

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.01.004

TYMS 蛋白在原发性肝癌中的表达及预后评估价值分析^{*}黄丽芳^{1,2}, 粟连秀², 吕自力^{1△}1. 广西医科大学第一附属医院病理科, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学
第八附属医院病理科, 广西贵港 537100

摘要:目的 探讨胸苷酸合成酶(TYMS)蛋白在原发性肝细胞癌(HCC)中的表达水平及其对临床预后的评估价值。方法 采用免疫组织化学染色法检测 100 例经病理学诊断为 HCC 患者癌组织及癌旁组织 TYMS 蛋白的表达情况, 并进行量化评分, 分析 TYMS 蛋白在不同临床病理特征患者中的表达情况, 以及 TYMS 蛋白表达水平与 HCC 患者生存率的关系。结果 TYMS 蛋白表达水平在不同性别、年龄、肿瘤最大径、甲胎蛋白水平、乙型肝炎病毒-DNA 水平等患者间比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 低分化者 TYMS 蛋白表达阳性率(83.87%)高于中-高分化者(62.32%), 差异有统计学意义($P<0.05$)。TYMS 蛋白在 HCC 癌组织的表达水平高于癌旁组织, 差异有统计学意义($P<0.01$)。3 年总生存期分析结果显示, TYMS 蛋白低表达者生存率(61.3%)明显高于高表达者(22.6%), 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 TYMS 蛋白在 HCC 癌组织中表达明显异常且与肿瘤组织分化程度、患者预后密切相关。抑制 TYMS 蛋白表达对 HCC 患者的治疗和预后具有重要意义。

关键词:原发性肝细胞癌; 胸苷酸合成酶; 生存分析

中图法分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)01-0014-04

Expression of TYMS protein in primary liver cancer and its prognostic evaluation value analysis^{*}HUANG Lifang^{1,2}, SU Lianxiu², LYU Zili^{1△}

1. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Pathology, Eighth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guigang, Guangxi 537100, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of thymidylate synthase (TYMS) protein in primary hepatocellular carcinoma (HCC) and its clinical prognostic evaluation value. **Methods** The immunohistochemistry staining was used to detect the expression of TYMS protein in liver cancer tissues and paracancerous tissues of 100 patients with pathologically diagnosed HCC and the quantitative scoring was performed; the expression situation of TYMS protein in tissues with different clinicopathological features patients and the relationship between TYMS protein expression level and survival rate of the patients with HCC were analyzed. **Results** There was no statistically significant difference in the expression level of TYMS protein among the patients with different genders, ages, tumor maximal diameter, AFP level, HBV-DNA level etc. ($P>0.05$), the positive rate of TYMS protein expression in the low differentiation patients was 83.87%, which was higher than 62.32% in the medium differentiation and high differentiation patients, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression level of TYMS protein in HCC cancer tissues was higher than that in paracancerous tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The 3-year overall survival analysis showed that the survival rate of the patients with TYMS protein low expression was 61.3%, which was significantly higher than 22.6% of the patients with TYMS protein high expression, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The TYMS protein expression is significantly abnormal in HCC cancer tissue and closely correlated to the differentiation degree of cancer and the prognosis of the patients. Inhibiting TYMS protein expression has an important significance for the treatment and prognosis of the patients with HCC.

Key words: primary hepatocellular carcinoma; thymidylate synthase; survival analysis

