

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.12.010

文章编号: 1005-8982(2017)12-0050-05

肝细胞癌患者 CNTN1 检测的临床意义

赵冀¹, 周超², 李宏敏³

(四川省人民医院 1.器官移植中心, 2.消化内科, 3.肿瘤科, 四川 成都 610072)

摘要:目的 检测肝细胞癌(HCC)患者肿瘤组织中接触蛋白 1(CNTN1)的表达水平,及其对患者疾病预后价值的分析。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western blot 检测 25 例新鲜 HCC 样本,以及邻近非肿瘤组织中 CNTN1 mRNA 和蛋白的表达,同时采用免疫组织化学法检测 135 例石蜡包埋 HCC 样本与邻近非肿瘤组织中 CNTN1 的蛋白表达,统计分析其表达与 HCC 患者临床病理特征的关系,采用 RNAi 技术干扰肝癌细胞系 HepG2 CNTN1 的表达,对其进行肿瘤细胞侵袭和转移能力检测。结果 25 例新鲜 HCC 样本 qRT-PCR 和 Western blot 检测结果表明,与邻近非肿瘤组织相比,HCC 组织中 CNTN1 mRNA 和蛋白表达均上调($P < 0.05$)。免疫组织化学法结果证实 62.22%(84/135)HCC 样本为 CNTN1 阳性,高于邻近非肿瘤组织 17.78%(24/135)($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析表明,CNTN1 阳性 HCC 患者无疾病生存率和总生存率低于阴性患者。CNTN1 表达与 HCC 患者肿瘤转移、乙型肝炎病毒感染、淋巴结肿瘤转移分期及肿瘤直径相关($P < 0.05$)。RNAi 实验表明,干扰 CNTN1 表达后 HepG2 细胞活力下降($P < 0.05$)。多重变量分析表明,CNTN1 表达是 HCC 患者无疾病生存期和总生存期的独立标志物($P < 0.05$)。结论 HCC 患者肿瘤组织中 CNTN1 蛋白表达上调,且其表达与肿瘤恶性状态密切相关,参与肝细胞癌的侵袭和转移,可以作为 HCC 患者疾病预后的独立标志物。

关键词: 接触蛋白 1;肝细胞癌;预后;生物标志物

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Feasibility of contactin 1 as a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma

Ji Zhao¹, Chao Zhou², Hong-min Li³

(1. Organ Transplantation Center; 2. Department of Gastroenterology; 3. Department of Oncology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the feasibility of contactin 1 (CNTN1) as a novel prognostic marker for epithelial hepatocellular carcinoma. **Methods** qRT-PCR and Western blot were performed to assess the mRNA and protein levels of CNTN1 in 25 matched fresh HCC specimens. The clinical and prognostic significance of CNTN1 in 135 cases of HCC was determined by immunohistochemistry. The correlations between CNTN1 expression and clinicopathological characteristics were analyzed. The expression of CNTN1 in HepG2 cells was interfered by RNAi technique, then the invasive and metastatic abilities of the HepG2 cells were determined. **Results** CNTN1 expression in the fresh HCC tissues was higher than that in the paracancerous tissues at both mRNA and protein levels ($P < 0.05$). Notably, immunohistochemical results revealed that CNTN1 expression significantly increased in the HCC compared to the adjacent tissues (62.22% vs 17.78%, $P < 0.05$). The vitality of HepG2 cells was significantly decreased after RNA interference ($P < 0.05$). Furthermore, positive CNTN1 expression was associated with tumor size, HBV infection, metastasis, and tumor-node-metastasis stage ($P < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that high CNTN1 was correlated with reduced overall survival (OS) rate ($P < 0.05$) and disease-free survival (DFS) rate ($P < 0.05$). Multivariate analysis identified CNTN1 as an independent poor prognostic factor of OS and DFS in HCC patients ($P < 0.05$). **Conclusions** Our results

suggest that CNTN1 expression is up-regulated in HCC and closely correlated with the invasion and metastasis of HCC. It can be served as an independent unfavorable prognostic marker for HCC.

