



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.013
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.013
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(7):1011-1016.

· 基础研究 ·

抑癌基因 Merlin 与干细胞标记物 Nanog 在肝细胞癌中表达的关系及意义

欧阳锡武¹, 冯铁诚¹, 张赛², 陶一明¹, 王志明¹

(中南大学湘雅医院 1. 肝脏外科 2. 医学科学研究中心, 湖南长沙 410008)

摘要

目的: 探讨肝细胞癌(HCC)抑癌基因失活与肝癌干细胞(LCSC)的关系及其临床意义。

方法: 用免疫组化法检测116例HCC组织标本中抑癌基因Merlin与LCSC表面标记物Nanog的蛋白表达,分析两者的表达与HCC患者临床病理因素及预后间的关系。

结果: 按X-tile软件计算得出的Merlin与Nanog表达量的分界值,116例HCC中Merlin低表达者92例(79.3%),高表达者24例(20.7%);Nanog高表达者36例(31.0%),低表达者80例(69.0%)。单因素分析显示,分化较差,有卫星灶、静脉浸润、出血坏死的HCC组织中Merlin低表达,而Nanog高表达(均 $P<0.05$);多因素分析显示,Merlin低表达和Nanog高表达是HCC术后存活和复发的独立的预测指标(均 $P<0.05$)。将患者分为低危组(Merlin高表达并Nanog低表达)、中危组(Merlin高表达并Nanog高表达或Merlin低表达并Nanog低表达)、高危组(Merlin低表达并Nanog高表达)分析,3组患者的术后总体生存率(低危组>中危组>高危组)和复发率(低危组<中危组<高危组)差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

结论: 抑癌基因Merlin失活与Nanog高表达有一定关系,两者的消长与HCC患者预后密切相关。

关键词

肝肿瘤; 癌, 肝细胞; 基因, 肿瘤抑制; 肿瘤干细胞
中图分类号: R735.7

Relationship between expressions of cancer suppressor gene Merlin and stem cell marker Nanog in hepatocellular carcinoma and the significance

OUYANG Xiwu¹, FENG Tiecheng¹, ZHANG Sai², TAO Yiming¹, WANG Zhiming¹

(1. Department of Liver Surgery 2. Research Institute of Medical Sciences, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract

Objective: To investigate the relationship between inactivation of cancer suppressor gene and liver cancer stem cells (LCSC) in hepatocellular carcinoma (HCC) and the clinical significance.

Methods: The protein expressions of cancer suppressor gene Merlin and LCSC surface marker in 116 specimens

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(81372631);中南大学湘雅医院2014年度临床科研基金资助项目(2014L07);湖南省发改委科研基金资助项目(湘发改高技[2013]1199);“湘雅临床大数据系统”资助建设项目(22)。

收稿日期: 2016-05-04; **修订日期:** 2016-06-16。

作者简介: 欧阳锡武,中南大学湘雅医院硕士研究生,主要从事肝细胞癌外科临床与基础方面的研究。

通信作者: 王志明, Email: wzmxyesu@hotmail.com

of HCC tissue were determined by immunohistochemical staining, and then the relations of their expressions with clinicopathologic factors and prognosis of HCC patients were analyzed.

Results: According to the cut-off values of Merlin and Nanog expression levels calculated by X-tile software, in the 116 HCC patients, 92 cases (79.3%) had low Merlin expression and 24 cases (20.7%) had high Merlin expression; 36 cases (31.0%) had high Nanog expression and 80 cases (69.0%) had low Nanog expression. Univariate analysis showed that HCC tissues with poor differentiation, satellite lesions, venous invasion or hemorrhagic necrosis had low Merlin but high Nanog expression (all $P < 0.05$). Multivariate analysis showed that low Merlin expression and high Nanog expression were independent predictors for postoperative survival and recurrence (both $P < 0.05$). After the patients were divided into low risk group (high Merlin and low Nanog expression), medial risk group (high Merlin and high Nanog expression or low Merlin and low Nanog expression) and high risk group (low Merlin and high Nanog expression), the analysis demonstrated that both overall survival rate (low risk group > medial risk group > high risk group) and recurrence rate (low risk group < medial risk group < high risk group) were statistically different among the three groups (all $P < 0.05$).

