



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.013
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3759.shtml

· 基础研究 ·

p28GANK 在肝门胆管癌表达的意义及其与预后的关系

陈平平¹, 刘初平², 李灼日¹

(1. 海南省人民医院 肝胆外科, 海南 海口 570311; 2. 湖南省人民医院 肝胆外科, 湖南 长沙 410005)

摘要

目的: 探讨 p28GANK 在肝门胆管癌中表达的意义及其与患者术后预后的关系。

方法: 用免疫组化染色检测 p28GANK 在肝门胆管癌组织 (62 例) 及正常胆管组织 (16 例) 表达, 分析其表达水平与患者临床病理特征以及术后生存的关系。

结果: p28GANK 在胆管癌组织中的阳性表达率为 74.2% (46/62), 而在正常胆管组织中为 0, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。p28GANK 在癌组织表达水平与患者年龄、性别分组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 而在肿瘤分化程度、TNM 分期、肝门静脉浸润、淋巴结转移分组间差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); p28GANK 阳性表达患者术后 5 年生存率明显低于阴性表达者 ($P = 0.001$)。

结论: p28GANK 在肝门胆管癌中表达增高, 其高表达患者恶性进展程度密切相关, 并提示术后预后不良。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(1):64-68]

关键词

胆管肿瘤 / 病理学; 癌基因蛋白质类; 预后
中图分类号: R735.8

Significance of P28GANK expression in hilar cholangiocarcinoma and its relation with prognosis

CHEN Pingping¹, LIU Chuping², LI Zhuori¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial Hospital, Changsha 410005, China)

Corresponding author: LI Zhuori, Email: lzh59@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: To study the significance of p28GANK expression in hilar cholangiocarcinoma and its relation with the postoperative prognosis of the patients.

Methods: The p28GANK expressions in hilar cholangiocarcinoma tissues (62 cases) and normal bile duct tissues (16 cases) were determined by immunohistochemical staining, and the relations of p28GANK expression level with the clinicopathologic parameters and postoperative survival of the patients were analyzed.

Results: The p28GANK positive expression rate in cholangiocarcinoma tissues was 74.2% (46/62), while in normal bile duct tissues there was no expression, and the difference between them had statistical significance ($P < 0.01$). The p28GANK expression levels in cholangiocarcinoma tissue showed no statistical difference between

收稿日期: 2013-06-06; 修订日期: 2013-07-02。

作者简介: 陈平平, 海南省人民医院主治医师, 主要从事肝胆胰外科基础与临床方面的研究。

通信作者: 李灼日, Email: lzh59@hotmail.com

the groups divided by age or sex (both $P>0.05$), but were statistically different between or among the groups stratified by degree of tumor differentiation, TNM stage, portal vein invasion, and lymph node metastasis (all $P<0.05$). The 5-year overall survival rate of p28GANK positive expression patients was significantly lower than that of p28GANK negative expression patients ($P=0.001$).

Conclusion: p28GANK expression is increased in hilar cholangiocarcinoma, and its high expression is closely associated with the degree of malignant progression of the tumor and also indicates a poor prognosis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(1):64-68]

KEYWORDS Bile Duct Neoplasms/pathol; Oncogene Proteins; Prognosis

CLC number: R735.8

胆管癌是一种起源于胆管系统上皮细胞的恶性肿瘤, 近年来发病率有上升趋势^[1], 其恶性进展是多因素、多步骤复制协同的病理过程, 比如抑癌基因表达或功能降低, 原癌基因的激活以及遗传学的改变等方面原因^[2]。肝门胆管癌约占胆管癌的 58%~75%^[3]。目前报道血管内皮生长因子 C^[4]、NF- κ B^[5] 等分子在胆管癌恶性进展过程中起重要作用。然而由于缺乏有效治疗患者预后不良, 因此寻找能够预测、诊断及治疗肝门胆管癌的标志物对于提高患者疗效具有重要意义。本课题利用免疫组化方法检测癌基因蛋白质 p28GANK 在肝门胆管癌中表达的临床意义, 并分析其与患者预后的关系, 为胆管癌预警、诊断及预后判断打下基础。

