

文章编号:1005-6947(2007)08-0813-04

· 简要论著 ·

# VCP 在肝细胞癌中的表达及临床意义

游燊<sup>1,2</sup>, 王志明<sup>1</sup>, 何晓顺<sup>2</sup>, 周乐杜<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 2. 中山大学附属第一医院 器官移植中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**为探讨 VCP(p97) 在肝细胞癌中的表达情况, 以及其与各临床病理指标、预后之间的关系。笔者采用免疫组织化学的方法检测 56 例肝细胞癌中 VCP 的表达情况, 分析肝癌细胞中 VCP 的表达与临床病理指标之间的关系; 并通过 43 例行根治性肝癌切除的随访, 探讨 VCP 的表达与复发转移及预后之间的关系。结果显示, 56 例肝细胞癌患者的肝癌组织中 33 例 VCP 呈阳性表达, 23 例 VCP 呈阴性表达。肝癌细胞中 VCP 表达与 pTNM 分期、静脉侵犯密切相关 ( $P < 0.05$ )。43 例行根治性肝癌切除的病例中, VCP 表达阳性的 1, 2 年复发率 (59.1%, 86.4%) 明显高于 VCP 表达阴性 (9.5%, 52.4%) 者 ( $P < 0.05$ ); VCP 表达阳性的 1, 2 年的生存率 (77.3%, 31.8%) 明显低于 VCP 表达阴性的 (100%, 81.0%) ( $P < 0.05$ )。提示 VCP 可促进癌细胞的血管侵犯, 可能以导致肝内转移有关, VCP 的表达与 pTNM 分期有关, VCP 高表达可能预示着肝癌的早期复发及预后不良。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(8): 813-816]

**关键词:** 癌, 肝细胞/病理学; 蛋白质 p97; 免疫组织化学; 复发; 预后

**中图分类号:** R 735.7

**文献标识码:** B

Valosin-Containing Protein (VCP, 又名 p97) 是近来新发现的一个可能预测肿瘤细胞的转移、复发以及预后的分子生物学指标。Yamamoto 等分别对胰腺癌<sup>[1]</sup>、肠癌<sup>[2]</sup>、胃癌<sup>[3]</sup>等多种上皮细胞肿瘤进行了研究, 在一定程度上揭示了 VCP 的表达与血管侵犯, 淋巴结的转移, 肿瘤病灶侵犯的深度等病理指标密切相关, 并且可成为判断以上多种肿瘤预后的相关因子。本研究主要是通过免疫组织化学的方法, 检测肝癌细胞中 VCP 的表达水平, 探讨其与静脉侵犯等多种临床病理指标, 以及肝癌的复发率和生存率之间的关系, 为判断 HCC 预后提供新的预测指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床病例标本的选择

收集 1999—2004 年 4 月湘雅医院手术切除并经病理确诊为肝细胞癌的手术标本 56 例。所有患者术前均未接受过任何治疗, 男 51 例, 女 5 例; 年龄 25~72 (平均  $49.72 \pm 21.51$ ) 岁。其

中 43 例为肝癌根治性切除患者。根治性标准<sup>[4]</sup>: 整块切除肿瘤包括邻近主瘤旁的卫星结节; 切缘和余肝无残癌结节; 门静脉主干及一级分支、肝总管及一级分支、肝静脉主干及下腔静脉无癌栓; 门静脉或肝管二级分支、肝静脉分支有癌栓, 但能包含在整块切除中。术后 2 个月影像学检查未见残余癌结节。

### 1.2 临床病理指标

临床病理指标包括: 性别、乙肝表面抗原、甲胎蛋白 (20 mmol/dl)、肿瘤直径、肿瘤结节数目、肿瘤组织分级、是否肝硬化、肝内静脉侵犯 (血管侵犯包括光镜下血管旁有癌细胞浸润伴血管内皮细胞染色不连续, 或肉眼管腔内有癌栓存在)、pTNM 分期 (2002 年新版的《恶性肿瘤 TNM 分类》)。

### 1.3 实验试剂

羊抗人 VCP 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 兔抗羊的 S-P 试剂盒 (北京中杉生物有限公司), DBA 显色试剂盒 (北京中杉生物有限公司)

### 1.4 标本的收集和处理

全部标本取自肝细胞癌组织, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋。4  $\mu\text{m}$  厚度切片备用, HE 染色确定病理组织学诊断, 观察临床病理特征。

