样本中发现了 EMT 的特征, 包括 E-cadherin 膜表达的丢失(图 3A), β -Catenin 和 Vi-

mentin 细胞质积累的增加(图 3B~3C)。统计分析表明, 在肝癌组织中 E-cadherin 和 β -catenin 的表达与 IL-8 的水平显著相关, (E-cadherin 的 $R_{\text{cad}}=0.299$, $P_{\text{cad}}=0.002$; β -catenin 的 $R_{\text{cat}}=0.247$, $P_{\text{cat}}=0.020$), 这提示在肝癌细胞中, NTS/IL-8 炎症通路的异常活化引起 IL-8 表达上调可能会促进 EMT。

2.4 NTS 与 HCC 患者临床预后的相关性

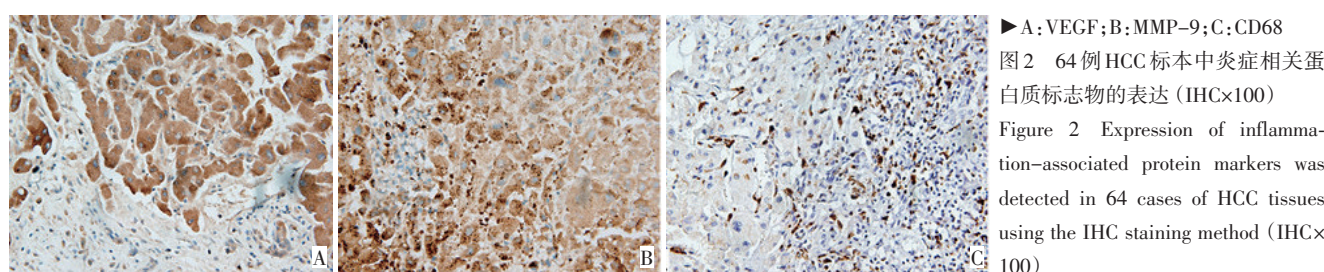
在不同性别, 年龄, HBV 感染情况, 饮酒史或临床分期的患者之间显示的总生存期 OS 没有统计学差异。单因素分析比较患者 OS 与 NTS, IL-8, MMP-9, 和 VEGF 表达水平之间的关系, 发现 NTS 的表达水平对 HCC 患者的 OS 具有重大影响, 其中 NTS⁺HCC 患者的 OS 明显短于 NTS⁻HCC 患者 ($P=0.035$)。同样, 多变量 Cox 回归分析表明 NTS⁺IL-8⁺患者的 OS 是其他患者的 1/3 ($P=0.011$), 提示 NTS 和 IL-8 同时表达是 HCC 患者 OS 的独立预后因素。相比没有 NTS⁺IL-8⁺共表达的肝癌患者, NTS⁺IL-8⁺肝癌患者的 OS 显著下降 [(24.65±4.45)个月 vs. (75.79±16.32)个月, $P=0.013$], 并且这些患者在预期危险比(HR)为 3.457 的较高死亡风险值下。通过 K-M 生存分析发现 NTS 和 IL-8 双阳性 HCC 患者的 OS 较单阳性和阴性患者明显缩短, 分别为 (24.65±4.45)个月与 (75.79±16.32)个月 ($P=0.036$), 提示 NTS/IL-8 炎症通路异常活化的 HCC 患者预后较差。



A: NTS; B: IL-8; C: Correlation curve of NTS and IL-8 expression

图1 64例HCC标本中NTS与IL-8的组化表达结果(IHC×100)

Figure 1 NTS/IL-8 pathway group detection in 64 cases of HCC tissues using the IHC staining method (IHC×100)



►A: VEGF; B: MMP-9; C: CD68

图2 64例HCC标本中炎症相关蛋白质标志物的表达(IHC×100)

Figure 2 Expression of inflammation-associated protein markers was detected in 64 cases of HCC tissues using the IHC staining method (IHC×100)

