

肝癌患者高表达神经细胞黏附分子 L1 预后差

杨少芬¹, 池秀芳²

(1. 广州医科大学卫生职业技术学院基础医学部病理教研室, 广州 510925;

2 广东省妇幼保健院新生儿科, 广州 510010)

[摘要] **目的** 神经细胞黏附分子 L1(L1CAM)在肝癌中的表达及其与临床预后的关系。**方法** 对 110 例肝癌样本用 Western blot 及 qRT-PCR 方法检测 L1CAM 蛋白和 mRNA 的表达,分析了 L1CAM 表达与肝癌患者总体生存率的关系。**结果** 肝癌组织 L1CAM 蛋白、mRNA 表达水平显著高于对应非肿瘤组织($P < 0.01$);在中-低分化肝癌患者 L1CAM 表达量高于高分化肝癌患者($P < 0.01$);L1CAM mRNA 的表达与肿瘤的分化程度、TNM 分期密切相关($P < 0.05$);采用 Kaplan-Meier 法生存分析,高表达 L1CAM 患者预后差($P < 0.01$)。**结论** L1CAM 与肝癌的发生、发展具有相关性,或许可作为评估肝癌患者预后的指标之一。

[关键词] 癌,肝细胞;神经细胞黏附分子 L1;预后**[中图分类号]** R365**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)22-3055-03

High level of L1CAM predicting poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients

Yang Shaofen¹, Chi Xiufang²

(1. Vocational College of Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510925, China;

2. Department of Neonatology, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical significance and prognostic value of PKD3 expression in human hepatocellular carcinoma (HCC) after hepatectomy. **Methods** We analyzed mRNA expression of L1CAM in 110 HCCs by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and western blot, and the relationship among the overall survival of HCCs. **Results** The relative protein and mRNA expression level of L1CAM was up-regulated in HCCs comparing with adjacent non tumor liver tissues ($P < 0.01$). L1CAM expression in the well-differentiated group was higher than that in the poor-differentiated group ($P < 0.01$). The expression of L1CAM mRNA was significantly correlated with tumor differentiation and TNM stage ($P < 0.05$). The prognosis of patients with high expression L1CAM was poor ($P < 0.01$). **Conclusion** L1CAM expression is related to occurrence and development of HCCs and may predict the prognosis of HCCs after hepatectomy.

[Key words] carcinoma, hepatocellular; neural cell adhesion molecule L1; prognosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,每年新发病例高达 748 300 例^[1-2],由于肝癌极易发生转移、复发,导致其病死率一直高居不下^[3],因此,找到一种能够预测肝癌术后复发、转移的生物学标记物是非常有必要的。神经细胞黏附分子 L1(L1CAM)为免疫球蛋白超家族成员之一,近年研究表明,L1CAM 在肿瘤的演变过程中起着重要作用,已发现其在神经胶质瘤^[4]、卵巢癌^[5]、胰腺癌^[6]等不同类型肿瘤中均有表达。为了研究 L1CAM 与肝癌患者预后的关系,采用定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)及蛋白免疫印迹试验(Western blot)方法分析肝癌及配对癌旁组织 L1CAM 的表达,探讨其与肝癌患者预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取南方医科大学附属南方医院肝癌手术切除标本 110 例,其中男 95 例,女 15 例,年龄 31~78 岁,中位年龄为 47 岁。标本经手术切除离体时,尽快选取组织,每块组织大约 0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm,肝癌组织取自癌灶,术后病理诊断均为肝细胞癌;相对正常的肝组织取自切除肝脏中肿瘤病灶的远端切缘(经术后病理证实无癌组织浸润)。所有患者均有完整的临床资料及随访信息,所有病例术前均未行放疗、化疗等辅助治疗。本课题所有病例术前均已签署科研知情同意书。肝细胞癌的诊断和组织学分类是根据 2000 年世界卫生组织

