

CNTN-1 表达在肝癌术后早期复发中的预测价值

李光耀, 葵卫东, 程 亚, 盛须仁

摘要 目的 探讨神经黏附分子接触蛋白-1 (CNTN-1) 在原发性肝细胞性肝癌 (肝癌) 根治术后早期复发中的预测价值。方法 应用免疫组化法研究 90 例肝癌组织和癌旁组织中 CNTN-1 的表达。分析 CNTN-1 与肝癌临床病理特征及术后早期复发的关系。结果 CNTN-1 在肝癌组织中表达明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。CNTN-1 表达与肿瘤直径、有无完整包膜和 TNM 分期相关 ($P < 0.05$)。单因素 Logistic 回归分析表明 CNTN-1、肿瘤大小、有无完整包膜、微血管侵犯、甲胎蛋白 (AFP)、Edmondson 分级和 TNM 分期与肝癌根治术后早期复发密切相关; 多因素 Logistic 回归分析表明 CNTN-1 高表达是肝癌根治术后早期复发的独立危险因素。结论 CNTN-1 的高表达是肝癌根治术后早期复发的潜在预测因子。

关键词 肝癌; CNTN-1; 早期复发

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)04-0587-05

原发性肝细胞性肝癌 (简称肝癌) 是世界范围内第五大常见恶性肿瘤, 其死亡率在癌症相关死因中位列第三, 5 年生存率仅为 10%^[1-2]。虽然肝切除是目前治疗早中期肝癌最有效的手段, 但术后约 50% 的患者 2 年内出现复发, 导致患者长期生存率较低^[3]。因此寻找特异性肿瘤标志物对预测肝癌术后早期复发和改善患者预后具有重要价值。神经黏附分子接触蛋白-1 (contactin 1, CNTN-1) 是免疫球蛋白超家族成员之一, 在调节神经轴突生长、突触形成等方面发挥重要作用^[4-5]。但 CNTN-1 在肝癌组织中的表达情况及其与临床意义尚不清楚。该研究采用免疫组化法检测 CNTN-1 在肝癌组织和癌旁组织中的表达, 分析 CNTN-1 与肝癌临床病理特征、术后早期复发的关系。为肝癌术后早期复发高危患者的鉴别提供依据。

2016-01-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81172364); 安徽省科技攻关项目 (编号: 1301042199)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普外科, 合肥 230001

作者简介: 李光耀, 男, 硕士研究生;

葵卫东, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: jwd2013@126.com

1 材料和方法

1.1 病理标本 肝癌标本均取自 2006 年 1 月 ~ 2010 年 12 月安徽医科大学附属省立医院肝脏外科收治经术后病理证实为肝癌组织及相应的癌旁组织 (距离癌组织 $> 2\text{cm}$ 的肝脏组织) 的石蜡标本 90 例, 随访截止至 2013 年 12 月, 所有患者术前术后未行放疗、化疗、介入等抗癌治疗。肝癌根治术后 2 年内复发的为早期复发, 2 年以上未复发为非早期复发^[6]。其中男 83 例, 女 17 例; 年龄 19 ~ 74 (54.30 \pm 10.90) 岁, < 60 岁 56 例, ≥ 60 岁 34 例; 肿瘤 $\phi < 5\text{cm}$ 28 例, $\geq 5\text{cm}$ 62 例; 病理学组织学分型: 高分化 44 例, 中低分化 46 例。肿瘤分期参照美国癌症联合委员会 (AJCC) TNM 分期手册第七版^[7]。

