

父系表达基因 10 蛋白在肝细胞癌组织中的表达及临床意义*

陈 锐¹, 解 新¹, 孙和国², 谭龙益², 黄 涛^{1△} (上海市第一人民医院宝山分院: 1. 医学检验科; 2. 病理科 200940)

【摘要】 目的 研究父系表达基因 10(PEG10)在肝细胞癌中的表达及其临床意义。方法 收集 2006 年 3 月至 2011 年 5 月 52 例肝细胞癌组织, 采用免疫组织化学法检测组织中 PEG10 表达, 分别以 31 例癌旁组织、10 例正常肝组织标本和 10 例胎盘组织作为对照。回顾 52 例肝细胞癌患者各项指标检测结果, 并分析各项指标与 PEG10 表达的关系。结果 PEG10 在肝细胞癌组织中阳性表达率为 90.38%(47/52), 显著高于癌旁正常组织[67.74%(21/31)]和正常肝组织(0), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。PEG10 表达的阳性程度与肝细胞的分化程度呈正相关($r = 0.441, P < 0.01$)。PEG10 表达在肿瘤大小、不同年龄和性别患者间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 PEG10 在肝细胞癌组织中表达的阳性程度与肿瘤分化程度有关, 对肝细胞癌的敏感性好, 但其特异性不强。

【关键词】 父系表达基因 10; 病理分级; 肝细胞癌

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.24.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)24-2951-03

Expression of PEG10 in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance* CHEN Kun¹, XIE Xin¹, SUN He-guo², TAN Long-yi², HUANG Tao^{1△} (1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Pathology, The Baoshan Branch of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200940, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of PEG10 as HCC cell marker in human hepatocellular carcinoma tissues and its clinical significance. **Methods** From March 2006 to May 2011, 52 paraffin samples of human hepatocellular carcinoma tissues were obtained, and the expression of PEG10 was examined by immunohistochemical staining. Another 31 normal tissues adjacent to human hepatocellular carcinoma and 10 normal liver tissues and 10 normal placenta tissues were served as controls. The clinicopathological data of 52 patients with hepatocellular carcinoma were retrospectively analyzed, and their relationship with the expression of PEG10 was analyzed. **Results** The positive expression rate of PEG10 in human hepatocellular carcinoma tissues was 90.38%(47/52), which was significantly higher than that in normal tissues adjacent to human hepatocellular carcinoma(67.74%, 21/31) and normal liver tissues(0)($P < 0.01$). The expression of PEG10 was positively correlated with the different differentiation of hepatocellular carcinoma($r = 0.441, P < 0.01$). There was no significant difference in the expression of PEG10 among patients with the different differentiation of tumor size age and gender($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of PEG10 is correlated with the pathology stage. The sensitivity of hepatocellular carcinoma is good, but its specificity is not strong.

【Key words】 PEG10; pathology stage; hepatocellular carcinoma

肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 约 70% 的肝细胞癌患者有复发和转移的可能^[1]。只有早期准确地检测肝细胞癌的转移复发, 才能有效降低复发率和转移率, 提高生存率。父系表达基因 10(PEG10)的表达可以灵敏地反映不同肝细胞癌转移细胞株之间的转移潜能^[2]。研究认为 PEG10 基因在肝细胞癌组织中的表达比甲胎蛋白(AFP)的表达更具有特异性^[3]。PEG10 基因是一个反转座子衍生来的父系表达的遗传印记基因, 它定位于人 7 号染色体长臂 2 号带 1 号位^[4]。Tsou 等^[5]和 Okabe 等^[6]研究发现, 在肝癌细胞和正常的肝再生细胞中 PEG10 有过量的表达, 通过细胞的转染证实 PEG10 具有促进恶性细胞生长的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 收集本院病理科 2006 年 3 月至 2011 年 5 月的肝细胞癌组织 52 例, 肝细胞癌中癌旁组织 31 例, 正常肝组织 10 例。

