

肝内胆管癌患者中期因子蛋白表达与临床病理特征的相关性

钱涛^{1,2}, 马江辉¹, 夏雪峰^{1,3}, 陶亮^{1,3}, 李强^{1,3}

1. 南京医科大学鼓楼临床医学院普通外科, 江苏 南京 210008;

2. 江苏省中西医结合医院普通外科, 江苏 南京 210028; 3. 南京鼓楼医院普通外科, 江苏 南京 210008

摘要: **目的** 探讨肝内胆管癌 (ICC) 患者肿瘤组织中中期因子 (MK) 蛋白表达水平与肿瘤临床病理特征、患者生存期之间的关系。**方法** 收集 2013 年 12 月至 2017 年 12 月在南京鼓楼医院行手术治疗的 ICC 患者的临床资料及手术切除的肿瘤样本 35 例, 应用免疫组化方法检测癌组织中 MK 蛋白的表达水平, 并分析其与临床病理特征的关联性; 手术后对患者进行随访, 以因 ICC 死亡为终点事件, 采用 Kaplan-Meier 生存曲线进行 MK 高、低表达者的生存分析。**结果** 35 例 ICC 患者中, 免疫组化结果显示, 17 例 MK 蛋白低表达 (弱阳性), 18 例高表达 (强阳性)。在 T 分期 T1 + T2 期、有淋巴结转移、低分化程度者中, MK 蛋白高表达阳性率较 T 分期 T3 + T4 期、无淋巴结转移、高分化程度者显著升高 (P 值分别为 0.044、0.028、0.019)。本次随访截止于 2018 年 3 月, 失访 8 例, 完成随访 27 例; 死亡 20 例, 存活 7 例。MK 蛋白低表达者的中位生存期 (23 个月) 明显长于 MK 蛋白高表达者 (7 个月), 差异有统计学意义 ($P=0.020$)。**结论** MK 蛋白拟可作为 ICC 的肿瘤标记物, 提示其恶性程度及患者预后。

关键词: 肝内胆管癌; 中期因子; 临床病理特征; 预后

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2018)10-1361-03

Correlation between midkine protein expression and clinicopathological features in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma

QIAN Tao*, MA Jiang-hui, XIA Xue-feng, TAO Liang, LI Qiang

* Department of General Surgery, Drum Tower Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210008, China

Corresponding author: LI Qiang, E-mail: liqianjing@163.com

Abstract: Objective To investigate the associations of the expression of midkine (MK) protein with clinicopathological features and outcomes of the patients with intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). **Methods** The clinical data and surgically resected tumor samples of 35 ICC patients who underwent surgical treatment in Nanjing Drum Tower Hospital from December 2013 to December 2017 were collected. The expression of MK protein in cancer tissues was detected using immunohistochemistry, and its correlation with clinicopathological features was analyzed. The patients were followed up after surgery, and the end point was death from ICC. The survival of patients with high and low MK expression was analyzed by Kaplan-Meier survival curve. **Results** Immunohistochemical results showed the low expression (weak positive) of MK in 17 cases and high expression (strong positive) in 18 cases. The positive rate of MK protein expression was significantly higher in patients of T1 and T2 stage and with lymph node metastasis and poor differentiation than that in patients of T3 and T4 stage and with non-lymph node metastasis and high differentiation ($P=0.044$, $P=0.028$, $P=0.019$, respectively). The follow up ended on March 2018, and 8 cases were lost to follow-up. Out of 27 cases with follow-up, 20 cases died and 7 cases survived. The median survival time (23 months) of patients with low MK protein expression was significantly longer than that (7 months) of patients with high MK protein expression ($P=0.020$). **Conclusion** MK protein may be used as a tumor marker for ICC and can predict the degree of malignancy and prognosis of ICC patients.