Conclusion: Inactivation of Nanog protein expression is related to inhibition of tumor suppression gene Merlin, and their increase and decrease are closely linked to the prognosis of HCC patients.

Key words Liver Neoplasms; Carcinoma, Hepatocellular; Genes, Tumor Suppressor; Neoplastic Stem Cells

CLC number: R735.7

抑癌基因的失活是导致肝细胞癌 (HCC) 发生的重要分子机制之一^[1]。肿瘤干细胞学说认为, 肝癌干细胞 (LCSC) 在 HCC 的发生发展中具有重要作用^[2]。目前研究^[3]结果显示, LCSC 表面标记物 Nanog 表达上调促进了 HCC 发生发展, 并与抑癌基因失活具有一定内在关系^[4]。Merlin (或称 Schwannomin) 蛋白为至今被证明的第一种具有肿瘤抑制作用的蛋白质^[5]。笔者前期研究^[6-7]发现 Merlin 在 HCC 组织和细胞系表达下调具有潜在抑癌基因功能。目前有关 LCSC 表面标记物联合抑癌基因在肝癌中的表达及预后鲜见报道。本文回顾性分析 2010 年 2 月—2010 年 10 月间 116 例 HCC 病例, 采用免疫组织化学方法联合检测癌组织中 Merlin、Nanog 蛋白表达, 并分析两者与 HCC 临床病理因素及其预后的关系。旨在探讨抑癌基因与 LCSC 表面标记物在 HCC 中的表达及关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2010 年 2 月—2010 年 12 月间, 收集湘雅医院肝脏外科肝切除治疗 116 例 HCC 患者临床资料, HCC 确诊根据 2010 年版世界卫生组织 (WHO) 病理诊断标准^[8]。其中男 93 例, 女 23 例; HBsAg 阳性者为 97 例 (83.6%); 肿瘤最大直径 ≤ 5 cm 36 例,

>5 cm 80 例。HCC 出血坏死表型界定参照笔者以前的文献^[9]报道, 有出血坏死者为 79 例, 无出血坏死者为 37 例。

1.2 免疫组化

所有标本常规石蜡包埋制成 4 μ m 厚连续切片。采用免疫组织化学 SP 法检测 Merlin 和 Nanog 蛋白表达 (抗体购自英国 Abcam 公司, 工作浓度 1:500) 在 HCC 中的表达, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。操作步骤按照免疫组织化学 SP 试剂盒的说明书 (福州迈新生物技术公司)。免疫染色评分标准参照我们以前的文献报道^[10]。

1.3 Merlin 与 Nanog 蛋白表达量分界值的选取

采用 X-tile 3.6.1 软件 (Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA)、最小 P 值法 (minimum/optimal P value) 确定的最佳分界点作为患者分组标准^[11-12]。癌组织中 Merlin 和 Nanog 蛋白表达水平分为低表达组及高表达组。

1.4 随访和观察指标

所有患者均每隔 2~3 个月复查胸片、AFP 及肝脏超声检查, 2 年后复查门隔延长至 6 个月。对有可疑复发病灶行增强 CT 及 MRI 检查。116 例患者中位随访期 16.5 (3~36) 个月。观察总体生存率和无瘤生存率。

1.5 统计学处理

半定量资料组间比较采用 Mann-Whitney U 检

验。采用Kaplan-Meier法计算总体生存率和无瘤生存率, Log-Rank法比较总体生存率和无瘤生存率之间的差异。以上统计均采用SPSS 18.0软件进行分析。

