

T-钙黏蛋白与肝癌肝移植术后肿瘤复发转移的相关性研究

张志强, 刘玉珍, 刘 邦, 卢玲玲, 方 坚, 江 艺, 张 霞

解放军联勤保障部队第九〇〇医院(福州总医院)肝胆内科, 福建 福州 350025

摘要: **目的** 探讨T-钙黏蛋白在肝癌肝移植患者癌组织和癌旁组织中的表达及其与肿瘤复发转移的关系。**方法** 收集解放军联勤保障部队第九〇〇医院2003年1月—2012年12月行原位肝移植手术的183例肝细胞癌(HCC)患者的临床资料,以符合肝癌肝移植米兰标准,且被切除肝脏的癌旁组织无微小血管侵犯(MVI)的76例患者为研究对象。根据术后随访中肿瘤是否复发转移分为复发转移组和无复发转移组,采用免疫组化法检测T-钙黏蛋白基因,观察其在两组患者癌组织和癌旁组织中的表达,比较术后5年内出现复发转移患者与未出现复发转移患者癌组织中T-钙黏蛋白基因的表达差异。**结果** 纳入的76例患者5年总复发转移率为21.05%,其中无MVI的患者46例(60.52%),术后肝癌复发转移率为17.39%;肝癌组织中细胞膜T-钙黏蛋白阳性表达率降低,缺失和异常表达明显升高,占47.83%,而癌旁组织缺失及异常表达较少见,仅占6.52%;两组相比差异具有统计学意义($\chi^2=19.828$, $P=0.000$);在出现复发转移的肝癌肝移植患者中癌组织T-钙黏蛋白异常表达(100%)与未复发转移的肝癌肝移植患者的(36.84%)相比差异有显著的统计学意义($\chi^2=10.565$, $P=0.001$)。结论 T-钙黏蛋白基因在HCC中缺失和异常表达率较高,且与肝移植术后肝细胞癌的复发转移密切相关,有可能作为判断HCC肝移植术后的预测指标和药物干预的靶点。

关键词: 肝细胞癌; T-钙黏蛋白; 肝移植; 癌复发; 癌转移

中图分类号: R969.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)06-1146-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.06.016

Study on relationship between T-cadherin and recurrence and metastasis in hepatocellular carcinoma patients undergoing liver transplantation

ZHANG Zhiqiang, LIU Yuzhen, LIU Bang, LU Lingling, FANG Jian, JIANG Yi, ZHANG Xia

Department of Hepatobiliary Medicine, The 900th Hospital of Joint Logistic Support Force PLA (Fuzhou General Hospital) Fuzhou 350025, China

Abstract: Objective To investigate the difference of T-cadherin expression level between cancer and corresponding non-cancerous tissues in hepatocellular carcinoma (HCC) patients undergoing liver transplantation and the relationship between T-cadherin and tumor recurrence and metastasis. **Methods** A total of 183 patients who received liver transplantation for HCC at 900th Hospital of PLA from January 2003 to December 2012 were enrolled in this study, and 76 patients who met Milan Criteria For Liver Transplantation and had no microvascular invasion (MVI) in the para-carcinoma tissues were included. The patients were divided into two groups: recurrence & metastasis group and no recurrence & metastasis group, based on five years of follow-up after operation. The expression differences of T-cadherin between cancer and corresponding non-cancerous tissues of the two groups were observed, and within five years later after surgery, the expression differences of T-cadherin gene were compared with recurrence & metastasis and those without recurrence & metastasis in the cancer tissues of patients. **Results** The five-year cumulative recurrence and metastasis rate was 21.05% in 76 patients who met the Milan Criteria for liver transplantation of HCC, among which no MVI were 46 patients (60.52%), and the recurrence and metastasis rate was 17.39%. The rate of T-cadherin gene expression was low in cancer tissues, but its abnormal expression and deletion rate was up to 47.83%, which was significantly higher than that (6.52%) in the para-carcinoma tissues. The difference between the two groups was statistically significant ($\chi^2=19.828$, $P=0.000$). The T-cadherin

