

文章编号:1005-6947(2005)02-0104-04

· 肝癌专题研究 ·

MRP1/CD9 蛋白在人肝细胞癌中的表达及其意义

张卫国¹, 王一², 吴伟清², 冼志红², 关新元³, 吴孟超²

(1. 解放军第一〇七中心医院 肝胆外科, 山东 烟台 264002; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院 上海 200438; 3. 香港大学, 香港特别行政区)

摘要:目的 探讨 MRP1/CD9 蛋白在人肝细胞癌(HCC)中的表达及其与癌侵袭转移的关系。方法 构建肝癌组织芯片。样本包括肝细胞癌及癌旁肝组织 152 例, 癌栓 22 例, 肝内转移癌 4 例, 肝外转移癌 17 例。正常对照肝组织 5 例。应用免疫组织化学(免疫组化)方法检测肝癌组织芯片中样本 MRP1/CD9 蛋白的表达。结果 27% (41/152) 肝细胞癌原发灶表达 MRP1/CD9 蛋白。伴癌栓形成 HCC 中 MRP1/CD9 蛋白表达率低于无癌栓形成者(分别为 21.82% 和 40.48%; $P < 0.05$)。巨块型肝癌中 MRP1/CD9 蛋白表达率亦低于直径在 10cm 以下者(分别为 5% 和 34.82%; $P < 0.01$)。MRP1/CD9 蛋白表达尚与 HCC 病理分级及血清 AFP 水平有关:病理分级 2 级的阳性表达率高于 3~4 级(分别为 39.02% 和 22.52%; $P = 0.043$), 血清 AFP $\leq 20 \mu\text{g/L}$ 者阳性表达率高于 $> 20 \mu\text{g/L}$ 者(分别为 41.94% 和 22.50%; $P = 0.029$)。结论 肝细胞癌 MRP1/CD9 蛋白表达水平低下可能与癌组织侵袭转移有关。

关键词: 肝肿瘤/病理学; 肝细胞癌/病理学; 基因表达; MRP1/CD9 蛋白

中图分类号: R735.7; R730.261

文献标识码: A

Significance of MRP1/CD9 protein expression in human hepatocellular carcinoma

ZHANG Wei-guo¹, WANG Yi², WU Wei-qing², XIAN Zhi-hong², GUAN Xin-yuan³, WU Meng-chao²

(1. Department of General Surgery, 107th Hospital of PLA, Yantai, Shandong 264002, China; 2. Eastern Hepatobiliary Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 3. Hong Kong University, Hong Kong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of MRP1/CD9 protein in human hepatocellular carcinoma (HCC), and its relationship to carcinoma invasion and metastasis. **Methods** The specimens of tissue microarray from 152 primary hepatocellular carcinomas with paracancerous liver tissue, 22 tumor emboli, 4 intrahepatic satellite metastases, 17 extrahepatic metastases, and 5 normal livers, respectively, were constructed and used for detection of MRP1/CD9 expression by immunohistochemistry. **Results** Immunohistochemical analysis of tissue microarrays demonstrated MRP1/CD9 protein expression in 27.0% (41/152) of the primary HCCs. The expression of MRP1/CD9 protein was higher in HCCs without cancer thrombi than in those with cancer thrombi (40.48% vs 21.82%, $P < 0.05$). MRP1/CD9 protein expression was also inversely correlated with the tumor size ($\leq 10 \text{ cm}$ vs $> 10 \text{ cm}$, $P < 0.01$), pathological grade ($P = 0.043$), and the serum level of AFP ($\leq 20 \mu\text{g/L}$ vs $> 20 \mu\text{g/L}$, $P = 0.029$). **Conclusions** Loss of MRP1/CD9 protein expression may be associated with invasion and metastases of hepatocellular carcinoma.

Key words: LIVER NEOPLASMS/pathol; HEPATOMY/pathol; GENES EXPRESSION; MRP1/CD9 PROTEIN

CLC number: R735.7; R730.261

Document code: A

收稿日期:2004-09-10; 修订日期:2004-12-20。

作者简介:张卫国(1970-),男,山东菏泽人,解放军第一〇七中心医院主治医师,主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者:张卫国 电话:13054560825(手机); E-mail:zhangwg1970@163.com。

MRP1/CD9 基因定位于人 12 号染色体 (12p13)。Boucheix 等^[1]报道克隆获得长 1.4 kb CD9 cDNA 片段,编码产物为一 227 个氨基酸的蛋白质,分子质量为 24 kD。该基因是跨膜 4 超家族 (transmembrane 4 superfamily, TM4SF) 成员之一,MRP1/CD9 蛋白表达与黑色素瘤^[2]、肺腺癌^[3]、乳癌^[4,5]等侵袭转移抑制相关。笔者应用组织芯片 (tissue microarray) 技术研究 MRP1/CD9 蛋白在人肝细胞癌 (HCC) 中的表达规律,初步探讨 MRP1/CD9 抑制肿瘤侵袭转移的分子机制。

