



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.005  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.005  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(2):180-184.

· 胆道肿瘤专题研究 ·

## 肝内胆管癌中 ErbB4 的表达及临床意义

谭永辉<sup>1</sup>, 吕品<sup>1</sup>, 聂盛丹<sup>2</sup>, 曾杰宏<sup>1</sup>, 蒋波<sup>1</sup>

(湖南师范大学第一附属医院 1. 肝胆外科 2. 临床研究所, 湖南长沙 410005)

### 摘要

**目的:** 探讨表皮生长因子受体 ErbB4 在人肝内胆管癌 (ICC) 组织中的表达及意义。

**方法:** 采用免疫组化法分别检测 24 例 ICC 患者癌组织 (ICC 组)、癌旁胆管组织 (癌旁组) 及 16 例肝内胆管结石患者胆管组织 (结石组) 中 ErbB4 的表达, 并分析 ErbB4 表达与 ICC 患者临床病理因素的关系。

**结果:** ErbB4 的强阳性表达率在 ICC 组中为 75.0%, 明显高于癌旁组 (45.8%) 和结石组 (37.5%) (均  $P < 0.05$ ); 且 ICC 组细胞核 ErbB4 阳性表达率高于另两组 (均  $P < 0.05$ ), 而胞膜与胞质 ErbB4 阳性表达率 3 组间差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。ErbB4 的高表达与 ICC 患者淋巴结转移及 TNM 分期有关 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** ErbB4 的表达增高与核内移与 ICC 的发生发展以及浸润转移密切相关。

### 关键词

胆管肿瘤; 胆管, 肝内; 受体, 表皮生长因子; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.8

## ErbB4 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical significance

TAN Yonghui<sup>1</sup>, LU Pin<sup>1</sup>, NIE Shengdan<sup>2</sup>, ZENG Jiehong<sup>1</sup>, JIANG Bo<sup>1</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery 2. Institute of Clinical Medical Research, the First Affiliated Hospital, Hunan Normal University, Changsha 410005, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the expression of epidermal growth factor receptor ErbB4 in human intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) tissues and its significance.

**Methods:** The ErbB4 expressions in 24 paired specimens of ICC tissue (ICC group) and adjacent bile duct tissue (tumor adjacent group), and 16 specimens of bile duct tissue from hepatolithiasis patients (hepatolithiasis group) were detected by immunohistochemical staining, and the relations of ErbB4 expression with the clinicopathologic factors of ICC patients were also analyzed.

**Results:** The strong positive expression rate of ErbB4 in ICC group was 75.0%, which was significantly higher than that in tumor adjacent group (45.8%) or hepatolithiasis group (37.5%) (both  $P < 0.05$ ), nuclear expression rate of ErbB4 in ICC group was significantly higher than that in the other two groups (both  $P < 0.05$ ), while the membranous and cytoplasmic expression rates of ErbB4 showed no significant difference among the three groups

**基金项目:** 湖南省医药卫生科研计划资助项目 (B2013-071); 湖南省科学技术厅科技计划资助项目 (2014FJ3033)。

**收稿日期:** 2014-11-27; **修订日期:** 2015-01-26。

**作者简介:** 谭永辉, 湖南师范大学第一附属医院硕士研究生, 主要从事肝胆胰外科方面的研究。

**通信作者:** 吕品, Email: lypinhn@163.com; 蒋波, Email: jiangbo@medmail.com

(both  $P>0.05$ ). High ErbB4 expression was significantly associated with lymph node metastasis and TNM stage of ICC patients (both  $P<0.05$ ).

**Conclusion:** Increased expression of ErbB4 and its transfer into cellular nucleus are closely related to the occurrence and development as well as infiltration and metastasis of ICC.