1 材料与方法

1.1 标本收集

收集 2009 年 1 月—2012 年 6 月在湖南省人民医院手术切除的肝门胆管癌组织石蜡标本 62 例, 其中男 36 例, 女 26 例; 年龄 36~72 岁, 平均 (54.2 ± 12.3) 岁, 另选取同期 16 例正常胆管上皮组织 (主要来源于胆道结石及胆道损伤手术切除标本) 为对照组样本。入选患者术前未接受放化疗等抗肿瘤治疗, 所有标本均经临床与病理确诊。

1.2 实验方法

应用免疫组化染色检测 p28GANK 在胆管癌及正常胆管上皮组织表达情况, 蜡块切片, 经常规脱蜡、水化后, 分别经过抗原修复 (柠檬酸缓冲液在微波炉中煮沸 10 min), 抗原封闭 (胎牛血清常温 60 min), 以及 3% H_2O_2 去除内源性氧

化酶活性, 加入兔抗人 p28GANK 单抗 (1:100, Santa) 常温 4 h 后, 加入山羊抗兔二抗, 常温 60 min 后冲洗, 经 DAB 显色、自来水充分冲洗, 苏木精复染及脱水后封片。

1.3 结果判定

所有免疫组化结果经 2 位病理医生未知患者资料情况下进行判定, 棕红色、棕褐色 / 棕黑色定位于胞浆和 (或) 胞核被判断为阳性信号。以肿瘤细胞着色强度计分: 0 分 (无着色), 1 分 (淡黄染色), 2 分 (棕黄色), 3 分 (颗粒)。以肿瘤细胞阳性范围分别计分: 0 分 ($<5\%$), 1 分 ($5\% \sim 25\%$), 2 分 ($>25\% \sim 50\%$), 3 分 ($>50\% \sim 75\%$), 4 分 ($>75\%$)。两组分值相加为最终结果: 0~3 分为 (-), 4~7 分为 (+)。

1.4 随访

术后均通过电话、Email 或门诊就诊随访, 术后 60 个月为随访终点, 所有 62 例患者均有完整的随访资料, 若在随访终点前病死患者按照手术与病死间隔时间计算。

1.5 统计学处理

所有数据均经 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 表达水平与患者临床资料相关性分析采用 Kruskal-Wallis 分析, 生存分析采用 Kaplan-Meier 方法。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 p28GANK 在胆管癌及正常胆管表达差异

免疫组化染色用于检测 p28GANK 在肝门胆管癌及正常胆管组织表达情况, 结果显示, p28GANK 在 46 例胆管癌细胞浆或 (和) 核阳性

表达 (图 1A), 16 例为阴性表达 (图 1B), 阳性表达率为 74.2%; 而在正常胆管上皮全部为阴性

表达, 阳性表达率为 0, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

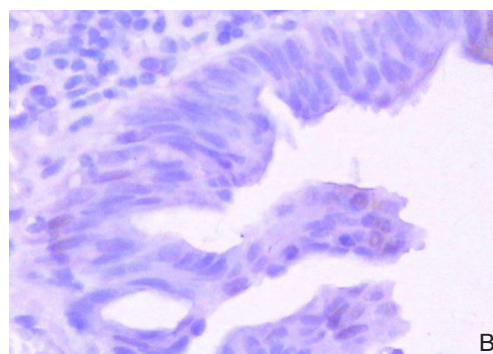
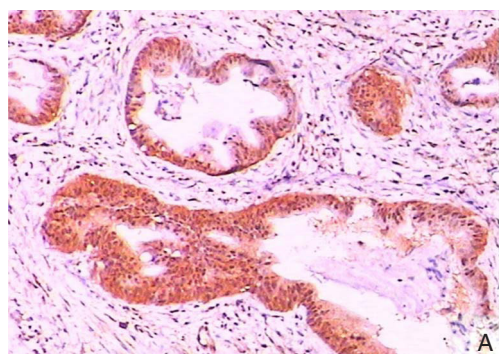


图 1 免疫组化检测 p28GANK 的表达 ($\times 200$)

