

四跨膜蛋白 CO-029 在肝内胆管细胞癌中的表达及临床意义

赵鸣 李灼日 周开伦 陈良 王业鸿 武金才

【摘要】 目的 探讨四跨膜蛋白 CO-029 在人肝内胆管细胞癌中的表达及其临床意义。方法 应用蛋白印迹与实时-PCR 检测 20 例患者肝内胆管癌组织、相应癌旁组织及肝内胆管细胞癌细胞系 HCCC-9810 中 CO-029 的表达水平。应用组织芯片检测 40 例肝内胆管细胞癌病理标本中 CO-029 的表达,并分析其与肿瘤的临床病理特征及预后的关系。**结果** 蛋白印迹与实时-PCR 检测显示 CO-029 在 20 例肝内胆管癌患者组织中高表达,且表达水平明显高于相应癌旁组织,在 HCCC-9810 细胞系中亦显著高表达($P < 0.05$)。组织芯片检测显示 CO-029 阳性表达率为 65% (26/40)。按复发时间(TTR)分组,术后早期复发组(TTR < 1 年)CO-029 的表达明显高于未复发组(TTR ≥ 1 年),且 CO-029 表达与肿瘤包膜、肝门淋巴结转移、TNM 分期及预后密切相关($P < 0.05$)。**结论** CO-029 在胆管细胞癌组织中的差异表达与肿瘤复发转移及预后密切相关。

【关键词】 肝内胆管细胞癌; 四跨膜蛋白,CO-029; 复发转移; 预后

Expressions and clinical significance of tetraspanin CO-029 in intrahepatic cholangiocarcinoma Zhao Ming, Li Zhuori, Zhou Kailun, Chen Liang, Wang Yehong, Wu Jincai. Department of Hepatobiliary-Pancreatic Surgery, People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, China

Corresponding author: Li Zhuori, Email: lizhuori0898@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of tetraspanin CO-029 in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and to find out their clinical significance. **Methods** RT-PCR and western blot were used to detect the expressions of CO-029 in ICC and their matched para-tumorous tissues from 20 patients with ICC, as well as in the HCCC-9810 cell lines. The expressions of CO-029 were further detected via tissue microarray (TMA) in the pathological specimens of 40 patients with ICC. Correlations between the expressions of CO-029 and the clinicopathologic features and prognosis were analyzed. **Results** A high level of CO-029 was detected in the 20 patients with ICC and the HCCC-9810 cell lines via western blot and RT-PCR. Moreover, the expression levels of CO-029 in the ICC tissues were higher than the matched para-tumorous tissues ($P < 0.05$). TMA detection revealed the positive expression rate of CO-029 to be 65% (26/40). The expression level of CO-029 was much higher in the early recurrence group (Time to recurrence, TTR < 1 year) than the non-recurrence group (TTR ≥ 1 year). On analysis, the correlations were significant between the expressions of CO-029 and tumor encapsulation, hilar lymph node metastasis, TNM stage and prognosis ($P < 0.05$). **Conclusions** CO-029 was highly expressed in ICC. It had close correlations with recurrence, metastasis and prognosis of patients with ICC.

【Key words】 Intrahepatic cholangiocarcinoma; Tetraspanin, CO-029; Metastasis and recurrence; Prognosis

肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)为起源于肝内胆管上皮细胞的原发性腺癌,是肝脏常见恶性肿瘤之一。其发病率在原发性肝癌中居第二位,仅次于肝细胞癌。近年来,肝内胆管细胞癌发病率明显上升。ICC 起病隐匿,临床表

现缺乏特异性,大部分患者明确诊断时已为临床晚期,无法手术治疗,预后极差,是肝内原发肿瘤导致死亡的重要原因。因此,研究其生物学特性对改善肝内胆管细胞癌的预后意义重大^[1-2]。对肝内胆管细胞癌发病机制的探索,寻找提高早期诊断率和及时干预的方法,已成为肝内胆管细胞癌研究的重点。CO-029(或 TM4SF3, Tspan 8)是一种由 TSPAN8 基因编码的细胞膜蛋白,为四跨膜蛋白超家族(TM4SF)的重要成员之一。而四跨膜蛋白通过四跨膜蛋白网络(Tetraspanin Webs, TEM)产生的远大

DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2015.08.005

基金项目:国家自然科学基金项目(81160310、81260367);海南自然科学基金(812155、814318、811179);海南卫生厅项目(琼卫2011-1)