提出的肿瘤分级标准进行。依据肿瘤分化程度将 110 例肝癌患者分为高分化组及中-低分化组;以 110 例肝癌组织中 L1CAM mRNA 相对表达量的中位数为临界值,将所有患者分为 L1CAM 高表达组和 L1CAM 低表达组。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 5 例肝癌及对应癌旁组织样品经 RIPA 裂解提取总蛋白,采用蛋白质定量试剂盒(BCA 法)进行蛋白定量,每种样品各取 40 μg 上样,经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后将凝胶上蛋白电转至聚偏氟乙烯膜(PVDF 膜)上,采用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗 4℃孵育过夜,TBST 洗涤后加入相应二抗室温孵育 1 h, TBST 充分洗涤后采用 ECL 化学发光法观察结果。

1.2.2 qRT-PCR 所有标本总 RNA 提取采用 Trizol(Invitrogen 公司)裂解,所有操作步骤严格按照说明书进行,所得 RNA 采用 qRT-PCR 试剂盒(TAKARA 公司)根据说明书进行反转录获得 cDNA。L1CAM 基因上、下游引物(上海生物工程公司)序列分别为:5'-ACG AGG GAT GGT GTC CAC TTC AAA-3';5'-TTA TTG CTG GCA AAG CAG CGG TAG-3'。

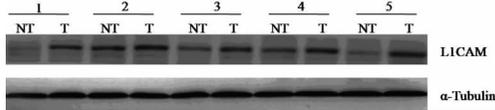
1.2.3 检测指标 L1CAM 在肝癌组织标本的表达;L1CAM mRNA 在肝癌中的表达与临床病理特征的关系;肝癌患者 L1CAM 表达量与预后关系。患者总生存率及术后生存时间

的计算为手术日期至患者死亡日期或最后随访日期。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计分析。计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,生存函数采用 Kaplan-Meier 法并进行 Log-rank 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 L1CAM 在肝癌组织标本的表达 Western blot 显示 L1CAM 在肝癌组织中的表达水平高于癌旁组织,见图 1; qRT-PCR 显示 L1CAM mRNA 在肝癌组织的中位表达水平为 2.71,其在对应癌旁组织的中位表达水平为 1.49,在肝癌组织中的表达水平显著高于对应癌旁组织 ($P < 0.01$),见图 2。L1CAM mRNA 表达量在中-低分化组明显高于在高分化组(中位表达量:3.38 vs. 2.14, $P < 0.01$),见图 3。



NT:癌旁组织;T:肝癌组织。

图 1 L1CAM 蛋白在肝癌及对应癌旁组织的表达

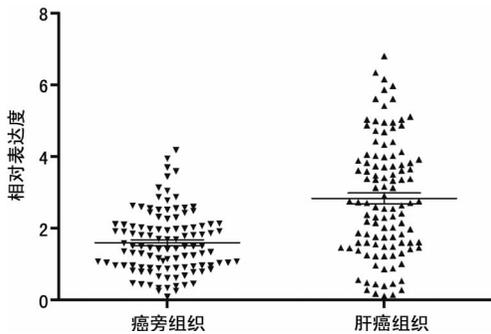


图 2 L1CAM 基因在肝癌及对应癌旁组织的 mRNA 表达

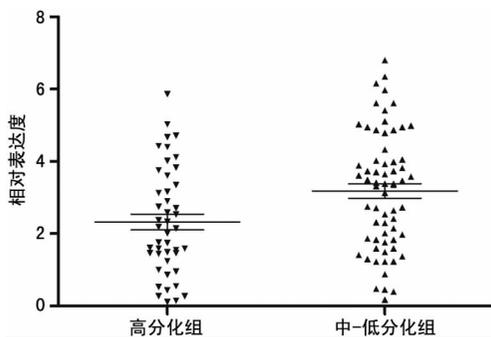


图 3 L1CAM 基因在不同分化程度肝癌组织的表达

2.2 L1CAM mRNA 在肝癌中的表达与临床病理特征的关系 L1CAM 的表达与肿瘤的分化程度、TNM 分期密切相关 ($P < 0.05$);与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤数目、血清 AFP 水平、HBsAg、肝硬化未见明显相关性 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 L1CAM mRNA 的表达与临床病理特征的关系 (n)