A: 胆管癌组织; B: 正常胆管组织

Figure 1 Immunohistochemical staining for p28GANK expression ($\times 200$)

A: Cholangiocarcinoma tissue; B: Normal bile duct tissue

2.2 p28GANK 蛋白表达与肝门胆管癌患者临床病理参数的关系

进一步分析 p28GANK 在肝门胆管癌表达的临床意义发现, 其表达水平在患者年龄、性别间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在高、中、低分化癌组织阳性表达率依次为 43.8% (7/16), 80.8% (21/26) 及 90% (18/20) ($P = 0.003$); 在 I+II、III+IV 期组织阳性表达率分别为 59.3% (16/27) 及 85.7% (30/35) ($P = 0.02$); 在伴有或无门静脉浸润组织阳性表达率分别为 86.2% (25/29) 及 63.6% (21/33) ($P = 0.04$); 在伴有或无淋巴结转移组织阳性表达率分别为 88.9% (24/27) 及 62.9% (22/35) ($P = 0.02$) (表 1)。

2.3 生存分析

所有入选患者术后 5 年总生存率为 29.0% (18/62), p28GANK 阳性患者术后 5 年生存率为 17.4% (8/46), 而 p28GANK 阴性患者术后 5 年生存率为 62.5% (10/16), log-rank 生存分析提示 p28GANK 阴性患者术后 5 年生存率明显高于 p28GANK 阳性患者 ($P < 0.01$)。单因素分析 TNM 分期 ($P = 0.03$), 门静脉浸润 ($P = 0.04$) 及淋巴结转移 ($P = 0.001$) 与患者术后 5 年生存率密切相关 (表 2, 图 2)。

表 1 p28GANK 表达水平与患者临床参数关系 [n (%)]
Table 1 Relations of p28GANK expression level with the clinical parameters of the patients [n (%)]

项目	n	(-)	(+)	P
性别				
男	36	9 (25.9)	27 (75.0)	0.86
女	26	7 (26.9)	19 (73.1)	
年龄 (岁)				
> 54	31	6 (19.4)	25 (80.6)	0.25
≤ 54	31	10 (32.3)	21 (67.7)	
分化				
高	16	9 (56.2)	7 (43.8)	0.003
中	26	5 (19.2)	21 (80.8)	
低	20	2 (10.0)	18 (90.0)	
TNM 分期				
I+II	27	11 (40.7)	16 (59.3)	0.02
III+IV	35	5 (14.3)	30 (85.7)	
门静脉浸润				
有	33	12 (36.4)	21 (63.6)	0.04
无	29	4 (13.8)	25 (86.2)	
淋巴结转移				
有	27	3 (11.1)	24 (88.9)	0.02
无	35	13 (37.1)	22 (62.9)	

表 2 临床参数与患者预后关系的单因素分析
Table 2 Univariate analysis for the relationship of clinical parameters and prognosis of the patients

项目	生存率 (%)	P
TNM 分期		
I+II	29.6 (8/27)	0.03
III+IV	14.3 (5/35)	
门静脉浸润		
有	30.3 (10/33)	0.04
无	10.3 (3/29)	
淋巴结转移		
有	0 (0/27)	0.001
无	37.1 (13/35)	

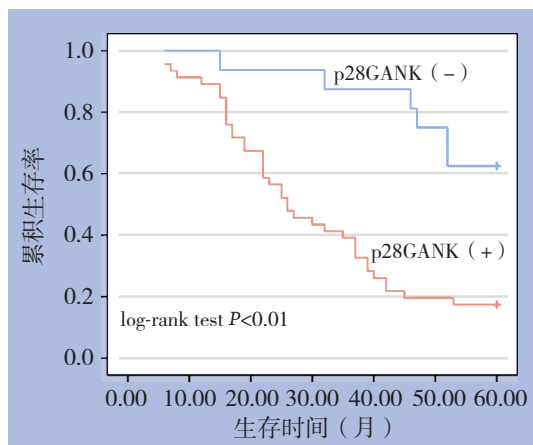


图 2 不同 p28GANK 表达患者术后生存率比较

Figure 2 Comparison of the postoperative survivals between patients with different p28GANK expressions