收稿日期: 2007-05-14; 修订日期: 2007-08-14。

**作者简介:** 游燊, 男, 福建福州人, 中山大学附属第一医院器官移植中心博士, 主要从事肝脏外科方面的研究。

**通讯作者:** 王志明 E-mail: wangzhiming008@yahoo.com.cn

### 1.5 主要试验步骤

严格按照试剂盒说明书并固定由一人进行操作免疫组化

结果判断:光镜下观察,VCP染色主要定位于细胞浆,阳性细胞表现为细胞胞浆染成棕黄色。以肝癌组织中汇管区的血管内皮细胞染色为内参照,弱于血管内皮细胞染色为阴性细胞,等于或强于血管内皮细胞染色为阳性细胞<sup>[5]</sup>。评分标准:由2个观察者对切片进行盲式阅片,在显微镜100倍视野下观察,每张切片随机选择5个区域,根据棕黄色阳性信号的强弱和面积判断结果。(1)阳性细胞百分比:<1%为0,1%~10%为1,11%~30%为2,31%~60%为3,>60%为4;(2)阳性细胞染色强弱:阴性为0,淡黄色为1,黄色为2,棕黄色为3;两项相加的和即为该标本的免疫组化评分,评分0~2为阴性(-),3~7为阳性(+)

### 1.6 随访

随访时间截止日期为2005年5月1日,主要通过门诊定期复查、电话联系和发送随访调查表

等方式获得其术后复发/死亡资料,重点记录术后复发/死亡时间。术后复发以B超或CT影像诊断为准。

### 1.7 统计学处理

统计学处理采用SPSS11.0统计软件包辅助分析,计数资料均采用四格表资料 $\chi^2$ 检验或Fisher确切概率法,用Kaplan-Meire法计算复发率、生存率,绘制生存曲线。Log-Rank法计算组间差异,显著性差异水准 $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 肝癌细胞中VCP的表达及与肝癌临床病理因素之间的关系

在56例肝癌组织中33例(58.9%)VCP呈阳性表达(图1),23例(41.1%)VCP呈阴性表达(图2)。VCP表达与性别、乙肝表面抗原、甲胎蛋白、肿瘤直径、肿瘤结节数、肿瘤组织分级和是否肝硬化之间无关( $P > 0.05$ )。而与肝内静脉侵犯和pTNM分期密切相关( $P < 0.05$ )(表1)。

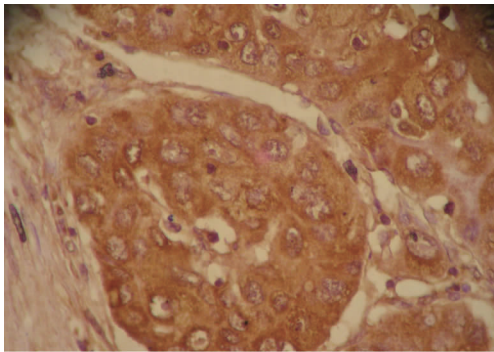


图1 VCP阳性表达( $\times 400$ )

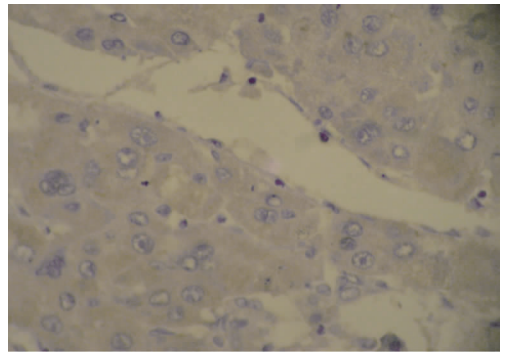


图2 VCP阴性表达( $\times 400$ )

表1 VCP表达与肝细胞癌临床病理因素之间关系

因素	总例数	VCP 阳性例数(阴性)	P 值	因素	总例数	VCP 阳性例数(阴性)	P 值
性别				肿瘤组织分级			
男	51	32(19)	1.000	I-II	18	9(9)	0.457
女	5	3(2)		III-IV	38	23(15)	
乙肝表面抗原				肝硬化			
阳性	47	30(17)	0.715	有	48	29(19)	0.696
阴性	9	5(4)		无	8	6(2)	
甲胎蛋白				静脉侵犯			
阳性	43	26(17)	0.747	有	13	12(1)	0.020
阴性	13	9(4)		无	43	23(20)	
肿瘤大小				pTNM分期			
$\leq 5.00\text{cm}$	17	8(9)	0.115	I-II	37	18(19)	0.003
$> 5.00\text{cm}$	33	27(12)		III-IV	19	17(2)	
肿瘤结节数							
单个	47	27(20)	0.132				
多个	9	8(1)					

