

化疗栓塞对肝细胞癌癌基因 ras/p21 表达的影响

肖恩华, 胡国栋

【摘要】 目的:研究原癌基因 ras/p21 在肝细胞癌(HCC)中表达的意义以及不同化疗栓塞方法对其表达的影响。**方法:**7 种不同组织学类型的 HCC 共 98 例,单纯手术治疗 57 例,4 种介入治疗后二期切除 41 例。采用 SABC 免疫组化方法,检测各样本中 ras/p21 的表达,并与临床转移情况对照。**结果:**ras/p21 阳性和阴性者转移率分别为 75.0%、37.9% ($\chi^2=4.67, P<0.05$),介入治疗组及其 A、B、C、D 各组与单纯手术组 p21 阳性率分别为 29.3%、57.1%、25.0%、20.0%、27.3%、61.4% (介入组分别与单纯手术组相比, χ^2 值依次为 9.87、0.04、3.79、8.17、4.36, P 值依次为 <0.01 、 >0.75 、 >0.05 、 <0.01 、 <0.05)。化疗栓塞使 HCC 各组织学类型及各病理分级 ras/p21 表达不同程度下降。介入组与单纯手术组转移率分别为 48.8%、56.1% ($\chi^2=0.52, P>0.25$)。**结论:**ras/p21 高表达可促进 HCC 转移,就 ras/p21 而言,化疗栓塞可抑制 HCC 转移潜能,且碘油、无水乙醇、明胶海绵多材料联合化疗栓塞优于单一材料栓塞和单纯化疗。

【关键词】 癌,肝细胞; 栓塞,治疗性; 基因表达; ras 基因; 免疫组织化学

【中图分类号】 R815; R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2004)07-0474-03

The effect of chemoembolization on ras/p21 gene expression of hepatocellular carcinoma XIAO En-hua, HU Guo-dong. Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, P. R. China

【Abstract】 Objective: To study the significance of ras/p21 gene expression of hepatocellular carcinoma (HCC), and the effect of the different chemoembolization treatment on ras/p21. **Methods:** Ninety-eight histopathologically verified HCC specimens were obtained. The patients were treated with surgical resection alone (57 cases) and second stage surgical resection after four kinds of chemoembolization (41 cases). Strept avidin biotin complex (SABC) immunohistochemical staining with monoclonal antibody against human ras/p21 was used to observe the p21 in all specimens. The experimental results were compared with the surgical and clinical findings. **Results:** The metastatic rate in p21(+) and (-) was 75.0% and 37.9% respectively ($\chi^2=12.63, P<0.05$); 29.3% of chemoembolization group, 57.1% of only chemotherapy, 25.0% of chemotherapy combined with iodized oil, 20.0% of chemotherapy combined with iodized oil and spongia gelatini absorbens (sga), 27.3% of chemotherapy combined with ethanol, iodized oil and sga, 61.4% of surgical resection alone were positive for p21 (interventional groups were compared with surgical resection alone, $P<0.01, >0.75, >0.05, <0.01, <0.05$, respectively). The metastatic rate in interventional group and surgical resection alone was 48.8% and 56.1% respectively ($P>0.05$). **Conclusion:** The increased expression of ras/p21 would enhance metastasis of HCC. It could act as a prognosis predictive marker. With respect to ras/p21, chemoembolization could suppress the potential of metastasis of HCC. Combined chemoembolization with ethanol, iodized oil and sga is superior to only chemotherapy and/or embolization with single material.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; Embolization, therapeutic; Gene expression; ras gene; Immunohistochemistry

随着分子生物学技术的不断发展,对肿瘤基因的研究不断深入,发现 ras 癌基因与肿瘤细胞的转移潜能密切相关^[1]。为探讨 ras 癌基因与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)转移潜能的关系,以及介入治疗对 HCC 的 ras 癌基因表达的影响,我们采用链霉亲和素-生物素酶复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)免疫组化方法对 57 例单纯手术标本及

41 例介入治疗二期手术标本 ras 癌基因表达产物 p21 进行了研究。

材料与方法

标本选择:经手术病理证实的 HCC 117 例,其中单纯手术(术前未经其它治疗)58 例,男 52 例,女 6 例,年龄 24~70 岁,平均 45.3 岁,其中 1 例为完全坏死;介入治疗后二期手术 59 例,男 53 例,女 6 例,年龄 15~68 岁,平均 44 岁,其中完全坏死 12 例,另有 6 例标本无法再作研究,连同完全坏死者排除在实验外。病理组织学类型和病理分级由 2 名病理专科医师确

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二医院放射科(肖恩华); 430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科(胡国栋)
作者简介:肖恩华(1964—),男,湖南人,教授,博士后,主要从事肝癌影像学诊断与介入治疗。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070235)

