

上皮细胞黏附分子、乙酰肝素酶 在胆囊癌中的表达及其意义

王 锐¹, 刘会春²

[摘要]目的:观察上皮细胞黏附分子(Ep-CAM)和乙酰肝素酶(Hpa)在原发性胆囊癌的表达,并探讨它们在原发性胆囊癌发生、发展中的作用。方法:应用免疫组织化学EliVision™ plus染色法检测50例原发性胆囊癌组织、20例胆囊腺瘤组织和20例慢性胆囊炎组织标本中Ep-CAM和Hpa的表达情况。结果:Ep-CAM胆囊癌组阳性率高于胆囊炎组($P < 0.05$);Hpa胆囊癌组与胆囊腺瘤及慢性胆囊炎组阳性率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Ep-CAM、Hpa阳性率与Nevin分期均有一定关系($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。Ep-CAM过表达与非过表达患者的中位生存时间分别为13个月、24个月。结论:Ep-CAM和Hpa表达可能在胆囊癌的发生及疾病进展过程中起重要作用,并可能作为判断胆囊癌转移的有用指标。Ep-CAM可能是胆囊癌重要的预后指标之一。

[关键词] 胆囊肿瘤; 上皮细胞黏附分子; 肝素酶; 免疫组织化学

[中国图书资料分类号] R 735.8 [文献标识码] A

Expression and prognostic significance of epithelial cell adhesion molecule and heparanase in gallbladder carcinoma

WANG Rui¹, LIU Hui-chun²

(1. Research Center Bengbu Medical College Anhui Key Laboratory of Tissue Transplantation Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) and heparanase (Hpa) in primary gallbladder carcinoma and to investigate their role in the genesis and development of primary gallbladder carcinoma. **Methods:** Ep-CAM protein and Hpa protein were determined in 50 cases of primary gallbladder carcinoma, 20 cases of gallbladder adenoma and 20 cases of chronic cholecystitis using immunohistochemistry EliVision™ plus staining method. **Results:** The positive rate of Ep-CAM expression in gallbladder carcinoma was higher than that in cholecystitis ($P < 0.05$). The positive rate of Hpa expression in gallbladder carcinoma was higher than that in gallbladder adenoma and cholecystitis ($P < 0.05$). The positive rate of Ep-CAM expression and Hpa in gallbladder carcinoma was related with the Nevin stages ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The median survival time of the tumor patients with or without overexpression of Ep-CAM was 13 and 24 months, respectively. **Conclusions:** The expression of Ep-CAM and Hpa may play an important part in the genesis and progression of gallbladder carcinoma and may act as a marker for gallbladder carcinoma metastasis. Ep-CAM can be used as a prognostic marker for patients with advanced gallbladder carcinoma.

[Key words] gallbladder carcinoma; adhesion molecule; heparanase; immunohistochemistry

上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, Ep-CAM)表达于大部分正常上皮细胞表面,是一种嗜同种的钙非依赖性Ep-CAM。在Ep-CAM的作用下,上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)介导的细胞黏附作用减弱,Ep-CAM介导的细胞黏附作用逐渐占据主导地位^[1]。考虑到Ep-CAM在细胞

黏附、分化、增殖中的作用,它对癌症患者预后的影响是值得期待的。肿瘤细胞侵袭、转移必须穿越细胞基膜及细胞外基质组成的屏障以及新生血管的形成。而这一屏障主要包括IV型胶原、层黏连蛋白以及硫酸乙酰肝素蛋白多糖。肝素酶(heparanase, Hpa)是迄今为止在哺乳动物中发现并克隆成功的唯一一种裂解硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)中硫酸乙酰肝素(HS)链的糖苷酸内切酶。本研究旨在探讨Ep-CAM及Hpa在原发性胆囊癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集2002年1月至2007年6月

[收稿日期] 2010-04-25

[作者单位] 1. 蚌埠医学院科研中心, 安徽省组织移植重点实验室, 安徽蚌埠233030; 2. 蚌埠医学院第一附属医院肝胆外科, 安徽蚌埠233004

[作者简介] 王锐(1980-)男, 硕士, 助教。

[作者单位] 刘会春, 主任医师, 教授。E-mail: doctorlhc2000@yahoo.com.cn

蚌埠医学院第一附属医院肝胆外科手术切除并经病理证实为胆囊癌 50 例及胆囊腺瘤 20 例和慢性胆囊炎 20 例标本的组织蜡块。对胆囊癌组病例以信件或电话的形式随访,至研究结束获得完整随访资料 24 例。

