



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.015
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.015
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(7):1023-1028.

· 基础研究 ·

NRAGE 在小肝细胞癌中的表达及临床意义

王秀秀¹, 隋柏强², 单连峰¹, 王桂杰¹

(1. 中国医科大学公共基础学院 数学教研室, 辽宁 沈阳 110122; 2. 中国医科大学附属第四医院 第二普通外科, 辽宁 沈阳 110032)

摘要

目的: 探讨 NRAGE 在小肝细胞癌中的表达情况及其临床意义。

方法: 采用免疫组化技术检测 160 例原发性小肝细胞癌组织及配对癌旁非癌组织中 NRAGE 的表达, 分析 NRAGE 表达与小肝细胞癌患者临床病理指标及预后的关系。

结果: NRAGE 在小肝细胞癌组织中阳性表达率明显高于配对癌旁组织 (63.13% vs. 14.38%, $P < 0.05$)。NRAGE 表达增高与患者年龄、术前 AFP 水平、完整包膜和复发密切相关 (均 $P < 0.05$)。单因素分析显示, 微血管癌栓、术前 AFP 水平、子灶、完整包膜、复发、浆膜浸润、巴塞罗那分期、分化程度和 NRAGE 表达是小肝细胞癌患者的预后影响因素 (均 $P < 0.05$)。多因素分析结果显示, NRAGE 表达与微血管癌栓、术前 AFP 水平、复发、巴塞罗那分期是影响小肝细胞癌患者预后的独立危险因素 (均 $P < 0.05$)。NRAGE 高表达小肝细胞癌患者 5 年生存率明显低于低表达患者 (35.63% vs. 54.23%, $P < 0.05$)。

结论: NRAGE 在小肝细胞癌组织中表达增高, NRAGE 高表达患者预后差。

关键词

癌, 肝细胞; 黑色素瘤特异性抗原; 预后

中图分类号: R735.7

NRAGE expression in small hepatocellular carcinoma and its clinical significance

WANG Xiuxiu¹, SUI Baiqiang², SHAN Lianfeng¹, WANG Guijie¹

(1. Department of Mathematics, School of Fundamental Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China; 2. Second Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110032, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression and clinical value of neurotrophin receptor-interacting melanoma antigen-encoding protein (NRAGE) in small hepatocellular carcinoma (HCC) and its clinical significance.

Methods: The NRAGE expressions in 160 specimens of small HCC tissue with paired adjacent non-tumorous tissue were determined by immunohistochemical staining. The relations of NRAGE expression with clinicopathological features and prognosis of small HCC patients were analyzed.

Results: The positive expression rate of NRAGE in small HCC tissue was significantly higher than that

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81372496); 辽宁省自然科学基金资助项目 (201102249)。

收稿日期: 2016-04-30; 修订日期: 2016-06-12。

作者简介: 王秀秀, 中国医科大学公共基础学院助教, 主要从事医学数学方面的研究。

通信作者: 王桂杰, Email: gjwang@mail.cmu.edu.cn

in adjacent tissues (63.13% vs. 14.38%, $P < 0.05$). NRAGE expression was significantly related to age, preoperative AFP level, complete capsule and recurrence (all $P < 0.05$). Univariate prognostic analysis showed that microvascular invasion, AFP level, childhood lesions, complete capsule, recurrence, serosal invasion, Barcelona stage, degree of differentiation and NRAGE expression were factors affecting the prognosis of small HCC patients (all $P < 0.05$), and multivariate prognostic analysis showed that NRAGE expression together with microvascular invasion, preoperative AFP level, recurrence, and Barcelona stage were independent risk factors for prognosis of small HCC patients (all $P < 0.05$). In addition, the 5-year survival rate of patients with high NRAGE expression was significantly lower than those with low NRAGE expression (35.63% vs. 54.23%, $P < 0.05$).

Conclusion: NRAGE expression is up-regulated in small HCC tissue, and patients with high NRAGE expression may have an unfavorable prognosis.

