

组织芯片检测肝细胞肝癌中 ARF6 蛋白的表达及临床意义

吴晓峰,王 科,武正山*

(南京医科大学第一附属医院肝脏外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨二磷酸腺苷核糖基化因子 6(ADP-ribosylation factor 6, ARF6)在肝细胞肝癌(简称肝癌)组织中的表达及临床意义。方法:收集肝癌手术切除标本 150 例,以癌旁肝硬化组织作对照,制作组织芯片,用组织芯片技术结合免疫组化法,检测肝癌组织和癌旁肝硬化组织 ARF6 的表达,探讨 ARF6 表达与临床病理特征及预后之间的关系。结果:肝癌组织中 ARF6 的阳性表达率为 48.7%(73/150),在癌旁肝硬化组织中 ARF6 的阳性表达率为 8.3%(4/48),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。肝癌组织中 ARF6 阳性表达与门静脉癌栓、临床分期、肿瘤直径及甲胎蛋白(AFP)水平相关($P < 0.05$)。ARF6 表达阴性的肝癌患者在肝切除术后的无瘤中位存活时间为 45 个月,1、3、5 年无瘤生存率分别为(93.22 ± 7.93)%、(58.91 ± 6.18)%、(24.59 ± 6.80)%;ARF6 表达阳性患者的无瘤中位存活时间为 36 个月,1、3、5 年无瘤生存率分别为(88.91 ± 3.70)%、(41.61 ± 5.93)%、(19.03 ± 4.94)%。ARF6 表达阴性与表达阳性的肝癌患者的无瘤生存时间差异有统计学意义($P = 0.019 1$)。结论:肝癌组织中 ARF6 的表达与预后密切相关,ARF6 不仅可作为肝癌预后不良的判断指标,还有望成为一种新的肝癌预后判断的标志物和潜在的治疗靶标。

[关键词] 肝细胞肝癌; ARF6; 组织芯片; 免疫组织化学; 预后

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1696-04

Expression and clinical significance of ARF6 in hepatocellular carcinoma

WU Xiao-feng, WANG Ke, WU Zheng-shan*

(Department of Hepatic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** The expression of ARF6 was determined by tissue microarray and immunohistochemistry in 150 cases of HCC and 48 cases of adjacent cirrhosis tissue. **Results:** The positive expression of ARF6 in HCC and adjacent cirrhosis tissue were 48.7% (73/150) and 8.3% (4/48) respectively ($P < 0.05$). The positive expression of ARF6 in HCC was closely related to the portal vein invasion, clinical stage, tumor diameter and AFP level. The results also indicated that a high expression level of ARF6 was associated with worse recurrence-free survival. The median recurrence-free survival was substantially reduced among patients with positive ARF6 protein (36 months vs. 45 months, $P = 0.019 1$). **Conclusion:** The expression of ARF6 is closely correlated with the clinical prognosis of HCC. It suggests ARF6 may be a potential prognostic biomarker and therapeutic target for HCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma (HCC); ARF6; tissue microarray; immunohistochemistry (IHC); prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1696-1699]

全球 40% 以上的肝细胞肝癌(简称肝癌)发生在中国,肝癌的病死率高居我国肿瘤病死率的第 2 位。随着对高危人群监测的推广和诊疗策略的改进,部分肝癌患者因为早期发现、早期诊断及综合治疗而获得长期生存,但是肝癌的整体治疗效果仍难以令人满意,总 5 年生存率较低^[1]。肝癌的转移是影响治疗效果和患者长期生存的主要原因。肝癌转移机

制研究已经成为肿瘤研究领域新的热点。近年来研究发现二磷酸腺苷核糖基化因子 6(ADP-ribosylation factor 6, ARF6)与多种肿瘤的增殖、侵袭、转移、临床预后密切相关^[2]。本文通过利用组织芯片技术检测肝癌组织中 ARF6 蛋白的表达与临床病理因素的相关性,旨在探讨 ARF6 的表达对肝癌预后的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助(30901442)