作者单位:570311 海口,海南省人民医院肝胆胰外科

通信作者:李灼日,电子邮箱:lizhuori0898@126.com

于或不同于单个蛋白或分子的作用,被视为“分子促进子”^[3]。其通过连接特异性的细胞表面蛋白增强功能性信号转导复合物的形成和稳定性,从而参与细胞的活化与增殖、黏附与迁移、分化与癌变等过程。目前研究显示,CO-029 在结肠癌、肝癌、食管癌、胃癌、胰腺癌等多种肿瘤中显著表达,且与肿瘤复发转移密切相关^[4-11]。我们前期研究显示,CO-029 蛋白在肝癌组织中的表达明显高于相应癌旁组织,且显著高表达于高转移潜能的肝癌细胞。下调其表达则对肝癌侵袭转移能力有明显抑制作用^[4]。目前,CO-029 在肝胆管细胞癌中的研究尚未见报道。本研究通过检测 CO-029 在肝内胆管细胞癌的表达水平,并进一步结合肿瘤临床病理特征,初步探讨了其在肝胆管细胞癌中的潜在临床价值。

资料与方法

1. 一般资料:(1)组织标本:本实验所用肝内胆管细胞癌组织及相应癌旁组织(20 例)标本来自海南省人民医院(以下简称“我院”)肝胆胰外科临床肿瘤标本库(以下简称“我科标本库”),均源自 2013 年间行根治性手术切除、经术后病理证实诊断的肝内胆管细胞癌患者。标本均在离体后 10 min 内采集,相应癌旁组织均取自距离肿瘤组织边缘 2 cm 以外区域。切取的新鲜组织分类收集标记基本信息后(癌组织为 TT,癌旁组织为 PT),迅速转移至液氮罐中暂存,全过程不超过 30 min,最后转移至我科标本库 -80 °C 冰箱保存备用。(2)病例标本:本实验所选病例的肝内胆管细胞癌组织及相应癌旁组织(40 例)来自我院病理科组织标本库,为 2010 年 4 月至 2013 年 11 月行根治性手术切除的肝内胆管癌患者。纳入标准:40 例标本均经术后病理确诊,所有患者术前未接受放、化疗,肿瘤完整切除,切缘无癌组织,局部受累淋巴结清扫,石蜡包埋完整的标本,且有完整临床及随访资料。肿瘤 TNM 分期参考国际抗癌联盟(Union For International Cancer Control, UICC)标准。其中男性 23 例,女性 17 例,并根据术后复发时间(Time to recurrence, TTR)分为早期复发组(TTR < 1 年,本组 25 例),未复发组(TTR ≥ 1 年,本组 15 例)。

2. 主要试剂及细胞培养:CO-029 兔抗人多克隆抗体(Anti-TM4SF3)购自英国 Abcam 公司,GAPDH 抗体购自美国 Chemicon 公司。CO-029 及 GAPDH 引物由美国 Invitrogen 公司合成。RNA 提取试剂 TRIzol、逆转录、聚合酶链反应试剂盒均购自

北京百泰克生物技术有限公司。蛋白印迹杂交显影化学发光显色系统购自美国 Pierce 公司。HCCC-9810 细胞系(货号: CX0133)购自武汉博士德生物科技有限公司,在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中培养。

3. 蛋白印迹分析:提取细胞总蛋白,12% 丙烯酰胺凝胶电泳后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,10% 脱脂奶粉封闭 1 h。一抗分别为 1: 200 稀释的 CO-029,1: 5 000 稀释的 GAPDH。二抗采用辣根过氧化物酶标记的 IgG,按 1: 1 000 稀释。PVDF 膜依次与抗体作用后,进行免疫印迹化学发光试剂(ECL)反应。X 线片曝光,显影、定影后分析图像。

4. 实时-PCR 检测:细胞总 RNA 提取参照 TRIzol 试剂盒说明书进行。CO-029 引物由美国 Invitrogen 生命科技公司设计、选择最佳引物合成,选取 GAPDH 基因作为内参照基因。CO-029 引物序列:上游引物:5'-ATAGATATCGACAAGCCTGTACCGAA-3',下游引物:5'-GATCTCGAGGTTCCGATCTGG-3'; GAPDH 引物序列:上游引物:5'-CCACTAGGCGCTCACTGTTCT-3',下游引物:5'-GCCAACTCACCCGTTGACT-3'。反应体系参照二步法反应试剂盒说明书。PCR 产物电泳后经凝胶图像分析仪进行积分吸光度分析并摄像。反应条件:94 °C 45 s,57 °C 40 s,72 °C 45 s,25 个循环。最后一次循环结束后,72 °C 延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下分析 PCR 结果。拍照后用图像分析仪分析 CO-029 带和 GAPDH 带的灰度,并计算两者的比值。

