

# 乙酰肝素酶的表达与肝癌侵袭转移及预后的关系

王顺祥, 王士杰, 吴晓慧, 徐振辕

**Clinical Study on the Relationship between the Expression of Heparanase ( Hpa) and the Invasion, Metastasis and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma**

WANG Shun-xiang, WANG Shi-jie, WU Xiao-hui, XU Zhen-yuan

Department of Hepatobiliary Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

**Abstract: Objective** The main aim of this investigation were to explore the expression of heparanase mRNA and protein in hepatocellular carcinoma (HCC) and the relationship between the expression of Hpa and clinical pathological features of HCC. **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical staining were used to detect expression of the heparanase mRNA and protein in normal hepatic tissues, liver cancer cell line, tumor tissues and adjacent tissues of hepatocellular carcinoma. **Results** The expression of Hpa mRNA and protein in HCC tissues was significantly higher than that in adjacent tissue and normal hepatic tissues ( $P < 0.05$ ). It was correlated with capsular invasion, portal vein invasion, intrahepatic metastasis, TNM classification and recurrence of HCC ( $P < 0.05$ ). Hpa protein expression was related with Edmondson-Steiner's classification ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of the heparanase mRNA and protein related to the invasion, metastasis, recurrence and prognosis of hepatocellular carcinoma.

**Key words:** Hepatocellular carcinoma; Heparanase; Invasion; Metastasis; Recurrence

**摘要:**目的 探讨乙酰肝素酶(Heparanase Hpa)在肝癌中的表达及其与肝癌临床病理特征的关系。方法 分别采用 RT-PCR 和免疫组织化学法检测 Hpa mRNA 及 Hpa 蛋白在肝细胞肝癌、癌旁肝组织及肝癌细胞株中的表达。结果 肝癌 Hpa mRNA 的表达显著高于癌旁及正常肝组织 ( $P < 0.05$ ), 肝癌组织中 Hpa mRNA 的表达与肿瘤包膜受侵、门脉受侵、肝内转移、TNM 分期、复发有关 ( $P < 0.05$ )。肝癌 Hpa 蛋白的表达与包膜和门脉是否受侵、Edmondson 分级、有无肝内转移、TNM 分期及复发有关 ( $P < 0.05$ )。结论 Hpa mRNA 及蛋白在肝癌中高表达, 并与肝癌的侵袭转移、复发、预后有关。

**关键词:**肝细胞肝癌;乙酰肝素酶;侵袭;转移;复发

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)02-0080-03

## 0 引言

乙酰肝素酶(heparanase, Hpa)是1999年克隆分离出的一种葡糖苷酸内切酶<sup>[1]</sup>。它可以降解硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS),破坏细胞外基质和血管基底膜,并促进肿瘤新生血管生成,使肿瘤细胞实现侵袭转移。我们运用 RT-PCR 和免疫组织化学法对 Hpa mRNA 及 Hpa 蛋白在肝细胞肝癌、癌旁肝组织及肝癌细胞株中的表达进行了检测,探讨其与肝癌临床病理特征及预后的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

43例肝癌和癌旁标本来自我院2001年1月~2002年6月手术切除并经病理证实的肝细胞肝癌患者,癌旁组织为距肿瘤2cm处肝组织。另取手术治疗的良性疾病的正常肝组织10例作对照。标本切除离体后一份立即投入液氮中,置于-70℃冰箱保存备用,另一份用10%的福尔马林固定。病人随访2年以上,其中23例复发,1例死于其他疾病。本组病例男性36例,女性7例。年龄36~72岁,平均52.7岁;HBsAg阳性者37例。病理学分级根据Edmondson方法,分期按国际抗癌联盟于1997年提出的TNM分期方案。

### 1.2 主要试剂

Trizol试剂(美国Gibco BRL公司),DNTPs、AMV、TaqDNA聚合酶由华美公司提供,内参照及

收稿日期:2005-04-01;修回日期:2005-06-01  
基金项目:河北省卫生厅科研基金资助项目(04029)  
作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院肝胆外科  
作者简介:王顺祥(1965-),男,博士,教授,从事肝癌侵袭转移机制的研究