*通讯作者, E-mail: wvzzss355@163.com

收集 2004 年 1 月~2007 年 6 月间本院第 1 次行手术切除、术前均未行化疗及其他抗肿瘤治疗、并经组织病理学检查证实为肝细胞肝癌的患者,从中挑选适合制作组织芯片的蜡块且临床资料完整的 150 例组成此次的检测对象,选取相应的 48 例癌旁肝硬化组织作为对照组。150 例中,男 130 例,女 20 例;最大年龄 78 岁,最小年龄 17 岁,中位年龄 48.7 岁;按 Edmondson 分级标准: I~II 级 119 例, III~IV 级 31 例;根据国际抗癌联盟制定的 TNM 分期: I 期 103 例, II~III 期 47 例;肿瘤直径 ≤ 5 cm 91 例,直径 > 5 cm 59 例;有门静脉癌栓者 22 例,无门静脉癌栓者 128 例。随访内容除了患者的一般资料,包括年龄、性别、肝炎情况等,还有肿瘤的病理学特征如肿瘤包膜、数目、肝硬化、甲胎蛋白(AFP)水平、生存及复发情况。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片构建

根据 HE 染色的切片确定具有代表性的病变部位,使用直径 1.0 mm 的组织穿刺针取出石蜡标本的组织芯,并有规律地排列在空白受体蜡块上制备成组织阵列块。通常每个石蜡标本的同一种组织各取 2 个组织芯作为复点,以防止在进行实验时由于脱点而造成实验数据的丢失。

1.2.2 免疫组化染色

采用免疫组织化学 SP 法,第一抗体小鼠抗人 ARF6 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),工作浓度 1:300。所有芯片染色均在相同条件下进行,每批染色均设阳性对照、空白对照。阳性对照用已知染色阳性的肝癌组织进行,结果为阳性;空白对照用相当于一抗浓度的血清代替一抗孵育组织切片,结果为阴性。

结果判定:由 2 名不知患者临床资料的病理科医生观察 HE 染色及免疫组化染色之组织芯片,分别独立作出判断。阳性染色细胞条件:细胞结构清晰,阳性颗粒定位好,着色与背景对比清楚。ARF6 染色阳性判断标准: $>10\%$ 癌细胞胞浆或细胞膜呈棕黄色染色为 ARF6 阳性染色(图 1)。

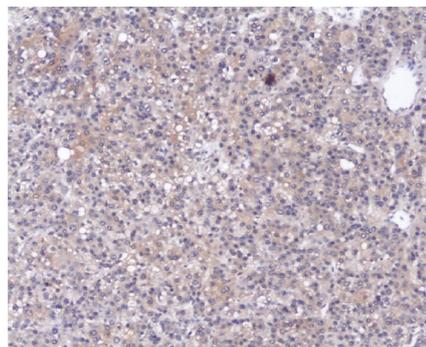
1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件处理数据,定性资料用卡方检验和 Pearson 相关分析,生存分析用 Kaplan-Meier 和 Log-rank 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

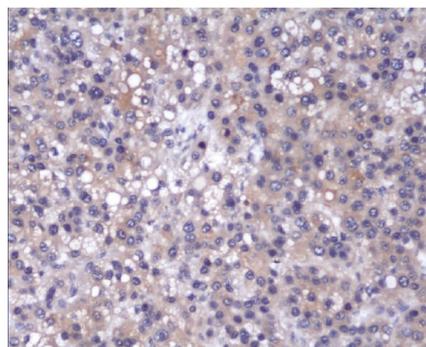
2 结果

2.1 ARF6 表达情况

肝癌组织芯片结果显示 ARF6 在肝癌和癌旁肝硬化组织中均表达于细胞膜和胞质。在 150 例肝癌组织中,ARF6 的阳性表达率为 48.7%(73/150);在 48 例癌旁肝硬化组织中,ARF6 的阳性表达率为 8.3%(4/48),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



SP, $\times 100$



SP, $\times 200$

图 1 肝癌组织中 ARF6 阳性表达

Figure 1 Positive expression of ARF6 in HCC tissue

2.2 ARF6 表达与肝癌临床病理特征的关系

ARF6 表达与肝癌患者的门静脉癌栓、临床分期、肿瘤直径及 AFP 水平相关($P < 0.05$, 表 1),与性别、年龄、肝硬化、肝炎情况、Edmondson 分级、病灶数目、肿瘤包膜均无明显相关性。