## 2.2 VCP 表达与肝细胞癌的复发率和生存率之间关系

### 2.2.1 VCP 表达与肝细胞癌复发率之间关系

43 例根治性肝癌切除的病例中,VCP 的表达与肝细胞癌复发率之间有关,VCP 表达阳性的患者术后 1,2 年的复发率较表达阴性的患者明显升高 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 2 VCP 表达与肝细胞癌复发率之间关系

	总例数	1 年复发率	P 值	2 年复发率	P 值
阳性	22	59.1%	0.001	86.4%	0.022
阴性	21	9.5%		52.4%	

### 2.2.2 VCP 表达与肝细胞癌生存率之间关系

43 例中 VCP 的表达与肝细胞癌生存率之间存在密切关系。VCP 表达阳性的患者 1 年和 2 年的生存率较表达阴性的患者明显降低 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

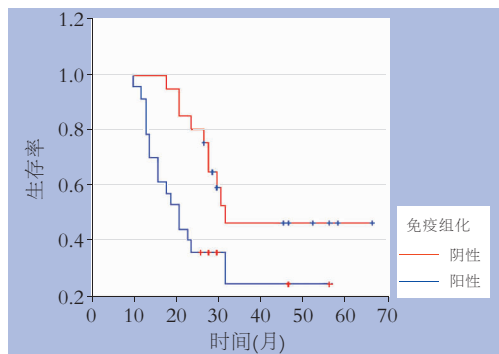


图 3 VCP 阳性表达与阴性表达的生存时间曲线

表 3 VCP 表达与肝细胞癌生存率之间关系

	总例数	1 年生存率	P 值	2 年生存率	P 值
阳性	22	77.3%	0.048	31.8%	0.001
阴性	21	100.0%		81.0%	

2.2.3 肝癌术后 VCP 阳性表达与阴性表达的生存时间、无瘤生存时间曲线 将 43 例肝癌根治术患者术后的随访资料经 Kaplan-Meier 法分析估计生存曲线,结果显示:VCP 表达阳性组平均生存时间为 26.7 个月,中位生存时间为 20 个月。VCP 表达阴性组平均生存时间为 43.8 个月,中位生存时间为 31 个月(图 3),Log-Rank 法检测有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示 VCP 阳性组的生存时间明显低于 VCP 阴性组。VCP 表达阳性组平均无瘤生存时间为 17 个月,中位无瘤生存时间为 11 个月。VCP 表达阴性组平均无瘤生存时间为 37 个月,中位无瘤生存时间为 19 个月(图 4),Log-Rank 法检测有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示 VCP 阳性组的无瘤生存率明显低于 VCP 阴性组。

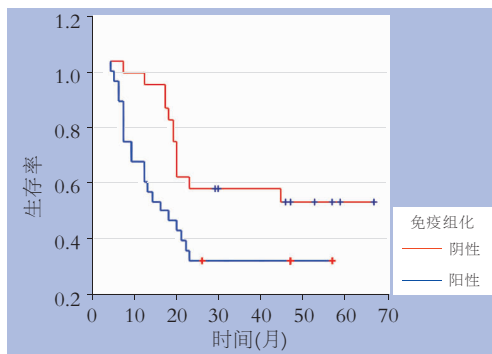


图 4 VCP 阳性表达与阴性表达的无瘤生存时间曲线

## 3 讨论

肝细胞癌是一种生长快,转移早,术后复发率高,预后极差的恶性肿瘤。如何有效的对肝癌术后患者进行监测,判断是否复发,以便尽早的干预,以提高生存率,是医学所面临的重要问题。目前临床上依据病理的 TNM 分期、肿瘤的大小、血管的侵犯以及肿瘤的结节数做为判定肝癌患者预后重要指标,对肝癌术后复发的监测则是通过定期的血清 AFP 值的<sup>[6]</sup>检测及影像学的诊断,但 AFP 的敏感性只有 33% ~ 65%<sup>[7]</sup>,因此需要其它的标志物进行辅助诊断。