随机引物由上海生工生物工程公司合成。Hpa 兔抗人多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,SP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。人肝细胞癌细胞株 SMMC-7721 细胞、BEL-7402 细胞由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。

1.3 细胞培养方法

用 RPMI1640 培养基在含有 5% CO<sub>2</sub>、37 恒温培养箱中分别培养人肝细胞癌细胞株 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞,常规传代,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,离心 10min (1 000r/min),10mol/L PBS 洗细胞两次后,收集细胞用于提取总 RNA。

1.4 总 RNA 提取

参照 Trizol 试剂说明书提取组织及细胞总 RNA,然后在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,将凝胶移至紫外透射仪下,在 300nm 紫外光线照射下进行观察,验证 RNA 的完整性,并在紫外分光光度仪上测 260nm 和 280nm 两个波长的吸光度,进行 RNA 的定量。

1.5 半定量 RT-PCR 检测

Hpa 引物序列上游为 5'-TTCGATC-CCAA GAA GGAATCAAC-3',下游为 5'-GTA GTGAT-GCCATGTA ACTGAATC-3',其扩增片段长度为 585bp。以  $\beta$ -actin 作为内参照,其引物序列上游为 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGA GCTGCG-3'下游为 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3',其扩增片段长度为 838bp。Hpa 的反应条件为反转录 37 60min;预变性 94 5min;变性 94 1min;复性 57 1min;延伸 72 1min。进行 35 个循环后进一步延伸 72 5min。取 10 $\mu$ l 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后,通过凝胶扫描仪(美国 FOTODYNE 公司)进行 cDNA 电泳条带和光量子强度分析,将 Hpa 与  $\beta$ -actin 比值作为 Hpa 表达水平的参数。

1.6 免疫组织化学染色方法及结果判定

标本常规甲醛固定取材、脱水、石蜡包埋后做 4 $\mu$ m 连续切片,按 SP 免疫组织化学染色试剂盒染色步骤进行,Hpa 表达阳性为细胞浆染成棕黄色,在光镜下观察 5 个高倍视野,计算阳性细胞数,阳性细胞数 10% 为阴性表达,>10% 为阳性表达。

1.7 统计学处理

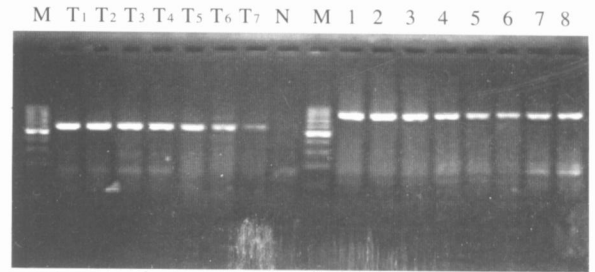
采用 *t* 检验及  $\chi^2$  检验,由 SPSS 10.0 软件进行处理。

2 结果

2.1 Hpa 在不同组织中的表达

43 例肝癌组织中有 26 例 (60.5%) Hpa mRNA 阳性表达,43 例癌旁组织中仅 2 例 (4.7%) 阳性表

达;免疫组织化学染色显示 25 例肝癌组织 Hpa 蛋白表达阳性,癌旁组织有 5 例表达阳性;10 例正常肝组织均未见表达;肝癌与癌旁、正常肝组织的 Hpa mRNA 及蛋白表达差异有显著性 ( $P < 0.05$ );人肝癌细胞株 SMMC-7721 及 BEL-7402 细胞 Hpa mRNA 及蛋白均呈阳性表达,见图 1~3。



T<sub>1</sub> ~ T<sub>2</sub>, SMMC-7721 cell; T<sub>3</sub> ~ T<sub>4</sub>, BEL-7402 cell; T<sub>5</sub> ~ T<sub>7</sub>, HCCS; N: adjacent tissues of HCC;  $\beta$ -actin expression: 1 ~ 8; M: Marker