2.3 ARF6 表达与肝癌患者手术预后的关系

Kaplan-Meier 生存分析显示,ARF6 阳性组的无瘤生存率和总体生存率均显著低于阴性组(图 2),ARF6 表达阴性的患者在肝切除术后的无瘤中位存活时间为 45 个月,1、3、5 年无瘤存活率分别为 $(93.22 \pm 7.93)\%$ 、 $(58.91 \pm 6.18)\%$ 、 $(24.59 \pm 6.80)\%$;ARF6 表达阳性患者的无瘤中位存活时间为 36 个月,1、3、5 年无瘤存活率分别为 $(88.91 \pm 3.70)\%$ 、 $(41.61 \pm 5.93)\%$ 、 $(19.03 \pm 4.94)\%$ 。ARF6 表达阳性与表达阴性的患者无瘤生存时间的差异有统计学意义($P = 0.019 1$, 图 2)。

表1 肝癌患者临床病理指标与肝癌组织 ARF6 表达的关系
Table 1 Relation between clinic-pathologic variables and expression of ARF6 in HCC tissues

临床病理特征	ARF6 染色		P 值
	阴性(n = 77)	阳性(n = 73)	
AFP(ng/ml)			
≤40	50	31	0.009
>40	27	42	
肿瘤大小(cm)			
≤5	54	37	0.019
>5	23	36	
门静脉癌栓			
有	5	17	0.003
无	72	56	
TNM 分期			
I	60	43	0.014
II~III	17	30	

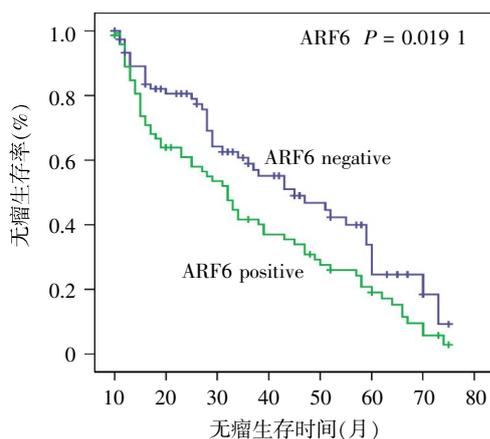


图2 ARF6 表达阳性与表达阴性的肝癌患者的无瘤生存时间差异有统计学意义

Figure 2 Kaplan-Meier curves show that HCC patients with their tissue expressed higher level of ARF6 had poorer prognosis in terms of recurrence-free survival

3 讨论

组织芯片又称组织微阵列(tissue microarray)是1998年在cDNA微阵列的基础上发明的一种特殊的生物芯片,即将数十个甚至数千个小的组织片按预先设计的需要集成在一张固相载体上所形成的矩阵微缩组织芯片。它可以克服传统病理技术只能逐个组织切片进行研究的方式,为医学分子生物学特别是分子流行病学提供了一种高通量、大样本以及快速的分子水平的分析工具。本研究将198例石蜡包埋组织(150例肝癌组织标本和48例癌旁肝硬化组织)制作组织芯片研究ARF6在肝癌组织中的表达及临床意义。

ARF蛋白家族是一类在真核细胞中广泛存在的高丰度肉豆蔻酰基化的小鸟嘌呤核苷结合蛋白,由ARF基因家族编码,其序列、结构上与三磷酸鸟苷(GTP)酶超家族中的Ras家族相似,其结构和功能高度保守。ARF家族参与调节囊泡的形成、高尔基复合体到内质网的逆转运、细胞内吞作用和肌动蛋白的重排。ARF6与恶性肿瘤的关系已经成为目前研究的热点。ARF6参与细胞内吞作用,调节肌动蛋白的重排影响细胞迁移^[3]。另外ARF6还可以通过脂筏(lipid raft)调节Rho GTP酶活性,促进肿瘤细胞迁移和转移^[4-5]。有研究显示ARF6表达水平在不同恶性程度的肿瘤细胞中变化显著,ARF6的表达、定位的改变、活性失调等可能与多种肿瘤的发生、发展、浸润及转移密切相关。Shigeru等^[6]发现,ARF6定位于乳腺癌细胞的侵袭性足突(invadopodia),侵袭力强的乳腺癌细胞高表达ARF6, RNA干扰下调ARF6可以影响乳腺癌细胞侵袭伪足的形成,局部基质的降解和穿透Matrigel,抑制乳腺癌细胞的侵袭能力。黑色素瘤细胞裸鼠实验表明持续激活ARF6抑制肿瘤生长,促进肿瘤细胞侵袭能力,进一步研究表明ARF6诱导的细胞外信号调节激酶(ERK)信号增强Rac1的活性,促进黑色素瘤细胞侵袭性足突的形成和细胞浸润,结果表明ARF6是黑色素瘤的生长、侵袭和转移重要的调控因子^[7-8]。EFA6A是ARF6的鸟嘌呤核苷酸交换因子的一种,通过激活ARF6和ERK1/2促进神经胶质瘤细胞侵袭,进一步证实EFA6A/ARF6/ERK信号转导通路在肿瘤细胞侵袭的作用,提示ARF6是防止肿瘤侵袭和转移的潜在的治疗靶点^[9]。

