

SRC pY416在肝细胞癌中的表达与临床相关参数及肝内转移的关系

吴 维¹, 崔培元¹, 鲁 正¹, 吴 华¹, 甘怀勇², 余美玲³

1. 蚌埠医学院第一附属医院肝胆外科, 安徽 蚌埠 233000 ;
2. 蚌埠医学院第一附属医院病理科, 安徽 蚌埠 233000 ;
3. 蚌埠医学院第一附属医院药剂科, 安徽 蚌埠 233000

[摘要] 背景与目的: 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一, 肝内复发转移是影响其中期生存率的主要因素, 因此, 转移标志物的寻找至关重要。该研究探讨HCC中肉瘤酪氨酸激酶磷酸化Tyr416(tyrosine kinase phosphorylation Tyr416 of sarcoma, SRC pY416)的表达与临床相关参数及肝内复发转移的关系。方法: 采用免疫组织化学法和蛋白[质]印迹法(Western blot)检测112例HCC组织、40例相应癌旁正常肝脏组织中SRC pY416的表达, 化学发光法检测患者乙型肝炎病毒DNA(hepatitis B virus-DNA, HBV-NDA)和甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP), 随访12个月, 分析SRC pY416与HCC患者临床相关参数及预后的关系。结果: SRC pY416在HCC组织中的表达(65.40±15.69)均高于癌旁正常肝脏组织(11.25±2.73, $P<0.001$)。SRC pY416的表达与患者年龄、肝硬化、包膜完整、分化程度、HBV-NDA及AFP均存在相关性($P<0.01$)。单因素分析显示, HCC患者术后12个月肝内复发转移与患者年龄、AFP表达、分化程度、是否携带HBV及SRC pY416蛋白表达有关($P<0.01$), 多因素分析显示, SRC pY416蛋白表达是HCC患者12个月肝内复发转移的独立危险因素。结论: SRC pY416可能在HCC转移中起重要作用, 有望成为HCC肝内转移的分子标志物。

[关键词] 肝肿瘤; 肝细胞癌; 肉瘤酪氨酸激酶磷酸化Tyr416

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.02.006

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)02-0115-06

Relationship of SRC pY416 expression in hepatocellular carcinoma with clinical parameters and intrahepatic metastasis WU Wei¹, CUI Peiyuan¹, LU Zheng¹, WU Hua¹, GAN Huaiyong², YU Meiling³
(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China; 3. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China)

Correspondence to: YU Meiling E-mail: doctorcyh@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumors. Intrahepatic recurrence is the main factor affecting its medium-term survival rate. Therefore, the search for the markers of metastasis is essential. This study aimed to evaluate the relationship of expression of tyrosine kinase phosphorylation Tyr416 of sarcoma (SRC pY416) in HCC with clinical parameters and prognosis. **Methods:** Immunohistochemical method and Western blot were used to detect the expression of non-receptor tyrosine kinase (SRC pY416) in 112 cases of HCC tissues and 40 cases of corresponding cancer adjacent normal liver tissues. Hepatitis B virus (HBV) DNA and alpha fetoprotein (AFP) in patients were detected with chemiluminescence. In the 12 months Follow-up of the study, the association between SRC pY416 expression and clinical parameters was analyzed. **Results:** SRC pY416 expressions in HCC (65.40±15.69) were higher than those in cancer adjacent normal liver tissues (11.25±2.73, $P<0.001$). The expressions of SRC pY416 were all associated with the age, the liver cirrhosis, the complete capsule, the tumor differentiation, the HBV DNA and the AFP value of the patients ($P<0.01$). 12 months after operation,

single factor analysis showed that the recurrence was associated with the tumor differentiation, the HBV DNA, the AFP value and the expression of SRC pY416 of the patient ($P < 0.01$). Multivariate analysis showed that the expression of SRC pY416 was an independent prognostic factor for recurrence and metastasis in patients with HCC in 12 months. **Conclusion:** SRC pY416 may play an important role in the metastasis of HCC. The expression of SRC pY416 may be the marker for HCC liver metastasis.