3 讨论

p28GANK, 又名 Gankyrin 或 PSMD10, 是通过肝细胞癌 cDNA 文库中经消减杂交法克隆的一个肝癌相关基因^[6], 经鉴定由 226 个氨基酸组成的分子量为 25 kDa 的蛋白, 且其序列与 p28 基因完全一致^[7]。三维晶体结构研究结果提示 p28GANK 是由螺旋-环-螺旋结构形式组成的 ANK 结构, 其分子表面有凹槽, 能够与其他分子的相互作用来发挥其生物学功能^[8]。据报道, p28GANK 在人体消化系统包括肝, 胰腺, 胃肠等组织呈阴性表达^[9], 其在肿瘤组织中高表达可能与其恶性生物学行为密切相关。

本课题应用免疫组化染色发现, p28GANK 在肝内胆管癌细胞核或(和)细胞浆呈阳性表达, 而在正常胆管组织呈阴性表达, 统计学分析提示其在胆管癌组织表达水平显著高于正常胆管组织, 提示其在胆管癌恶性进展中可能扮演重要的角色; 因此进一步分析发现 p28GANK 在胆管癌中表达水平与患者分化、TNM 分期、门静脉浸润及淋巴结转移密切相关; Kaplan-Meier 生存分析提示 p28GANK 阴性患者术后 5 年生存率显著高于 p28GANK 阳性患者, 进一步说明 p28GANK 在胆管癌恶性进展中起着重要的作用, 可以作为患者术后预后判断的标记物, 这些研究结果与 p28GANK 在肝癌^[10], 结肠癌^[11] 及食道癌^[12] 等作用与功能相一致。另外, 单因素分析发现患者 TNM 分期、淋巴结转移及门静脉浸润都与患者术后五年生存率密切相关。

最近研究^[13] 报道, 在肝癌发生过程中, p28GANK 可以通过阻止 Oct4 降解来促进初始肿瘤细胞扩增; 在肿瘤恶性进展中, 它可以激活 MDM2, 使其更易降解抑癌基因 p53 而使得细胞肿瘤恶性转变^[14]。另外, p28GANK 在肝癌^[15-16], 乳腺癌^[17], 及结肠癌^[18] 转移过程中同样起重要作用。有关 p28GANK 在肝内胆管癌发生、发展过程中的作用机制有待进一步深入研究。

综上所述, 本课题发现 p28GANK 在肝内胆管癌表达显著高于正常胆管上皮组织, 其高表达与患者恶性程度呈正相关, 对于肝内胆管癌患者术后预后判断具有一定指导意义, 也为胆管癌诊断及生物靶向治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Berthiaume EP, Wands J. The molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24 (2):127-137.
- [3] 黄志强. 黄志强胆道外科[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1998:79.
- [4] 肖科, 汤恢煊. 血管内皮生长因子 C 和微淋巴管密度与胆管癌淋巴结转移及预后的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(8):946-951.
- [5] 黄奋, 陈汝福, 周泉波, 等. 肝内胆管结石合并肝内胆管癌组织中 NF- κ B 的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19(8):925-928.
- [6] Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas[J]. *Nat Med*, 2000, 6(1):96-99.
- [7] Hori T, Kato S, Saeki M, et al. cDNA cloning and functional analysis of p28 (Nas6p) and p40.5 (Nas7p), two novel regulatory subunits of the 26S proteasome[J]. *Gene*, 1998, 216(1):113-122.
- [8] Yuan C, Li J, Mahajan A, et al. Solution structure of the human oncogenic protein gankyrin containing seven ankyrin repeats and analysis of its structure-function relationship[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(38):12152-12161.
- [9] Fu XY, Wang HY, Tan L, et al. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(4):638-43.
- [10] Tan L, Fu XY, Liu SQ, et al. Expression of p28GANK and its correlation with RB in human hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2005, 25(3):667-676.
- [11] Tang S, Yang G, Meng Y, et al. Overexpression of a novel gene gankyrin correlates with the malignant phenotype of colorectal cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(2):88-95.
- [12] Ortiz CM, Ito T, Tanaka E, et al. Gankyrin oncoprotein overexpression