Keywords: contactin 1; hepatocellular carcinoma; prognosis; biomarker

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)在全球常发恶性肿瘤中排第 5 位,在肿瘤病死率排第 3 位^[1]。我国乙肝患者数量较多,导致肝细胞癌高发^[2]。术后复发和肿瘤转移是导致 HCC 患者疾病预后不良的主要因素^[3]。接触蛋白 1(contactin 1,CNTN1)是免疫球蛋白超家族成员,属于糖基磷脂酰肌醇锚定的神经细胞黏附分子。报道表明,CNTN1 在胃癌、肺癌等恶性肿瘤中表达上调,且与上述肿瘤患者疾病发展、侵袭及转移密切相关^[4-6]。目前 CNTN1 在肝细胞癌中研究报道较少,本研究旨在检测 HCC 组织中 CNTN1 的表达水平及其对患者疾病预后价值的分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2010 年 1 月 -2012 年 12 月四川省人民医院收治的 135 例肝细胞癌患者,取其石蜡样本及相应的临近非肿瘤组织样本(距离肿瘤组织 >2 cm)。25 例新鲜样本采集后液氮浸泡,分别用于提取总 RNA 和蛋白。本研究纳入患者均通过病理检查确诊,临床样本采集及后续研究均获得患者同意和本院医学伦理审查。通过病历获取患者一般资料。

1.2 细胞及 RNAi 实验

人肝癌细胞(human hepatocellular carcinoma cell,HepG2)购自美国模式培养物保藏所,常规方法培养^[7]。分为正常组与 RNAi 组,RNAi 组干扰前将 HepG2 按 2×10^5 个/孔,铺 6 孔板,换无血清改良培养基,细胞汇合度达 40% 时进行干扰。根据 Lipofectamine 说明书将 siRNA duplex-Lipofectamine RNAi MAX 加入培养基。孵育 4 h 后,换成含 10% 胎牛血清培养基,干扰后测定细胞活力。CNTN1 靶标 siRNA 和阴性对照 siRNA 购自上海基因治疗有限公司。siRNA 正向引物:5'-GAUGGAAAGUGAG-GAAGACAGUAAU-3',反向引物:5'-AUUACUGUCU UCCUCACUUUCCAUC-3'; 阴性对照 RNA 正向引物:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反向引物:5'-AUUACUGUCU UCCUCACUUUCCAUC-3'。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应

采用 Trizol 方法提取组织总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度后,取 2 μ g 进行逆转录,生成 cDNA。采用 SYBR green 染料法进行实时荧光定

量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测,CNTN1 正向引物:5'-CCTAGTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3',反向引物:5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC-3'。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)基因为内参,GAPDH 正向引物:5'-CCTAGTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3',反向引物:5'-GCCAGTAGA GGCAGGGATGATGTTC-3'。扩增条件及计算方法参考文献[8]。

1.4 Western blot 检测

常规方法提取组织总蛋白,二喹啉甲酸方法测定蛋白质含量后,进行凝胶电泳,上样 20 μ g/孔,电转至聚偏氟乙烯薄膜上后,3%脱脂奶封闭 2 h,分布孵育抗人 CNTN1 和 GAPDH 一抗,4℃孵育过夜,三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline and tween 20,TBST)洗膜,孵育二抗后显影。采用 Quantity one 软件对条带亮度进行分析。

1.5 免疫组织化学法

采用常规方法制备 5 μ m 厚的石蜡切片,进行免疫组织化学法染色,在 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)热激 30 min 介导抗原复性,采用抗 CNTN1 单克隆抗体孵育,4℃过夜。洗涤后孵育二抗,加显色液后进行曝光。根据染色强度进行判定,总分 0~3 分,0 分为无染色,1 分为弱染色,2 分为中度染色,3 分为强染色。