**Key words** Bile Duct Neoplasms; Bile Ducts, Intrahepatic; Receptor, Epidermal Growth Factor; Neoplasm Invasiveness

**CLC number:** R735.8

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是肝脏常见的高度侵袭性肿瘤, 世界范围内发病率约为1~10/10万, 并且逐年上升<sup>[1]</sup>。其发病隐匿、淋巴转移早、对放、化疗不敏感、根治性手术切除率低特点, 使得ICC预后很差<sup>[2]</sup>。而行根治性手术患者术后容易复发或转移, 5年无瘤生存率仅为12.8%<sup>[3]</sup>。分子靶向治疗逐渐成为诊治肝胆管恶性肿瘤的研究热点<sup>[4]</sup>。其中表皮生长因子受体ErbB4已被证实与多种恶性肿瘤相关<sup>[5]</sup>, 但目前为止, ErbB4与ICC关系的研究鲜见报道。本研究拟采用免疫组化方法检测ICC中ErbB4的表达, 旨在探讨ErbB4在ICC中的表达及意义, 进一步明确ICC发生发展机制, 为临床诊治ICC提供更多思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料

选用湖南省人民医院病理科2010年4月—2014年9月的部分石蜡标本, 包括: 24例ICC组织标本 (ICC组) 及相应的癌旁组织标本 (癌旁组, 距离胆管癌组织1 cm的肝内胆管组织, 经病理学检测为无癌组织) 以及16例肝内胆管结石的胆管组织标本 (结石组, 经病理学检测为无癌组织)。上述病例均有完整的临床、病理资料, 包括年龄、性别、肿瘤大小、病理分型及临床分期等; 患者术前均未行放化疗等相关肿瘤方面治疗。在24例ICC患者中, 男18例, 女6例; 年龄42~69岁, 中位年龄56岁。参考国际抗癌联盟 (UICC) 肿瘤TNM分期标准, I+II期8例, III+IV期16例; 参照湖南省人民医院病理科提供资料, 肿瘤分化程度分为: 中分化8例, 中低分化14例, 低分化2例; 根据术前资料、术中探查及术后病理结果, 有淋巴结及远处转移8例, 无淋巴结及远处转移16例。

### 1.2 试剂

兔抗人ErbB4多克隆抗体及SP试剂盒为Santa Cruz公司产品, DAB购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 免疫组化方法

取石蜡切片, 厚度为5  $\mu\text{m}$ , 采用辣根过氧化物标记的ABC法检测ErbB4在胆管癌组织中表达, 操作均严格按照说明书进行。ErbB4一抗工作浓度为1:200。PBS代替一抗做阴性对照。

### 1.4 结果判断

每张切片随机取3个400倍视野, 在相同条件下由2位相关专业人员进行判定评分。具体评分标准采用染色强度及阳性细胞数进行半定量判定。染色强度的评分标准为: 不着色0分, 淡黄色1分, 棕黄色2分; 黄褐色3分; 显微镜下阳性细胞数所占百分比的评分标准为: 无阳性细胞为0分, <10%为1分; 11%~50%为2分; 51%~75%为3分; >75%为4分; 将染色强度分数和阳性细胞百分比的分数相乘为最后评分, 评分<3分为阴性 (-), >3分判定为阳性 (+), >6分为强阳性 (++或+++)。

### 1.5 统计学处理

实验数据采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析, 组间ErbB4表达差异采用 $\chi^2$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ErbB4 在各组中表达强度

ErbB4在肝胆管细胞中可表达于胞膜、胞质及胞核。其中在ICC组中主要表达于胞质和胞核, 胞质为轻中度黄染, 而胞核为中重度黄染, 胞膜无明显黄染。在癌旁组中表达情况跟肿瘤组类似, 但胞核染色程度较之偏弱。而在结石组中, ErbB4主要表达于胞膜, 呈中度黄染, 胞核则为阴性或

弱阳性(图1)。

ErbB4强阳性表达率在肿瘤组中占75.0%，癌旁组为45.8%，结石组为37.5%。其中ICC组与癌旁组之间( $\chi^2=4.269$ ,  $P=0.039$ )、ICC组与结石

组之间( $\chi^2=5.63$ ,  $P=0.018$ )表达差异均有统计学意义，而癌旁组与结石组之间差异无统计学意义( $\chi^2=0.273$ ,  $P=0.601$ ) (表1)。