1.2 主要试剂 鼠抗人 CNTN-1 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 相应二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法 采用免疫组化法检测 CNTN-1 蛋白的表达。连续组织切片 ($4\ \mu\text{m}$) 经二甲苯脱蜡、枸橼酸盐 (pH 6.0) 微波抗原修复后 3% 去离子过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶活性, 滴加一抗 CNTN-1 (浓度 1 : 500), $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜。复温后滴加二抗, DAB 显色。最后苏木精复染、脱水、透明、封片。由两位未参与实验、经验丰富的病理科医师对切片进行半定量评分, 评分标准: 每张切片在 400 倍显微镜下随机选取 5 个视野, 每个视野记数 200 个细胞, 根据染色细胞所占百分率评分: 无明显细胞着色为 0 分; 1% ~ 10% 细胞着色为 1 分; 10% ~ 30% 细胞着色为 2 分; $> 30\%$ 细胞着色为 3 分。再根据染色强度评分: 未显色或显色不清为 0 分; 浅黄色为 1 分; 棕黄色为 2 分; 深褐色为 3 分。每张切片最终得分为染色百分率和染色强度平均分数的乘积, 得分 ≥ 3 分者即定为高表达, 得分 < 3 分者即定为低表达。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析, 连续资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。分类变量采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。单因素和多因素的 Logistic 回归分析用于寻找影响肝癌术后早期复发的因素。将

单因素分析中有统计学意义的变量纳入到多因素分析。在 Logistic 回归基础上使用受试者工作特征曲线(ROC)分析判断各种危险因子预测肝癌术后早期复发的可靠性。

2 结果

2.1 肝癌组织及癌旁组织中 CNTN-1 的表达 免疫组化结果显示 CNTN-1 主要定位于细胞质,见图 1。CNTN-1 在 90 例肝癌和癌旁组织中的高表达率分别为 54.4% (49/90) 和 12.2% (11/90), 两者差异有统计学意义($\chi^2 = 6.718, P = 0.01$)。

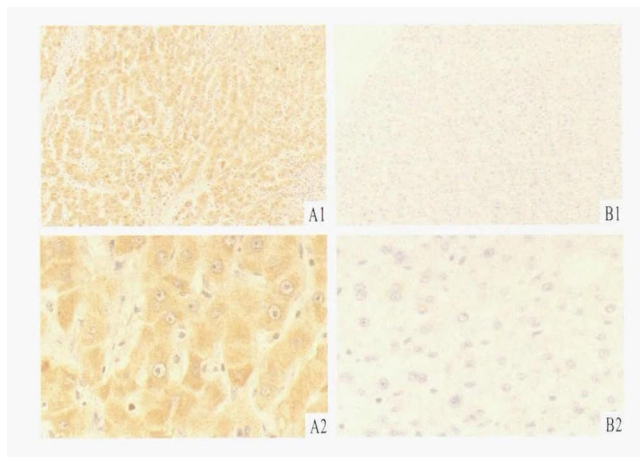


图 1 CNTN-1 在肝癌和癌旁组织中的表达 DAB 染色

A: CNTN-1 在肝癌组织中的阳性表达; B: CNTN-1 在癌旁组织中的阴性表达; 1: $\times 100$; 2: $\times 400$

2.2 CNTN-1 的表达与肝癌临床病理参数及早期复发的关系 CNTN-1 在肝癌组织中的高表达与更大的肿瘤直径 ($P = 0.004$)、无完整包膜 ($P < 0.001$)、更晚的 TNM 分期 ($P < 0.001$) 和术后早期复发 ($P < 0.000$) 显著相关。而 CNTN-1 的表达与年龄、性别、肿瘤分化程度、微血管侵犯、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、乙肝表面抗原、肝硬化及 Child 分级均无关。见表 1。

2.3 早期复发相关因素的 logistic 回归分析 为了寻找肝癌术后早期复发的影响因素, 本研究对相关因素进行了 Logistic 回归分析。在单因素分析中, 较大的肿瘤直径、无完整包膜、微血管侵犯、更高的 AFP 水平、更高的 Edmondson 分级、更晚的 TNM 分期、CNTN-1 的高表达是肝癌术后早期复发的危险因子。见表 2。在多因素分析中, 微血管侵犯、更晚的 TNM 分期及 CNTN-1 的高表达是肝癌术后早期复发的独立危险因子。见表 3。

2.4 早期复发相关因素的 ROC 曲线分析 分别

表 1 CNTN-1 表达与肝癌临床病理特征及术后早期复发的相关性(n)