5. 组织芯片(TMA)制备:40 例标本石蜡块均由病理科阅片专家复诊及标本定位,应用组织阵列仪(ALPHELYS Tissue Array MiniCore)穿刺取样。随后将取样组织挤压到受体蜡块阵列孔中。4 μm 连续切片后展片置于载玻片上,贴片、烤片,创建胆管细胞癌组织芯片数张,操作过程严格按照说明书完成。

6. 免疫组织化学检测:采用链酶菌抗生物素蛋白-过氧化酶连结法(SP 法)进行免疫组织化学染色。实验步骤参照说明书进行。DAB 染色,苏木素复染,细胞膜见棕褐色颗粒为 CO-029 表达阳性细胞。评判标准:组织芯片上每样本孔选 5 个高倍视野,计算阳性细胞数占同类计数细胞百分比。将染色结果分为阴性和阳性,阳性细胞数 < 50% 为阴性,≥ 50% 为阳性。以 PBS 代替一抗作阴性对照,用已知阳性肝癌组织片作阳性对照。

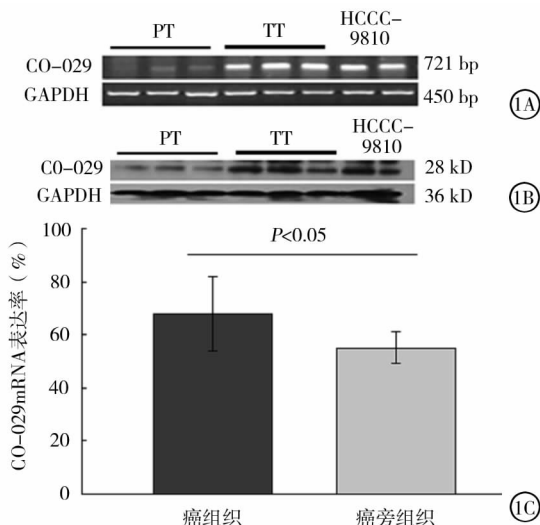
7. 统计学处理:采用 SPSS 18.0 统计学软件。计量资料进行 *t* 检验分析,计数资料组间分析采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 蛋白印迹与实时-PCR 检测 CO-029 在肝内胆管细胞癌组织、相应癌旁组织及 HCCC-9810 细胞系中的表达:CO-029 在肿瘤组织中的表达明显高于癌旁组织,在 HCCC-9810 细胞系中亦高表达(图 1A、1B)。实时-PCR 及蛋白印迹检测显示,CO-029 在 HCCC-9810 细胞中高表达,在 20 例胆管癌组织中亦显著表达,且与相应癌旁组织中的表达相比具有显著差异。灰度扫描分析癌组织及相应癌旁组织中 CO-029 表达发现:CO-029 在胆管细胞癌组织中的表达高于相应癌旁组织(图 1C, $P < 0.05$)。

2. 组织芯片(TMA)检测癌组织中 CO-029 的表达:组织芯片(TMA)检测显示,CO-029 阳性表达率为 65% (26/40)。CO-029 蛋白阳性染色主要见于肿瘤细胞膜,呈棕黄色均一染色,高表达者着色深呈深棕色。TMA 检测结果显示:癌组织和癌旁组织染色差异明显,癌组织中 CO-029 高表达,在相应的癌