[Key words] Liver neoplasms; Hepatocellular carcinoma; Tyrosine kinase phosphorylation Tyr416 of sarcoma

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的肝癌类型, 每年有56万新发肝癌病例, 死亡率高^[1]。肝内复发转移是影响HCC术后生存的主要原因^[2]。因此, 寻找转移标志物对肝癌患者的生存和靶向治疗具有重要意义。肉瘤(sarcoma, SRC)是最早报道的癌基因, 不同位点的磷酸化调节SRC失活和激活, 在肉瘤络氨酸激酶磷酸化Tyr416(tyrosine kinase phosphorylation Tyr416 of sarcoma, SRC pY416)中SRC被激活, SRC激活后启动信号通路, 诱导细胞增殖、黏附、迁移及侵袭, 参与各种类型的肿瘤进展^[3]。但HCC中SRC pY416的表达与临床参数及术后肝内复发转移间的关系尚未见报道。本实验应用免疫组织化学法和蛋白[质]印迹法(Western blot)检测HCC组织中SRC pY416蛋白的表达, 评估SRC pY416在HCC癌组织及癌旁正常肝组织中表达的差异, 并分析SRC pY416与HCC患者临床学参数及术后肝内转移之间的关系。为寻找HCC早期肝内复发转移的分子标志物及为HCC术后的分子靶向治疗提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 临床资料

收集2013年3月—2015年6月蚌埠医学院第一附属医院肝胆外科存档的112例有严格手术指征、且行手术切除的HCC患者的癌组织及其相应的癌旁正常肝组织标本。其中男性82例, 女性30例, 年龄26~72岁, 中位年龄54岁。伴有肝硬化102例, 无肝硬化10例; 肿瘤有完整包膜者10例, 无完整包膜者102例; HBsAg阳性88例, 阴性24例; 甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)小于20 ng/mL者52例, 20~399 ng/mL者18例, 大于等于

400 ng/mL者42例; 低分化26例, 中分化78例, 高分化8例; 随访12个月肝内复发转移者42例, 无肝内复发转移者70例。癌旁组织定义为距离肝癌病灶2 cm的正常肝组织。病例均经手术和病理确诊, 术前均未接受放疗、化疗和免疫治疗等相关治疗。有完整临床及病理资料。所有标本均分成2份, 1份经4%甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋; 1份放置于-80℃冰箱保存备用。标本收集过程有蚌埠医学院医学伦理委员会监督, 符合赫尔辛基宣言, 所有患者均知情同意。所有病例随访12个月, 肝动脉造影、肝脏CT和B超确诊肝内复发转移病灶。手术后均进行常规的介入治疗, 伴有HBV-DNA复制者予以抗病毒治疗。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法检测蛋白表达

标本经4%甲醛溶液固定, 取材, 常规脱水, 石蜡包埋, 5 μm厚切片。切片脱蜡水化, 高压修复2 min, 加3% H₂O₂, 室温温育10 min, 加一抗(兔抗人多克隆抗体, SRC 1:100, SRC pY416 1:100, 购自美国Cell Signaling公司)。4℃温育过夜, 再在37℃的条件下加聚合物辅助剂30 min后, 加酶标二抗(山羊抗兔IgG多聚体, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司), 二氨基联苯胺(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)显色, 封片。阴性对照PBS代替一抗。用已知阳性的前列腺癌标本为阳性对照。

1.2.2 Western blot检测蛋白含量

取12例-80℃保存的HCC癌组织和相应癌旁正常肝组织标本约0.2 cm, 在液氮下碾成粉状, 冰上裂解30 min, 匀质, 以1 000×g离心10 min, 收集上清液。利用考马斯亮蓝法, 蛋白定量以牛血清蛋白为标准计算标本蛋白浓度并制成样本。取每道上样30 μg蛋白, 经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。50 g/L脱脂奶