1.6 细胞活力检测

取 1.2 中干扰后的 HepG2 细胞和 HepG2 细胞,按 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板,培养至细胞密度为 60% 时,换为无血清的达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium,DMEM),分别培养 8、24、48 和 72 h 后,按照 Presto blue cell viability rgnt 试剂盒(南京科佰生物科技有限公司)加入 Presto Blue 试剂,二氧化碳 CO₂ 培养箱 37℃孵育 10 min,取出 96 孔板酶标仪进行检测。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用独立 *t* 检验或重复测量设计的方差分析;计数资料以率表示,用 χ^2 检验;总生产率与无疾病生存率的评估用 Kaplan-Meier 检验,两组生存曲线的比较用 Log-rank 检验,多重

变量分析用 Cox 比例危险模型进行, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组与 RNAi 组不同时间细胞活力的比较

正常组与 RNAi 组在 8、24、48 和 72 h 细胞活力比较, 采用重复测量数据的方差分析, 结果: ①不同时间细胞活力比较, 差异有统计学意义 ($F = 17.841$, $P = 0.000$); ②正常组与 RNAi 组细胞活力比较, 差异有统计学意义 (除 8 h 时间) ($F = 91.561$, $P = 0.000$)。③正常组和 RNAi 组细胞活力变化趋势有差异 ($F = 15.215$, $P = 0.000$)。见表 1 和图 1。

2.2 CNTN1 mRNA 和蛋白的比较

采用 qRT-PCR 检测 25 对肝细胞癌样本和临近非肿瘤组织样本, 肝细胞癌 CNTN1 mRNA 表达量为 (7.22 ± 1.85), 与非肿瘤组织 (2.81 ± 1.42) 比较,

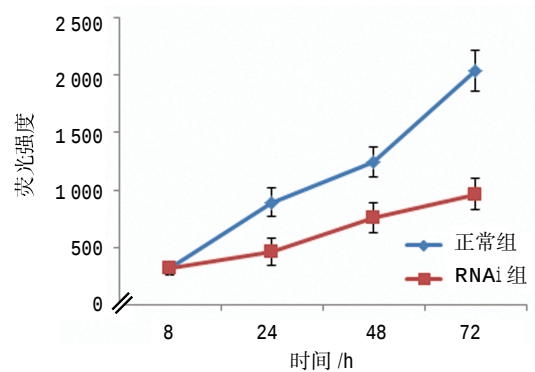


图 1 HepG2 细胞活力

差异有统计学意义 ($t = 0.236$, $P = 0.003$); Western blot 检测结果表明, 肝细胞癌 CNTN1 蛋白表达量为 (1.32 ± 0.61), 与非肿瘤组织 (0.83 ± 0.50) 比较, 差异有统计学意义 ($t = 0.416$, $P = 0.003$), 肝细胞癌高于与非肿瘤组织。见图 2、3。

表 1 两组不同时间细胞活力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	8 h	24 h	48 h	72 h
正常组	470.00 ± 13.64	820.00 ± 23.64	1320.00 ± 39.69	2120.00 ± 43.64
RNAi 组	468.00 ± 13.89	482.00 ± 25.67 [†]	760.00 ± 30.64 [†]	96.00 ± 33.56 [†]

