

Significance of CD44v6 and FN Expressions in Hepatocellular Carcinoma

Peizhong Shang¹, Zhihu Wang², Yongqing Li¹, Yijie Zhao³, Shujun Pei¹, Huaping Gu¹

¹Department of General Surgery, The 251st Hospital of Chinese PLA, Zhangjiakou Hebei

²Department of Surgery, People's Hospital of Zhuolu County, Zhuolu Hebei

³The Library of Hebei North College, Zhangjiakou Hebei

Email: spz251@163.com

Received: Jul. 5th, 2017; accepted: Jul. 21st, 2017; published: Jul. 26th, 2017

Abstract

Objective: To investigate the significance of CD44v6 and FN expressions in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** EliVision™ plus two-step immunohistochemical method was used to detect CD44v6 and FN expressions in 140 cases of HCC. **Results:** Positive expression rate of CD44v6 and FN in HCC were 42.9% and 35.7%, respectively. HCC with positive expression of CD44v6 had a higher metastatic rate ($P < 0.05$) and lower survival rate of 5 years ($P < 0.05$); HCC with positive FN expression had lower metastatic rate ($P < 0.05$) and higher survival rate of 5 years ($P < 0.05$). The expression of CD44v6 was negatively correlated to FN expression in HCC ($r = -0.46$). **Conclusion:** These results showed that the expressions of CD44v6 and FN were closely linked to potential metastasis and to the survival rate in HCC. CD44v6 and FN may be clinically used as prognostic indicators in HCC.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, CD44v6, FN, Neoplasm Metastasis

肝细胞癌CD44v6和FN表达及其意义

尚培中¹, 王志湖², 李永庆¹, 赵一洁³, 裴树俊¹, 谷化平¹

¹中国人民解放军第251医院普通外科, 河北 张家口

²河北省涿鹿县人民医院外科, 河北 涿鹿

³河北北方学院图书馆, 河北 张家口

Email: spz251@163.com

收稿日期: 2017年7月5日; 录用日期: 2017年7月21日; 发布日期: 2017年7月26日

摘要

目的：探讨肝细胞癌(HCC)CD44v6和FN表达及其意义。方法：应用免疫组化染色EliVision™ plus二步法检测140例HCC组织中CD44v6和FN蛋白表达，结合随访资料进行分析。结果：CD44v6和FN在HCC中阳性表达率分别为42.9%和35.7%。CD44v6阳性表达的HCC转移率高($P < 0.05$)，分化程度及患者5年生存率低($P < 0.05$)；FN阳性表达的HCC转移率低($P < 0.05$)，分化程度及患者5年生存率高($P < 0.05$)。CD44v6表达与FN表达呈负相关($r = -0.46$)。结论：CD44v6和FN表达与HCC分化程度、浸润转移和患者生存期密切相关，联合检测CD44v6和FN蛋白表达可作为判断HCC预后有价值的参考指标。

关键词

肝细胞性肝癌，CD44v6，FN，肿瘤转移

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要类型，约占肝癌的85%~90%，在人类恶性肿瘤死亡原因中位居第三，半数以上病例死于中国，5年生存率8.9% [1] [2] [3]。局部浸润和远处转移是影响HCC患者生存的重要因素，与多种基因及其蛋白产物的表达异常有关[2]-[11]。本文采用免疫组化染色EliVision™ plus二步法检测140例HCC组织白细胞分化抗原44变异体6(CD44v6)和纤黏连蛋白(Fibronectin, FN)的表达，探讨它们之间的相关性，结合临床随访资料分析其表达与HCC浸润、转移和患者预后的关系。

2. 资料与方法

2.1. 一般资料

本研究的病例来自2000年11月至2011年2月在中国人民解放军第251医院手术切除的原发性HCC标本140例，其中男90例，女50例；年龄27~73岁，平均年龄(48.6 ± 8.8)岁。肉眼形态：巨块型63例，结节型54例，弥漫型23例。肿瘤大小：≤5 cm 48例，>5 cm 92例。按Edmondson分级标准I~II级为高分化癌56例，III~IV级为低分化癌84例。伴有淋巴结、肝内、肝外转移者63例，无转移者77例。140例HCC患者中随访满5年者84例，其中死亡62例，存活22例。选取距癌灶2cm的癌旁肝组织30例和尸检正常肝组织10例作为对照。研究方案通过医院伦理委员会批准，所有患者及家属均签署知情同意书。

2.2. 纳入标准

- 1) 原发性HCC，手术切除后病理诊断确诊。
- 2) 年龄 ≥ 18岁，≤80岁。
- 3) AFP ≥ 400 μg/L，并能触及肝脏肿块或影像学检查有肝癌特征的占位性病变。
- 4) AFP < 400 μg/L，并有两种影像学检查有肝癌特征的占位性病变或有两种肝癌标志物(AFP异质体，异常凝血酶原，γ-谷氨酰转肽酶同工酶II及α-L-岩藻糖苷酶等)阳性及一种影像学检查有肝癌特征的占位