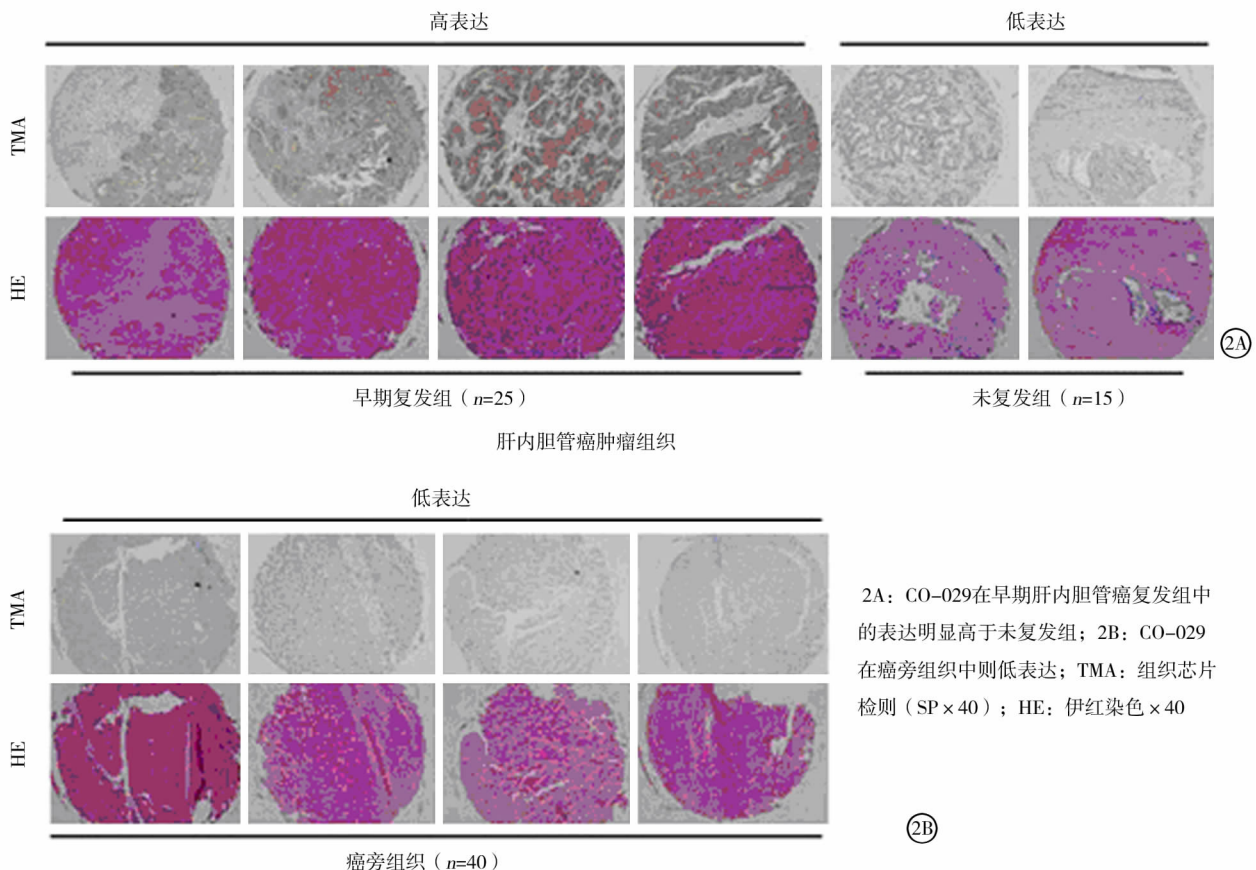
旁组织低表达(图 2A、2B)。



1A、1B 分别为实时-PCR 和蛋白印迹检测 CO-029 在胆管细胞癌组织(TT)、癌旁组织(PT)及 HCCC-9810 细胞系中的表达;1C 为灰度扫描后分析显示结果

图 1 四跨膜蛋白 CO-029 在肝内胆管细胞癌组织、癌旁组织的表达

3. CO-029 在肝内胆管细胞癌中高表达与临床病理及预后特征的关系:按术后复发时间(time to



2A: CO-029在早期肝内胆管癌复发组中的表达明显高于未复发组;2B: CO-029 在癌旁组织中则低表达;TMA: 组织芯片检测(SP×40); HE: 伊红染色×40

(2B)

图 2 组织芯片检测四跨膜蛋白 CO-029 在 40 例手术切除的肝内胆管细胞癌组织及相应癌旁组织中的表达

recurrence, TTR) 分组, 对比实验结果发现, 在早期复发组 (TTR < 1 年, 本组 25 例) 中 CO-029 的表达明显高于未复发组 (TTR ≥ 1 年, 本组 15 例, 图 2A)。进一步结合临床病理特征分析显示: CO-029 蛋白表达与肝胆管细胞癌患者的年龄、性别、肿瘤大小及数目、分化程度均无明显相关性 ($P > 0.05$), 而与肿瘤有无包膜、肝门淋巴结转移与否、TNM 分期及复发时间相关性显著 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 四跨膜蛋白 CO-029 表达与肝内胆管细胞癌患者临床病理及预后特征的关系