图 1 Hpa mRNA 表达的 RT-PCR 结果

2.2 Hpa 表达与临床病理特征的关系 见表 1。

表 1 Hpa mRNA 和蛋白的表达与肝癌临床病理特征的关系

临床病理因素	例数	Hpa mRNA	<i>P</i>	Hpa 蛋白	<i>P</i>
肿瘤大小					
5cm	13	0.452 $\pm$ 0.135		8	
>5cm	30	0.517 $\pm$ 0.099	0.125	17	0.10
包膜受侵					
有	19	0.541 $\pm$ 0.096		15	
无	24	0.435 $\pm$ 0.101	0.017	10	0.010
门脉受侵					
有	13	0.594 $\pm$ 0.110		11	
无	30	0.463 $\pm$ 0.094	0.002	14	0.022
肝内转移					
有	14	0.595 $\pm$ 0.067		12	
无	29	0.453 $\pm$ 0.108	0.004	13	0.010
Edmondson 分级					
Ⅰ级	17	0.453 $\pm$ 0.108		5	
Ⅱ级	26	0.526 $\pm$ 0.109	0.069	20	0.012
TNM 分期					
Ⅰ期	13	0.453 $\pm$ 0.111		4	
Ⅱ期	30	0.533 $\pm$ 0.104	0.038	21	0.025

2.3 Hpa mRNA 表达与预后的关系

将本组病人分为两组,一组 Hpa 高表达 (Hpa mRNA 表达阳性,Hpa/actin 值  $\geq 0.5$ ),另一组为低表达 (Hpa mRNA 表达阴性,Hpa/actin 值  $< 0.5$ )。其中高表达组复发率 (73.9%) 显著高于低表达组 (30%) ( $P < 0.05$ )。Hpa mRNA 高表达组的平均无瘤生存时间 (15.88 月) 显著低于低表达组 (28.88 月,  $P < 0.05$ )。Hpa 阳性表达组的复发率显著高于阴性表达

组, Hpa 阳性表达组的无瘤生存时间(14.98月)显著低于阴性表达组(28.34月,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

在生理状态下, Hpa 主要分布在胎盘、脾脏、血小板以及中性粒细胞、单核细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞等免疫细胞内, 在肝脏、肾脏及胰腺等均不表达。研究发现 Hpa 在结肠癌、肝癌、卵巢癌、子宫内膜癌等<sup>[2,3]</sup>多种恶性肿瘤细胞中异常高表达, 而相应的正常组织不表达。本实验结果显示, 肝癌组织 Hpa mRNA 及 Hpa 蛋白的表达显著高于癌旁肝组织及正常肝组织( $P < 0.05$ ), 正常肝组织不表达, 与文献报道一致。EF Assal 等<sup>[4]</sup>运用 RT-PCR 研究显示 47% 的肝癌组织 Hpa mRNA 表达阳性, 癌旁组织不表达或微弱表达, 正常肝组织不表达。说明 Hpa 的表达可能与肝细胞的恶性转化及肿瘤的演进有关。

HS 是构成细胞外基质和基底膜的基本成分, 起着维持基质结构稳定, 限制细胞运动及粘附的作用, 其降解破坏了基质及基底膜的完整性; 同时, 使基质中储存的大量生长因子如碱性成纤维因子和血管内皮生长因子释放, 加速血管的形成。最终导致肿瘤的侵袭转移。Hulett 等<sup>[5]</sup>发现高转移的鼠腺癌细胞系表达高水平 Hpa mRNA, 而低转移细胞系仅有少量表达。Gohji 等<sup>[6]</sup>发现 Hpa 蛋白在肌层受侵、有淋巴结转移、临床分期高的膀胱癌组织表达显著升高, 显示其与膀胱癌的侵袭转移有关。Vlodavsky 等<sup>[7]</sup>研究也发现侵袭性乳腺癌比非侵袭组织有更高 Hpa 表达。本实验显示高侵袭性的人肝癌细胞株 SMMC-7721 及 BEL-7402 细胞 Hpa mRNA 及蛋白均呈阳性表达。在肝癌组织 Hpa mRNA 表达与包膜和门静脉有无受侵、有无肝内转移、TNM 分期有关( $P < 0.05$ ); Hpa 蛋白的表达与包膜和门脉是否受侵、Edmondson 分级、有无肝内转移及 TNM 分期有关( $P < 0.05$ , 见表 1); 两种实验方法结果基本一致。临床上肝癌包膜实际上是假包膜, 只是肿瘤边界的标志, 包膜受侵同门静脉受侵和肝内转移一样可以提示肿瘤的侵袭转移。因此, 我们认为 Hpa 的表达与肿瘤的侵袭转移有关, 是肿瘤侵袭转移的促进因素。人们常将肿瘤分化程度作为反映肿瘤生物学特性的客观指标, 但是本实验 Edmondson 分级与 Hpa mRNA 表达水平无关( $P = 0.069$ ), 免疫组织化学检测结果显示 Hpa 蛋白的表达与 Edmondson 分级有关, 有待于进一步的研究。另外, 本研究表明肿瘤大小与 Hpa 的表达无关。我们认为肿瘤大小只能反映肿瘤自身的生长情况, 与