VCP 是新发现的一种与多种上皮细胞肿瘤复发与预后密切相关的分子指标,Valosin 是一个具有 25 个氨基酸分子的多肽,VCP (Valosin-contain-

ing Protein) 在多种细胞中普遍存在,是一种对于细胞生存必不可少的蛋白质,在一些增生活跃的细胞中高度表达。它是 ATP 酶相关活性 (AAA) 超家族的成员,分子量为 97-kDa,在细胞活动中主要起着分子伴侣的作用,参与膜的融合、转录活性的调节、细胞周期的调节、内质网相关蛋白的降解及细胞的凋亡等生理病理过程<sup>[8]</sup>。

本组结果显示,VCP 在肝癌中的表达与性别、乙肝表面抗原、甲胎蛋白、肿瘤直径、肿瘤结节数和是否肝硬化等指标之间无关 ( $P > 0.05$ ),而与肝内静脉侵犯有密切有关 ( $P < 0.05$ ),在 13 例肉眼癌栓和镜下癌栓的病例中有 12 例 (92.3%) VCP 表达阳性,说明发生肝内静脉侵犯者 VCP 呈高表达,提示 VCP 可能参与了肝癌的侵袭转移。Yamamoto 等<sup>[5]</sup>对 170 例肝癌组织进行 VCP 表达

的检测,也发现 VCP 高表达的肝癌病人具有较高的门静脉侵犯潜能 ( $P < 0.01$ )。有学者<sup>[9]</sup>认为, VCP 促进肿瘤细胞的侵袭转移是通过 (Ub-Pr) 泛素蛋白酶降解途径,激活转录因子活性 (NF- $\kappa$ B),启动肿瘤基因的表达以及抑制细胞的凋亡等机制完成的。Asai 等<sup>[10]</sup>的实验显示,经 VCP 污染的肿瘤细胞所种植的动物具有更高的肺转移率。Tietze 等<sup>[11]</sup>研究表明:核转录因子 NF- $\kappa$ B 在肝癌细胞中甚至能够抑制电离辐射或药物所造成的细胞的凋亡。

本组资料显示,VCP 表达阳性的患者术后 1 年和 2 年的复发率升高,术后 1 年和 2 年的生存率降低,与表达阴性的患者比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。肝癌术后的生存时间曲线和无瘤生存时间曲线也显示:VCP 表达阳性的病例的生存时间和无瘤生存时间都明显低于 VCP 表达阴性者。此结果与 Yamamoto 等<sup>[5]</sup>研究结果一致。肝癌的侵袭转移是造成术后生存率降低,预后差的重要原因,而肿瘤的血管侵犯是导致转移的一个重要因素。VCP 则可能通过 NF- $\kappa$ B 进一步激活细胞黏附因子<sup>[12]</sup>等多种细胞因子,改变肿瘤细胞黏附性能,促进肿瘤内血管的生成,引起肝癌细胞侵犯血管,致使肿瘤肝内转移复发,转移,而致生存率降低。

总之,VCP 的过度表达可能预示着肝癌细胞具有肝内血管侵犯的高转移高复发潜能,致其预后较差。因此 VCP 可能成为反映 HCC 复发转移能力及预后的新指标,以及为治疗 HCC 复发转移提供新的潜在治疗靶点。但都需要进一步的研究证实。

#### 参考文献:

- [1] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, *et al.* Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2004, 11 (2): 165 - 172.
- [2] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, *et al.* Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (2): 651 - 657.
- [3] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, *et al.* Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21 (13): 2537 - 2544.
- [4] 汤钊猷. 肝癌转移复发的基础与临床 [M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2003. 1.
- [5] Yamamoto S, Tomita Y, Nakamori S, *et al.* Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21 (3): 447 - 452.
- [6] 常实, 汤恢煥, 龚学军, 等. 原发性肝癌组织 VEGF 与外周血 AFPmRNA 检测的临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (3): 205 - 208.
- [7] 汤钊猷, 余业勤. 原发性肝癌 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 169 - 172.
- [8] Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, *et al.* VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration [J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8 (10): 977 - 984.
- [9] Song EJ, Yim SH, Kim E, *et al.* Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25 (6): 2511 - 2524.
- [10] Asai T, Tomita Y, Nakatsuka S, *et al.* VCP (p97) regulates NFkappaB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93 (3): 296 - 304.
- [11] Tietze MK, Wuestefeld T, Paul Y, *et al.* I kappaBalpha gene therapy in tumor necrosis factor-alpha- and chemotherapy-mediated apoptosis of hepatocellular carcinomas [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7 (10): 1315 - 1323.
- [12] 王鲁, 汤钊猷, 孙惠川, 等. 肝细胞癌中 NOS 和 VEGF 的表达及其与肿瘤血管的关系 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2000, 22 (4): 301 - 303.