临床病理特征	n	L1CAM 低表达 ($n=55$)	L1CAM 高表达 ($n=55$)	P
性别				>0.05
男	95	45	50	
女	15	10	5	
年龄				>0.05
≥ 50	48	26	22	

续表 1 L1CAM mRNA 的表达与临床病理特征的关系 (n)

临床病理特征	n	L1CAM 低表达 ($n=55$)	L1CAM 高表达 ($n=55$)	P
< 50	62	29	33	
肿瘤大小				>0.05
≤ 5 cm	28	17	11	
> 5 cm	82	38	44	
肿瘤数目				>0.05
单个	82	43	39	
多个	28	12	16	
分化程度				<0.05
高分化	42	29	13	
中-低分化	68	26	42	
甲胎蛋白(AFP)				>0.05
≤ 400 ng/mL	47	28	19	
> 400 ng/mL	63	27	36	
乙肝表面抗原(HBsAg)				>0.05
阴性	13	8	5	
阳性	97	47	50	
肝硬化				>0.05
否	33	20	13	
是	77	35	42	
TNM 分期				<0.05
I~II	73	43	30	
III~IV	37	12	25	

2.3 肝癌高表达 L1CAM 预后差 Kaplan-Meier 生存分析曲线结果显示,L1CAM 低表达组的第 1、3 年生存率及生存时间显著高于 L1CAM 高表达组 ($P < 0.01$),见图 4。

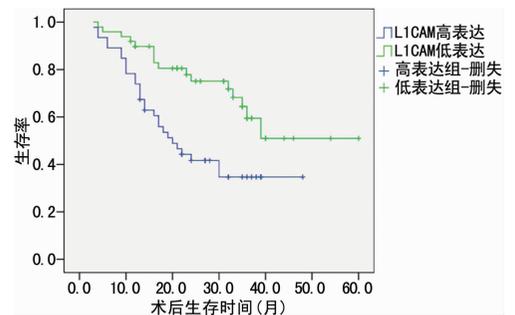


图 4 L1CAM 表达与肝细胞癌预后

3 讨论

肝细胞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,由于其极易发生肝内转移、复发,导致患者术后 5 年生存率一直居高不下^[7-8]。目前尚无有效预测肝癌术后复发、转移的指标,因此,寻找一种有效预测临床预后的分子标记物具有重大的社会价值。

L1CAM 也称之为 CD171,分子量大小在 $200 \times 10^3 \sim 220 \times 10^3$,是一种细胞黏附受体,为免疫球蛋白超家族中的一员,包含有 6 个免疫球蛋白样的区域及 5 个纤维连接蛋白 3 型区域^[9]。近年有学者研究表明,L1CAM 可以使乳腺癌肿瘤细胞凋亡减少并促进细胞运动,该作用机制可能是激活了 β -catenin 的转录活性,导致细胞间的黏附减弱,而更具侵袭性^[10]; Gavert 等^[11] 通过研究 L1CAM 与大肠癌的关系后认为,L1CAM 可以活化核转录因子 kappa B(NF- κ B),该信号通路与

肿瘤的侵袭、转移关系密切, NF- κ B 的激活又进一步加强了 L1CAM 对肿瘤的侵袭、转移作用; Weidle 等^[12]发现 L1CAM 可作为鉴别良、恶性黑色素细胞的鉴别标志物; Zechini 等^[5]研究卵巢癌与 L1CAM 关系后发现, 其可作为卵巢癌预后的生物标志物, 高表达 L1CAM 患者预后差; 但其在肝癌中起到何种作用的相关报道甚少。

本研究表明 L1CAM 在肝癌组织中表达增高, 其表达量与肿瘤的分化程度、TNM 分期密切相关, L1CAM 表达水平与肝癌患者总体生存率及术后存活时间呈负相关。本研究结果与近年对 L1CAM 在其他肿瘤提示其为癌基因的结论相符^[13-14], 但其与肝癌发生、发展的相关分子学机制还有待进一步阐明。

参考文献

[1] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(12): 1118-1127.