收稿日期: 2019-03-20

基金项目: 福建省自然科学基金(2016J01590), 福建省社会发展引导性重点项目(2016Y0068), 福建省科技创新联合基金(2016Y9063)

第一作者: 张志强(1984—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为肝癌及门脉高压的诊断治疗。Tel: 15280103710 E-mail: 411072716@189.cn

*通信作者: 张 霞, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向为肝胆肿瘤的基础和临床。Tel: 13950487926 E-mail: liliedzh@189.cn

abnormal expression rate of the recurrence & metastasis group (100%) was significantly different from that in the no recurrence & metastasis group (36.84%) ($\chi^2=10.565$, $P=0.001$) in cancer tissues. **Conclusions** The abnormal expression and deletion of T-cadherin gene in cancer tissues is closely related to the recurrence and metastasis of HCC after liver transplantation, and T-cadherin gene may be used as a prognostic indicator and drug research target for HCC patients undergoing liver transplantation.

Key words: hepatocellular carcinoma; T-cadherins; liver transplantation; recurrence of cancer; metastasis of cancer

肝细胞癌(hepatic cellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,发病率居全球第6位,病死率居第3位,每年新发患者高达56万多,我国占50%^[1]。目前HCC作为肝移植的适应症已被广泛认可,尤其是伴有严重肝硬化或急慢性肝功能不全无法手术切除的患者,肝移植具有明显的优势。随着肝移植技术的发展成熟,患者的术后并发症越来越少,肿瘤的复发和转移成为影响肝癌肝移植术后长期存活的主要因素。文献报道进展期肝癌肝移植术后1年肿瘤复发率达30%~60%,5年存活率不到30%^[2]。肿瘤复发转移严重影响肝移植的治疗效果。因此,探讨肝癌肝移植术后复发转移的高危因素,寻找和发现HCC组织浸润和转移相关的关键分子靶点,进而筛选、确定和开发分子靶向药物,不仅具有重大的科学价值,也具有重要的临床意义和潜在的经济效益。

肿瘤细胞脱离原发病灶、运动能力增强是肿瘤发生转移的先决条件。细胞黏附分子是介导细胞与细胞或细胞与细胞外基质相互联系和结合的一类糖蛋白分子,T-钙黏蛋白(T-cadherin)是一种新的非经典黏附分子,以糖基磷脂酰肌醇分子附着于细胞膜上,调节钙介导的细胞黏附、细胞极性并参与细胞间的识别和信号传导等作用^[3-4]。有研究表明在缺失T-钙黏蛋白的黑色素瘤中使其再表达可抑制肿瘤细胞生长及侵袭运动能力^[5]。也有研究显示,HCC中的T-钙黏蛋白异常表达^[6],但目前T-钙黏蛋白与HCC肝移植术后复发和转移的关系尚不明确。本研究以本中心肝癌肝移植患者为研究对象,探讨受体癌组织T-钙黏蛋白基因的表达与肝移植术后肿瘤复发和转移的关系,为HCC的治疗以及开发分子靶向治疗药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及分组

收集2003年1月—2012年12月于解放军联勤保障部队第九〇〇医院(原南京军区福州总医院)行原位肝移植手术的HCC患者183例的临床随访资料。排除年龄<18岁、血型不合、再次肝移植、术后3个月内因出血、感染、急性排斥反应、肝炎复发

等非肿瘤因素死亡及失访的患者。筛选出符合国际公认的肝癌肝移植米兰标准^[7]的患者76例,排除切除标本检出癌旁边组织微小血管侵犯(microvascular invasion, MVI)的患者30例。将无MVI的46例患者根据术后随访过程中有无肿瘤复发转移分为复发转移与无复发转移两组,观察T-钙黏蛋白在两组患者受体切除的原肝脏癌组织中的表达差异。所有患者术前术后均未接受介入栓塞化疗及其他治疗。

1.2 疗效判定

所有病例术后随访5年,截止至2017年12月,每3个月复查甲胎蛋白(AFP)及胸、腹部电子计算机断层扫描(CT)及其他项目。肿瘤复发转移的判断主要根据患者术后AFP、B超、CT或磁共振(MRI)检查结果,以CT、MRI检查发现具有HCC表现特点的肿瘤结节或经穿刺活检证实者判定为复发。记录复发例数,5年累积复发转移率为复发例数/总例数。