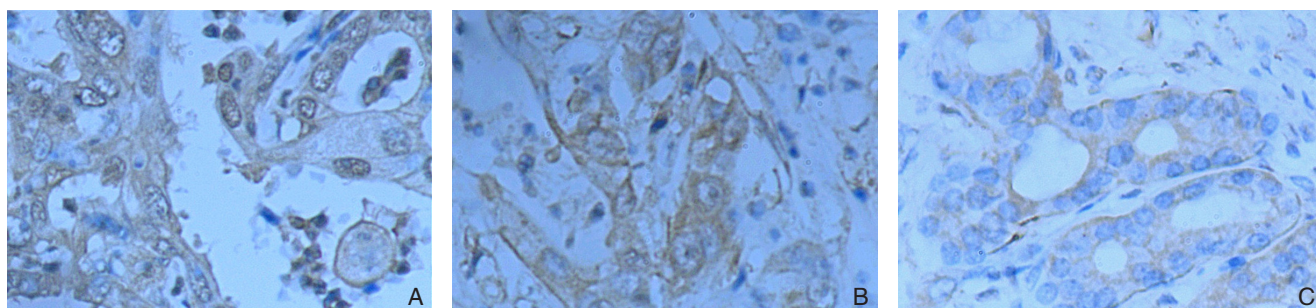


图1 免疫组化检测各组 ErbB4 的表达 (×400) A: ICC 组; B: 癌旁组; C: 结石组

Figure 1 Immunohistochemical staining for ErbB4 expressions in each group (×400) A: ICC group; B: Paratumor group; C: Hepatolithiasis group

表1 ErbB4 在各组织中表达 [n (%) ]

Table 1 ErbB4 expressions in different tissues [n (%)]

组别	n	(+++)	(++)	(+)	(-)
ICC 组	24	10 (41.7)	8 (33.3)	4 (16.7)	2 (8.3)
癌旁组	24	5 (20.8)	6 (25.0)	8 (33.3)	5 (20.8)
结石组	16	2 (12.5)	4 (25.0)	4 (25.0)	6 (37.5)

## 2.2 ErbB4 在各组中的表达分布差异

在胞膜上 ErbB4 阳性表达率，ICC 组为 16.7%，癌旁组为 29.2%，结石组为 37.5%，3 组之间 ErbB4 表达差异无统计学意义 ( $\chi^2=2.27$ ,

$P=0.32$ )。在胞质中 ErbB4 阳性表达率，ICC 组为 45.8%，癌旁组为 37.5%，结石组为 31.3%，3 组之间 ErbB4 表达差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.9$ ,  $P=0.64$ )。在胞核中 ErbB4 阳性表达率，ICC 组为 66.7%，癌旁组为 37.5%，结石组为 12.5%，ICC 组 ErbB4 阳性表达率明显高于癌旁组 ( $\chi^2=4.09$ ,  $P=0.043$ ) 和结石组 ( $\chi^2=11.38$ ,  $P=0.00074$ ), 而癌旁组与结石组之间表达差异无统计学意义 ( $\chi^2=3.01$ ,  $P=0.083$ ) (表2)。

表2 各组 ErbB4 表达分布差异 [n (%) ]

Table 2 ErbB4 expression profiles in each group [n (%)]

组别	n	胞膜		$\chi^2$	P	胞核		$\chi^2$	P	胞质		$\chi^2$	P
		(+)	(-)			(+)	(-)			(+)	(-)		
ICC 组	24	4(16.7)	20(83.3)			16(66.7)	8(33.3)			11(45.8)	13(54.2)		
癌旁组	24	7(29.2)	17(70.8)	2.27	0.32	9(37.5)	15(62.5)	11.9	0.00	9(37.5)	15(62.5)	0.9	0.64
结石组	16	6(37.5)	10(62.5)			2(12.5)	14(87.5)			5(31.3)	11(68.7)		

## 2.3 ICC 组织中 ErbB4 表达与患者临床病理关系

ICC 组织中 ErbB4 蛋白的表达与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤病理分期、是否有门静脉癌栓无关 (均  $P>0.05$ ) ; 但 ErbB4 的表达与 ICC 患者区

域淋巴结转移及 TNM 分期有关 (均  $P<0.05$ ) , 即在有区域淋巴结转移的 ICC 患者中, 肿瘤细胞中 ErbB4 阳性表达高; 患者临床 TNM 分期越高, 其 ErbB4 表达越高 (表3)。



表3 ErbB4表达与ICC临床病理因素的关系[n(%)]  
Table 3 Expressions of ErbB4 with the clinicopathologic factors of ICC [n(%)]