1 资料与方法

1.1 标本及临床病理资料

全部标本 (200 份) 取自第二军医大学东方肝胆外科医院 1997 ~ 2000 年手术切除组织,包括肝细胞癌及癌旁肝组织 (距癌组织 3 ~ 10 cm, 镜下无癌) 152 例,癌栓 22 例 (18 例门静脉癌栓,3 例胆管癌栓,1 例肝静脉癌栓),肝内癌灶 4 例,肝外癌组织转移灶 17 例 (腹腔 7 例,网膜 4 例,腹壁 3 例,淋巴结 3 例)。肝海绵状血管瘤旁正常肝组织 5 例。152 例肝细胞癌中男 142 例,女 10 例,年龄 13 ~ 75 (平均 47) 岁。全部病例按 WHO 病理诊断标准及肝细胞癌 Edmondson Steiner 分级经两名病理医师独立诊断。

1.2 构建肝癌组织芯片

参照 Kononen 等^[6]介绍的方法。主要技术流程:选择所需病例的存档蜡块。对选出的所有蜡块制作新鲜 HE 切片,并进行形态学观察。选择具有代表性区域 (避开出血坏死及纤维化区),在相应蜡块上标记取材部位。应用组织芯片构建仪器 (美国制造) 穿取直径 0.6 mm,长约 2 ~ 3 mm 组织准确放入 4.5 cm × 2.5 cm × 1.5 cm 空白蜡块中,间距 0.3 mm。制备 5 μm 厚连续石蜡切片。HE 染色,以确定组织芯片中的组织样本及形态学表现。

1.3 免疫组织化学 (免疫组化) 染色

采用 EnVision 两步法。常规脱蜡水化,经含有 0.1% (v/v) Triton X-100 PBS 处理 15 min, 0.3% H₂O₂ 30 min, 1 mmol/L, pH 8.0 EDTA 修复 30 min, 10% 正常山羊血清处理 30 min。第一抗体 (一抗) 应用鼠抗人 MRP1/CD9 单克隆抗体 (30371A, PharMingen, 1:40), 4℃ 过夜。第二抗体 (二抗) 应

用 EnVision⁺™ 山羊抗鼠抗体 (K4001, DAKO), 37℃ 孵育 1 h, DAB 显色,苏木素复染。以抗体稀释液替代一抗作阴性对照。

1.4 免疫组化染色结果判断标准

细胞胞质出现淡黄色 ~ 棕黄色沉淀,即为阳性细胞。强阳性 (高表达): 细胞胞质出现棕黄色沉淀,或阳性细胞数 ≥ 50%; 弱阳性 (低表达): 细胞胞质出现淡黄色沉淀,或阳性细胞数 5% ~ 50%; 阴性: 细胞胞质无阳性着色,或阳性细胞数 < 5%。

1.5 统计学处理

两率的比较采用 χ^2 检验 (四格表资料校正公式) 或计算 Fisher 确切概率,多个率的比较亦采用 χ^2 检验 ($2 \times k$ 表资料中的 $r \times 2$ 计算公式)。

2 结果

2.1 MRP1/CD9 表达

MRP1/CD9 蛋白在正常肝细胞及癌旁肝细胞的胞质内呈弥漫性表达,而在癌细胞胞质内则呈片状或弥漫表达 (图 1, 2)。部分小胆管上皮亦呈阳性表达。5 例正常肝组织中 4 例表达强阳性、1 例弱阳性。152 例癌旁肝组织中 142 例强阳性,9 例弱阳性,1 例阴性。152 例原发癌中 17 例强阳性,24 例弱阳性,111 例阴性。22 例癌栓中 2 例强阳性,6 例弱阳性,14 例阴性;其中原发癌及癌栓均阴性 10 例,均阳性 4 例,仅原发癌阳性 4 例,仅癌栓阳性 4 例。17 例肝外转移癌中 1 例强阳性,2 例弱阳性,14 例阴性;其中原发癌及转移癌均阴性 12 例,仅原发癌阳性 2 例,仅转移癌阳性 3 例。4 例肝内卫星转移癌中 3 例弱阳性,1 例阴性;其中原发癌及肝内卫星转移癌均弱阳性 2 例,原发癌弱阳性肝内卫星转移癌阴性 1 例,原发癌阴性肝内卫星转移癌弱阳性 1 例。癌旁肝组织中 MRP1/CD9 蛋白表达率显著高于原发癌、癌栓及肝外转移癌 (分别为 99.35%, 26.97%, 36.36% 和 17.65%; χ^2 分别为 168.77, 89.75 和 116.99, 均 $P < 0.01$)。癌旁肝组织中 MRP1/CD9 蛋白强阳性表达率亦显著高于原发癌、癌栓及肝外转移癌 (分别为 93.46%, 11.18%, 9.09% 和 5.88%; χ^2 分别为 203.70, 90.55 和 83.96, 均 $P < 0.01$)。原发癌与癌栓及肝外转移癌之间、癌栓与肝外转移癌之间 MRP1/CD9 蛋白表达率差别均无显著意义 (均 $P > 0.05$)。