2 结果

2.1 Merlin 和 Nanog 蛋白在肝癌组织中的表达

免疫组化显示, 癌组织标本中, Merlin蛋白染色阳性细胞主要是HCC细胞胞浆(图1A), Nanog蛋白染色阳性细胞主要是HCC细胞胞核(图1B); Merlin表达水平低于邻近非癌肝组织($P<0.05$), 而Nanog表达水平高于邻近非癌肝组

织($P<0.05$)(图1C)。

2.2 Merlin 和 Nanog 表达水平与临床病理因素的关系

使用X-tile软件结合随访资料计算出癌组织标本中Merlin和Nanog蛋白的分界值, 进而把Merlin和Nanog蛋白的表达分成高表达组和低表达组(图2)。其中Merlin低表达组92例(79.3%), 高表达组24例(20.7%); Nanog高表达组36例(31.0%), 低表达组80例(69.0%)。

单因素分析结果显示, 分化较差、有卫星灶、镜下静脉浸润、出血坏死的HCC组织中Merlin的表达水平较低, Nanog的表达水平较高(均 $P<0.05$)(表1)。

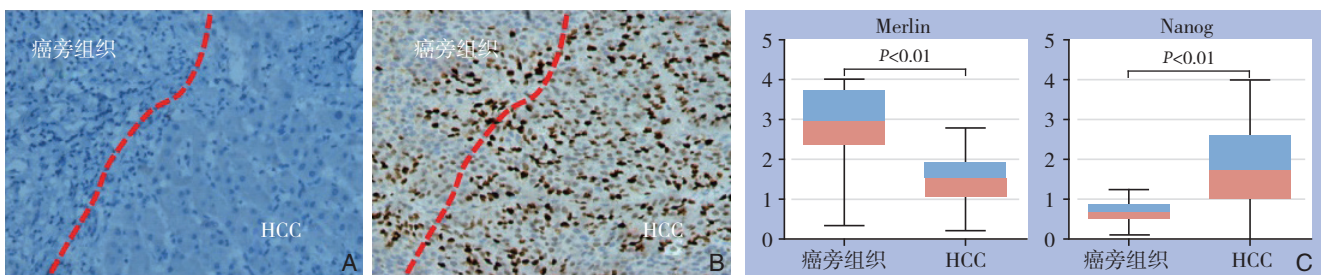


图1 免疫组化检测结果($\times 200$) A: Merlin 蛋白表达情况; B: Nanog 蛋白表达情况; C: 免疫组化评分比较
Figure 1 Results of immunohistochemical staining ($\times 200$) A: Merlin protein expression; B: Nanog protein expression; C: Comparison of scores of immunohistochemical staining