临床病理参数	n	CNTN-1		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
年龄(岁)				1.181	0.277
≤60	34	13	21		
>60	56	28	28		
性别				0.890	0.346
男	73	35	38		
女	17	6	11		
肿瘤包膜				15.902	<0.001
不完整	47	12	35		
完整	43	29	14		
肿瘤直径(cm)				8.151	0.004
≤5	28	19	9		
>5	62	22	40		
微血管侵犯				0.992	0.319
无	68	33	35		
有	22	8	14		
Edmondson 分级				0.164	0.686
I ~ II	44	21	23		
III ~ IV	46	20	26		
AFP (ng/ml)				1.555	0.212
≤20	27	15	12		
>20	63	26	37		
HBsAg				1.928	0.165
阴性	14	4	10		
阳性	76	37	39		
肝硬化				0.026	0.873
无	16	7	9		
有	74	34	40		
Child 分级				2.163	0.141
A	84	40	44		
B	6	1	5		
TNM 分期				6.771	0.009
I / II	48	28	20		
III / IV	42	13	29		
早期复发				15.510	<0.001
否	33	24	9		
是	57	17	40		

对肝癌患者各个临床病例特征和 CNTN-1 表达做 ROC 曲线分析, 结果表明肿瘤大小、有无完整包膜、微血管侵犯、AFP、Edmondson 分级、TNM 分期、CNTN-1 表达的曲线下面积 (area under curve, AUC) 分别为 0.637、0.721、0.645、0.622、0.616、0.749、0.715。接着将各个临床病理特征联合做 ROC 曲线分析, AUC 为 0.849。最后将所有临床病理特征与 CNTN-1 表达联合做 ROC 曲线分析, AUC 为 0.870。见表 4、图 2。

3 讨论

本研究通过免疫组化法检测了 CNTN-1 蛋白在 90 例原发性肝癌患者癌组织及相应癌旁组织中的

表2 肝癌术后早期复发相关因子的单因素 Logistic 回归分析

临床病理参数	B	SE	Wald χ^2 值	HR	95% CI	P 值
年龄	0.108	0.450	0.058	1.114	0.461 ~ 2.691	0.810
性别	0.401	0.584	0.471	0.670	0.213 ~ 2.104	0.492
肿瘤包膜	1.913	0.496	14.859	6.771	2.560 ~ 17.906	<0.001
肿瘤直径	1.261	0.476	7.010	3.529	1.388 ~ 8.977	0.008
微血管侵犯	2.126	0.781	7.416	8.378	1.814 ~ 38.688	0.006
Edmondson 分级	0.950	0.451	4.432	2.587	1.068 ~ 6.268	0.035
AFP	1.139	0.477	5.700	3.125	1.226 ~ 7.963	0.017
HBsAg	0.433	0.637	0.463	0.648	0.186 ~ 2.259	0.496
肝硬化	0.659	0.625	1.114	0.517	0.152 ~ 1.759	0.291
TNM 分期	2.338	0.559	17.478	10.36	3.462 ~ 31.001	<0.001
CNTN-1	1.836	0.486	14.255	6.275	2.418 ~ 16.279	<0.001

HR: 风险比; 95% CI: 95% 可信区间

表3 肝癌术后早期复发相关因子的多因素 Logistic 回归分析

临床病理参数	B	SE	Wald χ^2 值	HR	95% CI	P 值
肿瘤包膜	0.788	0.621	1.611	2.199	0.651 ~ 7.426	0.204
肿瘤直径	0.671	0.614	1.193	1.956	0.587 ~ 6.519	0.275
微血管侵犯	1.747	0.881	3.926	5.735	1.019 ~ 32.271	0.048
Edmondson 分级	0.188	0.672	0.078	0.829	0.222 ~ 3.092	0.780
AFP	0.875	0.606	2.085	2.399	0.731 ~ 7.867	0.149
TNM 分期	1.882	0.610	9.529	6.564	1.988 ~ 21.677	0.002
CNTN-1	1.718	0.558	9.488	5.572	1.868 ~ 16.622	0.002

