

肝细胞癌组织中高尔基体糖蛋白73和分泌型聚集素的表达及其相关性分析

曹茜 古丽比也·沙比尔 杨颖 肖蕾 毛睿 张瑞丽 张华 包永星

新疆医科大学第一附属医院肿瘤中心, 新疆 乌鲁木齐 830054

[摘要] **背景与目的:** 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种具有高度侵袭、转移性的常见恶性肿瘤, 预后极差。因此, 研究肝癌侵袭的机制, 寻找有效的干预靶点显得尤为重要。一些研究提示分泌型聚集素(secreted Clusterin, sCLU)和高尔基体糖蛋白73(Golgi glycoprotein 73, GP73)在肿瘤发生、发展及侵袭、转移过程中起重要作用, 且两者具有结构和功能上的相似性。本研究旨在探讨GP73和sCLU在HCC中的表达及其与临床病理特征和预后之间的关系。**方法:** 收集新疆医科大学第一附属医院75例HCC患者癌组织及癌旁正常肝组织标本, 采用免疫组化(EnVision二步法)检测HCC组织中GP73、sCLU的表达水平; 并与癌旁正常肝组织相比较; Spearman等级相关分析GP73和sCLU在肝癌中表达的关系; 研究GP73和sCLU表达水平与HCC临床病理特征及预后的关系。**结果:** GP73和sCLU在HCC中阳性表达率分别为72%和88%, 癌旁正常肝组织的阳性表达率均为4%。GP73在HCC和正常肝组织中阳性表达差异有统计学意义($\chi^2=73.60, P<0.05$)。sCLU在HCC和正常肝组织中阳性表达差异有统计学意义($\chi^2=207.94, P<0.05$); Spearman等级相关分析提示, HCC组织中, GP73和sCLU蛋白表达呈正相关($r=0.405, P<0.05$); GP73和sCLU在HCC中表达水平与肿瘤的Edmondson病理分级、TNM分期及血管侵犯相关($P<0.05$), 而与患者的性别、年龄、HBsAg、合并肝硬化、AFP值、门静脉癌栓、肿瘤数目无相关性($P>0.05$); GP73表达与患者生存期有关, 而sCLU表达与患者生存期无关。**结论:** GP73和sCLU在肝癌中有较高的阳性率, 且GP73和sCLU表达呈正相关, GP73和sCLU可能与HCC的侵袭性等生物行为密切相关, 检测其表达将有助于评价患者预后。

[关键词] 肝细胞癌; 高尔基体糖蛋白73; 分泌型聚集素; 侵袭; 预后

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.11.005

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)11-0880-05

Expression of Golgi glycoprotein 73 and secreted Clusterin in hepatocellular carcinoma CAO Qian, SHABIER Gulibiye, YANG Ying, XIAO Lei, MAO Rui, ZHANG Rui-li, ZHANG Hua, BAO Yong-xing (Tumor Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China)

Correspondence to: BAO Yong-xing E-mail: baoyx@vip.sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common cancer with poor prognosis. The main reason leading to the poor prognosis of HCC is the highly invasive and metastatic ability. Therefore, trying to know the mechanism of HCC invasion and getting an effective interventions target is very important. Some studies suggest that secreted clusterin (sCLU) and Golgi glycoprotein 73 (GP73) played important roles in the development of tumour process, and both of them have structural and functional similarities. The aim of the article was to investigate the expression of GP73 and sCLU in HCC and their relationship with the clinicopathological features and the prognosis, and finally to evaluate the value of them. **Methods:** Seventy-five cases of HCC were collected. Immunohistochemistry (IHC) was used to determine the expression of GP73 and sCLU in HCC and normal liver tissues. Spearman rank was used to analyze the correlation between GP73 and sCLU in HCC. The relationship of GP73 and sCLU expression with the clinicopathological features and the prognosis was investigated. **Results:** The positive rates of GP73 and sCLU in HCC were 72% (54/75) and 88% (66/75) respectively; but in normal liver tissues,

it was 4% (3/75). GP73-positive rate in HCC was higher than that of the normal liver tissues ($\chi^2=73.60, P<0.05$). sCLU-positive rate in HCC was also higher than that of the normal liver tissues ($\chi^2=207.94, P<0.05$). GP73 expression was positively correlated with sCLU expression in HCC ($r=0.405, P<0.05$). GP73 and sCLU were associated with clinicopathological features including tumor differentiation, TNM stage and vascular invasion ($P<0.05$); GP73 and sCLU had no correlation with the patient's gender, age, HBsAg, cirrhosis, AFP value, portal vein thrombosis and tumor numbers ($P>0.05$). GP73 was associated with survival but not sCLU. **Conclusion:** GP73 and sCLU have higher positive rates in HCC and GP73 is positively correlated with sCLU. The expression of GP73 and sCLU are probably closely related with the invasion of HCC, which can help evaluate the prognosis of the patients.