1.3 免疫组化法检测T-钙黏蛋白的表达

临床手术切除标本用常规4%甲醛固定,石蜡包埋,制成3 μm 连续切片并脱蜡、脱水;置于微波炉内抗原热修复90 s暴露抗原;3%双氧水室温下孵育10 min阻断内源性过氧化物酶活性;室温下置于0.05%聚山梨酯20(Amresco公司产品,Cat#9005-64-5)中10 min;滴加兔抗人T-钙黏蛋白单克隆抗体(1:150, Gibco公司产品,Cat#PA5-81934),室温下1 h;PBS冲洗3 min \times 3;再次放入0.05%聚山梨酯20中,室温放置2 h;滴加增强剂20 min;加羊抗兔二抗(中国碧云天公司产品,Cat#A0208),室温下放置30 min;PBS冲洗,DBA显色剂显色5~20 min;苏木精复染,饱和碳酸锂(中国索莱宝公司产品,Cat#G2960)30 s,95%~100%乙醇脱水,吹干,封片,镜下观察并拍照。以PBS代替一抗作为阴性对照进行同步染色。T-钙黏蛋白阳性产物主要分布在正常肝组织的肝细胞膜上,为粗细一致的棕黄色颗粒,在细胞质中可有微量表达,在细胞核内无表达。判断标准按文献[4]的方法,高倍镜($\times 400$)下每个视野计数100个细胞,每张切片数5个视野。观察

T-钙黏蛋白的定位。细胞膜阳性表达<5%为阴性(-),5%~24%为弱阳性(+),25%~50%为阳性(++),>50%为强阳性(+++)。当细胞膜上阴性及弱阳性表达和(或)出现胞质阳性表达>10%及细胞核阳性表达时均判定为异常表达。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,率的比较正态分布采用 χ^2 检验,偏态分布采用秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 米兰标准肝癌肝移植术后复发和(或)转移情况

76例符合米兰标准肝癌肝移植患者5年累积复发转移率为21.05%(16/76),其中MVI率39.47%(30/76),复发转移率为30.00%(9/30),无MVI率60.52%(46/76),复发转移率为15.22%(8/46),有MVI的患者转移复发率与无MVI的患者比较差异无统计学意义(30.00% vs 15.22%, $\chi^2=2.387$, $P=0.122$)。

2.2 T-钙黏蛋白在肝癌组织和癌旁组织中的表达

免疫组化结果显示,癌旁组织中T-钙黏蛋白主要在细胞膜上表达,阳性表达率为93.47%(43/46),

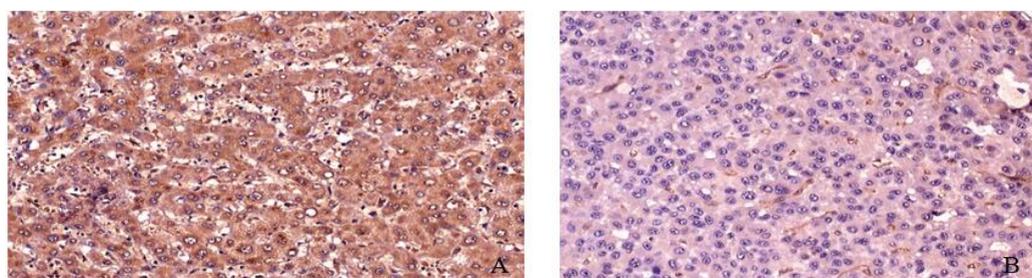
缺失及异常表达较少见,仅占6.52%(3/46);肝癌组织中细胞膜T-钙黏蛋白阳性表达率降低,为52.17%(24/46),缺失和异常表达明显升高,占47.83%(22/46)。与癌旁组织相比差异具有统计学意义($\chi^2=19.828$, $P=0.000$),见图1。

