

细胞外基质蛋白-1 在原发性肝癌中的表达及其临床意义

陈浩 李建生 姜卫东 王伟

【摘要】 目的 检测细胞外基质蛋白-1 (ECM1) 在原发性肝癌中的表达, 探讨其在肝癌转移中的临床意义。方法 收集 2008 年 6 月至 2009 年 12 月安徽医科大学附属省立医院手术切除的 60 例原发性肝癌患者的癌组织及癌旁组织标本和 9 例肝外伤患者的正常肝组织标本, 采用免疫组织化学染色和 Western blot 法检测 ECM1 的表达, 分析 ECM1 表达与肝癌临床病理特征之间的关系。率的比较采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法, 均数比较采用 t 检验。结果 免疫组织化学染色显示 ECM1 主要表达在细胞质中。肝癌组织中 ECM1 阳性表达率为 73%, 显著高于癌旁组织的 20% 和正常肝组织的 22% ($\chi^2 = 34.286, 7.044, P < 0.05$)。ECM1 的表达水平与肝癌有无转移和 TNM 分期有关 ($\chi^2 = 5.455, 4.275, P < 0.05$), 而与患者性别、年龄、肿瘤大小、有无包膜、分化程度、血清 AFP 水平和 HBsAg 表达等无明显关系 ($\chi^2 = 2.841, 0.014, 0.000, 0.734, 0.075, 0.000, 0.031, P > 0.05$)。Western blot 检测结果显示肝癌组织中 ECM1 相对含量为 25.49 ± 4.61 , 显著高于癌旁组织的 3.00 ± 0.37 和正常肝组织的 2.94 ± 0.21 ($t = 31.962, 31.699, P < 0.05$)。结论 ECM1 在原发性肝癌组织中的表达高于癌旁和正常肝组织, 且与肝癌有无转移和 TNM 分期有关, 提示 ECM1 可能参与了肝癌的转移, 可能是肝癌转移的预测指标之一。

【关键词】 肝肿瘤; 细胞外基质蛋白-1; 转移

Expression and clinical significance of extracellular matrix protein 1 in primary liver cancer CHEN Hao, LI Jian-sheng, JIA Wei-dong, WANG Wei. Department of Hepatic Surgery, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China

Corresponding author: LI Jian-sheng, Email: Lijiansheng1953@163.com

【Abstract】 Objective To detect the expression of extracellular matrix protein 1 (ECM1) in primary liver cancer tissues, and explore its clinical significance in liver cancer metastasis. **Methods** Sixty cases of primary liver cancer tissues and adjacent tissues from 60 patients who were admitted to the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University from June 2008 to December 2009 were collected, and nine cases of normal liver tissues were collected from patients with liver trauma as control. The expression of ECM1 and the relationship between ECM1 and clinicopathological features of liver cancer were detected and analyzed using the immunohistochemistry and Western blot. All data were analyzed using the chi-square test, Fisher exact test and t test. **Results** ECM1 was mainly expressed in the cytoplasm of liver cells. The positive expression rate of ECM1 in liver cancer tissues was 73%, which was significantly higher than those in adjacent tissues (20%) and normal liver tissues (22%) ($\chi^2 = 34.286, 7.044, P < 0.05$). The expression of ECM1 was correlated with liver cancer metastasis and TNM stages ($\chi^2 = 5.455, 4.275, P < 0.05$), while not with sex, age, size, capsule and differentiation of the tumor, alpha fetoprotein level and the expression of hepatitis B surface antigen ($\chi^2 = 2.841, 0.014, 0.000, 0.734, 0.075, 0.000, 0.031, P > 0.05$). The result of Western blot indicated that the relative content of ECM1 in the liver cancer tissues was 25.49 ± 4.61 , which was significantly higher than those in adjacent tissues (3.00 ± 0.37) and normal liver tissues (2.94 ± 0.21) ($t = 31.962, 31.699, P < 0.05$). **Conclusions** The expression of ECM1 in liver cancer tissues is higher than those in adjacent and normal liver tissues, and ECM1 expression is correlated with metastasis of liver cancer and TNM stages, which indicate that ECM1 may play a role in the metastasis of liver cancer, and it could be used as an indicator for liver cancer metastasis.