[Key words] Hepatocellular carcinoma; Golgi glycoprotein 73; Secreted Clusterin; Invasion; Prognosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的恶性肿瘤,预后较差,在全球恶性肿瘤的致死原因中位居第3位^[1]。导致肝癌预后极差的主要原因是肝癌具有高度侵袭、转移能力^[2],因此研究肝癌侵袭的机制,寻找有效的干预靶点显得尤为重要。高尔基体糖蛋白73(Golgi glycoprotein 73, GP73)是一种高尔基体分泌性糖蛋白,在多种上皮细胞中表达,参与上皮细胞的多项生理及病理活动^[3]。相关研究提示GP73在HCC中表达明显上调^[4-5],且与血管浸润、肿瘤分期有关^[6],由此推测GP73可能参与HCC的增殖、侵袭、转移的过程。最新研究证实GP73和同样定位于高尔基体的分泌型聚集素(secreted Clusterin, sCLU)功能相似^[7]。sCLU是一种硫化异二聚体糖蛋白,几乎表达于所有的组织和体液中^[8]。研究发现sCLU在肿瘤的增殖、侵袭、转移中起着重要作用^[9]。本研究通过检测GP73和sCLU在HCC中的表达水平,探讨其与患者临床病理特征和预后的关系,以及GP73和sCLU与HCC生物学行为的潜在相关性。

1 资料和方法

1.1 研究资料

选取新疆医科大学第一附属医院行手术切除、临床资料完整且剔除失访的肝癌患者组织标本及其癌旁正常肝组织标本75例。所有标本均由新疆医科大学第一附属医院病理科提供。所有患者术前均未行放疗、化疗或介入治疗且术后病理学确诊为HCC。根据美国癌症协会(UICC)2011年TNM分期标准,75例HCC标本中I~II期21例,III~IV期54例。根据Edmondson

分级法,HCC标本中,I~II级15例,III~IV级60例。经新疆医科大学伦理委员会批准并征得患者的知情同意后,从本院病案室调阅病历资料,包括性别、年龄、肝硬化程度、肿瘤大小、数目、TNM分期、血清AFP水平、肿瘤病理分级、有无血管侵犯、有无门静脉癌栓等。对患者进行随访,并绘制生存曲线。

1.2 主要试剂及器材

兔抗人GP73多克隆抗体购自美国Proteintech Group公司。兔抗人sCLU多克隆抗体购自武汉博士德公司。免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。其他试剂包括PBS缓冲液、抗原修复液、枸橼酸抗原修复液等。其他仪器包括LEICA DM3000显微镜、微波炉、恒温培养箱SLI-700、冰箱、切片、摊片机等。

1.3 染色方法

采用EnVision二步法进行免疫组织化学染色。HCC标本以4%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋。蜡块以5 μm 厚连续切片。常规脱蜡,水化,先后经3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,微波炉枸橼酸液修复。每批实验设阳性和阴性对照。阳性对照是用含有靶抗原的切片进行对照。本实验采取的阳性靶抗原为GP73蛋白和sCLU蛋白。实验过程中加入兔抗人GP73多克隆抗体(一抗)和兔抗人sCLU多克隆抗体(一抗)进行免疫组化反应。其中GP73一抗工作液浓度为1:50,sCLU一抗工作液浓度为1:200。阴性对照是以PBS液取代一抗作阴性对照。加入一抗后将反应体系置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(免疫组化试剂盒中提供的二抗),后采用DAB显色10~15 s,显微镜下观察染色程度,用自来水终止显色。最后苏木素复染,中性树脂胶封片。