HR: 风险比; 95% CI: 95% 可信区间

表4 肝癌术后早期复发相关因子的 ROC 曲线分析

因素	AUC	95% CI	P 值
肿瘤包膜	0.721	0.610 ~ 0.831	0.001
肿瘤直径	0.637	0.515 ~ 0.760	0.031
微血管侵犯	0.645	0.532 ~ 0.758	0.022
Edmondson 分级	0.616	0.496 ~ 0.737	0.067
AFP	0.622	0.499 ~ 0.745	0.055
TNM 分期	0.749	0.645 ~ 0.853	<0.001
CNTN-1	0.715	0.603 ~ 0.827	0.001
临床病理特征联合	0.849	0.771 ~ 0.927	<0.001
临床病理特征与 CNTN-1 联合	0.870	0.801 ~ 0.946	<0.001

95% CI: 95% 可信区间

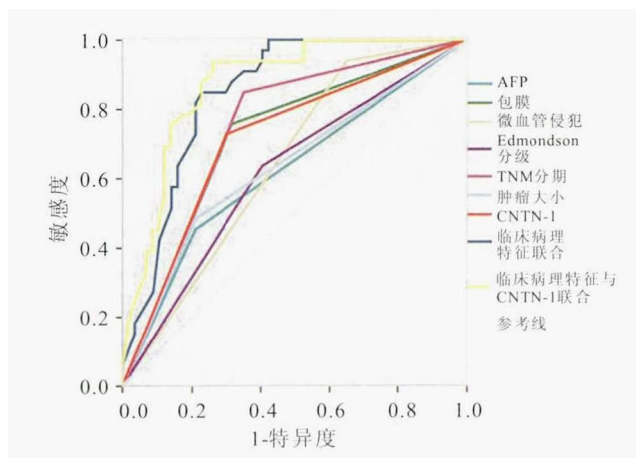


图2 Logistic 回归分析基础上使用 ROC 曲线比较 CNTN-1 与临床病理危险因素预测肝癌术后早期复发的准确性

表达情况,结果表明 CNTN-1 在肝癌组织中呈高表达,并且在肝癌组织中的表达与肿瘤直径、有无完整包膜和 TNM 分期显著相关,而与年龄、性别、肿瘤分化程度、微血管侵犯、AFP、乙肝表面抗原、肝硬化及 Child 分级均无关。重要的是 CNTN-1 的高表达与肝癌患者术后早期复发密切相关,并且是肝癌术后早期复发的独立危险因素。该研究结果提示 CNTN-1 与肝癌的侵袭能力及术后早期复发存在一定的相关性,可能成为预测肝癌患者术后早期复发和评估预后的有效指标。

研究^[8]显示 CNTN-1 在胃癌中的 mRNA 和蛋白水平均明显增高,其高表达与 TNM 分期、淋巴结转移及淋巴管侵犯密切相关。与胃癌中研究结果一致,Liu et al^[9]发现 CNTN-1 在食管癌组织中 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于癌旁组织。并且,CNTN-1 的高表达与肿瘤分期、淋巴结转移及淋巴管侵犯密切相关。研究^[10-11]显示 CNTN-1 在肺癌组织中呈高表达状态,并且与肿瘤分期及淋巴结转移相关。本研究也显示 CNTN-1 蛋白在肝癌组织中呈高表达状态,并且与肿瘤的侵袭性临床病理特征如无完整包膜、更大的肿块直径、更晚的 TNM 分期显著相关,表明其在肝癌的侵袭和转移中扮演着重要的角色。