肝细胞胞质出现棕黄色颗粒,MRP1/CD9 蛋白强阳性表达($\times 200$)

图1 癌旁肝组织 MRP1/CD9 蛋白的表达

肿瘤细胞胞质出现棕黄色颗粒,MRP1/CD9 蛋白强阳性表达($\times 400$)

图2 肝细胞癌 MRP1/CD9 蛋白的表达

2.2 MRP1/CD9 蛋白表达与肝细胞癌临床病理特征的关系

伴癌栓形成 HCC 中 MRP1/CD9 蛋白表达率低于无癌栓形成者($P < 0.05$)。巨块型肝癌中 MRP1/CD9 蛋白表达率亦低于直径在 10cm 以下肝癌($P < 0.01$)。另外,MRP1/CD9 蛋白表达分别与 HCC

病理分级及血清 AFP 水平有关:病理分级 2 级阳性率远高于 3~4 级者($P < 0.05$);血清 AFP $\leq 20 \mu\text{g/L}$ 者阳性率远高于 $> 20 \mu\text{g/L}$ 者($P < 0.05$)。MRP1/CD9 表达率与肿瘤包膜、分型、肝内卫星灶形成及肝外转移等因素无关($P > 0.05$)(附表)。

附表 152 例 HCC 中 MRP1/CD9 蛋白的表达及其与临床病理特征的关系

分析指标	例数	MRP1/CD9 蛋白的表达			χ^2 值	P 值
		阳性例数	阴性例数	阳性率(%)		
病理分级						
2	41	16	25	39.02		0.043
3~4	111	25	86	22.52		
肿瘤直径(cm)						
≤ 10	112	39	73	34.82	11.84	< 0.01
> 10	40	2	38	5.00		
癌栓						
有	110	24	86	21.82	4.47	< 0.05
无	42	17	25	40.48		
AFP($\mu\text{g/L}$) [†]						
≤ 20	31	13	18	41.94		0.029
> 20	120	27	93	22.50		

注:†1 例 AFP 不详

3 讨论

transmembrane 4 superfamily (TM4SF), 又称 tetraspans transmembrane family (TSTF), 在结构上属于细胞膜糖蛋白的特殊家族。已有十多个家族成员被

鉴定,如 MRP1/CD9, CD37, CD53, CD63/ME491, CD81/TAPA-1, CD82/KAI1, CD151/PETA-3, CO-029 及 Sm23 均为该家族成员。它们结构上的共同点在于均有 4 个高度保守的跨膜区及数目不等的糖基化位点^[7]。TM4SF 在白细胞及许多哺乳动物

组织中均有不同程度的表达,其确切功能至今尚不清楚。已有许多研究表明,该家族对细胞增生、运动及黏附有重要影响。

据报道,MRP1/CD9 和 CD82/ KAI1 蛋白表达于正常前列腺上皮、食管上皮、肺泡细胞及胃肠道黏膜上皮细胞的胞膜,亦可表达于不同类型细胞的胞质^[8,9]。本研究显示,MRP1/CD9 和 CD82/ KAI1 蛋白在肝细胞内的表达定位相似^[10]:MRP1/CD9 蛋白在正常肝细胞、癌旁肝细胞胞质呈强阳性,而在肝细胞癌、癌栓及其转移癌主要呈弱阳性表达或不表达。