Key words: Intrahepatic cholangiocarcinoma; Midkine; Clinicopathological feature; Prognosis

肝内胆管细胞癌 (ICC) 起源于二级胆管及其分支的上皮细胞, 其发病率及死亡率逐年升高, 约占肝

脏原发性恶性肿瘤的 10% ~ 15%^[1-2]。ICC 早期无明显临床症状,大多数患者在确诊时已处于肿瘤晚期,失去最佳的手术机会,5 年生存率尚未超过 10%^[3],因此早期诊断对 ICC 的治疗尤为重要。目前,ICC 肿瘤组织常用的免疫组化检测主要包括细胞角蛋白(CK)19、CK7,黏蛋白 1(MUC-1)^[4],但缺乏较好的敏感性及特异性。中期因子(midkine, MK)是一种肝素结合生长因子,最初被发现于胚胎分化发育过程中^[5]。在正常人体组织中, MK 蛋白在小肠黏膜组织中高表达,甲状腺组织中中度表达,肺、结肠、胃、肾及脾脏中微弱表达,而在肝脏中完全不表达^[6]。MK 功能多样,具有促进细胞分裂、促进血管生成、影响细胞分化及抗凋亡的作用,从而影响肿瘤的增殖、分化及凋亡^[7]。MK 在包括胃癌、肺癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌等在内的多数恶性肿瘤中的表达水平均出现升高^[8]。多项研究表明, MK 蛋白表达水平与恶性肿瘤的 TNM 分期密切相关,是一种潜在的预后相关标志蛋白^[9-12]。然而目前 ICC 肿瘤组织中 MK 蛋白表达的相关研究尚较少。

本研究旨在用免疫组化方法检测 35 例 ICC 肿瘤组织中 MK 蛋白的表达水平,旨在探讨其与临床病理资料之间的相关性以及患者的生存情况。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2013 年 12 月至 2017 年 12 月在南京鼓楼医院行手术治疗的 ICC 患者的临床资料及手术切除的肿瘤样本 35 例。所有病例中,平均年龄 61.09 岁,男性 13 例,女性 22 例。术后肿瘤标本的病理分期按照 2010 年第七版美国癌症联合会(AJCC)TNM 分期标准执行。肿瘤高分化 13 例,中分化 15 例,低分化 7 例;I 期 4 例,II 期 8 例,III 期 15 例,IV 期 8 例;淋巴结转移 11 例,远处转移 6 例。

1.2 实验方法 采用免疫组织化学方法检测 MK 蛋白表达水平, MK 单抗(ab52637)购于 Abcam 公司,通用型二抗购于北京中山金桥公司。肿瘤组织样本蜡块获取后进行切片,染色,检测 MK 蛋白表达情况。

1.3 结果判定 MK 蛋白表达以显微镜($\times 400$)下细胞膜/质中可清晰观察到棕黄色颗粒为阳性标准,反之为阴性。以阳性细胞百分比为强弱标准,即随机 10 个高倍视野内,每个视野内 100 个细胞,强阳性为阳性细胞百分比 $> 15\%$,弱阳性为 $0 \sim 15\%$ 。

1.4 随访 本研究对 35 例 ICC 患者,于手术治疗后通过门诊复诊、电话等方式进行随访,以因 ICC 死亡为终点事件。本次总结随访截止于 2018 年 3 月。

1.5 统计学分析 统计分析采用 SPSS 22.0 统计软

件。MK 蛋白表达与临床及病理资料的关联性采用确切概率法及 t 检验;采用 Kaplan-Meier 生存曲线进行 MK 蛋白高、低表达者的生存分析(删失数据包括失访及随访截止时仍存活患者数据),比较采用 Log-rank 检验。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