1.2 方法 采用免疫组织化学 EliVision™ plus 染色法测定 Ep-CAM 和 Hpa。鼠抗人 Ep-CAM 单抗购于 Santa Cruz 生物公司,兔抗人 Heparanase 多抗购于武汉博士德生物公司。按照即用型非生物素免疫组织化学 EliVision™ plus 检测试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)说明书要求的操作步骤进行检测。Ep-CAM 及 Hpa 均以结肠癌组作为阳性对照,以 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 代替一抗作阴性对照。

1.3 判定标准

1.3.1 Ep-CAM 判定 参照 Gastl 等^[2] 标准以半定量法进行判定,对染色强度进行评分,0 分无表达,1 分弱表达,2 分中等强度表达,3 分强表达;同时对阳性细胞所占百分比进行评分,0 为 0 分,<10% 为 1 分;10%~15% 为 2 分,50%~80% 为 3 分;>80% 为 4 分。两者乘积 >4 分者为过表达。Ep-CAM 主要集中在细胞膜,单独的细胞质染色被作为非特异性染色。

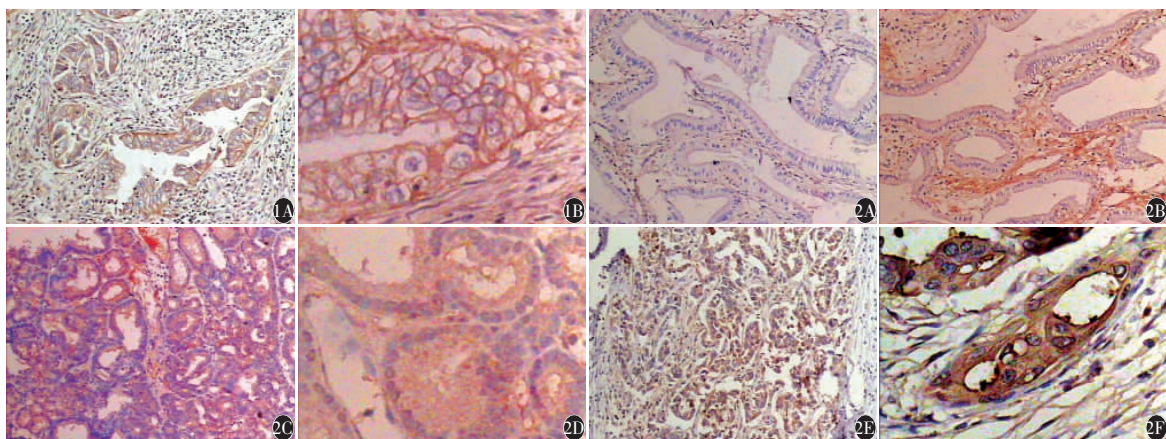
1.3.2 Hpa 评价标准^[3] 随机选择 10 个高倍镜视野进行判断,胞质内含有棕黄色或黄褐色颗粒为阳性,Hpa 的表达以阳性细胞数和染色强度的得分之

和进行判断。阳性细胞数 ≤10% 为 0 分,>10%~25% 为 1 分,>25%~50% 为 2 分,>50% 为 3 分;细胞无染色为 0 分,弱染色(浅黄色)为 1 分,中等染色(棕黄色)为 2 分,强染色(黄褐色)为 3 分。上述两项得分相加,0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(1+),3~4 分为中等阳性(2+),5~6 分为强阳性(3+)。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验、秩和检验、等级相关分析和 Cox 比例风险回归分析。