[2] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 1999, 49(1): 33-64.

[3] European Association for Study of Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(5): 599-641.

[4] Tsuzuki T, Izumoto S, Ohnishi T, et al. Neural cell adhesion molecule L1 in gliomas; correlation with TGF-beta and p53 [J]. *J Clin Pathol*, 1998, 51(1): 13-17.

[5] Zechini S, Bianchi M, Colombo N, et al. The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 1110-1118.

[6] Bergmann F, Wandschneider F, Sipos BA, et al. Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma

[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(4): 909-915.

[7] Lim KC, Chow P, Allen JC, et al. Systematic review of outcomes of liver resection for early hepatocellular carcinoma within the Milan criteria [J]. *Br J Surg*, 2012, 99(12): 1622-1629.

[8] Takayama T. Surgical treatment for hepatocellular carcinoma [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2011, 41(4): 447-454.

[9] Kiefel H, Bondong S, Hazin J, et al. L1CAM A major driver for tumor cell invasion and motility [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6(4): 374-384.

[10] Shtutman M, Levina E, Ohouo P, et al. Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(23): 11370-11380.

[11] Gavert N, Ben-Shmuel A, Lemmon V, et al. Nuclear factor-kappaB signaling and ezrin are essential for L1-mediated metastasis of colon cancer cells [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 12): 2135-2143.

[12] Weidle UH, Eggle D, Klostermann S. L1-CAM as a target for treatment of cancer with monoclonal antibodies [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(12): 4919-4931.

[13] Min JK, Kim JM, Li SJ, et al. L1 cell adhesion molecule is a novel therapeutic target in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(14): 3571-3580.

[14] Tischler V, Pfeifer M, Hausladen S, et al. L1CAM protein expression is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 127.

(收稿日期: 2015-02-08 修回日期: 2015-07-10)

(上接第 3054 页)

[5] Duma A, Helsten D, Brown F, et al. The effect of nitrous oxide anesthesia on early postoperative opioid consumption and pain [J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2014, 39(1): 31-36.

[6] Ihmsen H, Dexmedetomidine ST. Pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. *Anaesthesist*, 2012, 61(12): 1059-1066.

[7] 邓锋, 郁葱. “舒适化口腔医疗”理念与规范化管理 [J]. *重庆医学*, 2012, 41(26): 2681-2682.

[8] Huupponen E, Maksimow A, Lapinlampi P, et al. Electroencephalogram spindle activity during dexmedetomidine sedation and physiological sleep [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2008, 52(2): 289-294.

[9] Linares Segovia B, Garcia Cuevas MA, Ramirez Casillas IL, et al. Pre-anesthetic medication with intranasal dexmedetomidine and oral midazolam as an anxiolytic. A clinical trial [J]. *An Pediatr (Barc)*, 2014, 81(4): 226-231.

[10] Wilson KE. Overview of paediatric dental sedation: ni-

trous oxide/Oxygen inhalation sedation [J]. *Dent Update*, 2013, 40(10): 822-824.

[11] 张国良, 薛振猷, 徐礼鲜, 等. 高血压患者笑气吸入拔牙临床研究 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2002, 37(5): 359-360.

[12] Nooh N, Sheta SA, Abdullah WA, et al. Intranasal atomized dexmedetomidine for sedation during third molar extraction [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 42(7): 857-862.

[13] Cheung CW, Ng K, Liu J, et al. Analgesic and sedative effects of intranasal dexmedetomidine in third molar surgery under local anaesthesia [J]. *Br J Anaesth*, 2011, 107(3): 430-437.

[14] Sa ST, Al-Sarheed M, Abdelhalim AA. Intranasal dexmedetomidine vs midazolam for premedication in children undergoing complete dental rehabilitation; a double-blinded randomized controlled trial [J]. *Paediatr Anaesth*, 2014, 24(2): 181-189.

(收稿日期: 2015-02-18 修回日期: 2015-07-11)