粉室温封闭1 h, 一抗(兔抗人多克隆抗体, SRC 1 : 1000, SRC pY416 1 : 1 000, 购自美国Cell Signaling公司)。4 ℃温育摇床过夜, 洗膜, 复温到室温, 再用洗膜缓冲液脱色, 每次10 min洗2次, 三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液洗1次10 min。然后将聚偏二氟乙烯膜放入二抗中, 摇床温育2 h, 室温下用洗膜缓冲液脱色。最后在暗室中温育聚偏二氟乙烯膜3 min, 显影, 定影, 洗净, 晾干。采用图像分析软件Gene Tools V3.04b分析蛋白条带灰度。以β-actin作为内对照。

1.3 结果判定

SRC阳性表达为细胞质内有棕黄色颗粒沉着, SRC pY416阳性表达为细胞核内有棕黄色颗粒沉着。光镜下对每张切片的肝癌组织随机选取10个高倍视野, 每个视野计数100个细胞取均数。

1.4 随访

所有患者均随访至术后12个月, 肝内复发以肝动脉造影、肝脏CT检查和肝脏B超的结果发现

肝内性病灶为诊断标准, 其中肝内复发42例, 12例失访和1例术后因并发症死亡不纳入统计。

1.5 统计学处理

所有数据采用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 定性资料采用 χ^2 检验进行单因素分析, 定量资料采用两组独立样本 t 检验进行单因素分析, 资料不服从正态分布, 采用秩相关进行相关性分析, 12个月复发的影响因素采用Logistic回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC中SRC和SRC pY416的表达

免疫组化法检测SRC和SRC pY416阳性表达分别定位于细胞质和细胞核。SRC和SRC pY416在HCC组织中表达(65.40 ± 15.69 , 11.25 ± 2.73)均高于癌旁正常肝脏组织(56.20 ± 11.26 , 8.38 ± 3.39 , $P < 0.001$, 图1, 表1)。

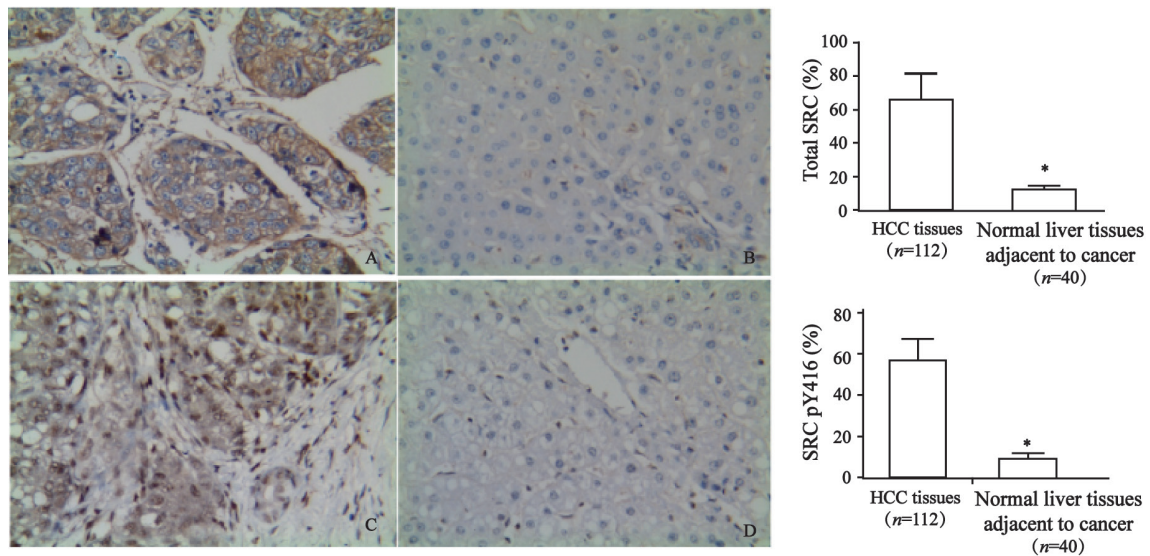


图 1 HCC组织和癌旁正常肝组织中SRC和SRC pY416的表达

Fig. 1 Expression of SRC and SRC pY416 in HCC tissues and normal liver tissues adjacent to cancer