注: [†] 与正常组比较, $P < 0.05$

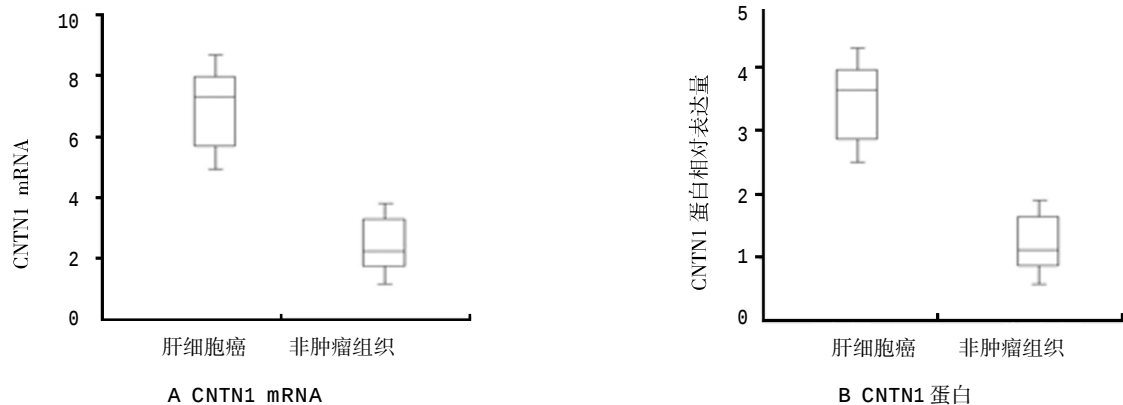


图 2 CNTN1 mRNA 和蛋白的表达

2.3 CNTN1 表达与 HCC 患者临床病理特征的关系

采用免疫组织化学法检测 135 例 HCC 样本 CNTN1 蛋白的表达, 62.22% (84/135) HCC 样本为 CNTN1 阳性, 高于临近非肿瘤组织的 17.78% (24/135) ($\chi^2 = 55.556$, $P = 0.005$)。CNTN1 表达与 HCC 患者肿瘤转移、乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染、肿瘤淋巴结转移 (tumor node metastasis, TNM) 分期及肿瘤直径相关 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 4。

2.4 CNTN1 表达与 HCC 患者疾病预后的关系

为进一步探讨 HCC 样本中 CNTN1 表达与患者

疾病预后的关系, 采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析其表达与患者随访总生存率及无疾病生存期的关系。CNTN1 阳性 HCC 患者的总生存期 ($19.96 \pm$

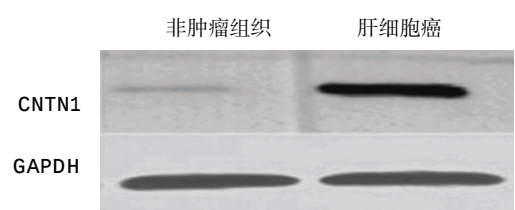


图 3 CNTN1 蛋白的表达

表 2 患者临床病理特征与 HCC 样本 CNTN1 表达的关系

临床病理特征	例数	CNTN1 表达 阳性 例(%)	χ^2 值	P 值
年龄				
≤55 岁	84	52(61.90)	0.891	0.363
>55 岁	51	32(62.75)		
性别				
男性	108	65(61.90)	0.124	0.075
女性	27	19(70.37)		
肿瘤直径				
≤4 cm	42	18(42.86)	0.102	0.004
>4 cm	93	66(70.97)		
肿瘤转移				
否	39	15(38.46)	0.345	0.028
是	96	69(71.88)		
HBsAg				
阳性	114	75(65.79)	0.453	0.006
阴性	21	9(42.86)		
TNM 分期				
I、II	47	20(42.44)	0.461	0.016
III、IV	88	64(72.73)		
AFP				
≤20 ng/ml	43	33(76.74)	0.572	0.063
>20 ng/ml	92	51(55.43)		
血管侵入				
是	33	16(48.48)	0.902	0.533
否	102	68(66.67)		
肝纤维化				
是	114	71(62.28)	0.683	0.074
否	21	13(61.90)		