1.4 结果判定

以细胞质显色为棕黄色颗粒为阳性细胞。选取切片染色对比度较好,背景清晰,定位准确及排除出血、坏死部位和切片边缘,在LEICA DM3000显微镜下观察整张切片染色情况,统一光源、光圈亮度、对比度、色彩饱和度,关闭白平衡,拍摄照片,将照片储存于计算机中,由2位病理科医生根据染色强度进行双盲结果判定,按着色强度给与组织评分:无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。在高倍视野下(400×)随机选取5个视野(每个视野观察不少于100个细胞),用Image-Pro Puls图像分析软件测定每张照片的阳性细胞百分比。按阳性细胞百分比给组织评分:无阳性细胞计为0分,1%~20%为1分,21%~50%为2分,51%~80%为3分,>80%为4分。两项得分相乘,0~1分为“-”,2~4分为“+”;5~7分为“++”;8分以上为“+++”。本研究将“-、+”定义为蛋白低表达组即阴性组,“++、+++”定义为蛋白高表达组即阳性组。

1.5 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。各

指标在两组之间阳性表达率的比较采用四格表Z检验,当理论值较小时,采用校正四格表 χ^2 检验。各指标蛋白表达量在两组间的比较服从正态性检验采用 t 检验,不服从正态性检验采用秩和检验。生存分析采用Kaplan-Meier法,对数秩和检验log-rank test比较生存曲线的差别。指标间相关性采用Spearman相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GP73和sCLU在HCC和癌旁肝组织中的表达

免疫组化结果显示,GP73和sCLU在肝细胞的细胞质中表达,颜色为棕黄色。HCC组织中GP73阳性表达率为72.00%(54/75),sCLU阳性表达率为88.00%(66/75)。癌旁正常肝组织中GP73和sCLU阳性表达率均为4.00%(3/75)。统计学分析表明:HCC组织中GP73阳性率高于癌旁肝组织($\chi^2=73.60$, $P<0.05$),HCC组织中sCLU阳性率也高于癌旁肝组织($\chi^2=207.94$, $P<0.05$,图1)。

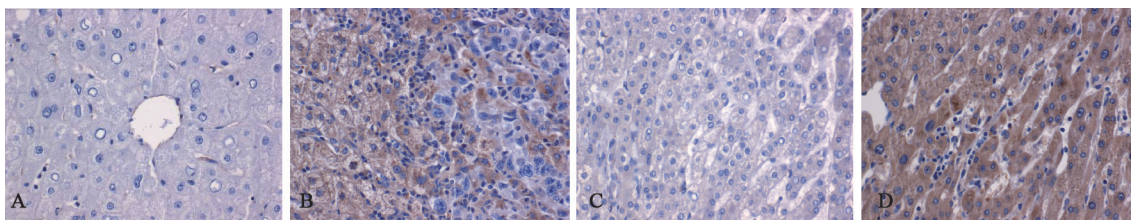


图1 GP73和sCLU在HCC和癌旁肝组织中的表达

Fig. 1 The expression of GP73 and sCLU in HCC and normal liver tissues

(IHC staining, 400×)

Both of the GP73 and sCLU were expressed in the cytoplasm; A: GP73 expressed in normal liver tissues; B: GP73 expressed in HCC; C: sCLU expressed in normal liver tissues; D: sCLU expressed in HCC.

2.2 肝癌组织中GP73和sCLU表达的相关性

Spearman等级相关分析结果显示,HCC标本中,GP73和sCLU表达呈正相关($r=0.405$, $P<0.05$)。

2.3 GP73和sCLU表达水平与HCC患者临床病理特征的关系

研究发现HCC中GP73和sCLU表达水平与肿瘤的Edmondson病理分级、TNM分期及血管侵犯相关(P 均 <0.05),而与患者的性别、年龄、HBsAg、合并肝硬化、AFP值、门静脉癌栓、肿瘤数目均无关($P>0.05$,表1)。

2.4 GP73和sCLU与患者预后的关系

随访75例HCC患者,GP73阳性组54例,中位生存时间为7个月;阴性组21例,中位生存时间为13个月,绘制Kaplan-Meier生存曲线并进行Log-rank检验,结果表明GP73阳性组与阴性组生存时间比较差异有统计学意义($\chi^2=28.72$, $P<0.05$)。sCLU阳性组66例,中位生存时间为8个月;阴性组9例,中位生存时间为9个月。生存曲线及Log-rank检验表明:sCLU阳性组与阴性组生存时间比较差异无统计学意义($\chi^2=0.661$, $P>0.05$,表2,图2)。