原发性肝细胞癌(HCC)是指发生于肝脏上皮组织的恶性肿瘤, 国际癌症研究机构 2018 年统计, 新增

^{*} 基金项目: 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20210848)。

作者简介: 黄丽芳, 女, 主管技师, 主要从事肝细胞癌致病机制的研究。△ 通信作者, E-mail: 15907817634@163.com。

癌症例数中,肝癌占比为 4.7%,成为仅次于乳腺癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌及胃癌的第六大肿瘤^[1]。根据病理细胞学起源,肝细胞癌、胆管癌和混合型肝细胞癌是肝癌最常见的 3 种类型,其中以 HCC 最为多见,占 70%~90%^[2]。胸苷酸合成酶(TYMS)是胸腺嘧啶脱氧核苷酸单磷酸从头合成途径的关键酶,可以催化尿嘧啶脱氧核糖核苷酸,是脱氧核糖核酸(DNA)合成和修复的重要物质。TYMS 蛋白在 DNA 复制和代谢旺盛部位表达显著增高。另外,有研究报道 TYMS 蛋白在肺鳞状细胞癌、乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌等多种癌症中均呈高表达^[3-6]。本研究旨在探讨 TYMS 蛋白在 HCC 癌组织中的表达水平及对 HCC 的预后评估价值,为 HCC 的靶向治疗和预测预后提供一定的理论依据和临床指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 1 月至 2020 年 10 月于广西医科大学第八附属医院就诊的 100 例 HCC 患者作为研究对象,所有患者均经组织病理检查确诊,每例标本中均含有癌组织和癌旁组织。对所有标本进行编号,随机标记为 1~100 号。研究对象中男 90 例,女 10 例;年龄 29~75 岁,平均(50.7±11.9)岁。所有患者术前均未接受放疗、化疗、靶向治疗和免疫治疗等相关抗肿瘤治疗,并排除 HCC 合并胆管细胞癌和其他肿瘤病史患者。病理诊断均由 2 位具有丰富阅片经验的病理医师分别进行阅片,收集的资料包括标本的病理号及患者的临床信息,如肿瘤最大径、甲胎蛋白(AFP)水平、乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 水平、病理类型等。本研究中所选取的临床病例标本均征得患者的知情同意并签字,并取得医院伦理委员会的批准(GYYXLL-20210618-08)。

1.2 方法 采用免疫组织化学染色法检测 HCC 癌组织和癌旁组织中 TYMS 蛋白的表达水平,采用的试剂为浓缩型兔抗人 TYMS 单克隆抗体(abcam 公司,ab108995),按试剂说明书进行操作:包埋、切片、烤片、脱蜡、热抗原修复(EDTA 修复法)、孵育抗体、显色、复染、盐酸乙醇进行分化处理、梯度乙醇脱水、二甲苯透明 3 min、自动盖片机(LEICA)封片、奥林巴斯显微镜阅片。阳性对照采用经确诊的卵巢癌石蜡组织标本,采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 参考 Axiotis 评分标准^[7],根据阳性细胞比例<10%、10%~<25%、25%~<50%、50%~<75%、75%~100%依次定义为 0、1、2、3、4 分。染色强度:背景色或无染色为 0 分,淡黄染色为 1 分,中等强度黄染为 2 分,棕黄色或棕褐色为 3 分。根据染色强度和阳性细胞比例得分之和,将免疫组织化学结果分为 4 个等级:5~7 分为强阳性(+++),3~4 分为阳性(++),1~2 分为弱阳性(+) ,0 分为阴性(-)。根据 TYMS 蛋白表达水平中位数分为低表达组和高表达组。

1.4 随访 采用门诊随访结合电话随访的形式随访至 2022 年 8 月,对随访满 3 年的数据进行分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理、分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异对比采用 t 检验,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法;采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行 Kaplan-Meier 生存分析和 log-rank 检验,分析 TYMS 蛋白表达情况与肝癌患者预后的关系。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