2.3 T-钙黏蛋白在术后复发和(或)转移患者及未复发和(或)转移患者癌组织中的表达

无MVI的46名患者中,术后复发或转移组患者切除肝癌组织中T-钙黏蛋白的缺失和异常表达的8例,异常表达率高达100%(8/8);而未发生复发转移的38名患者中,T-钙黏蛋白的缺失和异常表达的14例,异常表达率为36.84%(14/38),两组比较差异具有统计学意义($\chi^2=10.565$, $P=0.001$),见表1。

3 讨论

T-钙黏蛋白是近年来新发现的一个细胞黏附分子,为钙黏蛋白超家族中的重要一员^[4],与经典的黏附分子的区别主要在于经典的钙黏蛋白分子由细胞外钙结合区及跨膜区两部分组成,而非经典的黏附分子缺少跨膜区而以糖基磷脂酰肌醇分子附着于细胞膜上,故而命名truncated-cadherin,即T-钙黏蛋白(又称CDH13或H-cadherin)。T-钙黏蛋白定位于染色体16q24,其cDNA包含1个含714个氨基酸



A. 癌旁组织; B. 癌组织
A. cancer-adjacent tissue; B. cancer tissue

图1 免疫组化检测T-钙黏蛋白在癌组织和癌旁组织中的表达($\times 100$)

Fig. 1 Expression of T-cadherin in cancer tissue and cancer-adjacent tissue by immunohistochemistry ($\times 100$)

表1 T-钙黏蛋白在无MVI HCC肝移植患者癌组织和癌旁组织中的表达及与复发转移的相关性

Table 1 Expression of T-cadherin in hepatocellular carcinoma and adjacent tissues detected by immunohistochemistry and its relationship with recurrence and metastasis

组织分类	n/例	T-钙黏蛋白表达/例		χ^2	P值
		正常表达	异常表达		
癌旁组织	46	43	3		
癌组织	46	24	22*	19.828	0.000
无复发转移组癌组织	38	24	14		
复发转移组癌组织	8	0	8 Δ	10.565	0.001

与癌旁组织比较: * $P < 0.05$; 与无复发转移组癌组织比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs cancer-adjacent tissue; $\Delta P < 0.05$ vs no recurrence and metastasis cancer tissue

的开放读码框,全长约3 842 bp^[3,8]。T-钙黏蛋白有调节钙介导的细胞黏附、细胞形态形成、细胞间识别和信号传导等作用^[9]。

近年来陆续出现关于T-钙黏蛋白在肝癌^[6,10]、结直肠癌^[11]、胆囊癌^[12]、鳞状上皮细胞癌^[13]、膀胱移行细胞癌^[14]等不同程度异常表达的报道,提示其可能对上皮细胞类型的肿瘤有抑制作用,从而在肿瘤发生过程中扮演重要角色。Chan等^[6]报道T-钙黏蛋白基因在肝细胞癌中的表达下降,能诱导肝癌细胞停滞在G₂/M期,被认为是肝癌中的关键抑癌基因。在人类基因组中,DNA甲基化是一种表观遗传修饰,与肿瘤的发生关系密切。肿瘤抑制基因启动子甲基化导致基因失活在肿瘤的发病机制中起重要的作用。DNA启动子区域的甲基化是肿瘤抑制基因失活的主要机制,Yu等^[15]在肝癌患者中检测到T-钙黏蛋白基因的表达下调与其5'启动子区异常甲基化有关,推测T-钙黏蛋白基因5'启动子区异常甲基化是导致T-钙黏蛋白基因失活的主要机制。

肝移植是被公认的包括肝癌在内的终末期肝病最有效的治疗手段,但是肝癌肝移植术后肿瘤复发率高达20%~57.8%^[16],即便是按照最严格的米兰标准,肝癌肝移植术后5年肿瘤复发率也有约5%,严重影响肝移植的治疗效果。因此,肝癌肝移植术后复发转移的预防与治疗十分重要。除了合理把控肝癌肝移植的手术指征外,深入研究肿瘤的生物学特性,探讨肝移植术后肿瘤复发转移的发生机制是近年来肝癌肝移植研究的热点之一。