表 1 肝癌组织中GP73和sCLU表达与临床病理资料关系

Tab. 1 The correlation between GP73 and sCLU with clinicpathologic features

HCC	n	GP73			sCLU				
		Positive	Positive rate/%	χ^2	P	Positive	Positive rate/%	χ^2	P
Gender									
Male	51	39	76.47	1.58	0.21	46	90.20	0.73	0.40
Female	24	15	62.50			20	83.33		
Age/year									
>60	33	27	81.82	2.82	0.09	27	81.82	2.13	0.14
≤60	42	27	64.29			39	92.86		
HBsAg									
Positive	27	21	77.78	0.70	0.40	10	83.33	0.30	0.59
Negative	48	33	68.75			56	88.89		
Cirrhosis									
Yes	30	21	70.00	0.10	0.75	54	90.00	1.14	0.29
No	45	33	73.33			12	80.00		
AFP value/ng·mL ⁻¹									
>400	12	9	75.00	0.06	0.80	11	91.67	0.18	0.67
≤400	63	45	71.43			55	87.30		
Thrombosis									
Yes	30	21	70.00	0.10	0.75	27	90.00	0.19	0.66
No	45	33	73.33			39	86.67		
Number of tumors									
Single	51	36	70.59	0.16	0.69	44	86.27	0.45	0.50
Multiple	24	18	75.00			22	91.67		
Edmondson grade									
I - II	15	3	20.00	25.15	0.00	8	53.33	21.34	0.00
III - IV	60	51	85.00			58	96.67		
Vascular invasion									
Yes	36	18	50.00	16.62	0.00	28	77.78	6.85	0.01
No	39	36	92.31		38	97.44%			
TNM stage									
T ₁₋₂	21	9	42.86	12.29	0.00	13	61.90	18.81	0.00
T ₃₋₄	54	45	83.33		53	98.15%			

表 2 GP73和sCLU生存期的比较

Tab. 2 Survival time of HCC patients by GP73 and sCLU

HCC	n	Median OS/month	95%CI	χ^2	P
GP73 high level	54	7.00	6.25-7.75	28.72	0.00
GP73 low level	21	13.00	9.27-22.09		
sCLU high level	66	8.00	7.17-8.83	0.66	0.42
sCLU low level	9	9.00	7.54-10.46		

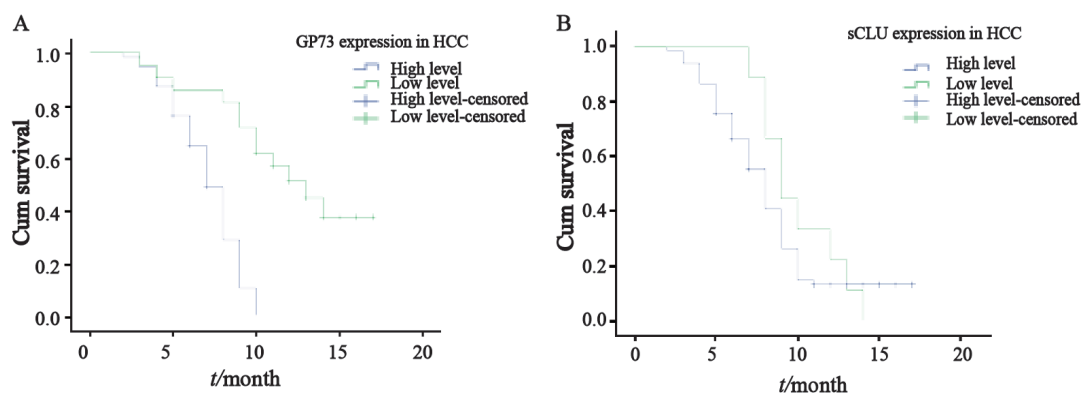


图 2 肝癌患者生存曲线图

Fig. 2 The survival curves of HCC patients

A: survival curves of HCC patients on the level of GP73; B: Survival curves of HCC patients on the level of sCLU.