35 例 ICC 患者中,免疫组化结果显示,17 例 MK 蛋白低表达(弱阳性),18 例高表达(强阳性)。

2.1 ICC 肿瘤组织中 MK 蛋白表达水平与临床资料及病理资料的关联性 在 T 分期 T1 + T2 期、有淋巴结转移、低分化程度者中, MK 蛋白高表达阳性率较 T 分期 T3 + T4 期、无淋巴结转移、高分化程度者显著升高(P 均 < 0.05),而在不同年龄、性别、TNM 分期、有无远处转移的分析中,并未发现 MK 蛋白表达水平差异有统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.2 不同 MK 蛋白表达水平 ICC 肿瘤患者生存率分析 对 35 例 ICC 患者进行了随访,本次随访截止 2018 年 3 月,完成随访 27 例,失访率为 22.9%;死亡 20 例。MK 蛋白低表达者的中位生存期为 23 个月, MK 蛋白高表达者为 7 个月,两者差异有统计学意义($P = 0.02$)。见图 1。图 1 可见删失者(包括失访 8 例,生存 7 例)共 15 例, MK 蛋白低表达者中 10 例,高表达者中 5 例;死亡者 MK 蛋白低表达者中 7 例,高表达者中 13 例。

表 1 ICC 肿瘤组织中 MK 蛋白表达水平与临床资料及病理资料的关联性 例(%)

临床及病理资料	例数	MK 低表达 ($n = 17$)	MK 高表达 ($n = 18$)	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)		59.00 \pm 9.39	63.1 \pm 6.41	0.143
性别				
男	13	5(38.4)	8(61.6)	0.489
女	22	12(54.5)	10(45.5)	
T 分期				
T1 + T2	19	6(31.6)	13(68.4)	0.044
T3 + T4	16	11(68.7)	5(31.2)	
淋巴结转移				
有	11	2(18.2)	9(81.8)	0.028
无	24	15(62.5)	9(37.5)	
远处转移				
有	6	2(33.3)	4(66.7)	0.658
无	29	15(51.7)	14(48.3)	
TNM 分期				
I + II	12	3(25.0)	9(75.0)	0.075
III + IV	23	14(60.9)	9(39.1)	
分化程度				
低	7	1(14.3)	6(85.7)	0.019
中	15	6(40.0)	9(60.0)	
高	13	10(76.9)	3(23.1)	

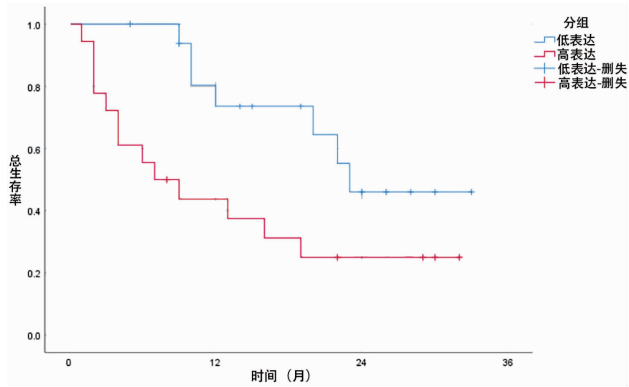


图 1 不同 MK 蛋白表达水平肿瘤患者生存曲线比较

3 讨论

ICC 作为恶性程度较高的肿瘤,由于尚欠缺早期诊断手段,其预后相对较差,仍是当前研究的热点和难点^[13]。由于 ICC 肿瘤组织无包膜,且可沿胆管壁呈浸润性生长,早期可发生血管侵犯及淋巴结转移^[14],因此 ICC 肿瘤发生发展过程中与组织的血管生成能力及侵袭转移密切相关。殷正丰等^[15]研究发现,在肝细胞癌中 MK 的表达显著升高,并与肝内的侵袭转移密切相关。姚行等^[16]提出,在肝外胆管癌中 MK 蛋白高表达提示肿瘤淋巴结转移的可能,预后较差。本研究生存分析显示,35 例 ICC 患者中 MK 蛋白高表达者生存期显著短于低表达者,提示 MK 蛋白与肿瘤恶性程度及预后密切相关。因此,推测 MK 蛋白可以作为潜在的 ICC 肿瘤标记物。