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Melanoma-Specific Antigen; Prognosis

CLC number: R735.7

原发性肝细胞癌是常见的恶性肿瘤之一，病死率在恶性肿瘤中位居第三位^[1]。由于对处在进展期或复发的肝细胞癌患者缺乏有效的治疗手段，肝细胞癌患者术后5年总生存率仅为15%~40%^[2]。小肝细胞癌早期症状不明显，待出现症状和体征时，大多已进入中晚期，因此，发现潜在的肿瘤标志物对于小肝细胞癌的早期诊断^[3]、判断预后^[4]有重要意义。NRAGE (neurotrophin receptor-interacting melanoma antigen-encoding protein) 属于黑色素瘤抗原家族D亚型，约含有778个氨基酸，分子量为86 kDa^[5-7]。NRAGE参与细胞增殖、凋亡过程^[8-9]，其作用存在组织特异性。在肺癌^[10]、食管癌^[11]中NRAGE表达增高，促进细胞增殖，起到促进肿瘤发生发展的作用。然而，有研究发现在胰腺癌^[12]、黑色素瘤^[13]、乳腺癌^[14]中NRAGE起到抑癌作用，抑制肿瘤发生发展。目前，NRAGE在小肝细胞癌发病机制中所起的作用并不清楚，有待进一步探讨。本文主要研究NRAGE在小肝细胞癌中的表达情况及其与临床病理指标之间的关系，并探讨其在小肝细胞癌预后中可能起的作用。

1 材料与方法

1.1 研究标本

收集整理2005年5月—2010年7月于中国医科大学附属第四医院第二普通外科行手术切除的小肝细胞癌组织病理石蜡标本，共计180例。纳入标

准：(1) 诊断为原发性小肝细胞癌；(2) 术前均未行放化疗，手术方式为根治性肝癌切除术，切缘均距肿瘤3 cm以上，术前、术中未见转移；(3) 患者的临床病理资料齐全。排除标准：(1) 原发性大肝癌，继发性小肝细胞癌；(2) 癌旁组织术后病理可见癌细胞；(3) 术前行放疗或化疗；(4) 患者生存期删失。其中，原发性大肝癌11例，继发性小肝细胞癌3例，术后病理见癌细胞1例，术前放化疗4例，生存期删失1例，累计20例。

1.2 免疫组化检测

小肝细胞癌组织标本应用4%的多聚甲醛固定15 min，石蜡包埋。切片后脱蜡水化。抗原修复采用枸橼酸钠缓冲液 (pH6.0)，水浴锅加热至95 ℃左右，放入标本切片加热8 min。一抗孵育 (兔多克隆NRAGE抗体，ab180841，Abcam公司)，4 ℃过夜。然后加入二抗 (山羊多克隆抗兔抗体，ab150077，Abcam公司) 室温下孵育30 min。PBS清洗标本3次，每次10 min。DAB显色约1 min。苏木素复染10 min。树胶封片，荧光显微镜下观察结果。为减少偏差，免疫组化结果至少被2名病理医生独立进行评估。根据染色程度分为0分 (0%)，1分 (1%~25%)，2分 (26%~50%)，3分 (51%~75%)，4分 (76%~100%)。每个标本被评估2次，得分相加，最后总得分0-3分被认为是NRAGE低表达，4-8分为NRAGE高表达。

1.3 随访

对所有患者进行随访，随访方式包括电话

随访和门诊随访。随诊内容包括腹部CT、AFP水平、血液检查等,怀疑复发时行增强CT扫描。随访至2015年5月1日,最短为3个月,最长为120个月,中位随访时间为51个月。

1.4 统计学处理

应用SPSS 19.0软件进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验, Kaplan-Meier生存曲线对NRAGE表达进行生存分析, Cox比例风险模型对预后进行单、多因素分析。 $P < 0.05$ 认为比较结果有差异,有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

按照纳入标准和排除标准筛选后共160名患者符合要求,其中男89例,女71例;年龄 ≥ 65 岁87例, < 65 岁73例;伴有肝硬化120例,无肝硬化40例;结节型83例,巨块型60例,弥漫型17例;