3 讨 论

2000年, 美国学者Kladney等^[10]在研究成人巨大细胞性肝炎病原学时, 首次发现了GP73。健康人肝细胞很少表达GP73, 而在肝脏出现急慢性炎性反应或肝纤维化时, 表达明显上调, 发展到HCC时, GP73的表达达到高峰^[11]。近年来在一项多中心、大样本、多人种的国际性研究中提出GP73诊断肝癌的敏感度和特异度均高于AFP, 可作为肝癌早期诊断的新型肿瘤分子标志物^[4]。但目前对于GP73的研究多停留在作为血清肿瘤标志物的方向, 而其在肝癌发生、发展中的调节机制及功能的报道均较少见。

研究提示GP73和sCLU存在结构和功能上的相似之处。二者均定位于高尔基体; GP73基因的C末端截短的小鼠患有局灶性节段性肾小球硬化, 而敲除sCLU基因后出现进展性肾小球硬化^[3]。本研究通过免疫组化方法在组织水平上发现HCC组织中GP73和sCLU蛋白阳性表达率均高于癌旁正常肝组织, Spearman等级相关分析显示, HCC中GP73和sCLU表达呈正相关。基于以上研究结果, 我们考虑GP73和sCLU在调控机制上存在相关性和重叠性。

目前研究认为sCLU是一种硫化异二聚体糖蛋白, 在多种肿瘤的侵袭、转移中起着重要的作用^[12-13]。熊茂明等^[14]也提出sCLU与肝癌分化程度有关。本研究证实, GP73和sCLU与肿瘤病理分级、血管侵犯以及肿瘤分期明显相关。考虑到GP73与sCLU的相互关系, 推测GP73可能与sCLU一样参与了肝癌的侵袭、转移过程。

对75例HCC患者随访结果显示, GP73阳性组与阴性组生存时间比较差异有统计学意义, 这说明HCC组织中GP73表达高的患者生存期短, 由此可见, 检测GP73可能有助于判断HCC的预后。

综上所述, GP73是极具研究价值的分子靶点。检测GP73在HCC中的表达, 可以作为判断肝癌的恶性程度、侵袭性及预后的重要参考指

标, 这将有助于指导临床治疗及评估病情。鉴于目前对于sCLU和GP73的分子生物学特性仍知之甚少, 如阻断其表达是否可达到治疗HCC的目的等, 还有待进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] KEW M C. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *Pathol Biol*, 2010, 58(4): 273-277.
- [2] JEMAL A, BRAY F, CENTER M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [3] KIM H J, LV D, ZHANG Y, et al. Golgi phosphoprotein2 in physiology and in diseases [J]. *Cell Biosci*, 2012, 2(1): 31.
- [4] MAO Y, YANG H, XU H, et al. Golgi protein 73 (GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2010, 59(12): 1687-1693.
- [5] 杨颖, 木尼热·马合苏提, 包永江, 等. GP73和AFP单项与联合诊断原发性肝癌的价值 [J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(11): 1034-1037.
- [6] 杨颖, 肖蕾, 毛睿, 等. 高尔基体糖蛋白73的表达特征及其对肝癌与肝硬化的鉴别诊断价值 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2012, 20(12): 920-924.
- [7] ZHOU Y, LI L, HU L, et al. Golgi phosphoprotein 2 (GOLPH2/GP73/GOLM1) interacts with secretory clusterin [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(3): 1457-1462.
- [8] PAJAK B, ORZECZOWSKI A. Clusterin: the missing link in the calcium-dependent resistance of cancer cells to apoptogenic stimuli [J]. *Postepy Hig Med Dsew*, 2006, 60: 45.
- [9] TROUGAKOS I P, DJEU J Y, GONOS E S, et al. Advances and challenges in basic and translational research on clusterin [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 403-406.
- [10] KLADNEY R D, BULLA G A, GUO L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection [J]. *Gene*, 2000, 249(1-2): 53-65.
- [11] LIU X, WAN X, LI Z, et al. Golgi protein 73(GP73), a useful serum marker in liver diseases [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(8): 1311-1316.
- [12] SUN B, ZHANG S D, et al. Clusterin is associated with spontaneous breast cancer in TA2 mice [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(17): 3277.
- [13] JULY L V, BERARDI E, SO A, et al. Nucleotide-based therapies targeting Clusterin chemosensitized human lung adenocarcinoma cells both in vitro and in vivo [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3: 223.
- [14] 熊茂明, 钱福永, 李贺, 等. 原发性肝癌中Clusterin异常表达与多药耐药关系的研究 [J]. *肝胆外科杂志*, 2007, 1: 34-38.

(收稿日期: 2013-08-05 修回日期: 2013-10-12)