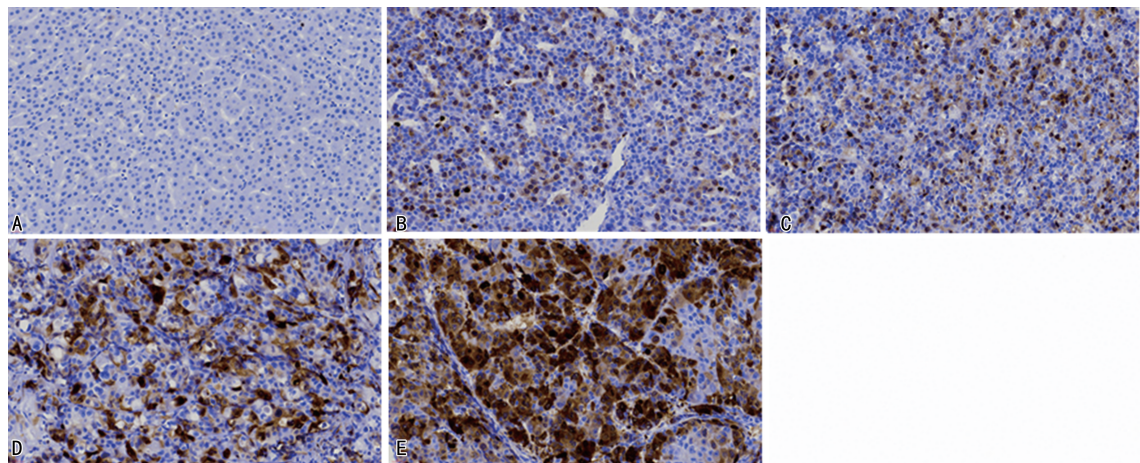
2.1 免疫组织化学结果 TYMS 蛋白在癌组织中的表达水平为(2.04±0.69)分,在癌旁组织中的表达水平为(0.17±0.06)分,差异有统计学意义($t=9.406$, $P<0.05$)。HCC 癌组织 TYMS 蛋白表达水平中位数为 2 分,<2 分为低表达组,≥2 分为高表达组。TYMS 蛋白表达水平在不同性别、年龄、肿瘤最大径、甲胎蛋白水平、乙型肝炎病毒-DNA 水平等患者间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),低分化者 TYMS 蛋白表达阳性率(83.87%)高于中-高分化者(62.32%),差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。HCC 癌组织和癌旁组织中 TYMS 蛋白的表达情况见图 1。

表 1 TYMS 蛋白表达水平与临床病理特征的关系(n)

项目	n	低表达 ($n=31$)	高表达 ($n=69$)	χ^2	P
性别				0.187	0.720
男	90	29	61		
女	10	2	8		
年龄(岁)				0.902	0.372
≤60	78	26	52		
>60	22	5	17		
肿瘤最大径(cm)				0.445	0.505
<3	27	7	20		
≥3	73	24	49		
AFP(ng/mL)				3.140	0.076
<400	72	26	46		
≥400	28	5	23		
HBV-DNA(IU/mL)				1.489	0.222
<100	31	7	24		
≥100	69	24	45		
分化程度				4.645	0.031
低分化	31	5	26		
中-高分化	69	26	43		
脉管内癌栓				0.097	0.755
有	59	19	40		
无	41	12	29		
微血管侵犯				0.463	0.496
M0	53	18	35		
M1~M2	47	13	34		
微卫星癌灶				0.269	0.604
有	12	5	7		
无	88	26	62		

2.2 随访与生存分析结果 截至随访终点,随访最长时间为 55 个月,中位随访时间为 29 个月,其中死亡 47 例、存活 48 例、失访 5 例。随访满 3 年者共 62 例,其中存活 26 例,中位生存期为 32 个月。低表达

组(31 例)中位生存期为 46 个月,生存率为 61.3%,高表达组(31 例)中位生存期为 30 个月,生存率为 22.6%。两组间生存率比较,差异有统计学意义($P=0.009\ 2$)。见图 2。



注:A 为 TYMS 蛋白在癌旁组织中呈阴性表达;B、C 分别为 TYMS 蛋白在 HCC 癌组织中呈阳性表达;D、E 分别为 TYMS 蛋白在 HCC 癌组织中呈强阳性表达。

图 1 HCC 癌组织和癌旁组织中 TYMS 蛋白的表达($\times 400$)