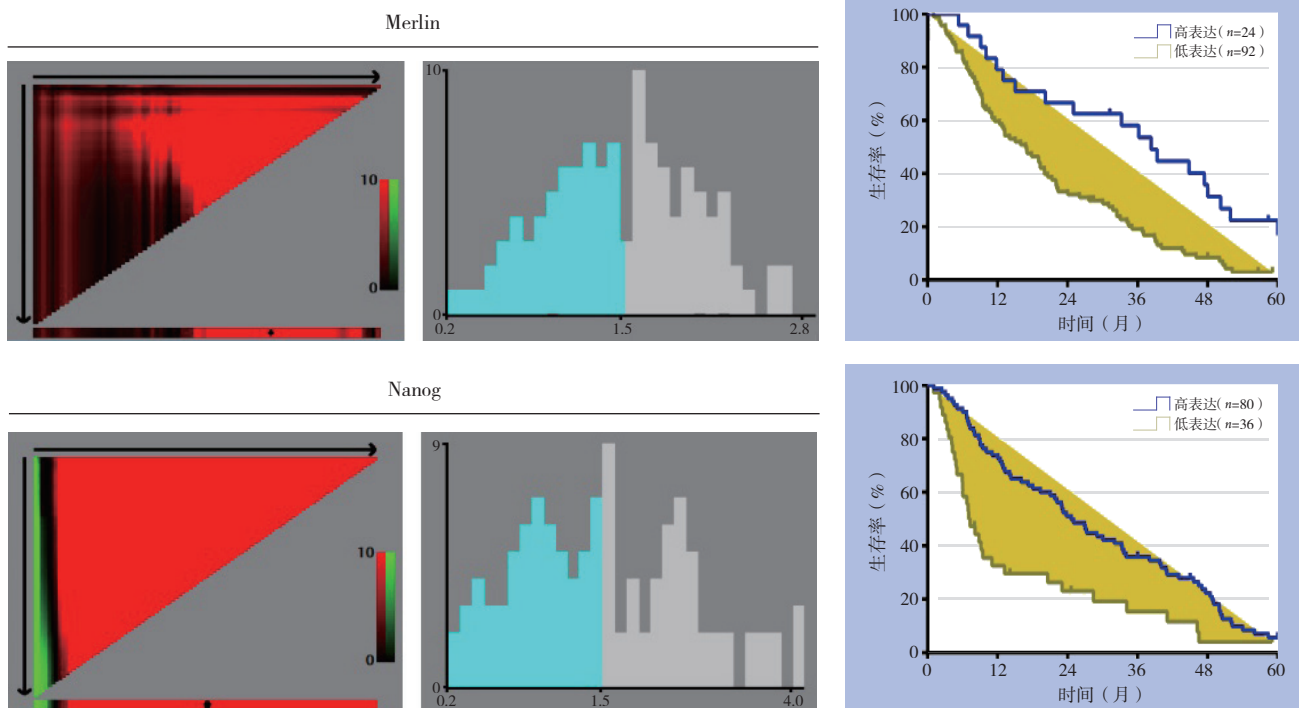


图2 X-tile 软件确定 Merlin 和 Nanog 蛋白表达水平基于总体生存率的分界值
Figure 2 Cut-off values of Merlin and Nanog expression levels calculated by X-tile software based on overall survival data

表 1 Merlin 与 Nanog 蛋白表达与 HCC 临床病理特征的关系 [n (%)]

Table 1 Relations Merlin and Nanog expressions with clinicopathologic characteristics of HCC [n (%)]

Table with 14 columns: Clinical Feature, n, Merlin (Low, High, P), Nanog (Low, High, P). Rows include Age, Sex, Liver Surface Antigen, White Protein, Child's Grade, AFP, Liver Cirrhosis, Tumor Size, Tumor Number, Tumor Capsule, Satellite Nodules, Venous Invasion, Differentiation Degree, Blood Vessel Invasion, TNM Stage, BCLC Stage.

2.3 Merlin 和 Nanog 表达水平与 HCC 患者预后的关系

在单因素生存分析中，性别，白蛋白水平，有无肝炎史，有无肝硬化等对总体生存率和无瘤

生存率均无统计学意义 (均P>0.05)，未纳入多因素分析。多因素分析显示，Merlin低表达和Nanog高表达是HCC术后存活率的独立的预测指标 (均P<0.05) (表2)。

表 2 116 例 HCC 单因素和多因素分析生存复发风险因素

Table 2 Univariate and multivariate analyses of factors associated with survival and recurrence in the 116 HCC patients

Table with 9 columns: Variable, Survival Rate (Univariate P, Multivariate, CI), P, Recurrence Rate (Univariate P, Multivariate, CI), P. Rows include Liver Surface Antigen, White Protein, Child's Grade, Liver Cirrhosis, AFP, Tumor Size, Tumor Number, Capsule, Satellite Nodules, Venous Invasion, Differentiation Degree, Blood Vessel Invasion, TNM Stage, BCLC Stage, Merlin and Nanog expression, and Merlin and Nanog expression combined prediction.