- as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(2):325-332.
- [13] Qian YW, Chen Y, Yang W, et al. p28(GANK) prevents degradation of Oct4 and promotes expansion of tumor-initiating cells in hepatocarcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7):1547-1558.
- [14] Higashitsuji H, Liu Y, Mayer RJ, et al. The oncoprotein gankyrin negatively regulates both p53 and RB by enhancing proteasomal degradation[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(10):1335-1347.
- [15] Dong LW, Yang GZ, Pan YF, et al. The oncoprotein p28GANK establishes a positive feedback loop in β -catenin signaling[J]. *Cell Res*, 2011, 21(8):1248-1261.
- [16] Fu J, Chen Y, Cao J, et al. p28GANK overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1 α pathways[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1):181-92.
- [17] Zhen C, Chen L, Zhao Q, et al. Gankyrin promotes breast cancer cell metastasis by regulating Rac1 activity[J]. *Oncogene*, 2013, 32(29):3452-3460.
- [18] Bai Z, Tai Y, Li W, et al. Gankyrin activates IL-8 to promote hepatic metastasis of colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(14):4548-4558.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 陈平平, 刘初平, 李灼日. p28GANK 在肝门胆管癌表达的意义及其与预后的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1):64-68. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.013

Cite this article as: CHEN PP, LIU CP, LI ZR. Significance of P28GANK expression in hilar cholangiocarcinoma and its relation with prognosis [J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(1):64-68. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.013

本刊远程稿件处理系统投稿步骤

1. 选择“作者投稿”一栏, 进入“作者投稿”界面。

如果是第一次投稿, 需要先注册本系统: 点“注册”进入注册流程, 按照系统提示进行注册, 请注意, “*”选项为用户必填项。

2. 点“作者投稿”, 选择左边的“我要投稿”一栏, 按照投稿向导的提示进行。

(1) 输入稿件中文文题和英文文题。

(2) 输入作者。若所投稿件为多人撰写, 在作者信息下添加该文的合作作者, 合作作者可以只添加姓名即可。此处需注意, 如该文为 n 位作者撰写, 需在填写完 n 位作者后, 再点一下“继续添加作者”后方可点“下一步”, 否则最后一个作者本系统将不会显示。

(3) 第三步“学科类型”、“专业类型”、“创作类型”、“投稿栏目”、“文章分类号/PACS 码”可以不选。

如果该文有基金支持, 请在“基金类型”下的长条框中输入(包括基金号); 如果有多个, 请用分号分开。输完以后点“下一步”。

(4) 输入关键词。请注意各词之间一定要用分号隔开。然后点击“添加”。再点“下一步”。

(5) 输入中英文摘要后再单击“下一步”。

(6) 根据系统提示在相应的栏目中输入你要回避或推荐的专家, 也可以不写。单击“下一步”, 检查稿件的基本信息, 如有需要修改的地方, 点击“修改”; 再确认无误后, 单击“下一步”进入稿件上传步骤。

(7) 在“稿件上传操作区”点“浏览”, 选中要上传的稿件后, 点击右边的“上传稿件”。待弹出“稿件上传完毕, 请继续下一步”的对话框时, 点“确定”, 再点“下一步”继续投稿。请注意, 这一步可能因您的网速和稿件的大小, 所需时间略有不同, 请耐心等待, 如果长时间仍没有弹出“稿件上传完毕, 请继续下一步”的对话框, 可重新尝试, 确保稿件上传方可进行下一步。

(8) 核对完所投稿件的信息后请点“下一步”。如果您对编辑部有什么特别的要求或说明, 请在“给编辑部留言”框中留下您的意见, 点“立即提交”, 系统会提示“*** 同志: 非常感谢您对本刊物的支持! 您的来稿《**》我们已经收到, 请等待编辑部通知。查询请登录编辑部网站 <http://www.zpwz.net> 或咨询编辑部邮箱: pw4327400@126.com”。

中国普通外科杂志编辑部