MRP1/CD9 蛋白表达与肿瘤侵袭转移抑制有关。如以 MRP1/CD9 转染黑色素瘤细胞可抑制其生长转移^[2]。MRP1/CD9 蛋白低表达与人肺腺癌^[3]及乳腺癌^[4,5]侵袭转移有关;MRP1/CD9 低表达或不表达肿瘤患者无病生存率及总体生存率低,术后早期复发率高。本研究显示,MRP1/CD9 蛋白表达分别与癌栓形成及病理分级有关。伴癌栓形成的 HCC 中 MRP1/CD9 蛋白表达率低于无癌栓形成者(分别为 21.82% 和 40.48%);病理分级 2 级 HCC 中 MRP1/CD9 蛋白表达率高于 3~4 级 HCC。但 MRP1/CD9 蛋白表达与肝内卫星灶形成及肝外转移等无关。目前研究表明,TM4SF 中部分成员对细胞增生、运动及黏附有重要影响,但其确切机制迄今未明。有研究表明,该家族可能通过整合素的介导发挥作用。Hirano 等^[11]发现,MRP1/CD9 对人滋养层样绒毛膜癌细胞系 BeWo 体外侵袭具有抑制作用,该作用部分由整合素亚单位 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 介导完成,而与整合素亚单位 $\alpha 3$ 作用无关。Park 等^[12]发现,MRP1/CD9 对子宫内膜癌细胞系体外侵袭特性的抑制作用部分由整合素亚单位 $\alpha 6$ 和 $\beta 1$ 介导完成,同样与整合素亚单位 $\alpha 3$ 作用无关。Serru 等^[13]研究表明,在众多 TM4SF 分子中,可能仅有 CD81 和 CD151 与整合素有直接作用(前者与整合素 $\alpha 4\beta 1$ 直接作用,后者则与整合素 $\alpha 3\beta 1$ 或 $\alpha 6\beta 1$ 直接作用),其他 TM4SF 分子(包括 MRP1/CD9, CD37, CD53, CD63/ME491, CD82/ KAI1 和 CO-029 等)则可能通过与 CD81 或 CD151 相互作用而间接影响整合素信号传导途径。

此外,Ono 等^[14]应用转染技术将 MRP1/CD9 或 CD82/ KAI1 cDNA 导入中国仓鼠卵巢巢突变细胞系 Idd,经过一定潜伏期后,仅有表达 MRP1/CD9 或 CD82/ KAI1 的细胞运动能力下降并出现大量凋亡,同时 CD82/ KAI1 发生高度 N-甲基化,MRP1/

CD9 N-甲基化程度相对较弱。提示 MRP1/CD9 和 CD82/ KAI1 抑制肿瘤恶性潜能的作用可能部分系通过诱导肿瘤细胞运动抑制和凋亡而实现的;MRP1/CD9 和 CD82/ KAI1 适度的甲基化可能增强这一诱导作用。

本研究表明:在肝细胞癌转移的早期,即局部侵袭阶段,MRP1/CD9 蛋白表达可能发生了一过性下调,从而丧失了抑制作用。

参考文献:

- [1] Boucheix C, Benoit P, Frachet P, *et al.* Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(1):117-122.
- [2] Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, *et al.* Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA [J]. *J Exp Med*, 1993, 177(13):1231-1237.
- [3] Higashiyama M, Doi O, Kodama K, *et al.* Immunohistochemically detected expression of motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) in lung adenocarcinoma and its relation to prognosis [J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(2):205-211.
- [4] Huang CI, Kohno N, Ogawa E, *et al.* Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(3):973-983.
- [5] Miyake M, Nakano K, Itoi SI, *et al.* Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(6):1244-1249.
- [6] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. *Nat Med*, 1998, 4(7):844-847.
- [7] Friess H, Guo XZ, Berberat P, *et al.* Reduced KAI1 expression in pancreatic cancer is associated with lymph node and distant metastases [J]. *Int J Cancer (Pred Oncol)*, 1998, 79(2):349-355.
- [8] Tagawa K, Arihiro K, Takeshima Y, *et al.* Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90(9):970-976.
- [9] Okochi H, Mine T, Nashiro K, *et al.* Expression of tetraspan transmembrane family in the epithelium of the gastrointestinal tract [J]. *J Clin Gastroenterol*, 1999, 29(1):63-67.
- [10] 张卫国,王一,吴伟清,等. KAI1/CD82 蛋白表达与肝细胞癌侵袭转移 [J]. *中华普通外科杂志*, 2002, 17(9):539-541.
- [11] Hirano T, Higuchi T, Katsuragawa H, *et al.* CD9 is involved in invasion of human trophoblast-like choriocarcinoma cell line, BeWo cells [J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(2):168-174.
- [12] Park KR, Inoue T, Ueda M, *et al.* Anti-CD9 monoclonal antibody-stimulated invasion of endometrial cancer cell lines in vitro: possible inhibitory effect of CD9 in endometrial cancer invasion [J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(8):719-725.
- [13] Serru V, Le-Naour F, Billard M, *et al.* Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions [J]. *Biochem J*, 1999, 340(1):103-111.
- [14] Ono M, Handa K, Withers DA, *et al.* Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(10):2335-2339.