尽管ARF6在肿瘤发生发展中的作用已经得到公认和广泛的研究,但ARF6在肝癌转移中的作用及临床意义尚不清楚。为了研究ARF6表达是否和肝癌侵袭性和预后有关,本研究将150例肝癌肝切除术后肝癌标本制作成组织芯片,分析ARF6表达与肝癌临床病理特征之间的关系,探讨ARF6表达的强度和肝癌临床病理特征及预后的关系。在150例肝癌中,73例ARF6表达阳性,在其余的标本中,ARF6表达仅为弱阳性或阴性。统计学结果表明ARF6表达与肝癌患者的门静脉癌栓、临床分期、肿瘤直径及AFP水平相关,此结果提示ARF6在肝癌的侵袭和转移中可能起了重要的作用。而且进一步研究发现ARF6的表达强度和肝癌患者术后无瘤生存明显相关,ARF6阳性肝癌患者预后较差,ARF6是肝癌复发转移的重要危险因素。ARF6和预后的

关系进一步表明 ARF6 促进肝癌的侵袭和转移,在肝癌细胞的侵袭中发挥重要作用。课题组前期研究发现二磷酸腺苷核糖基化样因子 6 作用蛋白 5 (ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5, ARL6IP5) 基因通过调控细胞迁移和侵袭抑制肝癌转移^[10],ARL6 属于 ARF 家族,ARF6 和 ARL6 在氨基酸序列高度相似,因此推测 ARF6 可能通过类似机制调控肝癌细胞的转移,但是具体的分子机制仍需进一步深入研究。

总之,本研究初步揭示了 ARF6 在肝癌中的表达情况及其临床意义,随着针对 ARF6 在肿瘤特别是肝癌中作用机制的更深入研究,ARF6 有可能在肝癌预后判断、分子靶向治疗及复发转移预防中成为非常有意义的生物标记物,从而更科学合理地指导肝癌的临床诊疗。

[参考文献]

- [1] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2003, 362(9399):1907-1917
- [2] Knizhnik AV, Kovaleva OB, Laktionov KK, et al. Arf6, RalA and BIRC5 protein expression in non small cell lung cancer[J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2011, 45(2):307-315
- [3] D'Souza-Schorey C, Li C, Colombo MI, et al. A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis [J]. *Science*, 1995, 267(5201):1175-1178
- [4] Balasubramanian N, Scott DW, Castle JD, et al. Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(12):1381-1391
- [5] Hu B, Shi B, Jarzynka MJ, et al. ADP-ribosylation factor 6 regulates glioma cell invasion through the IQ-domain GTPase-activating protein 1-Rac1-mediated pathway [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3):794-801
- [6] Hashimoto S, Onodera Y, Hashimoto A, et al. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(17):6647-6652
- [7] Muralidharan-Chari V, Hoover H, Clancy J, et al. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumorigenic and invasive properties in vivo [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6):2201-2209
- [8] Tague SE, Muralidharan V, D'Souza-Schorey C. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26):9671-9676
- [9] Li M, Ng SS, Wang J, et al. EFA6A enhances glioma cell invasion through ADP ribosylation factor 6/extracellular signal-regulated kinase signaling [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3):1583-1590
- [10] 吴晓峰, 陈海蓉, 白 津, 等. JWA 抑制人肝癌细胞的黏附和迁移侵袭潜能 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(12):1722-1725

[收稿日期] 2012-06-27