性病变。

5) 术前未曾接受过介入治疗、射频及其它间质治疗、化学治疗、放射治疗、免疫治疗、中药治疗及生物靶向治疗等。

2.3. 排除标准

- 1) 术前肝穿刺活检或手术切除后病理诊断为原发性胆管细胞癌。
- 2) 转移性肝癌。
- 3) 肝肉瘤或肝肉瘤样癌等其它少见恶性肿瘤。
- 4) 年龄 < 18 岁, >80 岁。
- 5) 术前曾接受过抗癌治疗措施。
- 6) 妊娠患者。
- 7) 活动性肝病或其它严重肝肾疾病。
- 8) 其它系统性疾病。

2.4. 免疫组化染色方法

手术标本均行常规 HE 染色。取相邻切片行免疫组化染色。即用型鼠抗人 CD44v6 和 FN 单克隆抗体、EliVision 试剂盒和二氨基联苯胺显色剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司。所有标本均经 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 常规制备 4 μm 厚连续切片, 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤备用。采用 EliVision™ plus 二步法, 主要操作步骤[12] [13] [14] [15] [16]: ① 石蜡切片脱蜡至水, 微波(micro-wave, MW) 5 (输出功率 90 W, 下同) 档, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 min \times 3; ② 微波-枸橼酸钠缓冲液(0.01 mol·L⁻¹, PH 6.0)修复抗原, MW3 档(输出功率 150 W) 2 min, MW5 档 2 \times 5 min, 自然冷却至近室温时自来水洗, PBS 洗 1 min \times 3; ③ MW5 档, 在甲醇-双氧水中封闭内源性过氧化物酶 2 min, PBS 洗 1 min \times 3; ④ 加一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 从冰箱中取出后, MW5 档 5 min, PBS 洗 2 min \times 3; ⑤ 加聚合物增强剂, 室温下孵育 20 min, PBS 洗 2 min \times 3; ⑥ 加生物素化鼠抗人 IgG (1:300), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min, MW5 档 5 min, PBS 洗 2 min \times 3; ⑦ 3,3'-二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB-H₂O₂)显色 10 min; 自来水终止显色; ⑧ 苏木素复染 0.5~1.0 min; ⑨ 常规酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。以公司提供的已知 CD44v6 和 FN 阳性染色切片作阳性对照, 磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。

2.5. 判定标准

阳性颗粒呈棕黄色或棕褐色, 由 2 位有经验的病理医师在光学显微镜下进行双盲观察, 按染色深浅强度评分: 无染色 0 分, 棕黄色 1 分, 棕褐色 2 分; 按染色癌细胞所占比例评分: $\leq 30\%$ 1 分, 31%~70% 2 分, $\geq 71\%$ 3 分。每例按两项评分之和定性: 0 分阴性(-), 1~3 分弱阳性(+), 4~6 分强阳性(++)。弱阳性和强阳性均计为阳性。

2.6. 统计学处理

数据资料应用 SPSS17.0 统计软件进行 χ^2 检验及相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3. 结果

3.1. CD44v6 和 FN 在 HCC 组织、癌旁肝组织和正常肝组织中的表达

CD44v6 阳性染色主要见于细胞质和细胞膜, FN 阳性染色主要见于细胞膜和细胞质。HCC 组织 140 例中 CD44v6 和 FN 阳性率分别为 42.9% (60/140)和 35.7% (50/140)。癌旁肝组织 30 例中 CD44v6 弱阳性

表达 3 例(阳性率 10%), FN 均呈不同程度的阳性表达(阳性率 100%)。正常肝组织 10 例中 CD44v6 均阴性, FN 均呈不同程度的阳性表达。 χ^2 检验, CD44v6 阳性率在 HCC 中显著高于癌旁肝组织和正常肝组织($\chi^2 = 11.435, \chi^2 = 7.143, P < 0.05$), FN 阳性率在 HCC 中显著低于癌旁肝组织和正常肝组织($\chi^2 = 40.982, \chi^2 = 16.071, P < 0.05$)。

3.2. CD44v6 和 FN 表达与 HCC 临床病理特征的关系

两者表达在不同性别、年龄、肿瘤肉眼形态及大小之间差异无统计学意义($P > 0.05$), 在不同分化程度及有无转移之间差异有统计学意义(见表 1)。

3.3. CD44v6 和 FN 表达与 HCC 预后的关系

在随访满 5 年的患者中, CD44v6 阳性者死亡率高, 生存率低; FN 阳性者死亡率低, 生存率高(见表 1)。

3.4. CD44v6 和 FN 表达之间的关系

在 CD44v6 阳性表达的 60 例 HCC 中, FN 阳性表达 4 例(6.7%), 在 CD44v6 阴性的 80 例 HCC 中, FN 阳性表达 46 例(55.5%)。CD44v6 与 FN 表达呈显著负相关($P < 0.05, r = -0.46$)。