肿瘤 ≥ 3 cm 114例, < 3 cm 46例;伴有乙肝病毒79例,无乙肝病毒81例;Child-Pugh A级124例,B级36例;微血管有癌栓35例,无癌栓125例;术前AFP水平 ≥ 20 $\mu\text{g/L}$ 128例, < 20 $\mu\text{g/L}$ 32例;有子灶39例,无子灶121例;有完整包膜56例,无完整包膜104例;复发98例,无复发62例;伴有浆膜浸润103例,无浆膜浸润57例;巴塞罗那分期0+A期135例,B+C期25例;高分化62例,低中分化98例。

2.2 NRAGE在小肝细胞癌组织及配对癌旁组织中表达情况

NRAGE主要表达于细胞膜和细胞质中,高表达着色呈棕黄色,在部分小肝细胞癌组织可见低表达(图1)。在小肝细胞癌组织中NRAGE高表达率为63.13% (101/160),而在癌旁组织中高表达率为14.38% (23/160),差异有统计学意义($P < 0.05$) (表1)。

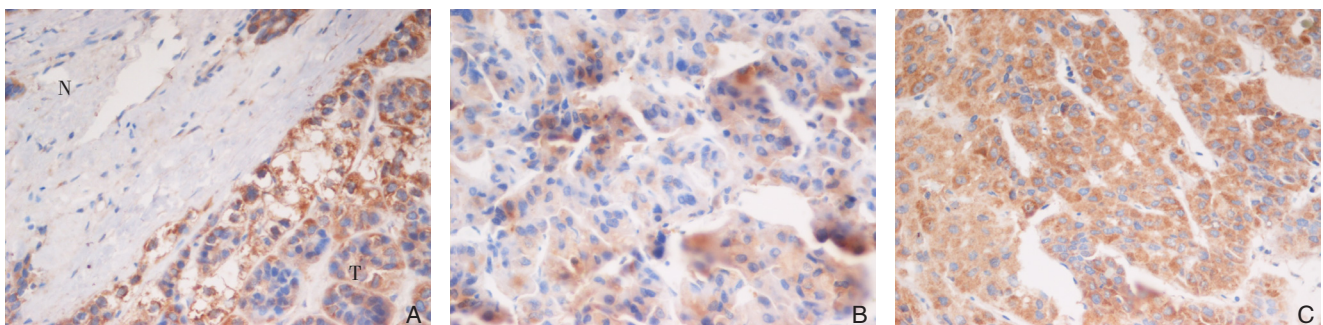


图1 免疫组化检测NRAGE表达($\times 400$) A: NRAGE表达在小肝细胞癌组织(T)与癌旁组织(N)中的表达; B: 小肝细胞癌组织中NRAGE低表达; C: 小肝细胞癌组织中NRAGE高表达

Figure 1 Immunohistochemical staining for NRAGE expression A: NRAGE expression in small HCC tissues (T) and adjacent non-carcinoma tissue (N); B: Low NRAGE expression in small HCC tissue; C: High NRAGE expression in small HCC tissue

表1 NRAGE在小肝细胞癌组织及配对癌旁组织中表达情况 [n (%)]

Table 1 NRAGE expressions in small HCC tissues and corresponding adjacent non-carcinoma tissues [n (%)]

组织	NRAGE 表达	
	高	低
肝癌组织	101 (63.13)	59 (36.88)
癌旁组织	23 (14.38)	137 (85.63)
χ^2	35.64	
P	< 0.05	

2.3 小肝细胞癌组织中NRAGE表达与临床病理指标的关系

分析NRAGE表达与小肝细胞癌临床病理指标的关系,结果发现NRAGE表达与年龄($P = 0.000$)、术前AFP水平($P = 0.001$)、完整包膜($P = 0.048$)和复发($P = 0.000$)有关,而与性别、肝硬化、大体分型、肿瘤大小、乙肝病毒、Child-Pugh分级、微血管癌栓、有无子灶、浆膜浸润、巴塞罗那分期和分化无关(均 $P > 0.05$) (表2)。