项目	CO-029 表达		P 值
	低	高	
年龄(岁)			>0.05
≤53	9	14	
>53	5	12	
性别			>0.05
男	8	15	
女	6	11	
肿瘤包膜			<0.05
完整	7	3	
无	7	23	
肿瘤分化			>0.05
I ~ II	9	19	
III ~ IV	5	7	
肿瘤直径(cm)			>0.05
<3	3	9	
≥3	11	17	
肿瘤数目			>0.05
单个	13	23	
多个	1	3	
肝门淋巴结有无转移			<0.05
无	7	5	
有	7	21	
TNM 分期			<0.05
I ~ II	13	14	
III ~ IV	1	12	
复发时间(年)			<0.05
<1	5	20	
≥1	9	6	

讨 论

四跨膜蛋白 CO-029 能结合膜内、跨膜及膜外蛋白, 发挥膜内、跨膜和膜外蛋白募集、整合的作用, 起到膜内外信号通道桥梁的功能, 直接或间接作用于细胞的信号转导通道从而影响细胞的各种生命活动^[12-13]。Szala 等^[14]首先发现, CO-029 蛋白为一种肿瘤相关性抗原。Claas 等^[15]首次在大鼠中发现其表达于转移的肿瘤细胞, 不转移的肿瘤细胞则不表达, 并指出 CO-029 为一种与肿瘤转移相关的抗原。随后, 在人黑色素瘤细胞中检测到 CO-029 是唯一

过表达的侵袭相关性四跨膜蛋白^[12]。进一步的 CO-029 分子生物学功能研究显示, CO-029 可通过四跨膜蛋白网络 (TEM) 信号平台影响细胞基质间或细胞间的黏附作用或骨架蛋白重建, 改变细胞表型, 从而使肿瘤细胞获得移动、迁徙和浸润能力。目前研究认为, 四跨膜蛋白与整合素形成复合体依赖于钙黏蛋白的作用, 改变细胞极性, 影响细胞外基质及血管的形成, 促进肿瘤细胞的侵袭转移; 而 CO-029 则可与整合素 $\alpha 4$ 及血管细胞黏附因子-1 (VCAM-1) 等相结合, 可能通过在不同肿瘤细胞中与特定整合素如 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 等结合形成复合体^[5,14], 并通过和蛋白酶、细胞因子受体、生长因子受体等相互作用, 促进肿瘤细胞的侵袭转移。在食道癌、结肠癌等消化系统肿瘤进行的相关研究表明, CO-029 与肿瘤的发生发展成正相关, 可通过上调 CO-029 的表达促进肿瘤的进展^[5-6]。同时有研究发现^[16] CO-029 表达的多种肿瘤细胞可通过上调血管内皮生长因子 (VEGF) 及其受体的表达, 促进相邻的成纤维细胞分泌基质金属蛋白酶 (MMPs) 及尿激酶纤维蛋白溶酶原激活物 (UPA), 改变细胞基质和细胞间黏附性, 促进血管的形成, 促进肿瘤细胞侵袭转移。

Kanetaka 等^[9-10]研究显示, 肝癌组织中 CO-029mRNA 表达水平高出正常组织 1.7 倍 ($P < 0.05$), 并且其在发生肝内转移癌组织中与未发生转移癌组织中的表达水平差异显著 ($P < 0.05$)。Greco 等^[8]研究发现, 在人大肠癌细胞中下调 CO-029 表达能显著抑制细胞运动。提示 CO-029 的表达与肿瘤细胞迁移密切相关, 但其具体机制尚不明确。这与我们的前期研究结果一致^[4], 即 CO-029 在高转移潜能的肝癌细胞中的表达明显高于低转移潜能或不转移的肝癌细胞; 通过慢病毒干扰下调 CO-029 的表达, 能抑制肝癌细胞分泌机制金属蛋白-12 (MMP12), 直接抑制其侵袭转移; 同时应用层粘蛋白-5 (laminin-5) 刺激高转移潜能肝癌细胞和其慢病毒感染细胞, 结果显示高转移潜能肝癌细胞可见上皮间质转变 (EMT) 过程, 而慢病毒感染细胞则未发生 EMT。对其机制进一步探索表明, CO-029 能通过偶联整合素 $\alpha 6$ 介导 EMT 发生而促进肝细胞癌的侵袭转移。新近研究指出 CO-029 有成为肿瘤细胞生长、侵袭转移生物标记的可能。德国海德尔堡大学医院肿瘤细胞生物学研究所首次报道了 Tspan8 (CO-029) 能作为免疫缺陷小鼠体内胰腺癌启动细胞长期生存、侵袭、转移的生物标记^[7]。目前, 对于