肿瘤侵袭性并不一致, 不能预示肿瘤的复发与转移。但也有相反的报道, EF Assal 等<sup>[4]</sup>认为 Hpa 的表达与肿瘤的大小有关。

文献报道 Hpa 的表达还与恶性肿瘤的预后有关, Mikami 等<sup>[8]</sup>应用免疫组化技术研究 Hpa 蛋白在食管癌组织中的表达情况, 发现 Hpa 表达阳性的食管癌病人预后较差。Koliopanos 等<sup>[9]</sup>应用半定量 RT-PCR 及 Western 等方法研究发现 Hpa 高表达的病人术后存活时间显著短于低表达的病人。根据我们的随访资料, Hpa mRNA 高表达组术后 2 年的复发率为 73.9%, 显著高于低表达组的 30% ( $P < 0.05$ ), Hpa mRNA 高表达组的平均无瘤生存时间为 15.88 月, 显著短于 Hpa mRNA 低表达组的 28.88 月( $P < 0.05$ )。免疫组织化学检测结果也得出同样结论。说明 Hpa 高表达, 加大了肿瘤的侵袭、转移和复发的风险, 与文献报道一致。

总之, 本研究结果表明, Hpa mRNA 及蛋白的表达与肝癌的侵袭、转移、复发有关, 可以作为判断预后、预测复发及指导术后治疗的指标, 并有望成为肝癌治疗的新靶点。

(本文图 2、3 见第 136 页)

### 参考文献:

- [1] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis[J]. Nat Med, 1999, 5(7):793-802.
- [2] Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, et al. Expression of heparanase in normal, dysplastic and neoplastic human colon mucosa and stoma[J]. Am J Pathol, 2001, 157(4):1167-1175.
- [3] Gnath S, Menczer J, Friedmann Y, et al. Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer[J]. Int J Oncol, 2001, 18(6):1133-1144.
- [4] EF Assal ON, Yamanoi A, Ono T, et al. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(5):1299-1305.
- [5] Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, et al. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis[J]. Nat Med, 1999, 5(7):803-809.
- [6] 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.
- [7] Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, et al. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis[J]. Isr Med Assoc J, 2000, 2(Suppl):37-45.
- [8] Mikami S, Ohashi K, Usui Y, et al. Loss of syndecan-1 and increased expression of heparanase in invasive esophageal carcinomas[J]. Jpn Cancer Res, 2001, 92(10):1062-1073.
- [9] Alexander Koliopanos, Helmut Friess, Jrg Kleeff, et al. Heparanase Expression in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer[J]. Cancer Research, 2001, 61(12):4655-4659.