A: Expression of SRC in HCC tissues ($\times 400$); B: Expression of SRC in normal liver tissues adjacent to cancer ($\times 400$); C: Expression of SRC pY416 in HCC tissues ($\times 400$); D: Expression of SRC pY416 in normal liver tissues adjacent to cancer ($\times 400$); *: $P < 0.001$, as compared with HCC tissues

表 1 HCC组织和癌旁正常肝组织中SRC和SRC pY416的比较

Tab. 1 Comparison of SRC and SRC pY416 in HCC tissues and normal liver tissues adjacent to cancer

Group	HCC tissues	Normal liver tissues adjacent to cancer	t value	P value
SRC	65.40 ± 15.69	11.25 ± 2.73	20.612	< 0.001
SRC pY416	56.20 ± 11.26	8.38 ± 3.39	26.399	< 0.001

($\bar{x} \pm s$)

Western blot检测结果显示, HCC癌组织和癌旁正常肝脏组织中SRC表达的灰度值为 0.83 ± 0.01 和 0.34 ± 0.02 , SRC pY416表达的灰度值为 0.81 ± 0.01 和 0.12 ± 0.01 。HCC组织中SRC和SRC pY416表达与癌旁正常肝脏组织相比, 差异有统计学意义($P<0.001$, 图2)。

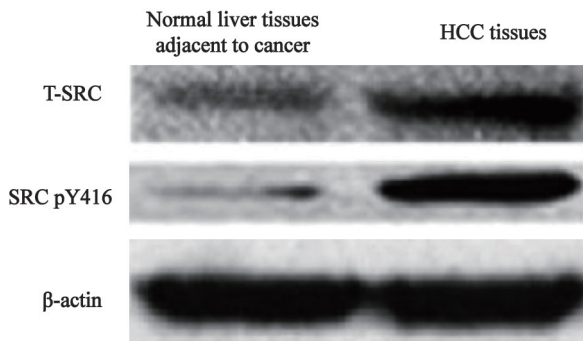


图2 Western blot检测HCC组织及癌旁正常肝组织中SRC和SRC pY416的表达

Fig. 2 Expression of SRC and SRC pY416 in HCC tissues and normal liver tissues adjacent to cancer by Western blot

2.2 SRC pY416蛋白表达与HCC临床病理特征的关系

SRC pY416在HCC中的表达与患者年龄、是否伴有肝硬化、有无完整包膜、肿瘤分化程度、HBV-NDA及AFP值均相关(表2)。

2.3 SRC pY416蛋白表达与HCC患者手术后12个月肝内复发转移的相关性

入组的HCC患者单因素分析提示, 患者年龄、肿瘤分化程度、HBV感染、AFP表达及SRC pY416的表达均是HCC术后12个月内肝内复发转移的影响因素(表3)。HCC患者术后12个月内肝内复发转移中多因素Logistic回归分析提示, SRC pY416表达是手术12个月后肝内复发转移的独立危险因素($P=0.013$, 95%CI: 1.032~1.301), 即SRC pY416值越大, 术后12个月内复发的可能性越大。

表2 SRC pY416蛋白表达与HCC临床病理特征的相关性

Tab. 2 Correlation between expression of SRC pY416 protein and clinicopathological features of HCC

Clinic pathologic feature	SRC pY416	<i>t</i> value	<i>P</i> value	($\bar{x}\pm s$)
Gender		0.332	0.741	
Male	55.88±10.69			
Female	55.13±10.01			
Age/year		5.979	<0.001	
< 60	59.29±11.77			
≥ 60	50.09±3.83			
Cirrhosis		5.381	<0.001	
Yes	56.41±10.64			
No	48.20±3.49			
Complete capsule		-5.992	<0.001	
Yes	48.60±2.37			
No	56.37±10.70			
HBV infection status		6.448	0.002	
No hepatitis B group	50.75±8.66			
Hepatitis B and DNA low group	54.75±10.95			
Hepatitis B and DNA high group	59.75±9.51			
Degree of differentiation		51.972	<0.001	
Poorly	67.85±8.12			
Moderately	53.05±7.42			
Well	41.75±6.98			
AFP value ρ_B /(ng·mL ⁻¹)		6.425	0.002	
< 20	52.15±10.66			
20-399	57.00±10.45			
≥ 400	59.48±8.88			