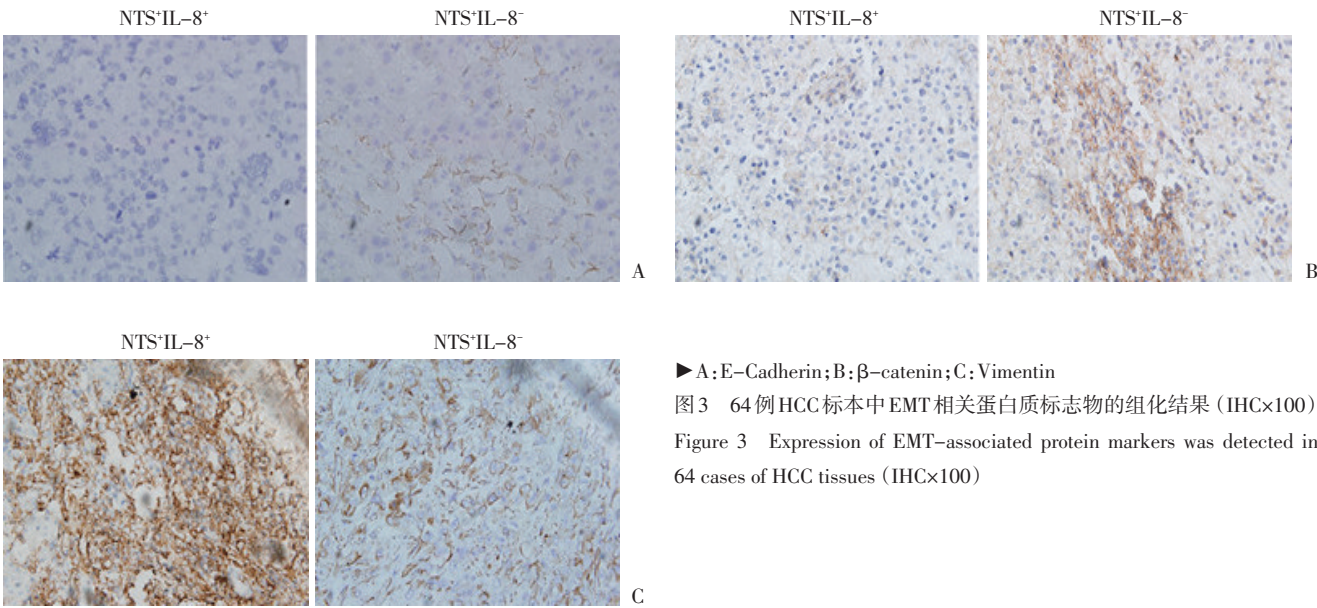


表 1 64 例肝癌患者不同的临床和病理参数对生存的影响 月

Table 1 Effect of different clinical and pathological parameters on the survival of 64 HCC patients (months)

Variable	Group	Estimated mean survival (95% confidence interval)	χ^2	<i>P</i>
Alcohol	0	39.27(34.73–43.80)	2.447	0.118
	1	71.41(49.47–93.36)		
HBV infection	0	27.15(21.40–32.89)	1.036	0.309
	1	70.90(41.08–100.76)		
Clinical stage	1	36.94(28.43–45.45)	0.793	0.673
	2	63.06(24.71–101.42)		
	3	26.38(20.11–32.65)		
NTS level	0	75.395(43.55–107.24)	4.444	0.035
	1	25.73(17.52–33.93)		
IL-8 level	0	36.88(32.19–41.56)	1.062	0.303
	1	60.97(33.40–88.54)		
Co-expression of NTS and IL-8	0	75.79(43.81–107.78)	6.416	0.011
	1	24.65(15.94–33.36)		
VEGF level	0	61.61(24.28–98.95)	0.031	0.861
	1	35.78(29.61–41.94)		
CD68 level	0	73.89(42.61–105.17)	1.905	0.168
	1	27.88(20.23–35.53)		

3 讨论

NTS是一个含有13个氨基酸的神经肽,1973年首次由Carraway等^[6]从牛的下丘脑中分离。NTS广泛表达在人类和动物的大脑和胃肠道中,作为一种神经内分泌肽,NTS显著作用于多巴胺能系统,对降低血压,调节胃肠道功能起着重要的作用^[7]。近年来,研究已表明,NTS可以为多种类型上皮细胞来源的恶性肿瘤提供一种生长信号促进肿瘤的增殖,包括结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、头颈肿

瘤^[8]。NTS/IL-8炎症通路已证实参与结肠癌的发生和转移过程,而这一过程与TGF信号介导EMT有密切关系^[9],但NTS在肝癌中的表达情况和临床病理意义目前尚不清楚。

本课题组前期工作中,利用Affymetrix公司的人类全基因组表达谱芯片(human genome U133 plus 2.0)对10例随机选择的原发性肝细胞癌标本中多种转录产物的表达情况进行检测,并与癌旁正常组织进行比较。并从肝细胞肝癌标本中分离出一个独特