研究^[12]表明, CNTN-1 在口腔鳞癌的表达与患者术后复发相关。然而 CNTN-1 的表达与肝癌复发的关系国内外尚未见报道, 因此, 本研究采用了 Logistic 回归分析来判断 CNTN-1 表达与肝癌患者术后早期复发的关系。单因素分析表明更大的肿瘤直径、无完整包膜、微血管侵犯、更高的 AFP 水平、更高的 Edmondson 分级、更晚的 TNM 分期、高表达的 CNTN-1 是肝癌术后早期复发的危险因子。多因素分析进一步表明微血管侵犯、更晚的 TNM 分期及 CNTN-1 的高表达是肝癌术后早期复发的独立危险因子。为进一步证实 CNTN-1 预测肝癌术后早期复发的可靠性, 在 Logistic 回归基础上使用 ROC 曲线构建了包括 CNTN-1 表达、单个临床病理特征、各临床病理特征联合及临床病理特征联合 CNTN-1 表达在内的 9 个模型。结果显示 CNTN-1 表达联合所有临床病理特征有更大的 AUC, 表明此模型在预测肝癌术后早期复发中可靠性更强。CNTN-1 与肝癌术后早期复发密切相关, 进一步揭示了 CNTN-1 基因在肿瘤发生和发展中起着至关重要的作用。本研究为肝癌术后早期复发的预测及早期干预治疗提供了新的思路。然而, CNTN-1 促进肝癌术后早期复发的具体机制尚不清楚, 需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Alekruse S F, McGlynn K A, Reichman M E. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(9): 1485-91.
- [3] Chun J M, Kwon H J, Sohn J, et al. Prognostic factors after early recurrence in patients who underwent curative resection for hepatocellular carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(2): 148-51.
- [4] Berglund E O, Murai K K, Fredette B, et al. Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression[J]. *Neuron*, 1999, 24(3): 739-50.
- [5] Fujita N, Saito R, Watanabe K, et al. An essential role of the neuronal cell adhesion molecule contactin in development of the Xenopus primary sensory system[J]. *Dev Biol*, 2000, 221(2): 308-20.
- [6] Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomized trial[J]. *Lancet*, 2000, 356(9232): 802-7.
- [7] Edge S B, Compton C C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(6): 1471-4.
- [8] Yu J W, Wu S H, Lu R Q, et al. Expression and significances of contactin-1 in human gastric cancer[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2013: 210205.
- [9] Liu P, Chen S, Wu W, et al. Contactin-1 (CNTN-1) overexpression is correlated with advanced clinical stage and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinomas[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(7): 612-8.
- [10] Su J L, Yang C Y, Shih J Y, et al. Knockdown of contactin-1 expression suppresses invasion and metastasis of lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2553-61.
- [11] Su J L, Yang P C, Shih J Y, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(3): 209-23.
- [12] Wu H M, Cao W, Ye D, et al. Contactin 1 (CNTN1) expression associates with regional lymph node metastasis and is a novel predictor of prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(2): 265-70.

Predictive value of CNTN-1 expression in early recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy

Li Guangyao, Jia Weidong, Cheng Ya, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the predictive value of CNTN-1 expression in early recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) after hepatectomy. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of CNTN-1 in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues from 90 HCC patients. The relationships of CNTN-1 expression with clinicopathological parameters and early postoperative recurrence were evaluated. **Results** CNTN-1 expression was significantly higher in tumor tissues than that in adjacent non-tumor tissues ($P < 0.01$). Besides, CNTN-1 expression was significantly associated with tumor size, tumor capsula, and tumor-node-metastasis (TNM) stage. Univariate logistic regression analysis indicated that early postoperative recurrence of HCC was significantly correlated with CNTN-1, tumor size, tumor capsula, vascular invasion, serum AFP, Edmondson grade, and TNM

网络出版时间:2016-3-8 8:29:02 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160308.0829.062.html>