【Key words】 Liver neoplasms; Extracellular matrix protein 1; Metastasis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.06.015

基金项目: 国家自然科学基金(30972892); 安徽省高等学校省级自然科学研究项目(KJ2010B386); 安徽省自然科学基金(070413073); 安徽省优秀青年科技基金(08040106818); 安徽省“115”产业创新团队项目

作者单位: 230001 合肥, 安徽医科大学附属省立医院肝脏外科

通信作者: 李建生, Email: lijiansheng1953@163.com

细胞外基质蛋白-1 (extracellular matrix protein 1, ECM1) 是在鼠成骨基质细胞系 MN7 中分离出来的一种分泌性糖蛋白, 参与细胞增生、血管生成、胚胎软骨形成、皮肤分化和肿瘤发生等多种生物学过程^[1]。ECM1 在多种恶性上皮肿瘤中高表达, 并能促进肿瘤的转移^[2]。本研究采用免疫组织化学染色和 Western blot 法检测 2008 年 6 月至 2009 年 12 月我科手术切除的 60 例原发性肝癌患者的癌组织及癌旁组织标本和 9 例肝外伤患者的正常肝组织标本中 ECM1 的表达情况, 旨在探讨 ECM1 在原发性肝癌转移中的临床意义。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

本组肝癌患者 60 例, 男 45 例, 女 15 例; 年龄 26 ~ 76 岁, 中位年龄 53 岁。所有患者术前未行介入、化疗等辅助治疗, 并经组织病理学检查确诊。术后立即取 60 例患者的肝癌组织和癌旁 (距肿瘤 2 cm) 组织保存于液氮中备用, 另取部分肝癌组织和癌旁组织经 4% 甲醛固定, 常规石蜡包埋。取 9 例因外伤行肝部分切除患者的正常肝组织作为对照。

1.2 主要试剂

兔抗人 ECM1 多克隆抗体购自美国 Proteintech 生物科技有限公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗和 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, β -肌动蛋白抗体和 ECL 显色试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究 所。

1.3 免疫组织化学染色检测

常规行石蜡切片, 厚 3 μ m。按试剂说明书行 SP 法染色。光镜下观察、拍照。细胞质中出现明显棕黄色颗粒者为阳性细胞。随机选取 10 个高倍 ($\times 400$) 视野, 每个视野计数 100 个细胞, 共计 1000 个细胞。统计 ECM1 阳性表达水平。将阳性染色细胞数 < 10% 定义为阴性, 10% ~ 30% 定义为弱阳性, 31% ~ 60% 定义为阳性, 61% ~ 100% 定义为强阳性。由 3 位病理科医生共同确认, 取均值。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 Western blot 检测

制备蛋白标本, BCA 法检测蛋白浓度, 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min。取 50 μ g 样品上样检测, 10% SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白后, 半干式电转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, ECM1 抗

体室温孵育 1 h, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗室温孵育 1 h。室温下将 PVDF 膜放入 ECL 发光剂中孵育 1 min 后, 在暗室中 X 线片曝光 10 s 显影、定影。结果拍照、扫描。采用 Bio-Red Quantity-One 软件分析条带灰度值, 计算 ECM1 相对含量。ECM1 相对含量 = ECM1 灰度值/ β -肌动蛋白灰度值 \times 100%。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 率的比较采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法, 均数比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝癌和癌旁及正常肝组织中 ECM1 的表达

免疫组织化学染色检测结果显示, 肝癌组织中 ECM1 阳性表达率显著高于癌旁组织和正常肝组织 ($\chi^2 = 34.286, 7.044, P < 0.05$)。但癌旁组织与正常肝组织比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.023, P > 0.05$)。见表 1。ECM1 主要表达在细胞质中 (图 1)。