表3 HCC患者术后12个月肝内复发转移的单因素分析结果

Tab. 3 Single factor analysis of recurrence and metastasis in patients with HCC after 12 months of operation

Clinic pathologic feature	Recurrence after 12 months		χ^2/t value	P value
	No	Yes		
Gender <i>n</i> (%)			0.109	0.741
Male	52(74.3)	30(71.4)		
Female	18(25.7)	12(28.6)		
Cirrhosis <i>n</i> (%)			4.948	0.026
Yes	60(85.7)	42(100.0)		
No	10(14.3)	0(0.0)		
Complete capsule <i>n</i> (%)			4.948	0.026
Yes	10(14.3)	0(0.0)		
No	60(85.7)	42(100.0)		
HBV infection <i>n</i> (%)			5.657	0.017
Yes	50(71.4)	38(90.5)		
No	20(28.6)	4(9.5)		
Degree of differentiation <i>n</i> (%)			45.046	< 0.001
Poorly	2(2.9)	24(57.1)		
Moderately	60(85.7)	18(42.9)		
Well	8(11.4)	0(0.0)		
AFP value ρ_B /(ng·mL ⁻¹) $\bar{x}\pm s$	362.80±616.66	925.10±865.94	3.685	< 0.001
Age/year $\bar{x}\pm s$	59.63±7.17	44.43±9.76	-8.771	< 0.001
SRC pY416 (%) $\bar{x}\pm s$	49.69±6.44	65.67±7.97	11.015	< 0.001

3 讨 论

HCC是一种全身性疾病,其发生、发展是多因素、多基因共同作用的结果。目前,随着对HCC发病机制的深入研究发现,HCC的发生与多个癌基因的突变、蛋白异常表达或异常激活及参与各种信号通路的相互作用有关。

SRC基因是首个被发现的人类癌基因,位于20号染色体q12-q13上。SRC蛋白是原癌基因*c-SRC*所表达的产物,是SRC家族激酶成员之一。SRC蛋白通过2个磷酸化位点调节其激酶活性:① 激酶结构域的正调节自身磷酸化位点Tyr416,位于N端半段结构与C端半段结构之间,促进Src蛋白激酶激活;② 位于C端尾处的负调节磷酸化位点Tyr527,使Src蛋白激酶失活^[4]。*c-SRC*酪氨酸激酶和蛋白酪氨酸磷酸酶调控SRC不同的磷酸化状态,活化的SRC参与PI3K/Akt、RAS/MAPK和STAT3通路,导致细胞生长和增殖。此外,SRC通过黏着激酶和Rho GTP酶家族调节细胞的迁移和整合^[5]。有研究表明,SRC pY416在滑膜肉瘤等浸润性癌中高表达,并对肿瘤的浸润转移起重要作用^[6-7]。

有研究报道,SRC在中国HCC组织中表达

增加,其中SRC的表达与患者AFP值呈正相关,SRC特异性拮抗剂kx2-391比广谱的SRC拮抗剂达沙替尼更有特异性治疗作用^[6],表明SRC在HCC发展中发挥关键性的作用,并有可能成为特异性治疗靶点。本研究亦发现,HCC组织中SRC表达高于癌旁正常肝组织,与上述报道一致。但本研究还发现,HCC中SRC pY416表达高于癌旁正常肝组织,进一步分析发现,HCC中SRC pY416高表达与HCC患者的以下临床参数相关:小于60岁、HBsAg阳性、无包膜、分化程度低及AFP表达高。众所周知,HCC患者的某些临床参数如年龄、肿瘤分化程度及有无完整包膜等与HCC的发生、发展、复发转移及预后密切相关。而本研究发现,与SRC pY416相关的临床参数是HCC复发转移及预后差的高危参数,该发现为SRC pY416可能作为HCC复发转移及预后的临床参数或预测指标提供了理论依据。