[编辑:周永红]

### 基因芯片在胰腺癌相关基因筛选中的初步研究

(正文见 86 页)

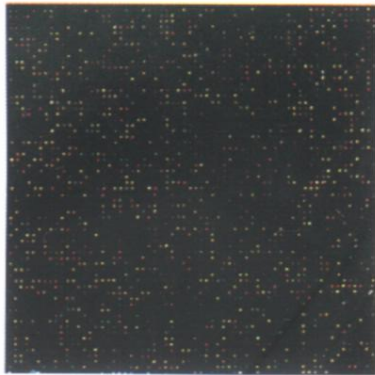


图1 不同组织标本双色荧光标记叠加图

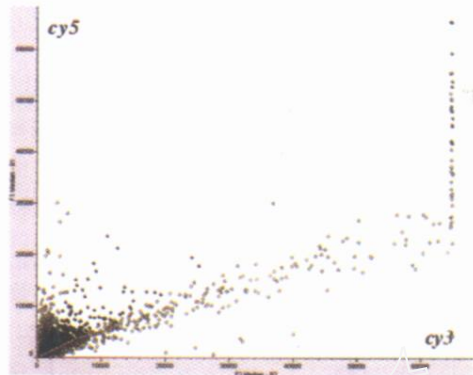


图2 不同组织标本杂交信号强度散点图

### 乙酰肝素酶的表达与肝癌侵袭转移及预后的关系

(正文见 80 页)

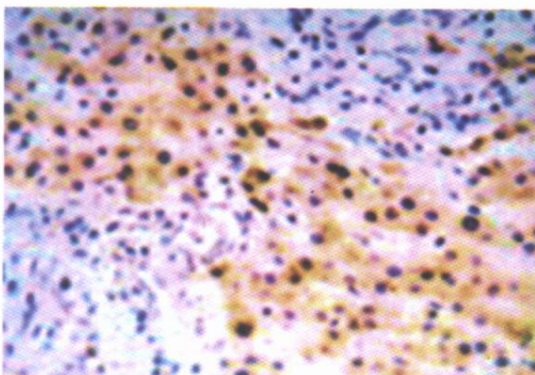


图2 Hpa蛋白右肝癌组织中的表达 (SP × 200)

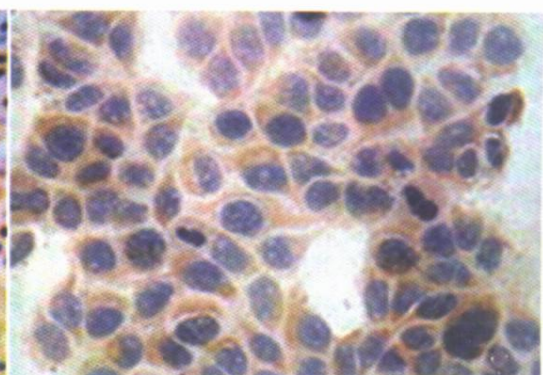


图3 Hpa蛋白右肝癌细胞株中的表达 (SP × 200)

### 维生素 E 琥珀酸酯对 MCF-7 乳腺癌细胞三苯氧胺敏感性的影响

(正文见 71 页)

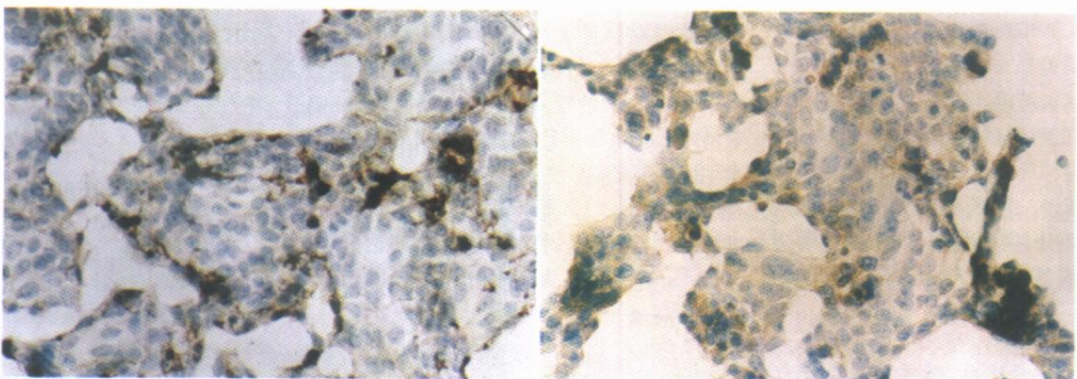


图3 VES 对乳腺癌细胞 c-erbB-2 表达的影响 (免疫组化 × 200)

1. 对照组 2. VES 10 μg/ml, 24h