定。选择无坏死的肝癌组织块 98 例做免疫组化。

介入方法:采用 Seldinger 技术,常规作肠系膜上动脉间接门静脉造影及腹腔动脉造影,再作肝左动脉或肝右动脉或肿瘤供血动脉选择性和超选择性插管。按治疗方式不同分四组:A 组仅灌注化疗药物(5-FU 500~1500 mg,丝裂霉素 8~12 mg,卡铂 300~500 mg),治疗 1~4 次,共 7 例;B 组先灌注化疗药物,方案同 A 组,再用碘化油 10~20 ml 与表阿霉素 1 支或 5-Fu 10 ml 乳化剂栓塞,治疗 1~2 次,共 8 例;C 组为在 B 组基础上加适量明胶海绵颗粒栓塞,治疗 1~3 次,共 15 例;D 组先灌注抗癌药,方案同 A 组,继而作无水乙醇 4~8 ml 加碘化油 10~20 ml 乳剂栓塞,最后用适量明胶海绵颗粒栓塞,治疗 1~3 次,共 11 例。

免疫组化染色采用 SABC 法,主要试剂有鼠抗人 ras/p21,生物素标记羊抗鼠 IgG, A、B 封闭液, SABC 等。用缓冲液(PBS)代替鼠抗人 ras/p21 作为阴性对照,全部阴性;用已知乳腺癌阳性切片代替肝癌组织作为阳性对照,全部为阳性。胞浆和/或胞膜呈棕黄色染色的细胞为阳性细胞,取五个有代表性的高倍镜视野计算阳性细胞数,平均阳性细胞数 $>10\%$ 为阳性,实验采用盲法。由两人分别计数,结果不一致者共同协商确定。

统计学处理:采用 χ^2 检验。

结 果

1. 不同组织学类型单纯手术组和介入治疗组的 p21 表达

表 1 98 例 HCC 不同组织类型的 p21 表达

组织学类型	单纯手术组			介入治疗组			χ^2 值	P 值
	例数	p21 阳性例数	阳性率(%)	例数	p21 阳性例数	阳性率(%)		
梁索型	16	10	62.5	21	6	28.6	4.26	<0.05
索状腺样型	9	7	77.8	2	0	0	1.58	>0.1
实体型	12	7	58.3	6	2	33.3	0.25	>0.5
透明细胞型	13	5	38.5	6	2	33.3	0.53	>0.25
低(未)分化型	5	5	100.0	6	2	33.3	2.75	>0.05
硬化型	1	1	100.0	—	—	—	—	—
小细胞型	1	1	100.0	—	—	—	—	—

注:p21 为 ras 癌基因表达产物,统计值为各组织学类型两治疗组对照。

表 2 98 例 HCC 不同病理分级的 p21 表达

病理分级	单纯手术组			介入治疗组			χ^2 值	P 值
	例数	p21 阳性例数	阳性率(%)	例数	p21 阳性例数	阳性率(%)		
I	8	5	62.5	4	0	0.0	2.1	>0.1
II	30	18	60.0	25	8	32.0	4.29	<0.05
III	19	12	63.2	11	3	27.3	3.59	>0.05
IV	1	1	100.0	—	—	—	—	—

注:p21 为 ras 癌基因表达产物,统计值为各病理分级现治疗组对照。

不同组织学类型 HCC 介入治疗组较单纯手术组 p21 表达不同程度下降,其中梁索型差异有显著性意义(表 1)。

2. 不同病理分级单纯手术组和介入治疗组的 p21 表达

病理分级采用Ⅳ级分类法,对介于两者之间者取高者(如Ⅰ~Ⅱ级取Ⅱ级),不同病理分级的 HCC 介入治疗组较单纯手术组 p21 表达不同程度的下降,其中Ⅱ级 HCC p21 表达下降有显著性意义(表 2)。

3. 不同治疗方法对 p21 表达的影响

HCC 介入治疗组较单纯手术组 p21 表达明显下降,差异有显著性意义,介入治疗各组较单纯手术组 p21 表达不同程度下降,其中碘油抗癌药加明胶海绵组(C 组)和乙醇、碘油、抗癌药加明胶海绵组(D 组)差异有显著性意义(表 3)。

4. p21 表达与 HCC 转移的关系

转移指血管内出现肉眼或镜下癌栓、淋巴结转移、其它非肝脏器官组织转移等。p21 表达阳性及阴性者转移率分别为 75.0%、37.9% ($\chi^2=4.67, P<0.05$)。单纯手术组和介入治疗组转移率分别为 56.1%、48.8% ($P>0.05$)。

讨 论

ras 癌基因家族包括 H-ras, K-ras 和 N-ras, 这些基因表达产物均为相对分子质量为 21 000 D 的蛋白质(p21)。主要位于胞浆,及胞膜内层,具有三磷酸鸟苷(GTP)酶的活性,介导正常细胞受体信号转导过

表 3 98 例 HHC 不同治疗方法的 p21 表达

组别	例数	p21 阳性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
介入治疗	41	12	29.3	9.87	<0.005
A 组	7	4	57.1	0.04	>0.75
B 组	8	2	25.0	3.79	>0.05
C 组	15	3	20.0	8.17	<0.005
D 组	11	3	27.3	4.36	<0.05
单纯手术	57	35	61.4		