根据患者Merlin与Nanog的表达情况,将患者分为:低危组(Merlin高表达并Nanog低表达)28例,中危组(Merlin高表达并Nanog高表达或Merlin低表达并Nanog低表达)50例,高危组(Merlin低表达并Nanog高表达)38例,3组患者

的术后总体生存率(图3A)与复发率(图3B)差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),总体生存率:低危组>中危组>高危组;复发率:低危组<中危组<高危组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

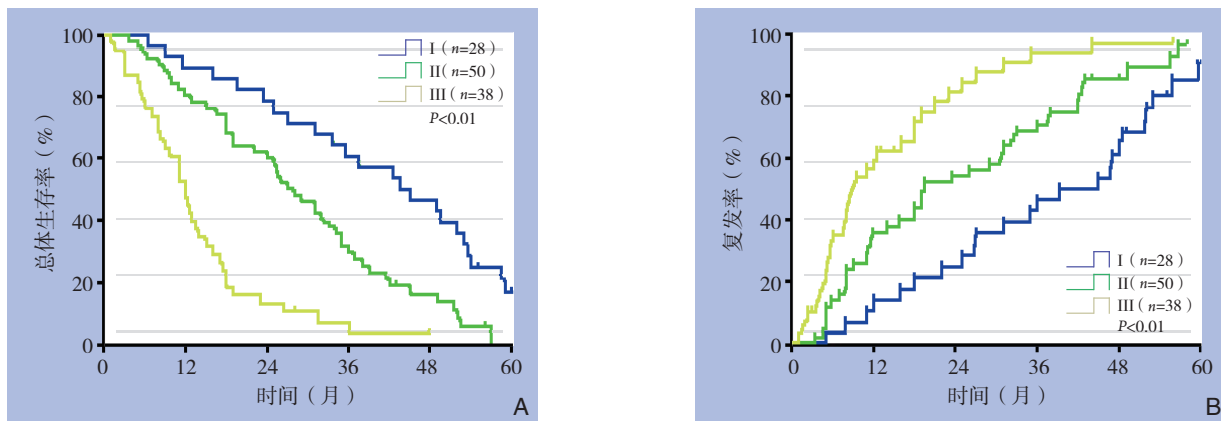


图3 Merlin 和 Nanog 蛋白表达与 HCC 预后的关系 A: 术后生存率; B: 复发率

Figure 3 Relations of Merlin and Nanog protein expressions with prognosis of HCC A: Postoperative survival; B: Recurrence rate

3 讨论

Merlin和HCC的发生具有密切的关系。近期研究^[13]显示,在肝脏特异性Merlin基因敲除鼠中,在发育的基因剔除小鼠会发生肝祖细胞(即肝卵圆细胞,OCs)过度增生,并最终基本全部发生HCC,且容易转移到肺,证明了Merlin基因在HCC的发生发展中具有关键的抑制作用。分子机制涉及:(1)肿瘤中Merlin其编码基因发生突变时,P21活化激酶(p21-activated kinase,PKA)调控Merlin分子自身在“开放”状态和“封闭”状态之间的转换^[14];(2)Merlin表达下降或缺失,转化生长因子 β (TGF- β)活化Wnt/ β -catenin信号通路;(3)Merlin蛋白通过折叠蛋白KSR1调节肿瘤抑制作用^[15];(4)活化FAK通路生长、增殖水平和迁移能力以及细胞与基质黏附能力。

此前人们已经发现Nanog不仅表达在胚胎原性肿瘤以及生殖细胞肿瘤中,而且在其他类型的肿瘤包括肝癌中均有表达^[3]。本研究免疫组化实验数据显示,大多数的肝癌患者样本中出现Merlin低表达和Nanog高表达,特别是在与低分化程度、出血坏死以及血管浸润的肝癌中。值得注意的是,肝癌中Merlin低表达和Nanog高表达与临床上的不良预后相关,提示其作为肝癌预后诊断的可能性。

将两种指标联合起来考虑后发现高表达干细胞标记物Nanog合并Merlin低表达患者术后生存曲线明显较干细胞标记物阴性表达且Merlin高表达组患者差。本研究结果表明,癌组织中Merlin与Nanog可作为判断HCC恶性程度及进展的指标。Merlin与Nanog水平与HCC患者术后复发和生存有关,两者联合检测可为HCC的早期诊断、进一步治疗及判断预后提供必要的理论依据。