表 2 小肝细胞癌中 NRAGE 表达与临床病理指标的关系 [n (%)]

Table 2 Relations of NRAGE expression with clinicopathologic variables of small HCC [n (%)]

参数	n	NRAGE 表达		χ^2	P	参数	n	NRAGE 表达		χ^2	P
		高	低					高	低		
性别						术前 AFP ($\mu\text{g/L}$)					
男	89	53 (59.55)	36 (40.45)	1.101	0.188	≥ 20	128	89 (69.53)	39 (30.47)	11.284	0.001
女	71	48 (67.61)	23 (32.39)			< 20	32	12 (37.50)	20 (62.50)		
年龄 (岁)						子灶					
≥ 65	87	70 (80.46)	17 (19.54)	24.616	0.000	有	39	23 (58.97)	16 (41.03)	1.124	0.570
< 65	73	31 (42.47)	42 (57.53)			无	121	78 (64.46)	43 (35.54)		
肝硬化						完整包膜					
有	120	72 (60.00)	48 (40.00)	2.014	0.108	有	56	30 (53.57)	26 (46.43)	3.378	0.048
无	40	29 (72.50)	11 (27.50)			无	104	71 (68.27)	33 (31.73)		
大体分型						复发					
结节型	83	54 (65.06)	29 (34.94)	0.892	0.640	有	98	74 (75.51)	24 (24.49)	16.666	0.000
巨块型	60	38 (63.33)	22 (36.67)			无	62	27 (43.55)	35 (56.45)		
弥漫型	17	9 (52.94)	8 (47.06)			浆膜浸润					
肿瘤大小 (cm)						有	103	69 (66.99)	34 (33.01)	1.856	0.117
≥ 3	114	76 (66.67)	38 (33.33)	≥ 3	114	76 (66.67)	38 (33.33)	无	57		
< 3	46	25 (54.35)	21 (45.65)	< 3	46	25 (54.35)	21 (45.65)	巴塞罗那分期			
乙肝病毒						0+A	135	86 (63.70)	49 (36.30)	0.124	0.444
有	79	50 (63.29)	29 (36.71)	有	79	50 (63.29)	29 (36.71)	B+C	25		
无	81	51 (62.96)	30 (37.04)	无	81	51 (62.96)	30 (37.04)	分化			
Child-Pugh 分级						高	62	38 (61.29)	24 (38.71)	0.146	0.414
A	124	75 (60.48)	49 (39.52)	A	124	75 (60.48)	49 (39.52)	低+中	98		
B	36	26 (72.22)	10 (27.78)	B	36	26 (72.22)	10 (27.78)	微血管癌栓			
微血管癌栓						有	35	19 (54.29)	16 (45.71)	1.504	0.152
有	35	19 (54.29)	16 (45.71)	有	35	19 (54.29)	16 (45.71)	无	125		
无	125	82 (65.60)	43 (34.40)	无	125	82 (65.60)	43 (34.40)				

2.4 NRAGE 表达与小肝细胞癌预后的关系

应用Kaplan-Meier生存曲线分析小肝细胞癌中NRAGE不同表达组的5年生存率,发现NRAGE高表达组5年生存率明显低于低表达组(35.63% vs. 54.23%),差异有统计学意义($P=0.000$) (图2)。Cox比例风险模型进行单因素分析结果显示微血管癌栓($P=0.001$)、术前AFP水平($P=0.000$)、子灶($P=0.000$)、完整包膜($P=0.029$)、复发($P=0.000$)、浆膜浸润($P=0.018$)、巴塞罗那分期($P=0.000$)、分化程度($P=0.016$)和NRAGE表达($P=0.000$)是影响小肝细胞癌患者预后的因素。多因素分析结果显示微血管癌栓($P=0.005$)、术前AFP水平($P=0.003$)、复发($P=0.000$)、巴塞罗那分期($P=0.000$)和NRAGE表达($P=0.000$)是影响小肝细胞癌患者预后的独立危险因素(表3)。