表 1 肝癌和癌旁及正常肝组织中 ECM1 的表达情况 (例)

组织	例数	ECM1 表达情况		阳性率 (%)
		阴性	阳性	
肝癌组织	60	16	44	73
癌旁组织	60	48	12	20
正常肝组织	9	7	2	22

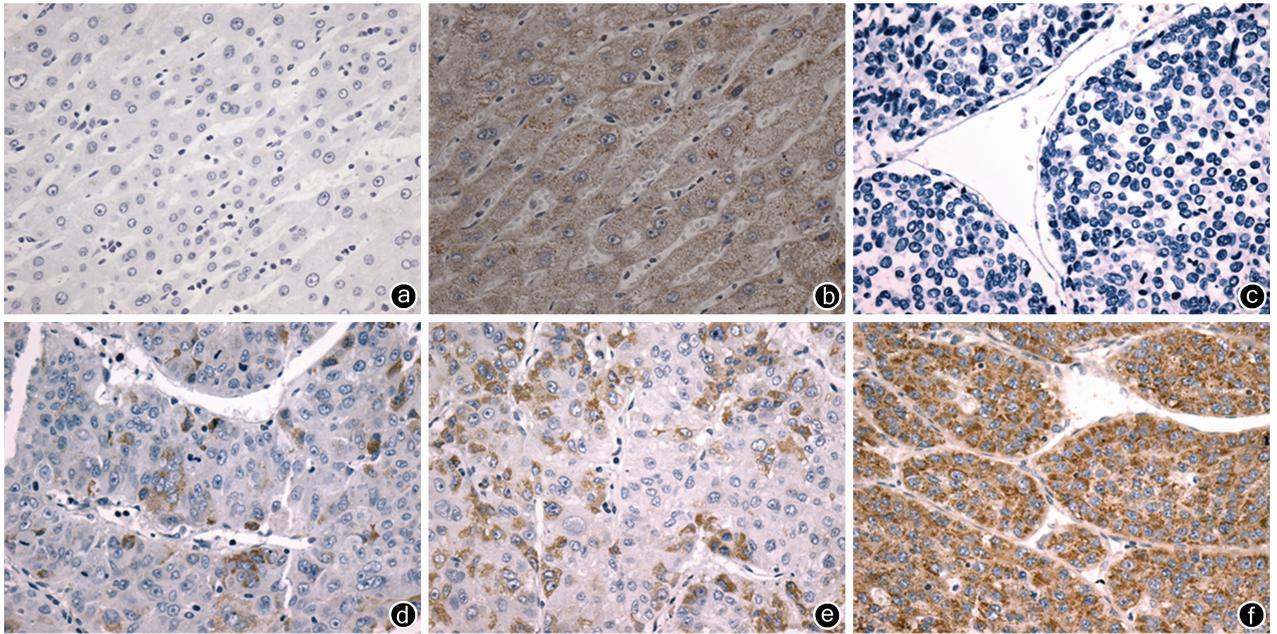
注: ECM1: 细胞外基质蛋白-1

2.2 肝癌组织中 ECM1 的表达与临床病理因素间的关系

肝癌患者发生淋巴结、膈肌、肾上腺等转移的组织中 ECM1 阳性表达率显著高于无转移者。TNM III、IV 期患者 ECM1 阳性表达率显著高于 TNM I、II 期患者。ECM1 阳性表达率与患者性别、年龄、肿瘤大小、有无包膜、分化程度、血清 AFP 水平及 HBsAg 表达无明显关系。见表 2。

2.3 肝癌和癌旁及正常肝组织中 ECM1 的相对含量

Western blot 检测结果显示, 肝癌、癌旁和正常肝组织中 ECM1 的相对含量分别为 25.49 \pm 4.61、3.00 \pm 0.37 和 2.94 \pm 0.21。癌旁和正常肝组织中 ECM1 的相对含量显著少于肝癌组织, 差异有统计学意义 ($t = 31.962, 31.699, P < 0.05$)。癌旁组织和正常肝组织中 ECM1 的相对含量比较, 差异无统计学意义 ($t = -0.221, P > 0.05$)。见图 2, 3。