2 结果

2.1 Ep-CAM 和 Hpa 在胆囊癌、胆囊腺瘤及慢性胆囊炎组织中的表达 50 例胆囊癌中 Ep-CAM 过表达者 32 例(见图 1),过表达率为 64%;20 例胆囊腺瘤中 Ep-CAM 过表达者 9 例,过表达率为 45%;20 例慢性胆囊炎中 Ep-CAM 过表达者 6 例,阳性率为 30%;差异有统计学意义($\chi^2 = 7.16, P < 0.05$)。其中胆囊癌组与慢性胆囊炎组差异有统计学意义($P < 0.05$)。50 例胆囊癌 Hpa 阳性染色 23 例,阳性率为 46%;20 例慢性胆囊炎阳性染色 2 例(均为 1+) ,阳性率为 10%;20 例胆囊腺瘤阳性染色 2 例(1+、2+ 各一),阳性率为 10%(见图 2);差异有统计学意义($\chi^2 = 13.71, P < 0.01$)。胆囊癌组 Hpa 阳性率均高于胆囊腺瘤及慢性胆囊炎组($P < 0.05$)。



1A:低倍镜,1B:高倍镜;2A:慢性胆囊炎阴性染色,2B:慢性胆囊炎弱阳性染色,2C、2D:胆囊腺瘤中等阳性染色,2E、2F:胆囊癌强阳性染色

图 1 Ep-CAM 在胆囊癌中过表达 图 2 Hpa 在胆囊良恶性病变中的表达

2.2 Ep-CAM 及 Hpa 在胆囊癌组织中的表达与其临床参数的关系 Ep-CAM 的过表达在胆囊癌 Nevin I~III 期和 Nevin IV~V 期的阳性率分别为 38.9% 和 78.1%,差异有统计学意义($P < 0.01$);而在患者的年龄、性别、组织类型和病理分级间差异均

无统计学意义($P > 0.05$)。Hpa 表达在胆囊癌 Nevin I~III 期和 Nevin IV~V 期的阳性率分别为 22.2% 和 59.4%,差异有统计学意义($P < 0.05$);而在患者的年龄、性别、组织类型和病理分级间差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1、2)。

表 1 各临床病理参数与 Ep-CAM 在胆囊癌组织中表达的关系 (n)

临床病理参数	n	Ep-CAM 表达			χ^2	P
		阴性	阳性	阳性率 (%)		
年龄						
<60 岁	23	9	14	60.9	0.18	>0.05
≥60 岁	27	9	18	66.7		
性别						
男	19	6	13	68.4	0.26	>0.05
女	31	12	19	61.3		
组织类型						
腺癌	41	13	29	69.0	3.00	>0.05
其他	9	6	3	3/9		
病理分级						
I 级	7	5	2	2/7	5.57 [△]	>0.05
II 级	24	9	15	62.5		
III 级	19	4	15	78.9		
Nevin 分期						
I ~ III 期	18	11	7	38.9	7.70	<0.01
IV ~ V 期	32	7	25	78.1		

△ 示 Hc 值

表 2 各临床病理参数与 Hpa 在胆囊癌组织中表达的关系 (n)

临床病理参数	n	Hpa 表达			χ^2	P
		阴性	阳性	阳性率 (%)		
年龄						
<60 岁	23	10	13	56.5	1.90	>0.05
≥60 岁	27	17	10	37.0		
性别						
男	19	8	11	57.9	1.75	>0.05
女	31	19	12	38.7		
组织类型						
腺癌	41	22	19	46.3	0.07	>0.05
其他	9	5	4	4/9		
病理分级						
I 级	7	4	3	3/7	0.29 [△]	>0.05
II 级	24	12	12	50.0		
III 级	19	11	8	42.1		
Nevin 分期						
I ~ III 期	18	14	4	22.2	6.40	<0.05
IV ~ V 期	32	13	19	59.4		

△ 示 Hc 值

2.3 Ep-CAM 及 Hpa 在胆囊癌组织中表达的相关性 Ep-CAM 的过表达与 Hpa 阳性表达之间无明显相关性 ($r_s = 0.023$ $P = 0.872$)。

2.4 生存分析 用 Kaplan-Meier 法绘制有随访资料的 24 例胆囊癌患者 Ep-CAM 和 Hpa 表达与生存率的关系的生存率曲线 (见图 3), 患者 1 年生存率和 3 年生存率分别为 66.7% (16/24) 和 37.5% (9/24)。Ep-CAM 过表达与非过表达的患者中位生存时间分别为 13 个月、24 个月, Hpa 阳性与阴性的中