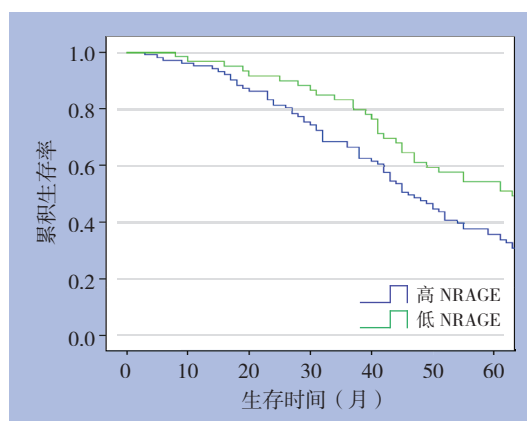


图 2 不同 NRAGE 表达水平小肝细胞癌患者生存率比较
Figure 2 Comparison of survival rate of patients with different NRAGE expression levels

表3 小肝细胞癌患者预后Cox比例风险模型分析

Table 3 Cox proportional hazards model analysis of prognostic factors for small HCC patients

参数	n	单因素生存分析			多因素生存分析		
		HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
女性	71	1.206	0.881~0.652	0.242	—	—	—
≥ 65岁	87	0.901	0.665~1.246	0.557	—	—	—
伴有肝硬化	120	0.920	0.640~1.323	0.654	—	—	—
结节型肝癌	83	1.121	0.880~1.427	0.355	—	—	—
≥ 3 cm	114	0.745	0.527~1.055	0.097	—	—	—
有乙肝病毒	79	0.946	0.693~1.293	0.729	—	—	—
Child-Pugh B级	36	1.398	0.962~2.031	0.079	—	—	—
有微血管癌栓	35	0.508	0.343~0.752	0.001	0.550	0.364~0.832	0.005
术前AFP ≥ 20 μg/L	128	2.442	1.578~3.777	0.000	2.085	1.295~3.357	0.003
有子灶	39	1.200	1.121~1.285	0.000	1.050	0.968~1.138	0.239
无完整包膜	104	1.446	1.039~2.011	0.029	0.476	0.080~2.820	0.414
复发	98	3.403	2.381~4.862	0.000	13.111	7.324~23.470	0.000
有浆膜浸润	103	1.487	1.070~2.065	0.018	2.791	0.470~16.574	0.259
巴塞罗那B+C期	25	7.174	4.400~11.698	0.000	3.517	1.926~6.422	0.000
低+中分化	98	1.490	1.077~2.062	0.016	0.987	0.686~1.421	0.945
NRAGE高表达	101	0.453	0.313~0.654	0.000	0.097	0.056~0.169	0.000

3 讨论

Salehi等^[15]应用双杂交技术首次发现NRAGE在介导交感神经前体细胞凋亡过程中起重要作用。NRAGE属于黑色素瘤抗原家族一员,这个家族主要编码肿瘤特异性抗原, NRAGE在不同肿瘤中的表达差异提示其在肿瘤发生发展过程中具有不同临床意义。NRAGE高表达通过改变胰腺癌细胞骨架和抑制癌细胞之间黏连抑制肿瘤转移^[12]。NRAGE可以负性调节受体酪氨酸激酶Ror2抑制黑色素瘤细胞转移^[13]。NRAGE表达增高可以抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭和转移能力^[14]。这表明NRAGE起到抑制肿瘤发展的作用。然而在食管癌中, NRAGE通过与PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 结合表达增高, 促进癌细胞增殖和迁移^[16], 并且NRAGE高表达增加食管癌抗辐射性^[17]。在非小细胞肺癌中, NRAGE通过JNK信号系统转录开始与肿瘤发生密切相关^[10]。这说明NRAGE在不同肿瘤中所起的作用具有组织特异性。

NRAGE在小肝细胞癌癌组织中表达明显高于癌旁组织, 这表明NRAGE高表达参与了小肝细胞癌的发生发展过程。NRAGE表达增高与小肝细胞癌患者年龄、术前AFP水平、完整包膜和复发密切相关。随着年龄增高, NRAGE表达越高, 与Shimizu等^[16]研究结果一致。NRAGE高表达与术前AFP增高一致, 可以同时检测帮助小肝细胞癌