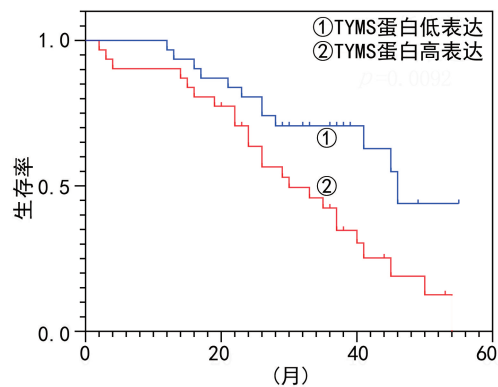


图 2 不同 TYMS 蛋白表达患者 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨 论

HCC 是临床常见的恶性肿瘤之一,具有病情隐匿、预后差、易复发等特点^[8],目前,临床上针对肝细胞癌治疗靶点的研究较少,需要继续加强研究力度,探索与肝细胞癌治疗靶点及预后有关的生物标志物。

TYMS 基因位于 18 号染色体短臂,共有 333 个氨基酸,其转录起始点位于起始密码子的上游区域^[9]。TYMS 蛋白是该基因编码的一种叶酸依赖性酶,对 DNA 的合成起重要作用。它是由对称分布的两个相同的亚单位组成,这种二聚体有两个活性位点,分别位于不同亚基上。脱氧胸苷一磷酸和二氢叶酸是 DNA 合成和修复的重要物质。当 TYMS 蛋白受到抑制时,会进一步阻碍脱氧胸苷三磷酸的合成,同时在反馈机制的调节下,导致其他脱氧核苷酸水平出现明显波动,影响整个分子库的平衡,不利于 DNA 的修复及合成,甚至可能会造成 DNA 损伤及细胞周期的停滞^[10-11]。5-氟尿嘧啶(5-FU)作为 TYMS 蛋白抑制剂最早应用于临床,其代谢产物氟脱氧尿苷酸

(FDUMP)与 TYMS 蛋白结合后,会减少脱氧尿苷酶生成^[12],从而抑制肿瘤细胞 DNA 的合成,使肿瘤细胞增殖减缓,最终致肿瘤细胞死亡。

TYMS 蛋白被报道在多种癌症组织中表达增高。ZHOU 等^[13]在研究中明确了癌症患者的不良预后与 TYMS 蛋白的高表达有关,针对乳腺癌患者,当肿瘤侵袭淋巴结时,其水平升高幅度更大,同时提示患者的预后差。LIU 等^[14]研究表明,肿瘤组织 TYMS 蛋白的低表达与非小细胞肺癌患者更好的预后有关,但亚组分析表明,这种显著性关联仅限于 TYMS 基因靶向治疗(培美曲塞或 5-FU)的患者。肝癌患者预后及化疗疗效的评估可以通过检测 TYMS 蛋白及 TYMS mRNA 表达水平来实现,与低表达的患者相比,TYMS 蛋白高表达患者的生存率更低^[15]。而大肠癌患者的 TYMS 蛋白表达水平不仅与预后有关,还与肿瘤耐药的分子机制也有一定的联系。JIANG 等^[16]研究表明,TYMS mRNA 可作为大肠癌患者疗效监测的判断指标。DONNER 等^[17]的一项探讨 TYMS 蛋白表达水平对肝癌切除术后患者预后影响的研究结果显示,低表达组的生存率显著高于高表达组($P<0.05$)。

本研究表明,HCC 癌组织中 TYMS 蛋白的表达水平明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。TYMS 蛋白表达水平在不同性别、年龄、肿瘤最大径、AFP 水平、HBV-DNA 水平等患者间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),低分化患者 TYMS 蛋白表达阳性率(26/31, 83.87%)高于中-高分化患者(43/69, 62.32%),差异有统计学意义($P<0.05$),与郭飞宇等^[18]报道结果一致。TYMS 蛋白表达水平与

细胞增殖活性有关, DNA 复制和代谢旺盛部位 TYMS 蛋白呈高表达状态^[14], 可引起肝癌细胞分化程度降低, 癌灶内异常增生动脉增多, 瘤体生长速度加快和侵袭力增加。WANG 等^[19]的细胞增殖、凋亡和侵袭实验表明, TYMS 蛋白促进 HCC 细胞的增殖和侵袭力增加, 并抑制其凋亡。本研究生存分析结果显示, TYMS 蛋白低表达者生存率(61.3%)明显高于高表达者(22.6%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与 DONNER 等^[17]研究结果相符, 提示 TYMS 蛋白高表达可能是预后不良的风险因素, 并可用于预测预后。由此可见, 研发高选择性、低耐药性、低毒性的 TYMS 蛋白抑制剂来抑制 TYMS 基因表达, 对 HCC 及其他恶性肿瘤患者的靶向治疗和预后意义重大。