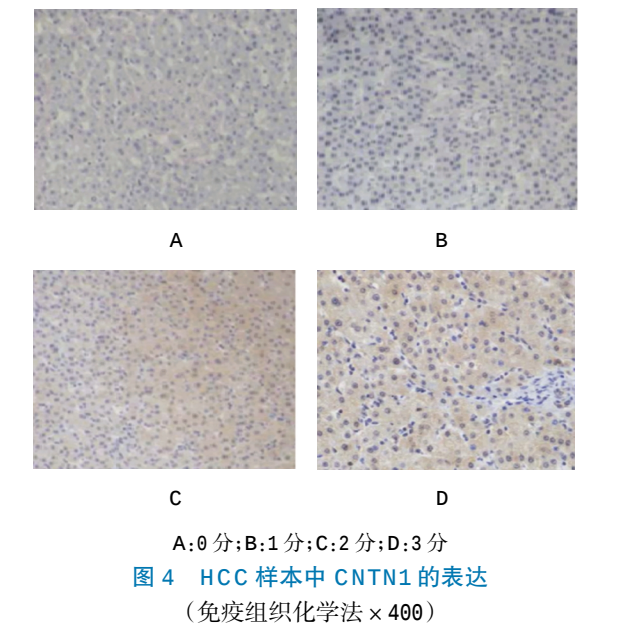


图 4 HCC 样本中 CNTN1 的表达
(免疫组织化学法 × 400)

9.39)个月低于阴性患者[(31.27 ± 11.45)个月]($P=0.006$)。此外 CNTN1 阳性 HCC 患者的无疾病生存期(13.61 ± 8.63)个月低于阴性患者[(24.51 ± 10.41)个月]($P=0.003$)。多重变量分析表明,CNTN1 表达是 HCC 患者总生存期[HR=2.383(95%CI:1.262,4.503) $P=0.003$]和无疾病生存期[HR=2.356(95%CI:1.370,4.049) $P=0.003$]的独立预后因素。见图 5。

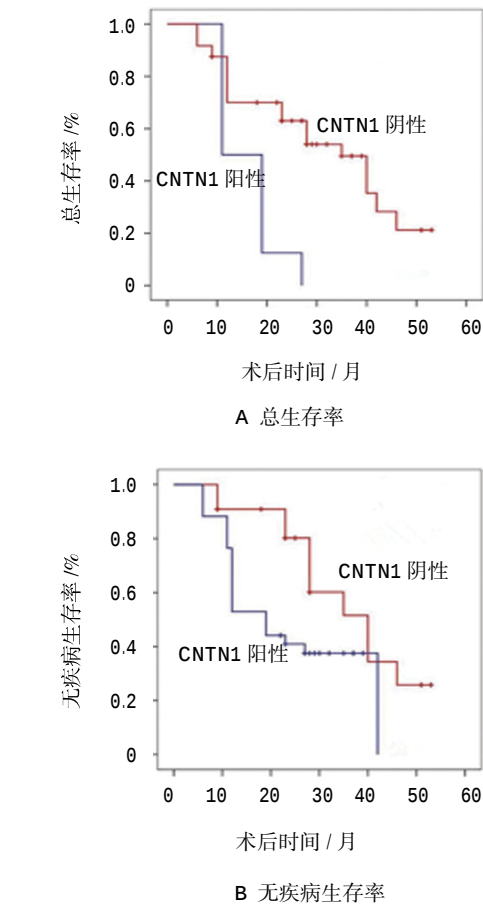


图 5 HCC 患者 CNTN1 表达的 Kaplan-Meier 生存曲线分析

3 讨论

CNTN1 与多种细胞表面蛋白相互作用,可能参与多种细胞表面信号转导^[9],其作为神经系统黏附分子,也参与肿瘤细胞的血管内皮生长因子 C/ 血管内皮生长因子受体 3 信号通路。研究表明,CNTN1 参与多种肿瘤细胞的侵袭和转移调节,CNTN1 基因敲除后能导致肺腺癌细胞转移抑制,增加负瘤小鼠的存活率^[10]。CNTN1 的肿瘤调节作用在多数人类恶性肿瘤中均有报道,而其在肝细胞癌发生、发展中的作用研究较少。