此外,在 T1 + T2 期、有淋巴结转移、分化程度低者中 MK 蛋白高表达阳性率较 T3 + T4 期、无淋巴结转移、分化程度高者显著增高。由此笔者认为, MK 蛋白在肿瘤形成早期可能参与血管生成及淋巴结转移, MK 高表达的肿瘤更易发生血管侵犯及浸润转移;而在肿瘤中晚期,由于肿瘤生长达到平台期及肿瘤组织坏死脱落, MK 蛋白表达相对减少。有报道称, MK 可通过促进上皮间质转化从而产生胆管癌吉西他滨耐药性^[17]。因此,笔者认为,早期干预 MK 蛋白的表达在控制肿瘤侵袭转移方面或可获益,从而为 ICC 的治疗提供新的思路。

本文尚存在以下不足,第一,样本量相对较少,有可能造成实验结果的假阳性。由于 ICC 发病隐匿且恶性程度高,多数患者就诊时已无手术机会,因此能够手术切除获得的样本相对较少,期待通过后期大样本临床数据获得更有力的证据;第二,本实验仅采用免疫组化方法检测 MK 蛋白的表达水平,后期将在此基础上,采用 RT-PCR、Western blot 方法进一步验证,进而更深入研究 MK 蛋白发挥促癌作用的分子机制,

为研究 MK 蛋白靶向药物研发提供理论参考。

综上所述,本课题结果显示, MK 拟可作为 ICC 肿瘤标记物, MK 蛋白高表达提示 ICC 恶性程度更高、发生血管侵犯及淋巴结转移可能性更大、预后更差。

参考文献

- [1] Bergquist A, von Seth E. Epidemiology of cholangiocarcinoma [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015, 29(2): 221-232.
- [2] Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, et al. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a casecontrol study [J]. Gastroenterology, 2005, 128(3): 620 - 626.
- [3] Bartella I, Dufour JF. Clinical diagnosis and staging of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2015, 24(4): 481 - 489.
- [4] 董辉, 丛文铭. 提高肝癌规范化病理诊断水平, 为临床精细化治疗保驾护航—《原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015 年版)》解读 [J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(7): 939 - 943.
- [5] Tomomura M, Kadomatsu K, Matsubara S, et al. A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product [J]. J Biol Chem, 1990, 265(18): 10765 - 10770.
- [6] Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, et al. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas [J]. Cancer Res, 1993, 53(6): 1281 - 1285.
- [7] Sakamoto K, Kadomatsu K. Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation [J]. Pathol Int, 2012, 62(7): 445.
- [8] Muramatsu T. Midkine: a promising molecule for drug development to treat diseases of the central nervous system [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(5): 410 - 423.
- [9] Obata Y, Kikuchi S, Lin Y, et al. Serum midkine concentrations and gastric cancer [J]. Cancer Sci, 2005, 96(1): 54 - 56.
- [10] Jia HL, Ye QH, Qin LX, et al. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(4): 1133 - 1139.
- [11] Ota K, Fujimori H, Ueda M, et al. Midkine as a prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2008, 99(4): 655.
- [12] Ibusuki M, Fujimori H, Yamamoto Y, et al. Midkine in plasma as a novel breast cancer marker [J]. Cancer Sci, 2009, 100(9): 1735.
- [13] 黄海. 消化道肿瘤化疗患者生存质量现状及影响因素探讨 [J]. 中国当代医药, 2015, 22(10): 161 - 163.
- [14] 吴胜东, 陆才德. 肝内胆管癌诊治进展 [J]. 现代实用医学, 2004, 16(9): 561 - 563.
- [15] 殷正丰, 罗祥基, 康晓燕, 等. 肝细胞癌高表达中期因子蛋白与肝内转移的关系 [J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(1): 27 - 29.
- [16] 姚行, 平金良, 戴利成, 等. 中期因子蛋白在肝外胆管癌中的表达及其临床意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(5): 400.
- [17] Lu Y, Yan B, Guo H, et al. Effect of midkine on gemcitabine resistance in biliary tract cancer [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 2003.