参考文献

- [1] Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV-and HCV-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2):123-135.
- [2] 程康文,詹勇强,王成友,等. 肝癌干细胞标志物研究的进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1): 110-115.
Cheng KW, Zhan YQ, Wang CY, et al. Advances in research of liver cancer stem cell markers [J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(1):110-115.
- [3] Shan J, Shen J, Liu L, et al. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3): 1004-1014.
- [4] Song Y, Pan G, Chen L, et al. Loss of ATOH8 increases stem cell features of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(4):1068-1081.

- [5] Cocciaferro L, Miceli V, Granata OM, et al. Merlin, the product of NF2 gene, is associated with aromatase expression and estrogen formation in human liver tissues and liver cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016. [Epub ahead of print]
- [6] 胡宽, 陶一明, 黄云, 等. miR-342-5p 调控靶基因 Merlin 表达促进肝细胞癌侵袭转移的实验研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(9): 1200-1206.
- Hu K, Tao YM, Huang Y, et al. Enhancing effect of miR-342-5p on invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via regulating its target gene Merlin expression[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2014, 23(9):1200-1206.
- [7] Luo ZL, Cheng SQ, Shi J, et al. A splicing variant of Merlin promotes metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2015, 7(6):845-847.
- [8] Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. WHO classification of tumours of the digestive system[M]. Lyon: IARC Press, 2010:1089.
- [9] 陶一明, 王志明. 出血坏死表型肝细胞癌病理特征及预后的前瞻性初步研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):6-11.
- Tao YM, Wang ZM. Pathologic features and prognosis of hepatocellular carcinoma with hemorrhagic/necrotic phenotype: a prospective preliminary study[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):6-11.
- [10] Tao YM, Huang JL, Zeng S, et al. BTB/POZ domain-containing protein 7: Epithelial-mesenchymal transition promoter and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(6):2326-2337.
- [11] Pan C, Wang X, Chen W, et al. Reevaluation of glypican-3 as a prognostic marker in HCC using X-tile software[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1):1-7.
- [12] Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile a new bioinformatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(21):7252-7259.
- [13] Benhamouche S, Curto M, Saotome I, et al. Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(16):1718-1730.
- [14] Quan M, Cui J, Xia T, et al. Merlin/NF2 Suppresses Pancreatic Tumor Growth and Metastasis by Attenuating the FOXM1-Mediated Wnt/ β -Catenin Signaling[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(22):4778-4789.
- [15] Hanemann CO, Zhou L, Ammoun S, et al. Scaffold protein KSR1 is negatively regulated by merlin and promotes tumor development in merlin deficient tumors[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15 Suppl):704.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 欧阳锡武, 冯铁诚, 张赛, 等. 抑癌基因Merlin与干细胞标记物Nanog在肝细胞癌中表达的关系及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(7):1011-1016. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.013

Cite this article as: Ouyang XW, Feng TC, Zhang S, et al. Relationship between expressions of cancer suppressor gene Merlin and stem cell marker Nanog in hepatocellular carcinoma and the significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(7):1011-1016. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.013

我刊被《日本科学技术振兴集团（中国）数据库》（JSTChina）收录

据《日本科学技术振兴集团（中国）数据库》[JSTChina, Japan Science and Technology Agency (Chinese Bibliographic Database)]最新公布的名单显示,《中国普通外科杂志》被JSTChina收录。

日本科学技术振兴机构(Japan Science and Technology Agency, JST),是隶属于日本政府文部科学省的科学技术管理组织,是实施日本“科技立国”战略的核心力量,也是日本最重要的科技信息机构。JST由对应的中国部门数据库下载期刊的英文摘要,译成日文。JSTChina于2007年建立,不接受推荐期刊。机构每年向中国科学技术期刊编辑学会国际交流工作委员会提供当年计划收录的中国期刊名单。

中国普通外科杂志编辑部