位生存时间分别为 15 个月、17 个月。用 Cox 比例风险回归分析进行预后因素的多变量分析, 结果显示, Ep-CAM 过表达的患者生存率明显低于非过表达患者 ($OR = 8.543$, 95% CI 1.848 ~ 39.499, $P = 0.006$)。而性别、年龄、病理分级、临床分期、Hpa 表达各因素对预后的影响均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

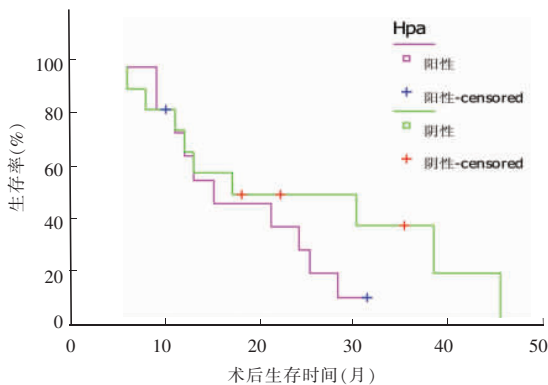
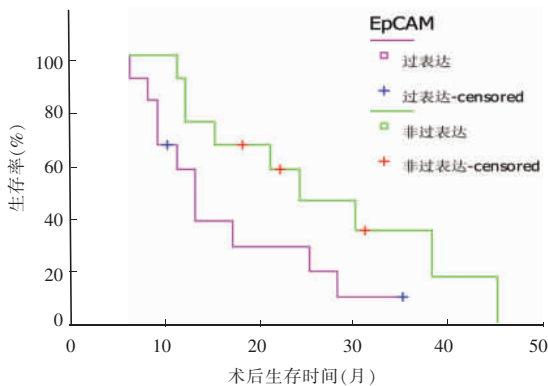


图 3 Ep-CAM、Hpa 表达与生存率关系的生存曲线

3 讨论

Ep-CAM 首先是作为几种不同来源癌的肿瘤特异性抗原被大家认识的, 各研究团体针对这一肿瘤特异性分子产生了不同的抗体。另外通过构建 cDNA 文库各实验室也克隆了不同的单抗株。所以该分子有很多不同的名称, 如 EGP40、CO17-1A 抗原、KSA1/4、ESA、GA733-2、MOC31、Ber-EP4 等。将 Ep-CAM 转染到鼠成纤维细胞中显示, Ep-CAM 的表达与增殖相关^[4]。当 Ep-CAM 过表达, E-cadherin 的黏着物分离, 导致 E-cadherin/ β -catenin 复合物的积聚, 减少了细胞总 α -catenin^[11]。研究表明, 在细胞分裂期间, 弱的 Ep-CAM 介导的细胞间黏附作用代替了强而紧密的 E-cadherin 介导的黏附作用。关于 Ep-CAM 在恶性细胞生长过程中的确切作用尚不清楚, 但体外的实验表明, Ep-CAM 与肿瘤细胞的生长周期直接相关, 其表达可使肿瘤细胞对生长因子的需要量明显下降, 增加细胞的代谢活力和克隆的

形成能力^[5]。本实验结果显示,在慢性胆囊炎、胆囊腺瘤、胆囊癌组织中 Ep-CAM 过表达水平逐渐升高,可能在胆囊癌变过程中存在着 Ep-CAM 基因的特异性激活,从而呈现肿瘤组织上的过表达。对 Ep-CAM 在胆囊癌组织中的过表达与各临床病理参数的关系研究中可以看出,Ep-CAM 的过表达与胆囊癌 Nevin 分期有关;而与患者的年龄、性别、组织类型、病理分级无明显关系。生存分析发现,Ep-CAM 过表达提示预后较差。这一结果与 Varga 等^[6]对胆囊癌的研究和 Spizzo 等^[7]在乳腺癌的研究相一致。相反有研究^[5,8-9]表明,在肾透明细胞癌和胃癌中 Ep-CAM 的表达与较好的预后相关。有学者^[10]认为,Ep-CAM 在胆囊癌和乳腺癌中发挥相同的功能,它对肿瘤细胞提供促进生长的刺激,导致肿瘤侵袭和转移能力的增高。