所收集的肝细胞癌标本均未在手术前化疗及放疗。(1)肝细胞癌组($n = 52$): 肝细胞癌手术切除标本。其中女 7 例, 男 45 例, 平均年龄 52.94 岁(18~76), 中位年龄 53.50 岁; 所有患者术前均未辅助放疗或化疗; 肿瘤分级参照 2000 年世界卫生组织病理组织分级, 其中高分化 13 例, 低分化 8 例, 中分化 31 例。(2)癌旁组织组($n = 31$): 52 例肝细胞癌手术切除标本中, 31 例含有癌旁组织。(3)正常肝组织组($n = 10$): 为创伤肝破裂手术切除标本, 均为男性, 年龄 18~33 岁。(4)阳性对照组($n = 10$): 胎盘蜕膜组织均来自本院妇产科。取材标本经甲醛固定、脱水、常规石蜡包埋, 制备 4 μ m 连续切片, 并经 HE 染色, 由病理科医生进行诊断和病理分级。

1.1.2 主要试剂 鼠源性 PEG10 单克隆抗体(Abcam), 按 1:600 稀释。ChenMate™ EnVisin 二步法抗兔/鼠免疫组织化学检测试剂盒(上海基因科技有限公司)。以胎盘蜕膜组织切片作阳性对照, 以磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。切片常

* 基金项目: 上海市宝山区科委基金资助项目(08-E-26)。△ 通讯作者, E-mail: tlhuangtao@yahoo.com。

规范蜡至水,3%过氧化氢处理 5 min,灭活内源性过氧化氢酶,微波修复抗原,加一抗 4 ℃ 湿盒中过夜,加二抗 37 ℃ 反应 30 min,以 (ChenMate™ EnVisin +/HRP, 兔/鼠) 室温孵育 30 min,加 DBA 显色,脱水、苏木素复染、封片后在光镜下观察。

1.2 方法

1.2.1 PEG10 检测 (1)采用免疫组织化学过氧化酶标记的二步法检测各组标本组织中 PEG10 的表达。严格参照试剂盒说明书进行操作。(2)阳性表达判断,PEG10 抗原阳性反应为位于细胞质内的棕黄色颗粒。每张切片随机选取 3~4 个高倍视野观察,计算阳性表达率。(3)阳性表达程度判定,按染色强度及阳性细胞数占肿瘤细胞总数的百分比综合计分。染色强度:无色(-)计为 0 分,淡黄色(+)为 1 分,棕黄色(++)为 2 分,棕褐色(+++)为 3 分;阳性细胞数:小于总数的 5%(-)计为 0 分,5%~25%(+)为 1 分,26%~50%(++)为 2 分,大于 50%(+++)为 3 分。染色强度得分与阳性细胞数得分相乘,0 分计为阴性(-),1~3 分计为弱阳性(+),4~5 分计为中度阳性(++),≥6 分计为强阳性(+++)[7]。

1.2.2 相关指标分析 (1)分析 PEG10 阳性表达与肝细胞癌临床病理分级的关系;(2)PEG10 表达与患者年龄、性别和肿瘤大小的关系。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据统计学处理。组间 PEG10 阳性表达率比较,以及各临床病理学指标与 PEG10 阳性表达程度的关系比较,采用 χ^2 检验和直线回归进行多因素分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 PEG10 阳性表达率免疫组织化学检测显示,肝细胞癌组、癌旁组织组、阳性对照组和正常肝组织组的 PEG10 阳性表达率分别为 90.38% (47/52)、67.74% (21/31)、100% (10/10)和 0(0/10)。肝细胞癌组 PEG10 阳性表达率显著高于癌旁组织组和正常肝组织组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 肝细胞癌组织 PEG10 阳性表达程度与肝细胞癌临床病理学指标的关系[n(%)]

组别	-	+	++	+++
性别				
男(n=45)	4(8.9)	10(22.2)	23(51.1)	8(17.8)
女(n=7)	1(14.3)	3(42.9)	2(28.6)	1(14.3)
年龄(岁)				
≤50(n=22)	1(4.5)	5(22.7)	12(54.5)	4(18.2)
>50(n=30)	4(13.3)	8(26.7)	13(43.3)	5(16.7)
病灶大小(cm)				
<5(n=41)	3(7.3)	11(26.8)	20(48.8)	7(17.1)
≥5(n=11)	2(18.2)	2(18.2)	5(45.5)	2(18.2)
病理分级				
I(n=13)	1(7.7)	0	6(46.2)	6(46.2)
II(n=31)	3(9.7)	8(28.5)	17(54.8)	3(9.7)
III(n=8)	1(12.5)	5(62.5)	2(25.0)	0