SRC是一类受体结合型蛋白质酪氨酸激酶,一般表达于细胞质和(或)细胞膜中^[7],但2014年美国一项关于前列腺癌研究发现,雄激素能增加前列腺癌细胞核中SRC pY416的表达,从而导致癌细胞的侵袭性生长,说明细胞

核中高表达的SRC pY416与肿瘤的侵袭转移相关^[8]。本研究亦发现, SRC pY416高表达于HCC的细胞核, 因此, 本研究对HCC细胞核中SRC pY416阳性表达的患者进行随访分析, 发现这些患者术后3个月内更易出现肝内转移复发。多因素回归分析表明, SRC pY416是术后12个月内肝内转移复发的独立危险因素, 而SRC则不是肝内复发转移的独立危险因素。结合文献报道, 推测减少细胞核内SRC pY416的表达可能减少HCC复发转移。因此, 细胞核内SRC pY416表达不仅可能作为预测指标, 更可能作为治疗靶点, 为开发SRC pY416特异性拮抗剂及靶向治疗提供理论依据。

此外, 有研究证实, SRC是炎症和癌变之间的重要中介, SRC能联系循环中免疫细胞和组织细胞, 最终导致癌细胞的发生、发展^[11]。Ito等^[12]研究发现, HCC组织中SRC表达增高与丙型肝炎病毒的感染有关。既往研究发现, HBsAg阳性是HCC的高危因素, 转氨酶增高及HBsAg阳性HCC患者预后差^[2]。本研究亦发现, 有HBV感染和复制及伴有肝硬化的HCC患者癌组织中SRC pY416表达增高。这些研究结果均间接提示, SRC pY416可能在肝脏炎症和肝细胞癌变之间起重要作用, 该发现为寻找肝炎后HCC的预防和分子治疗靶点提供理论依据。

综上所述, SRC pY416表达水平与HCC患者临床参数具有一定相关性, 在HCC的转移中起到很重要的作用, 可能作为HCC复发转移及预后的临床参数或预测指标。

[参 考 文 献]

[1] HUSSAIN S A, FERRY D R, EL-GAZZAZ G, et al.

Hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2001, 12(2): 161-172.

[2] POON R T, FAN S T, NG I O, et al. Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2000, 89(3): 500-507.

[3] BURGESS D J. Breast cancer: SRC hits the mark [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 314-315.

[4] ROSKOSKI R Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(1): 1-14.

[5] GU S, HONISCH S, KOUNENIDAKIS M, et al. Membrane androgen receptor down-regulates c-src-activity and beta-catenin transcription and triggers GSK-3beta-phosphorylation in colon tumor cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(4): 1402-1412.

[6] MICHELS S, TRAUTMANN M, SIEVERS E, et al. SRC signaling is crucial in the growth of synovial sarcoma cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8): 2518-2528.

[7] XU W, ALLBRITTON N, LAWRENCEL D S, et al. SRC kinase regulation in progressively invasive cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48867.

[8] LAU G M, LAU G M, YU G L, et al. Expression of Src and FAK in hepatocellular carcinoma and the effect of Src inhibitors on hepatocellular carcinoma in vitro [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(7): 1465-1474.

[9] HUANG Y W, CHEN C, XU M M, et al. Expression of c-Src and phospho-Src in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 376(1-2): 73-79.

[10] WU W, YANG Q, FUNG K M, et al. Linking γ -aminobutyric acid a receptor to epidermal growth factor receptor pathways activation in human prostate cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 383(1-2): 69-79.

[11] LIU S T, PHAM H, PANDOL S J, et al. Src as the link between inflammation and cancer [J]. *Front Physiol*, 2014, 4: 416.

[12] ITO Y, KAWAKATSU H, TAKEDA T, et al. Activation of c-Src gene product in hepatocellular carcinoma is highly correlated with the indices of early stage phenotype [J]. *J Hepatol*, 2001, 35(1): 68-73.

(收稿日期: 2016-09-01 修回日期: 2016-11-30)