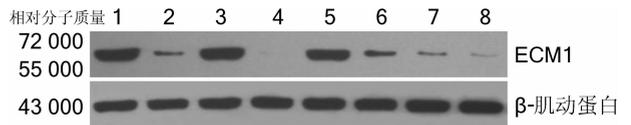
a: 癌旁组织中 ECM1 呈阴性表达; b: 癌旁组织中 ECM1 呈强阳性表达; c: 肝癌组织中 ECM1 呈阴性表达; d: 肝癌组织中 ECM1 呈弱阳性表达; e: 肝癌组织中 ECM1 呈阳性表达; f: 肝癌组织中 ECM1 呈强阳性表达; ECM1: 细胞外基质蛋白-1

图 1 肝癌和癌旁组织中 ECM1 的表达情况 免疫组织化学染色 ×400

表 2 肝癌组织中 ECM1 的表达与临床病理因素间的关系(例)

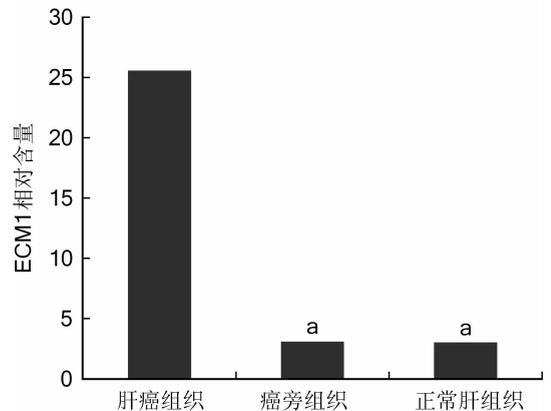
临床病理因素	例数	ECM1 表达情况		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
性别					
男	45	9	36	2.841	>0.05
女	15	7	8		
年龄(岁)					
≤50	27	7	20	0.014	>0.05
>50	33	9	24		
肿瘤大小(cm)					
≤5	17	4	13	0.000	>0.05
>5	43	12	31		
肿瘤包膜					
无	21	7	14	0.734	>0.05
有	39	9	30		
分化程度(Edmondson 分级)					
I ~ II 级	28	7	21	0.075	>0.05
III ~ IV 级	32	9	23		
AFP(μg/L)					
≤400	17	4	13	0.000	>0.05
>400	43	12	31		
HBsAg					
阳性	55	14	41	0.031	>0.05
阴性	5	2	3		
TNM 分期					
I ~ II 期	28	11	17	4.275	<0.05
III ~ IV 期	32	5	27		
转移					
无	30	12	18	5.455	<0.05
有	30	4	26		