CO-029 在肝内胆管细胞癌中的研究,尚无相关报道。本研究应用实时-PCR、蛋白印迹和组织芯片技术首次检测了肝内胆管细胞癌中 CO-029 蛋白的表达情况。结果显示 CO-029 在肝内胆管细胞癌组织中高表达,而在相应的癌旁组织中低表达,在肝内胆管癌细胞系 HCCC-9810 亦显著表达。同时,本研究应用组织芯片技术检测并结合临床病理特征资料分析了 CO-029 表达高低与肝内胆管细胞癌病理特征、侵袭转移能力与预后的相关性,结果显示:四跨膜蛋白 CO-029 表达高低,与肿瘤有无包膜、肝门淋巴结转移与否、TNM 分期及复发时间相关性显著,肿瘤无包膜、有肝门淋巴结转移、TNM 分期 III ~ IV 和术后 1 年内复发的患者中 CO-029 显著高表达。这提示 CO-029 在肝内胆管细胞癌中不同表达水平与侵袭转移及预后密切相关。然而,对于其具体分子生物学机制以及是否在肝内胆管细胞癌中亦偶联整合素介导 EMT 过程,尚需后续实验进一步证实。CO-029 有可能成为肝内胆管细胞癌生长、侵袭转移及复发预后预测的生物指标,具有潜在的临床价值。

参 考 文 献

[1] Kim J H, Yoon HK, Sung KB, et al. Transcatheter arterial chemoembolization or chemoinfusion for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: clinical efficacy and factors influencing outcomes[J]. *Cancer*, 2008,113(7):1614-1622.

[2] Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update[J]. *Gut*, 2012,61(12):1657-1669.

[3] anez-Mo M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, et al. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasmamembranes[J]. *Trends Cell Biol*, 2009,19(9): 434-446.

[4] 武金才,李灼日,周开伦,等. shRNA 下调 CO-029 基因对肝癌细胞侵袭与转移的影响[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2012,18(2):126-129.

[5] Le Naour F, Andre M, Greco C, et al. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(5):845-857.

[6] Zhou Z, Ran YL, Hu H, et al. TM4SF3 promotes esophageal carcinoma metastasis via upregulating ADAM12m expression[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008,25(5):537-548.

[7] Wang H, Rana S, Giese N, et al. Tspan8, CD44v6 and alpha6beta4 are biomarkers of migrating pancreatic cancer-initiating cells[J]. *Int Cancer*, 2013,133(2):416-426.

[8] Greco C, Bralet MP, Ailane N, et al. E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin CO-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2010,170(19):7674-7683.

[9] Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, et al. Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2002,35(5):637-442.

[10] Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, et al. Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2003,18(11):1309-1314.

[11] Berthier-vergnes O, Kharbili ME, de la Fouchardière A, et al. Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPAN8 as a novel mediator of invasion[J]. *Br J Cancer*, 2011,104(1):155-165.

[12] Zoller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2009,9(1):40-55.

[13] Hemler ME. Specific tetraspanin functions[J]. *Cell Biol*, 2001, 155(7):1103-1107.

[14] Szala S, Kasai Y, Steplewski Z, et al. Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, 87(17):6833-6837.

[15] Claas C, Seiter S, Claas A, et al. Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy[J]. *Cell Biol*, 1998,141(1): 267-280.

[16] Herlevsen M, Schmidt DS, Miyazaki K, et al. The association of the tetraspanin D6.1A with the $\alpha 6 \beta 4$ integrin supports cell motility and liver metastasis formation[J]. *Cell Sci*, 2006,116(Pt 21):4373-4390.

[17] Gesierich S, Berezovskiy I, Ryschich E, et al. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D 6.1A/CO-029[J]. *Cancer Res*, 2006,66(14):7083-7094.

(收稿日期:2015-04-11)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对人名汉语拼音书写规范的要求

根据中华医学会编排规范,在英文摘要中人名汉语拼音书写规范如下:

- (1) 少数民族语姓名按民族语读音拼写。如:Ulanhu(乌兰夫)。
- (2) 姓仅首字母大写,名字间不加分隔“-”。如:Wang Minde(王敏德)。
- (3) 双姓组合,双姓间加分隔“-”。如:Zheng-Li Shufang(郑李淑芳),Dongfang-Zhao Feng(东方赵峰)。
- (4) 不能分出姓名,首字母大写。如 Baogong(包公),Taibai Jinxing(太白金星)。
- (5) “吕”拼音为“Lyu”,吕和平(Lyu Heping)。