NKG2D 和分泌型 MICA 在胰腺癌组织中的表达及其临床意义

徐弘, 陈炯, 赵跃, 朱兴兴, 方恒忠, 赵金钱

摘要 目的 研究 NK 细胞活化性受体(NKG2D)及其分泌型主要组织相容性复合体 I 类相关基因 A(MICA)在胰腺癌和癌旁组织中的表达及其临床意义。方法 通过免疫组织化学方法检测 70 例胰腺癌组织和癌旁组织中 NKG2D 及分泌型 MICA 表达情况,并分析两者之间的关系及与临床病理因素之间的关系。结果 NKG2D 和分泌型 MICA 在胰腺癌组织中的阳性表达率为 32.9% (23/70) 和 67.1% (47/70);而在癌旁组织中的阳性表达率为 60.0% (42/70) 和 31.4% (22/70);差异均有统计学意义($P < 0.05$)。NKG2D、分泌型 MICA 在胰腺癌组织中的表达与肿瘤分化程度、神经侵犯、淋巴结转移和 TNM 分期显著相关($P < 0.05$),而与年龄、性别、肿瘤病变部位及大小均无关。NKG2D 的表达与分泌型 MICA 的表达呈负相关性($P < 0.05$)。结论 NKG2D 的表达与分泌型 MICA 的表达呈显著相关性,与胰腺癌侵袭转移能力有关,分泌型 MICA 可能通过下调 NKG2D 在肿瘤中的表达,从而逃避机体对肿瘤的免疫应答。

关键词 胰腺癌;NKG2D;MICA

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)04-0591-04

胰腺癌是消化系统中恶性程度高、早期诊断率低、治疗极其困难且预后效果较差的恶性肿瘤之一,其发病率逐年升高,5 年生存率小于 5%^[1]。胰腺癌早期即可发生转移导致其常规治疗效果不佳,寻求更为有效的治疗方法成为目前研究热点。肿瘤过继免疫治疗是指在体外将抗肿瘤效应细胞进行诱导、

激活和扩增后再回输给肿瘤患者,来提高患者抗肿瘤能力,达到治疗和预防复发的目的。双阴性 T 细胞(double negative T cell, DNT)是一种既具有免疫抑制调节功能又可以杀伤肿瘤细胞的 T 细胞亚群^[2],其抗肿瘤效应逐渐被研究者关注。DNT 细胞可以通过 NK 细胞活化性受体(NK cell activating receptor, NKG2D)途径参与杀伤肿瘤细胞^[3]。该研究通过免疫组织化学法联合检测 NKG2D 和相关配体,即分泌型主要组织相容性复合体 I 类相关基因 A (major histocompatibility complex class I chain-related A, MICA)在胰腺癌和癌旁组织中的表达,研究两者之间的关系及与胰腺癌临床病理参数之间的关系,为胰腺癌免疫治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 病理标本 胰腺癌组织及相应的癌旁组织(距离癌组织 > 1 cm)的石蜡标本 70 例,取自 2008 年 7 月~2013 年 7 月安徽医科大学附属省立医院普外科收治经手术治疗后,经病理证实为胰腺癌的标本。其中男 37 例,女 33 例;年龄 42~78 (60.24 ± 9.72) 岁; < 60 岁 33 例, ≥ 60 岁 37 例;胰头癌 39 例,胰体尾癌 31 例;肿瘤 $\phi < 20$ mm 25 例, ≥ 20 mm 45 例;病理学组织学分型:高分化 22 例,中低分化 48 例;有淋巴转移 42 例,无淋巴转移 28 例;有神经侵犯 45 例,无神经侵犯 25 例。患者术前均未行化疗或放疗。本实验的 70 例标本的病理参数均按照国际抗癌协会(UICC)2013 年标准^[4]进行分级。

1.2 主要试剂 羊抗人 NKG2D 多克隆抗体和鼠抗人 MICA 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;相应二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法 运用免疫组织化学法检测相关蛋白的表达。5 μ m 厚组织连续切片,经脱蜡、枸橼酸盐微

2016-01-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81071985);安徽省国际科技合作项目(编号:10080703038);安徽省科技攻关课题(编号:11010402172)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院普通外科,合肥 230001

作者简介:徐弘,男,硕士研究生;

陈炯,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: ch_jiong@126.com

stage. Multivariate analysis identified CNTN-1 was an independent risk factor for early recurrence of HCC after hepatectomy. **Conclusion** High expression of CNTN-1 is a potential predictive factor for early recurrence of HCC after hepatectomy.

Key words hepatocellular carcinoma; CNTN-1; early recurrence