本研究表明,HCC 样本中 CNTN1 mRNA 和蛋

白表达均上调。RNAi 实验表明, HepG2 细胞在干扰 CNTN1 表达后, 细胞活力下降。本实验结果表明, CNTN1 表达上调与 HCC 患者肿瘤转移、HBV 感染、TNM 分期及肿瘤直径相关。此外, 免疫组织化学法染色证实 CNTN1 阳性患者的总生存率和无疾病生存率低于 CNTN1 阴性患者, CNTN1 表达是 HCC 患者疾病预后不良独立标志物。

尽管文献和本研究数据均证实 CNTN1 能促进肿瘤细胞侵袭和转移, 但是其中的调节机制目前尚不清楚, 笔者推测 CNTN1 可能通过激活 Akt 途径促进 HCC 发展。YAN 等^[6]采用 A549 细胞证实, CNTN1 能使 E-钙黏着糖蛋白表达下调, 且 Akt 激活在 CNTN1 下调 E-钙黏着糖蛋白表达过程中发挥重要作用。现有研究表明, HCC 肿瘤中 PI3K-Akt-mTOR 信号途径异常^[11-13]。ZHOU 等^[14]研究表明, 上述通路异常常导致 HCC 患者疾病预后不良。

本研究结果证实, HCC 患者肿瘤组织中 CNTN1 蛋白表达上调, 且其表达与肿瘤恶性状态相关, 参与肝细胞癌的侵袭和转移, 可以作为 HCC 患者疾病预后的独立标志物。

参 考 文 献:

- [1] 代佑果, 李为明, 唐辉蓉, 等. 生理性深层海水联合热疗治疗肝细胞癌的体外抑瘤研究[J]. 重庆医学, 2016, 7: 899-902.
- [2] 高会霞, 王彬, 周希山. VEGF-C、VEGFR-3 及 CNTN-1 的表达与胃癌淋巴结转移的关系[J]. 中国实用医药, 2013, 34: 123-124.
- [3] 亢舰, 丁千山, 戴金芬, 等. 干扰 AGXT2L1 表达对肝细胞癌细胞运动、迁移和侵袭能力的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2016, 3: 414-417.
- [4] YU J W, WU S H, LU R Q, et al. Expression and significances of contactin-1 in human gastric cancer [J]. Gastroenterol Res Pract, 2013, DOI: 10.1155/2013/210205.
- [5] LIU Y C, ZHAO J, HU C E, et al. Comprehensive analysis of vascular endothelial growth factor-C related factors in stomach cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15: 1925-1929.
- [6] YAN J, WONG N, HUNG C, et al. Contactin-1 reduces E-cadherin expression via activating AKT in lung cancer[J]. PLoS One, 2013, 8, DOI: 10.1371/journal.pone.0065463.
- [7] 李先建, 何剑波, 陈闯, 等. 水蛭素对肝细胞癌 HepG2 细胞抑制作用机制探讨[J]. 中国癌症防治杂志, 2016, 1: 7-11.
- [8] 吴生华, 俞继卫, 郑林海, 等. CNTN-1、VEGF-C 和 VEGFR-3 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 2: 142-148.
- [9] 李光耀, 龚卫东, 程亚, 等. CNTN-1 表达在肝癌术后早期复发中的预测价值[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 4: 587-591.
- [10] EDGE S B, BYRD D R, COMPTON C C, et al. The American joint committee on cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17: 1471-1474.
- [11] 张萌, 彭利, 乔治斌, 等. pAkt、Skp2 和 P27kip1 蛋白在肝细胞癌中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 11: 1283-1287.
- [12] 许秋然, 郑鑫, 咎献峰, 等. 胶质瘤相关癌基因 1 在肝细胞癌中的表达及其与 Shh、Vimentin、E-cad-herin 蛋白的相关性研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 5: 536-539.
- [13] 张萌, 彭利, 乔治斌, 等. PTEN、Akt 和 pAkt 蛋白在肝细胞癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 18: 1904-1910.
- [14] ZHOU L D, HUANG Y, LI J D, et al. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma[J]. Med Oncol, 2010, 27: 255-261.

(童颖丹 编辑)