的亚群,该亚群高表达NTS,并伴有以IL-8升高为代表的多种炎症相关基因的过表达,以及显著增加的细胞迁移等特征。

文献报道,NTS在胎儿肝脏中短暂表达,在正常成熟的肝脏和原发性肝癌组织中消失^[10]。IHC结果表明NTS蛋白主要表达在肿瘤细胞的细胞膜和细胞质中,而不是基质细胞,这意味着在一些肝癌样本中存在NTS表观异位表达,这与Tang等^[11]在细胞系中获得的结果一致。同时免疫组织化学结果也进一步证实了本研究在基因表达谱芯片中的发现:NTS与IL-8的表达呈正相关,表明NTS/IL-8通路在一些肝癌样本中存在异常激活^[12]。

EMT是一个生物过程,使上皮细胞经过多次的生化变化,能够具有一个间质表型,这种表型是上皮源性癌症复发和转移的一个重要的分子基础^[13-14]。在NTS⁺IL-8⁺肝癌样本中观察到多种炎症相关蛋白,如VEGF、MMP-9表达显著升高,CD68⁺TAMs浸润程度增加,提示NTS/IL-8通路的异常活化导致HCC中炎症反应提高^[15]。NTS⁺IL-8⁺肝癌样本还表现出E-Cadherin膜表达丢失和胞浆内 β -catenin和Vimentin堆积等EMT特征,提示NTS/IL-8通路活化参与HCC中炎性微环境形成和EMT发生。

在探讨肿瘤中NTS和IL-8的共表达与临床预后的相关性,发现术后NTS⁺IL-8⁺HCC患者的OS显著缩短,而死亡风险明显升高,死亡率比非NTS和IL-8共表达的患者高2.5倍,提示NTS/IL-8通路的异常活化影响术后HCC患者预后,而这可能与NTS/IL-8通路活化引起的慢性炎症和EMT导致HCC侵袭性增加有关^[16]。

本研究通过生物信息学分析和免疫组织化学染色法证实在HCC中存在NTS/IL-8通路的异常活化,并通过促进局部炎症微环境的发展和增加肿瘤细胞的侵袭能力,影响HCC患者预后。这一发现可能为HCC的分子分型、疗效预测和靶向治疗提供了一个有价值的生物标志物。

参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2):74-108.
- 2 Bray F, Jemal A, Grey N, et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(8):790-801.

- 3 Morrison WB. Inflammation and cancer: a comparative view[J]. J Vet Intern Med, 2012, 26(1):18-31.
- 4 Law IK, Murphy JE, Bakirtzi K, et al. Neurotensin-induced proinflammatory signaling in human colonocytes is regulated by beta-arrestins and endothelin-converting enzyme-1-dependent endocytosis and resensitization of neurotensin receptor 1[J]. J Biol Chem, 2012, 287(18):15066-15075.
- 5 Wang X, Wang Q, Ives KL, et al. Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(18):5346-5355.
- 6 Carraway R, Leeman SE. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus[J]. J Biol Chem, 1973, 248(19):6854-6861.
- 7 Zhao D, Pothoulakis C. Effects of NT on gastrointestinal motility and secretion, and role in intestinal inflammation[J]. Peptides, 2006, 27(10):2434-2444.
- 8 Shimizu S, Tsukada J, Sugimoto T, et al. Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway[J]. Int J Cancer, 2008, 123(8):1816-1823.
- 9 Valcourt U, Kowanez M, Niimi H, et al. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(4):1987-2002.
- 10 Reubi JC, Waser B, Schaer JC, et al. Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas[J]. Int J Cancer, 1999, 82(2):213-218.
- 11 Tang KH, Ma S, Lee TK, et al. CD133(+) liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling[J]. Hepatology, 2012, 55(3):807-820.
- 12 Andrisani OM, Studach L, Merle P. Gene signatures in hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1):4-9.
- 13 Ding W, You H, Dang H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of murine liver tumor cells promotes invasion[J]. Hepatology, 2010, 52(3):945-953.
- 14 van Zijl F, Zulehner G, Petz M, et al. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. Future Oncol, 2009, 5(8):1169-1179.
- 15 Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression[J]. Immunol Lett, 2009, 123(2):97-102.
- 16 Sun JC, Liang XT, Pan K, et al. High expression level of EDIL3 in HCC predicts poor prognosis of HCC patients[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(36):4611-4615.

(2013-04-12收稿)

(2013-07-31修回)

(本文编辑:杨红欣)