注:r=0.441, $P < 0.01$ 。-表示阴性;+表示阳性。

2.2 相关指标分析结果 PEG10 阳性表达程度与肝细胞癌的病理分级呈正相关($r = 0.441, P < 0.01$),见表 1;PEG10 阳

性表达程度在不同大小的肝细胞癌组织及不同年龄和性别患者之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 肝细胞癌组织 PEG10 蛋白表达与肝细胞癌临床病理特征的关系

组别	PEG10 表达		χ^2	P
	-	+		
性别				
男(n=45)	4(8.9)	41(91.1)	0.203	>0.05
女(n=7)	1(14.3)	6(85.7)		
年龄(岁)				
≤50(n=22)	1(4.5)	21(95.5)	1.128	>0.05
>50(n=30)	4(13.3)	26(86.7)		
病灶大小(cm)				
<5(n=41)	3(7.3)	38(92.7)	1.178	>0.05
≥5(n=11)	2(8.2)	9(81.8)		
组织类型				
肝细胞癌(n=52)	5(9.6)	47(90.4)	6.725	<0.01
癌旁组织(n=31)	10(32.3)	21(67.7)		

3 讨 论

PEG10 是 Ono 等[4]于 2001 年在肝细胞癌组织中发现的一个新的父系表达遗传印记基因。

PEG10 是能整合入人类基因组后具有印迹作用的逆转录转座子元件。它定位于人类 7 号染色体长臂 2 号带 1 号位(7q21.3),与 SGCE 基因紧密相连,其在小鼠中的同源基因也属于印记基因[3]。

PEG10 包括了两个开放阅读框 ORF1 和 ORF2。通过逆转录病毒 1 介导的核糖体移码机制翻译出 PEG10-RF1 和 PEG10-RF1/2 蛋白,分别由 325 和 402 个氨基酸组成[8]。有研究证实 c-MYC 和 PEG10 在肝细胞癌的发生、发展中存在协同作用,并且两者的表达与肿瘤的分期、分级、分化程度、浸润转移、门静脉有无癌栓、血清中甲胎蛋白(AFP)水平、是否合并乙型肝炎病毒(HBV)感染有关[9-10]。

Paul 等[11]通过 cDNA 文库研究证实 PEG10 具有促进细胞生长的活性。Okabe 等[12]研究证实,PEG10 在正常睾丸、卵巢及胎盘组织中有明显表达。肝细胞癌的发生也是多因素、多步骤的复杂过程,现认为肝细胞再生结节是恶性转化的早期阶段,再生结节可以进展为癌前病变结节,最终转化为肝细胞癌[13-14]。本研究 PEG10 蛋白在癌旁组织中的再生结节中表达符合以上研究,同时 PEG10 反映再生结节的进展对治疗和预后具有一定的意义。

PEG10 在人类个体生长发育过程中起着重要作用,其过度表达会引起正常细胞的恶变。PEG10 在肝细胞癌组织中过度表达可作为检测早期肝细胞癌的敏感性指标。肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一,约 70% 的肝细胞癌患者有复发和转移的可能。只有早期准确地检测肝细胞癌的转移复发,检查出外周血或淋巴转移灶,才能降低复发率和转移率,提高生存率[1]。而体积很小的肝细胞癌存在着浸润性生长、低分化和肝内转移等提示不良预后的生物学特征[15]。对于大细胞异型增生的癌前病变性质,早期高分化肝细胞癌与高级别异型增生结节的病理诊断和鉴别诊断标准意见仍不一致[15-16]。即使经验

丰富的病理学家也难把握,最常见的问题为诊断不足。本研究 PEG10 与肝细胞癌的分化程度呈正相关,在病理诊断分级中结合 PEG10 蛋白的表达可以避免主观判断的错误,对肝细胞癌患者后期的治疗具有一定的临床意义。

PEG10 的表达水平可以灵敏地反映 HepG2、M 肝细胞癌-97L、M 肝细胞癌-97H 转移细胞株之间的转移潜能差异,肝癌细胞的转移能力越强,PEG10 基因的表达水平越高,两者呈正相关关系^[2]。本研究发现,PEG10 在癌变肝细胞癌组织中的阳性表达率为 90.83% (47/52),大于正常组织 0 (0/10)。PEG10 表达的阳性程度与肝细胞癌组织的不同分化程度呈正相关。因此认为,PEG10 表达水平可作为肝细胞癌分化程度的病理学指标之一。而肝细胞癌及患者的年龄和性别与 PEG10 阳性表达程度无相关性。