Table 1. The relationships between the expression of CD44v6 and FN and clinicopathologic feature of HCC
表 1. CD44v6 和 FN 表达与 HCC 临床病理特征的关系

临床病理指标	n	CD44v6				FN			
		-	+	++	阳性(%)	-	+	++	阳性(%)
性别									
男	90	49	20	21	41 (45.6)	54	19	17	36 (40.0)
女	50	31	9	10	19 (38.0)	36	7	7	14 (28.0)
年龄									
≤40	51	30	10	11	21 (41.2)	37	7	7	14 (27.5)
>40	89	50	19	20	39 (43.8)	53	19	17	36 (40.4)
肉眼形态									
巨块型	63	34	15	14	29 (46.0)	39	10	14	24 (38.1)
结节型	54	32	9	13	22 (40.7)	36	11	7	18 (33.3)
弥漫型	23	14	5	4	9 (39.1)	15	5	3	8 (34.8)
肿瘤大小									
≤5 cm	48	24	13	11	24 (50.0)	34	8	6	14 (29.2)
>5 cm	92	56	16	20	36 (39.1)	56	18	18	36 (39.1)
分化程度									
高分化	56	39	10	7	17 (30.4)	28	9	19	28 (50.0)
低分化	84	41	19	24	43 (48.8)*	62	17	5	22 (26.2)*
转移									
无	77	54	14	9	23 (29.9)	37	18	22	40 (51.9)
有	63	26	15	22	37 (58.7) [△]	53	8	2	10 (15.9) [△]
随访满5年者									
生存	22	13	6	3	9 (40.9)	3	7	12	19 (86.4)
死亡	62	20	18	24	42 (67.7) [#]	39	13	10	23 (37.1) [#]

注: 与高分化组比较* $P < 0.05$; 与无转移组比较[△] $P < 0.05$; 与生存组比较[#] $P < 0.05$ 。

4. 讨论

癌基因研究结果发现,恶性肿瘤发生发展的各个时期至少有两种或两种以上功能不同的癌基因或抑癌基因的异常表达,前者的激活及后者的突变失活等发挥了不同作用,协同促进细胞癌变。HCC 发病隐匿,恶性度高,侵袭力强,细胞与细胞或细胞与基质之间黏附特性的异常在浸润和转移过程中发挥了重要作用。近年已发现不少包括甲胎蛋白(AFP)在内的与 HCC 发生发展、浸润转移相关的肿瘤标志物,其应用价值在临床诊疗中不断得到肯定。

CD44 是一种整合膜糖蛋白,作为淋巴细胞的归巢受体和透明质酸酶的主要受体,能连接细胞基质中的 FN、层黏蛋白、I 型胶原、透明质酸以及骨架蛋白,参与细胞伪足形成,导致细胞形态和游动性改变。CD44v6 是 CD44 的一种拼接变异体,其表达可改变肿瘤细胞表面黏附分子的构成和功能,有助于肿瘤细胞获得转移潜能。CD44v6 的高表达与胃癌、结肠癌、黑色素瘤等多种恶性肿瘤的发生发展、浸润转移密切相关,被认为是一种独立的预后指标[17][18],与 HCC 分化程度及临床分期密切相关[6][7][8]。FN 是一种多功能基质糖蛋白,为基质和基底膜的主要黏合蛋白成分,介导了细胞间及细胞与细胞外基质的相互黏附作用,是维持机体完整性及防御机制的重要物质,在胶原合成、调节网状内皮系统功能、维持内环境平衡、修复肝细胞损伤等方面具有重要作用,其表达水平可反应肝细胞受损程度,与肝硬化及 HCC 的发生发展相关[9][10]。细胞 FN 和基膜 FN 的减少和缺失,可导致癌细胞黏附性下降,通过破坏基底膜,逃脱周围束缚,发生浸润和转移。

本组研究资料表明,CD44v6 在癌旁肝组织中仅少量呈弱阳性表达,在正常肝组织中均为阴性表达, FN 在癌旁肝组织及正常肝组织中均呈不同程度的阳性表达。在 HCC 组织中 CD44v6 阳性率显著高于癌旁肝组织和正常肝组织, FN 阳性率显著低于癌旁肝组织和正常肝组织。CD44v6 表达阳性的 HCC 分化程度低,转移率高,患者 5 年生存率低, FN 阳性表达的 HCC 分化程度高,转移率低,患者 5 年生存率高,表明 CD44v6 表达上调和 FN 表达下调与 HCC 分化程度、浸润转移及患者生存期密切相关。笔者还观察到,在 HCC 组织中两者表达呈显著负相关,提示它们在 HCC 恶性发展过程中可能具有相互诱导或负调控的协同作用。联合检测 CD44v6 和 FN 有助于了解其临床病理进程,提高对其生物学特性、尤其是浸润能力和转移潜能的判断水平。深入研究它们在 HCC 中的作用机制,对评估患者预后、随访中及时发现复发、指导临床采用再手术或其它抗癌治疗综合措施具有一定指导意义[19][20]。