本课题组前期研究发现T-钙黏蛋白在HCC中异常表达,且与手术切除的肝癌细胞复发转移密切相关^[10]。T-钙黏蛋白与肝癌肝移植术后肝癌复发转移的相关性研究尚未见报道,与HCC肝移植术后复发及转移的关系尚不明确。本研究采用免疫组织化学方法检测了肝癌肝移植患者受体癌组织和癌旁组织T-钙黏蛋白基因的表达,对比观察了MVI肝癌肝移植患者T-钙黏蛋白表达与术后复发转移的关系,结果显示癌组织细胞膜T-钙黏蛋白表达缺失或降低,异常表达率明显高于癌旁肝组织,且T-钙黏蛋白的异常表达与肝细胞癌的复发和转移有密切关系。发生复发和(或)转移的HCC肝移植患者癌组织T-钙黏蛋白的异常表达明显高于未发生复发和(或)转移的患者,提示T-钙黏蛋白可能在肝癌肝移植术后复发和转移中发挥重要的生物学作用,可以作为肝癌患者临床预后预测的参考指标之一,也可以作为调节甲基化药物的靶点。此外有研究

表明T-钙黏蛋白也是一种新的血管生成调节因子^[17],该分子可作为调节异常新生血管的治疗性靶点加以开发,以阻止肿瘤新生血管生成的病理过程,对其进一步的深入研究可为肿瘤的诊断和治疗带来新的契机,也为新的抗肝肿瘤治疗药物研发提供新的靶点。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017年版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(12): 886-895.
- [2] Agopian V G, Harlander-Locke M, Zarrinpar A, et al. A novel prognostic nomogram accurately predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: analysis of 865 consecutive liver transplant recipients [J]. *J Am Coll Surg*, 2015, 220(4): 416-427.
- [3] Philippova M, Joshi M B, Kyriakakis E, et al. A guide and guard: the many faces of T-cadherin [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(7): 1035-1044.
- [4] Angst B D, Marozzi C, Magee A I. The T-cadherin superfamily: diversity in form and function [J]. *Cell Sci*, 2001, 114(pt4): 629-641.
- [5] Kuphal S, Martyn A C, Pedley J, et al. H-cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009, 22(3): 296-306.
- [6] Chan D W, Lee J M, Chan P C, et al. Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(5): 1043-1052.
- [7] Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(11): 693-699.
- [8] Kipmen-Korgun D, Osibow K, Zoratti C, et al. T-cadherin mediates low-density lipoprotein-initiated cell proliferation via the low-density Ca²⁺-tyrosine kinase-Erk-1/2 pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 45(5): 418-430.
- [9] Ivanov D B, Philippova M P, Tkachuk V A, et al. Structure and functions of classical cadherins [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2001, 66(10): 1174-1186.
- [10] 李东良, 张志强, 陈少华, 等. T-cadherin在肝细胞癌中的表达及其与肿瘤复发转移的关系 [J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(4): 315-318.
- [11] Ren J Z, Huo J R. Correlation between T-cadherin gene expression and aberrant methylation of T-cadherin promoter in human colon carcinoma cells [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 915-918.

- [12] Adachi Y, Takeuchi T, Nagayama T, et al. Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(2): 430-436.
- [13] Pfaff D, Philippova M, Buechner S A, et al. T-cadherin loss induces invasive phenotype in human keratinocytes and squamous cell carcinoma (SCC) cells *in vitro* and is associated with malignant transformation of cutaneous SCC *in vivo* [J]. *Br J Dermatol*, 2010, 63(2): 353-363.
- [14] Lin Y, Sun G, Liu X, et al. Clinical significance of T-cadherin tissue expression in patients with bladder transitional cell carcinoma [J]. *Urol Int*, 2011, 86(3): 340-345.
- [15] Yu J, Ni M, Xu J, et al. Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis [J]. *BMC Cancer*, 2002, 15(2): 29-36.
- [16] 中国医师学会器官移植医师分会, 中华医学会器官移植分会. 中国肝癌肝移植临床实践指南 (2018版) [J]. *中华消化外科杂志*, 2019, 18(1): 1-7.
- [17] Pfaff D, Philippova M, Kyriakakis E, et al. Paradoxical effects of T-cadherin on squamous cell carcinoma: up- and down-regulation increase xenograft growth by distinct mechanisms [J]. *J Pathol*, 2011, 225(4): 512-524.