因素	n	ErbB4		$\chi^2$	P
		(+)	(-)		
性别					
男	18	13 (72.2)	5 (27.8)	0.296	0.586
女	6	5 (83.3)	1 (16.7)		
年龄(岁)					
>50	18	13 (72.2)	5 (27.8)	0.296	0.586
≤50	6	5 (83.3)	1 (16.7)		
肿瘤大小(cm)					
>2	18	14 (77.8)	4 (22.2)	0.296	0.586
≤2	6	4 (66.7)	2 (33.3)		
分化程度					
中分化	8	4 (50.0)	4 (50.0)	4.190	0.321
中低分化	14	12 (85.7)	2 (14.3)		
低分化	2	2 (100.0)	0 (0.0)		
TNM分期					
I+II期	8	4 (50.0)	4 (50.0)	4.000	0.046
III+IV期	16	14 (87.5)	2 (12.5)		
淋巴结转移					
有	8	4 (50.0)	4 (50.0)	4.000	0.046
无	16	14 (87.5)	2 (12.5)		
门脉癌栓					
有	4	3 (75.0)	1 (25.0)	1.600	0.206
无	20	15 (75.0)	5 (25.0)		

### 3 讨论

ErbB4属于酪氨酸激酶受体家族,是一种跨膜蛋白,由一个糖基化的细胞外配体结合区,单一的疏水跨膜区和一个位于细胞内的酪氨酸激酶区组成;ErbB4因剪切、编码不同而分为胞浆尾区的CYT-1和CYT-2和胞外近膜区的JM-a、JM-b 4种功能不同的亚型<sup>[6]</sup>。众多研究发现,ErbB4在肺癌、食管癌、甲状腺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、结肠癌、口腔鳞癌等多种肿瘤细胞中高表达<sup>[7]</sup>。在人乳头瘤病毒16(HPV-16)阳性患者中HPV-16 E5蛋白与ErbB4受体的表达呈强相关性<sup>[8]</sup>。本研究中也发现胆管癌组织中ErbB4强阳性表达率较癌旁组织和胆结石组织显著增高。

转染ErbB4基因可以增强细胞的增殖能力,而ErbB4单抗能抑制过表达ErbB4细胞的增殖率,并增加其凋亡率<sup>[9]</sup>;敲除ErbB4基因可抑制食管鳞癌细胞株ECA-109的迁移和侵袭<sup>[10]</sup>;miR-302b转录后下调ErbB4表达,可诱导食管鳞癌细胞株凋亡并抑制其侵袭性<sup>[11]</sup>;小分子酪氨酸激酶抑制剂通过ErbB4受体相互作用,可促使癌症生长停滞<sup>[12]</sup>;体

外实验显示,ErbB4可裂解的JM-a亚型的特异型单克隆抗体mAb 1479可以抑制肿瘤细胞生长<sup>[13]</sup>。ErbB4作为一种信号传导因子,其在肿瘤发生发展中的作用与其结构、信号传导路径及方式有密切关系<sup>[14]</sup>。与其他酪氨酸激酶受体一样,ErbB4可形成同源/异源二聚体,并招募蛋白质配体到质膜,进而激活酪氨酸激酶,随即其胞内区羧基末端特定的酪氨酸残基发生自身磷酸化,激活各种信号传导通路,最终影响基因的表达,产生细胞增殖、分化等多种生物效应<sup>[15]</sup>,可引起细胞生长增殖失控、恶性转化及肿瘤浸润转移<sup>[16]</sup>。以上研究都表明,ErbB4参与肿瘤细胞的增殖和迁移。据文献<sup>[5]</sup>报道,ErbB4在多种肿瘤中与肿瘤的临床分期、淋巴结转移情况及恶性程度相关,本研究结果也提示,ErbB4的表达与ICC患者区域淋巴结转移、TNM分期有关。故推测,ErbB4的表达增高可能在ICC的发生发展以及浸润转移过程中扮演了重要角色。