患者进行早期诊断, 而且均是影响小肝细胞癌预后的独立危险因素, 说明NRAGE表达可能与AFP相关, 待进一步实验进行验证。无完整包膜患者NRAGE表达增高, 说明NRAGE高表达对判断小肝细胞癌进展有重要意义。值得注意的是, NRAGE在复发患者中表达高于无复发患者, 进一步研究发现在复发患者中, 以5年区分复发早晚, 复发时间越早NRAGE表达越高, 这提示我们检测NRAGE表达水平有助于了解小肝细胞癌患者术后复发的危险程度。

本研究多因素分析结果显示NRAGE表达是影响小肝细胞癌患者预后的独立危险因素。NRAGE高表达患者生存期明显缩短, 是负性预后影响因素。这些研究表明NRAGE作为小肝细胞癌促进因子, 可以作为判断小肝细胞癌患者预后的肿瘤标志物。

综上所述, NRAGE在小肝细胞癌的发生发展过程中起重要作用。NRAGE高表达与小肝细胞癌患者预后密切相关, 可以通过检测NRAGE表达, 结合微血管癌栓、术前AFP水平和巴塞罗那分期, 进行早期诊断, 预测小肝细胞癌患者预后, 指导术后进行辅助治疗。

参考文献

- [1] World Health Organization. GLOBOCAN2012: Estimated Cancer

- Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012[EB/OL]. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- [2] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2012, 379(9822):1245-1255.
- [3] 周俭, 肖永胜. 肝癌的转化医学研究——从基础到临床[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):1-5.
Zhou J, Xiao YS. Translational medical research of hepatocellular carcinoma: from bench to bedside[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):1-5.
- [4] 汪晋, 马金良. 肝癌预后相关影响因素[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2):270-274.
Wang J, Ma JL. Prognostic factors in liver cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(2):270-274.
- [5] Kao HY, Downes M, Ordentlich P, et al. Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(1):55-66.
- [6] Li J, Lin Q, Wang W, et al. Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(6):687-692.
- [7] Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, et al. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(15):1924-1935.
- [8] Feng Z, Li K, Liu M, et al. NRAGE is a negative regulator of nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells mediated through TrkA-ERK signaling[J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(8):1822-1828.
- [9] Salehi AH, Xanthoudakis S, Barker PA. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(50):48043-48050.
- [10] Lee D, Lee GK, Yoon KA, et al. Pathway-based analysis using genome-wide association data from a Korean non-small cell lung cancer study[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e65396. doi: 10.1371/journal.pone.0065396.
- [11] Yang Q, Ou C, Liu M, et al. NRAGE promotes cell proliferation by stabilizing PCNA in a ubiquitin-proteasome pathway in esophageal carcinomas[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(7):1643-1651.
- [12] Chu C, Xue B, Tu C, et al. NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer in vitro and in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2007, 250(2):268-275.
- [13] Lai SS, Xue B, Yang Y, et al. Ror2-Src signaling in metastasis of mouse melanoma cells is inhibited by NRAGE[J]. *Cancer Genet*, 2012, 205(11):552-562.
- [14] Du Q, Zhang Y, Tian XX, et al. MAGE-D1 inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(3):659-665.
- [15] Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, et al. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis[J]. *Neuron*, 2000, 27(2):279-288.
- [16] Shimizu D, Kanda M, Sugimoto H, et al. NRAGE promotes the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3):1847-1854.
- [17] Xue XY, Liu ZH, Jing FM, et al. Relationship between NRAGE and the radioresistance of esophageal carcinoma cell line TE13R120[J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(10):900-906.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 王秀秀, 隋柏强, 单连峰, 等. NRAGE在小肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(7):1023-1028. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.015

Cite this article as: Wang XX, Sui BQ, Shan LF, et al. NRAGE expression in small hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(7):1023-1028. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.015