目前,AFP 仍作为肝细胞癌的主要分子标记。AFP 阳性者结合临床表现对诊断肝细胞癌多无困难,国内外报道其阳性率在肝细胞癌组织中表达不高,较低的敏感性限制了它在临床的应用^[17]。而 AFP 阳性程度并不能反映肝细胞癌的分化程度,但是具有较好的特异性。本研究 PEG10 蛋白在肝细胞癌组织中的阳性率为 93.8%,说明其具有很好的敏感性。但其在其他肿瘤中也有表达,说明其特异性比较差。

综上所述,PEG10 在肿瘤的发生、发展中起调控作用,同时能反映肿瘤的侵袭性,其表达的 PEG10 蛋白可以反映肿瘤的分化程度及肿瘤的侵袭性,对肝细胞癌临床的分期和预后具有很好的临床意义。但是其敏感性高而特异性不高,所以不能独立使用。因此,PEG10 需要联合 AFP 对肝细胞癌作出综合评价,在肿瘤转移方面具有很好的临床应用前景。

参考文献

[1] 张洁,王之青. 外周血 GPC3 与 PEG10 mRNA 检测对肝细胞癌转移的诊断价值[J]. 上海交通大学学报,2010,30(2):208-212.

[2] 张琼,叶达伟,常莹,等. PEG10 基因在不同转移潜能肝癌细胞中表达的定量分析[J]. 华中科技大学学报:医学版,2006,35(6):758-760.

[3] 常莹,陶璐薇,陈孝平,等. 肝癌组织中遗传印记基因 PEG10 表达的特异性及其意义[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(12):1408-1411.

[4] Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H, et al. A retro-transposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21 [J]. Genomics, 2001, 73(2):232-237.

[5] Tsou AP, Chuang YC, Su JY, et al. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG1, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers [J]. Biomed Sci, 2003, 10(8):625-635.

[6] Okabe H, Satoh S, Kate T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression [J]. Cancer Res, 2001, 61(21):2129-2137.

[7] 邢传平,刘斌,董亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法 [J]. 中华病理学杂志,2001,30(4):318.

[8] Lux A, Beil C, Majety M, et al. Human retroviral gag- and gag-pol-like proteins interact with the transforming growth factor-β receptor activin receptor-like kinase 1 [J]. Biol Chem, 2004, 280(30):8482-8493.

[9] Li CM, Margolin AA, Salas M, et al. PEG10 is a c-MYC target gene in cancer cells [J]. Cancer Res, 2006, 66(2):665-672.

[10] 朱光辉,邬善敏,胡洪生,等. PEG10 和 c-MYC 基因在肝细胞肝癌中的表达及意义 [J]. 中华实验外科杂志,2006, 23(8):1017.

[11] Ip WK, Lai PB, Wong NL, et al. Identification of PEG10 as a progression related biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2006, 10(10):1012-1016.

[12] Okabe H, Satoh S, Furukawa Y, et al. Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinoma genesis through interaction with SIAH1 [J]. Cancer Res, 2003, 63(23):3043-3048.

[13] Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(9):674-687.

[14] Eisner HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7):2557-2576.

[15] Kojiro M. Focus on dysplastic nodules and early hepatocellular carcinoma an eastern point of view [J]. Liver Transpl, 2004, 10(Suppl 1):83-88.

[16] Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules semin [J]. Liver Dis, 2005, 25(2):133-142.

[17] 范公忍,邬光惠,胡大荣. 肿瘤特异性生长因子测定在肝癌诊断中的应用及与 AFP 比较 [J]. 癌症, 2001, 20(2):203.

(收稿日期:2011-10-04)

(上接第 2950 页)

[9] Lussana F, Zighett ML, Bucciarelli P, et al. Blood levels of homocysteine, folate, vitamin B6 and B12 in women using oral contraceptives compared to non-users [J]. Thromb

Res, 2003, 11 (2):37-41.

(收稿日期:2011-09-18)