ErbB4通过释放可溶性胞内结构域片段传递来自细胞表面的信号,这个过程被称为受控膜内蛋白水解(RIP),受控膜内蛋白水解在ErbB4促进肿瘤发生发展中扮演了重要作用<sup>[17]</sup>。在与胞外配体结合后,ErbB4不仅可以激活接近细胞膜胞质面的下游信号传导分子,而且还能通过TACE和 $\gamma$ -分泌酶使ErbB4的胞外、胞内结构域裂解<sup>[18]</sup>。裂解后的胞内结构域片段移位到细胞核,成为一些转录因子的活化剂或阻遏剂,从而影响基因表达<sup>[19]</sup>。在肿瘤细胞中,ErbB4因为可裂解的JM-a亚型裂解后易位至胞核而出现核表达,且相比细胞质和细胞膜表达,核表达提示肿瘤更差的预后<sup>[20]</sup>。本研究发现,ErbB4在ICC、癌旁及结石性胆管组织中均存在表达,在细胞膜上,ICC组织ErbB4阳性率与癌旁组织、结石性肝胆管组织差异性无统计学意义,而在细胞核中,ICC组织ErbB4阳性率显著高于癌旁组织和结石性肝胆管组织。以上提示,胆管癌发生和发展时,胆管组织中ErbB4表达增加,胞外、胞内结构域裂解,其中胞内结构域转移至胞核,通过激活原癌基因或阻遏抑癌基因的表达,引起细胞生长增殖失控、恶性转化及肿瘤浸润转移。然而,ErbB4的致促癌机理仍有待进一步研究。

综上所述,ErbB4的表达增高和核内移在ICC

与发生发展以及浸润转移过程密切相关, 本研究为 ICC 的预后判断和治疗提供了一种新思路, ErbB4 可能成为预测 ICC 的新标志物和治疗潜在靶点。

#### 参考文献

- [1] Lepage C, Cottet V, Chauvenet M, et al. Trends in the incidence and management of biliary tract cancer: a French population-based study[J]. *J Hepatol*, 2011, 54(2):306-310.
- [2] 吕品, 蒋波, 王俊, 等. PROX-1与Ki-67在胆管癌中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(8):1082-1086.
- [3] 周少君, 黄志勇. 肝内胆管癌根治性切除术后肿瘤复发转移的预后因素分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(8):1024-1029.
- [4] Fisher SB, Fisher KE, Maithel SK, 等. 分子靶向治疗胆道恶性肿瘤: 靶点的确定 [J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(8):971-972.
- [5] Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2):124-134.
- [6] Schulze WX, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family[J]. *Mol Syst Biol*, 2005, 1:2005.
- [7] Burgess AW. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets[J]. *Growth Factors*, 2008, 26(5):263-274.
- [8] Chang JL, Tsao YP, Liu DW, et al. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix[J]. *J Biomed Sci*, 2001, 8(2):206-213.
- [9] Starr A, Greif J, Vexler A, et al. ErbB4 increases the proliferation potential of human lung cancer cells and its blockage can be used as a target for anti-cancer therapy[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(2):269-274.
- [10] 逢旭光, 范虹, 葛棣. HER4基因抑制对食管癌细胞Eca-109迁移和侵袭能力的影响[J]. *复旦学报:医学版*, 2008, 35(4):521-527.
- [11] Zhang M, Yang Q, Zhang L, et al. miR-302b is a potential molecular marker of esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor by targeting ErbB4[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33:10.
- [12] Carrasco-García E, Saceda M, Grasso S, et al. Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(10):1476-1489.
- [13] Hollmén M, Määttä JA, Bald L, et al. Suppression of breast cancer cell growth by a monoclonal antibody targeting cleavable ErbB4 isoforms[J]. *Oncogene*, 2009, 28(10):1309-1319.
- [14] Wells A, Marti U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus?[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9):697-702.
- [15] Kainulainen V, Sundvall M, Määttä JA, et al. A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(12):8641-8649.
- [16] Soonthornthum T, Arias-Pulido H, Joste N, et al. Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(10):2166-2178.
- [17] Ishibashi K, Fukumoto Y, Hasegawa H, et al. Nuclear ErbB4 signaling through H3K9me3 is antagonized by EGFR-activated c-Src[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 2):625-637.
- [18] Ni CY, Murphy MP, Golde TE, et al. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase[J]. *Science*, 2001, 294(5549):2179-2181.
- [19] Carpenter G, Liao HJ. Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(9):1556-1566.
- [20] Thor AD, Edgerton SM, Jones FE. Subcellular localization of the HER4 intracellular domain, 4ICD, identifies distinct prognostic outcomes for breast cancer patients[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5):1802-1809.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 谭永辉, 吕品, 聂盛丹, 等. 肝内胆管癌中ErbB4的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2):180-184. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.005

Cite this article as: TAN YH, LU P, NIE SD, et al. ErbB4 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(2):180-184. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.005