注:p21 为 ras 癌基因表达产物,A 组为单纯灌注化疗药组,B 组为碘油抗癌药组,C 组为碘油抗癌药加明胶海绵组,D 组为乙醇、碘油、抗癌药加明胶海绵组。统计值指介入组与单纯手术相比。

程^[2,3]。

ras/p21 促进肿瘤细胞转移潜能的机制包括^[1]:①与肿瘤病毒的协同作用,导致肿瘤细胞转移表型改变;②影响肿瘤细胞表面粘附分子的表达,促进细胞与基质间的粘附;③增强基质的蛋白酶活性,促进基质中的纤维蛋白降解;④诱导肿瘤细胞逃避免疫监视,最终导致肿瘤细胞的浸润和转移;⑤使血管内皮生长因子增加,促进肿瘤血管生成^[4];⑥ras/p21 高表达可使癌细胞凋亡抑制,产生耐药性^[5,6]。

本组研究显示,ras/p21 阳性表达者转移率多于 ras/p21 阴性表达者,差异有显著性意义,表明 ras/p21 高表达有促进 HCC 转移的潜能。ras/p21 阳性表达者尚有 25% 未发生转移,可能在某些情况下,ras/p21 高表达不引起细胞增殖,而使肿瘤细胞周期停滞在某一期^[7],从而使肿瘤细胞产生非侵袭性表型^[8];再者,ras 癌基因突变的肿瘤较 ras 无突变的肿瘤转移潜能更强^[9],但 ras 突变肿瘤和没有 ras 突变的肿瘤,p21 表达差异无显著性意义^[10],即能同时被免疫组化检测到。因此,有待进一步从 mRNA 水平研究 ras 基因的突变情况,化疗栓塞可引起 HCC 细胞 ras/p21 表达下降,与单纯手术组比,差异有显著性意义,说明化疗栓塞对 HCC 的转移潜能有抑制作用。在乙醇和/或碘化油、明胶海绵合用组(C 组和 D 组),ras/p21 表达下降差异有显著性意义,说明多材料联合栓塞较单材料栓塞优越。而且,化疗栓塞对 HCC 各种组织学类型、病理分级,均可引起 ras/p21 表达不同程度的下降,支

持化疗栓塞可用于任何类型的 HCC^[11]。

参考文献:

[1] 胡中伟,曾明新. ras 癌基因与肿瘤细胞转移潜能[J]. 国外医学:生理、病理科学与临床分册,1998,18(3):279-281.

[2] Cuatrecasas M,Erill N,Musulen E,et al. K-ras mutations in non-mucinous ovarian epithelial tumors;a molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients[J]. Cancer,1998,82(6):1088-1095.

[3] Gonzalez AF,Deangelo AB,Nasim S,et al. Ras oncogene activation during hepatocarcinogenesis in B6 C3 F1 male mice by dichloroacetic and trichloroacetic acids[J]. Carcinogenesis,1995,16(3):495-499.

[4] Chiang JM,Chou YH,Chou TB,et al. K-ras codon 12 mutation determine the polypoid growth of colorectal cancer[J]. Cancer Res,1998,58(15):3289-3293.

[5] Billadeau D,Jelinek DF,Shan N,et al. Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin-6 dependent myeloma cell line ANBL6[J]. Cancer Res,1995,55(16):3640-3645.

[6] Nemunatis T,Cox T,Meyer W,et al. Irinotecan hydrochloride (CPT-11) resistance identified by K-ras mutation in patients with progressive colon cancer after treatment with 5-Fluorouracil (5-Fu)[J]. Am J Clin Oncol (CCT),1997,20(5):527-529.

[7] Olson MF,Paterson HF,Marshall CJ. Signals from ras and rho G TPase interact to regulate expression of waf1/p21[J]. Nature,1998,394(6690):295-298.

[8] Meade-Tellin LC,Boukamp P,Fusenig NE,et al. Differential expression of matrix metalloproteinase in activated H-ras-transfected immortalized human keratinocytes[J]. Br J Cancer,1998,77(5):724-730.

[9] Nemunaitis J,Klemow S,Tong A,et al. Prognostic value of K-ras mutations,ras oncoprotein, and c-erb B-2 oncoprotein expression in adenocarcinoma of the lung[J]. Am J Clin Oncol (CCT),1998,21(2):155-160.

[10] Kalkuhl A,Troppmair J,Buchmann A,et al. ras/p21 downstream effectors are increased in activity or expression in mouse liver tumors; but do not differ between ras-mutated and ras-wild-type lesions[J]. Hepatology,1998,27(4):1081-1088.

[11] Okada S. Transcatheter arterial embolization for advanced hepatocellular carcinoma; the controversy continues[J]. Hepatology,1998,27(6):1743-1744.

(收稿日期:2003-05-12)