综上所述, 本研究通过实验结合临床数据分析得出 TYMS 蛋白在 HCC 癌组织中表达升高, 且与患者的预后有关, 可作为预后的判断指标。TYMS 蛋白抑制剂的研发有望给 HCC 患者带来福音。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] WU J, YANG S G, XU K J, et al. Patterns and trends of liver cancer incidence rates in eastern and southeastern Asian countries (1983—2007) and Predictions to 2030[J]. Gastroenterology, 2018, 154(6): 1719-1728.
- [3] KULDA V, HRDA K, HOUDEK Z, et al. Predictive significance of thymidylate synthase expression in non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2017, 37(12): 6953-6958.
- [4] SONG S R, TIAN B X, ZHANG M, et al. Diagnostic and prognostic value of thymidylate synthase expression in breast cancer[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2021, 48(2): 279-287.
- [5] MEROPOL N J, FENG Y, GREM J L, et al. Phase 2 study of treatment selection based on tumor thymidylate synthase expression in previously untreated patients with metastatic colorectal cancer; a trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E4203)[J]. Cancer, 2018, 124(4): 688-697.
- [6] WANG C Y, WENG Y J, WANG H Y, et al. Relationship between the expression of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase and survival in epithelial ovarian cancer[J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2010, 30(4): 494-499.
- [7] SARELA A I, SCOTT N, RAMSDALE J, et. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II

- colorectal carcinomas[J]. Ann Surg Oncol, 2001, 8(4): 672-681.
- [8] MASUHIRO N, SHINSAKU N. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2005, 20(6): 452-477.
- [9] 张凤岐, 沈燕, 王珊珊, 等. 外周血中 TYMS 和 ERCC1 基因多态性对胃肠道肿瘤患者化疗疗效的评估[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(8): 906-911.
- [10] KANG M X, ZHENG W, CHEN Q, et al. Thymidylate synthase prompts metastatic progression through the dTMP associated EMT process in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cancer Lett, 2018, 419: 40-52.
- [11] WANG L Y. Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2016, 35(10/12): 578-594.
- [12] 李馨阳, 王德普, 卢国庆, 等. 胸苷酸合成酶抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2021, 31(2): 117-128.
- [13] ZHOU Y H, LIU Y, ZHANG W, et al. Associations between clinical-pathological parameters and biomarkers, HER-2, TYMS, RRMI, and 21-gene recurrence score in breast cancer [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(11): 152644.
- [14] LIU Q Y, YU Z B, XIANG Y, et al. Prognostic and predictive significance of thymidylate synthase protein expression in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Cancer Biomark, 2015, 15(1): 65-78.
- [15] BAI W Q, WU Y Q, ZHANG P, et al. Correlations between expression levels of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase, and efficacy of 5-fluorouracil-based chemotherapy for advanced colorectal cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 12333-12345.
- [16] JIANG H, LI B S, WANG F X, et al. Expression of ERCC1 and TYMS in colorectal cancer patients and the predictive value of chemotherapy efficacy[J]. Oncol Lett, 2019, 18(2): 1157-1162.
- [17] DONNER D B, NAKAKURA E K, VENOOK A P, et al. High thymidylate synthase gene expression predicts poor outcome after resection of hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0219469.
- [18] 郭飞宇, 杨军, 熊书名, 等. 表皮生长因子受体和胸苷酸合成酶在原发性肝癌中的表达和意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(9): 666-669.
- [19] WANG L, SHI C Y, YU J, et al. FOXM1-induced TYMS upregulation promotes the progression of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 47.

(收稿日期: 2022-05-10 修回日期: 2022-10-08)