肿瘤的转移是一个多因素、多步骤的复杂过程,其中关键而必需的步骤是突破由基膜和细胞外基质构成的组织屏障,该屏障由 2 种主要成分构成:结构蛋白和糖胺聚糖,HSPG 为糖胺聚糖的主要成分。过去的研究多集中在类似基质金属蛋白酶等为底物的蛋白酶类,而以 HSPG 为底物的酶类研究则较少报道。Hpa 是一种近年克隆出的特异降解 HSPG 的内糖苷酶。

本实验检测结果显示,50 例胆囊癌中 23 例阳性表达,Hpa 表达率为 46%。胆囊腺瘤和慢性胆囊炎表达率为 10%。Hpa 在 Nevin 分期高级别肿瘤中的阳性染色率和染色强度高于早期肿瘤。但在病理分级之间 Hpa 的表达差异无统计学意义。表明 Hpa 可能与胆囊癌的转移密切相关。文献^[11-12]报道 Hpa 的表达水平与结肠癌的恶性程度呈高度相关性。本研究生存分析显示,Hpa 阳性组和阴性组中位生存时间为 15 个月和 17 个月,表明 Hpa 参与了胆囊癌的发生及其以后的侵袭和转移过程。

[参 考 文 献]

- [1] Litvinov SV ,Balzar M ,Winter MJ ,et al. Epithelial cell adhesion molecule modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins[J]. Cell Biol ,1997 ,139(5) : 1337 - 1348.
- [2] Gastl G ,Spizzo G ,Obriest P ,et al. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival [J]. Lancet ,2000 ,356 (9246) : 1981 - 1982.
- [3] Gohji K ,Katsuoka Y ,Okamoto M ,et al. Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer [J]. Hinyokika Kyo ,2000 ,46(10) : 757 - 762.
- [4] Litvinov SV ,Bakker HA ,Gourevitch MM ,et al. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40(Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion [J]. Cell Adhes Commun ,1994 2(5) : 417 - 428.
- [5] Songun I ,Litvinov SV ,van de Velde CJ ,et al. Loss of Ep-CAM (CO17-4A) expression predicts survival in patients with gastric cancer [J]. Br J Cancer 2005 92(9) : 1767 - 1772.
- [6] Varga M ,Obriest P ,Schneeberger S ,et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival [J]. Clinical Cancer Research 2004 ,10(9) : 3131 - 3136.
- [7] Spizzo G ,Went P ,Dirnhofer S ,et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat 2004 86(3) : 207 - 213.
- [8] Kim HL ,Seligson D ,Liu X ,et al. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma [J]. Clin Cancer Res 2004 ,10(16) : 5464 - 5471.
- [9] Went P ,Dirnhofer S ,Salvisberg T ,et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule in renal epithelial tumors [J]. Am J Surg Pathol 2005 29(1) : 83 - 88.
- [10] Osta WA ,Chen Y ,Mikhitarian K ,et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy [J]. Cancer Res 2004 64(16) : 5818 - 5824.
- [11] Nobuhisa T ,Naomoto Y ,Ohkawa T ,et al. Heparanase expression correlates with malignant potential in human colon cancer [J]. Cancer Res Clin Oncol 2005 ,131(4) : 229 - 237.
- [12] Kuniyasu H ,Chihara Y ,Kubozoe T ,et al. Co-expression of CD44v3 and heparanase is correlated with metastasis of human colon cancer [J]. Int J Mol Med 2002 ,10(3) : 333 - 337.

(本文编辑 刘畅)

本学报再次被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,本学报再次被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)(收录证书见封二)。

据中国科学技术信息研究所编制的《2010 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,本学报 2009 年的总被引频次、影响因子、他引率、扩散因子、权威因子分别为 578.0、0.395、0.87、35.12、362.83 较 2008 年的 421.0、0.248、0.82、5.46、280.95 有较大幅度增长;在《2010 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》收录的医科类大学学报类期刊(共 51 种)中,本学报影响因子位列第 17 位。

《蚌埠医学院学报》编辑部