5. 结论

CD44v6 和 FN 表达与 HCC 分化程度、浸润转移和患者生存期密切相关,联合检测 CD44v6 和 FN 蛋白表达可作为判断 HCC 预后有价值的参考指标。

参考文献 (References)

- [1] 郑作深. 精准医学引导下肝癌周围的亚临床癌灶研究进展[J]. 亚洲肿瘤科病例研究, 2016, 5(3): 45-54.
- [2] 贾丽, 许晓梅, 韩建雄. NUPR1 蛋白在肝癌中的表达水平及临床意义[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(6): 40-43.
- [3] 张金玲, 吴超, 赵志辉. 高尔基糖蛋白 73 在早期原发性肝癌中的表达及意义[J/CD]. 中华普通外科学文献(电子版), 2017, 11(1): 9-12.
- [4] 李永庆, 尚培中, 苗建军, 等. CD15s 和 E-cadherin 表达与肝细胞癌侵袭转移相关性研究[J]. 河北北方学院学报(医学版), 2009, 26(6): 5-7.
- [5] 尚培中, 李永庆, 苗建军, 等. CD15s 和 CD138 在肝细胞癌中的表达及其意义[J/CD]. 中华普通外科学文献(电子版), 2010, 4(4): 315-318.
- [6] 王志东, 张麒麟, 张子军, 等. GPC3 和 CD44v6 在肝细胞癌组织中的表达及其意义[J]. 大连医科大学学报, 2015, 37(5): 422-424, 460.

- [7] 李永庆, 尚培中, 苗建军, 等. 肝细胞癌 CD44v6 和 nm23H1 表达及临床意义[J]. 中国医学创新, 2010, 7(3): 3-4.
- [8] 刘伟, 王遵义, 白希永, 等. FN 和 CD44v6 在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(18): 1057-1058, 1062.
- [9] 吴金柱, 蔡卫华, 陆仁飞, 等. 肝癌组织中 FN 和 PTEN 的表达及其临床意义[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(8): 1108-1112.
- [10] 张鸣杰, 张国雷, 魏去海, 等. FHIT、FN 和 PTEN 在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 中华普通外科杂志, 2012, 27(6): 487-490.
- [11] 王涛, 高艳, 祁军安. 术前 C 反应蛋白水平与原发肝癌肝切除患者预后的关系[J/CD]. 中华普外科手术学杂志(电子版), 2016, 10(4): 328-331.
- [12] 臧盛兵, 黄爱民, 刘景丰, 等. 肝细胞癌组织芯片环氧合酶-2 表达的半定量图像分析[J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(1): 23-25, 59.
- [13] 高建芝, 杜经丽, 李佳, 等. VEGF 相关信号通路在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(1): 75-78.
- [14] 王玉兰, 杜经丽, 石怀银, 等. Cyclin D1、p21^{WAF1}、p53 及 Ki-67 在肝细胞癌中的表达及与预后的关系[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(1): 20-24.
- [15] 尚培中, 柳勇, 李永庆, 等. COX-2 和 Gal-3 表达与甲状腺乳头状癌浸润转移的关系[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2016, 32(8): 1-4.
- [16] 李永庆, 尚培中, 柳勇, 等. VEGF 和 SLeX 表达与甲状腺乳头状癌浸润转移的关系[J]. 中国医学创新, 2016, 13(21): 5-9.
- [17] 李延海, 孙辉, 任鹏. 新辅助化疗对胃癌组织 CD44V6、p21 阳性表达及患者预后的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(8): 38-39.
- [18] 宋云骏, 姜林鹤, 季世强, 等. CD44V6 在大肠癌组织和外周血表达及其临床意义[J]. 河北医学, 2016, 22(8): 1238-1241.
- [19] 张雪梅, 蒋华明, 甘利娟, 等. 术前抑癌消瘤汤联合新辅助化疗对结直肠癌术后淋巴结检出数目及癌组织中 CD44v6 和 p27 表达的影响[J]. 四川中医, 2016, 34(8): 94-96.
- [20] 焦云涛, 杨先照, 刘蕊洁, 等. 抗纤抑癌方介导 FN/整合素 $\alpha 5\beta 1$ 干预大鼠肝硬化病变的实验研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2016, 26(5): 281-283.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acrpo@hanspub.org