注: ECM1: 细胞外基质蛋白-1



1, 3, 5: 肝癌组织; 2, 4, 6: 癌旁组织; 7, 8: 正常肝组织; ECM1: 细胞外基质蛋白-1

图 2 肝癌和癌旁及正常肝组织中 ECM1 的表达情况



注: ^a与肝癌组织比较, P < 0.05; ECM1: 细胞外基质蛋白-1

图 3 肝癌和癌旁及正常肝组织中 ECM1 的相对含量

3 讨论

人 ECM1 基因定位在 1q21 邻近表皮分化复合体区, 由 10 个外显子构成, 序列全长 1838 bp, 79.6% 与鼠同源。

最近有研究发现, ECM1 在乳腺、喉、甲状腺等多种上皮来源恶性肿瘤组织中的表达水平显著高

于良性肿瘤组织,且发生转移的恶性肿瘤组织表达高于未发生转移的肿瘤组织^[1,3-6]。鉴于临床上肝癌易发生侵袭转移的特点,针对 ECM1 在肝癌中的研究则显得尤为重要。侯彦强等^[7]通过免疫组织化学染色法研究 ECM1 在多种肿瘤中的表达时发现,肝癌中 ECM1 的表达水平高于正常肝组织,但并未对其转移的特性展开深入研究。我们通过免疫组织化学染色和 Western blot 法检测原发性肝癌组织、癌旁组织及正常肝组织中 ECM1 的表达水平,发现 ECM1 在肝癌组织中阳性表达率显著高于癌旁和正常肝组织,且 ECM1 的表达水平与肝癌有无转移及 TNM 分期相关,而与患者性别、年龄、肿瘤大小、有无包膜、分化程度、血清 AFP 水平和 HBsAg 表达等无明显关系。癌旁和正常肝组织中 ECM1 的相对含量显著少于肝癌组织。由此可认为,ECM1 在原发性肝癌组织中高表达,可能与肿瘤的转移有关。

目前,对 ECM1 促使肿瘤转移的可能机制有以下几种假设:(1) ECM1 通过介导细胞与细胞外基质的黏附活动,促使肿瘤转移^[3]。(2) ECM1 能够刺激血管内皮细胞的迁移,促使新生血管的形成,而转移癌的形成与新生血管密切相关^[8]。肝癌是富血管肿瘤,我们推测 ECM1 可能通过刺激血管内皮细胞的迁移,促进血管的生成,从而促进肝癌的发生和转移,此途径也可能是肝癌发生和转移众多环节

中的一部分。其具体的相关机制暂未明确,尚在进一步的深入研究之中。

参考文献

[1] Sercu S, Zhang M, Oyama N, et al. Interaction of extracellular matrix protein 1 with extracellular matrix components; ECM1 is a basement membrane protein of the skin. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(6):1397-1408.

[2] Wang L, Yu J, Ni J, et al. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors. *Cancer Lett*, 2003, 200(1):57-67.

[3] Sercu S, Zhang L, Merregaert J. The extracellular matrix protein 1: its molecular interaction and implication in tumor progression. *Cancer Invest*, 2008, 26(4):375-384.

[4] Lal G, Hashimi S, Smith BJ, et al. Extracellular matrix 1 (ECM1) expression is a novel prognostic marker for poor long-term survival in breast cancer: a Hospital-based Cohort Study in Iowa. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(8):2280-2287.

[5] Han Z, Lin GJ, Chi FL, et al. The relationship between the extracellular matrix and the angiogenesis and metastasis of laryngeal carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2008, 70(6):352-358.

[6] Kebebew E, Peng M, Reiff E, et al. ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy. *Ann Surg*, 2005, 242(3):353-363.

[7] 侯彦强,范列英,屠小卿,等.细胞外基质蛋白 1 在肿瘤中的表达及意义. *第二军医大学学报*, 2004, 25(12):1314-1316.

[8] Han Z, Ni J, Smits P, et al. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. *FASEB J*, 2001, 15(6):988-994.

(收稿日期: 2010-07-26)

(本文编辑: 张昊)

2011 北京协和医院肝胆胰脾研讨班通知

由北京协和医院基本外科与中华医学会继续教育委员会联合举办的“2011 北京协和医院肝胆胰脾研讨班”拟于 2011 年 5 月 19 日至 22 日在北京协和医院召开。研讨班拟采用手术现场演示、学术讲座和专题讨论相结合的形式进行,会议将邀请知名专家就目前肝胆胰脾疾病的热点和难点进行手术演示和学术探讨。

本次研讨班为国家卫生部医学继续教育项目,与会代表可获得由中华医学会授予的 I 类学分 10 分。会务费 500 元,会议代表自行安排食宿。诚挚邀请全国各地的普通外科医师参加本次研讨班,我们将为报名代表准备免费资料和会议午餐,未报名者恕不提供。报名信请寄往:北京市东城区帅府园 1 号北京协和医院基本外科实验室,邮编 100730,收件人舒红;网上报名及投稿电子邮件:pancreaspunch@yahoo.cn;联系电话:010-65296007。

北京协和医院基本外科
中华医学会继续教育委员会