

## 肝内胆管癌中 E-cadherin/P120 的表达异常

翟博, 鄢和新, 刘淑琴, 陈磊, 吴孟超, 王红阳\*

(第二军医大学东方肝胆外科医院国际合作信号转导研究室, 上海 200438)

**[摘要]** **目的:**探讨肝内胆管癌中 P120 的表达特征及其与肿瘤临床病理特征和生存预后之间的关系。**方法:**应用免疫组织化学 EnVision 方法对 42 例肝内胆管癌标本进行 E-cadherin 和 P120 抗体染色。**结果:**E-cadherin 和 P120 的表达减低率分别为 64.3%(27/42) 和 73.8%(31/42)。E-cadherin 和 P120 的表达均与肿瘤的组织学分级(分别为  $P=0.009$  和  $P=0.003$ )、TNM 分期(分别为  $P=0.035$  和  $P=0.004$ )、肝内转移(分别为  $P=0.007$  和  $P=0.041$ )以及患者的生存预后(分别为  $P=0.024$  和  $P=0.004$ )之间存在显著相关。另外, P120 的表达缺失与 E-cadherin 的表达缺失之间协调一致。Cox 回归模型分析证实, 只有 P120 和肿瘤大小是肝内胆管癌患者生存预后的独立预测因素。**结论:**肝内胆管癌的发生发展中常发生 E-cadherin 和 P120 的表达下调, 且与肝内胆管癌的发生发展有关。二者均是肿瘤侵袭和患者预后的有价值预测指标, 但只有 P120 是肝内胆管癌患者生存预后的独立预测因素。

**[关键词]** 胆管, 肝内; 胆管肿瘤; 上皮钙黏附素; P120; 预后

**[中图分类号]** R 735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1324-04

## Altered expression of E-cadherin/P120 complex in human intrahepatic cholangiocarcinomas; correlation with clinicopathologic parameters and patients' survival

ZHAI Bo, YAN He-xin, LIU Shu-qin, CHEN Lei, WU Meng-chao, WANG Hong-yang\* (International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the expression of P120 in intrahepatic cholangiocarcinomas (ICCs) and its correlation with the clinicopathologic parameters and patients' survival. **Methods:** An immunohistochemical study was performed using Dako EnVision Kit to detect the expression of E-cadherin and P120-catenin in 42 ICC specimens. **Results:** The expression of E-cadherin and P120 was reduced in 27 (64.3%) specimens and 31 (73.8%) specimens, respectively. The expression of E-cadherin and P120 was significantly correlated with the tumor histological grade ( $P=0.009$  and  $P=0.003$ , respectively), pTNM stage ( $P=0.035$  and  $P=0.004$ , respectively), intrahepatic metastasis ( $P=0.007$  and  $P=0.041$ , respectively), and patients' survival periods ( $P=0.024$  and  $P=0.004$ , respectively). In addition, the expression of P120 accorded with that of E-cadherin ( $P<0.001$ ). We also found that P120 expression and the tumor size were the independent prognostic factors for ICC patients by a Cox regression model. **Conclusion:** Down-regulation of E-cadherin and P120 expression occurs frequently in ICC patients, which might be associated with the progression and development of ICC. Both of them may be valuable biologic markers for predicting tumor invasion, metastasis and patients' survival, but only P120 was an independent prognostic factor for patients' survival.

**[KEY WORDS]** bile ducts, intrahepatic; bile duct neoplasms; E-cadherin; P120; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1324-1327]

肝内胆管癌在肝脏原发性恶性肿瘤中居于第 2 位。尽管诊断和外科技术已经有了长足的进展, 但仍未弄清肝内胆管癌发生发展的分子生物学机制。

E-cadherin 是一种跨膜蛋白, 在同型细胞之间借助钙离子介导上皮细胞之间的黏附, 其功能的发挥必须有 catenin, 包括 P120 的正常存在。P120 独立于  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -catenin 之外, 单独与 E-cadherin 发生连接, 因此某种意义上可以将 P120 和 E-cadherin 视为一种复合物形式。

目前有关 E-cadherin/P120 表达与肝内胆管癌

发生发展之间的关系尚未见报道, 有鉴于此, 我们在 42 例肝内胆管癌患者的术后标本上同时检测 E-cadherin 和 P120 的表达, 并进一步探讨其表达与肿瘤侵袭转移以及患者生存预后之间的关系。

**[基金项目]** 青岛市自然科学基金(032jz12)。Supported by Natural Science Foundation of Qingdao(032jz12)。

**[作者简介]** 翟博, 博士, 主治医师。E-mail: zhaiboshi@sina.com

\* Corresponding author. E-mail: hywangk@online.sh.cn

## 1 材料和方法

1.1 临床资料 42 例肝内胆管癌标本全部取自上海东方肝胆外科医院 1997 年 10 月到 2004 年 3 月间的术后患者。其中男性 32 例, 女性 10 例。年龄 27~73 岁, 中位年龄 51 岁。每例标本均包括肿瘤组织和癌旁组织。42 例患者中伴发肝硬化者 13 例 (30.9%), 伴发慢性肝炎者 15 例 (35.7%)。

临床病理指标包括组织学分级、pTNM 分期、肿瘤大小、包膜和血管侵袭与否、卫星结节的有无、肝内转移、周围淋巴结浸润以及患者的生存状况。根据 Liver Cancer Study of Japan 标准<sup>[1]</sup>, ICC 的组织学分级包括高、中、低 3 种程度。根据 International Union Against Cancer UICC 进行 pTNM 分期<sup>[2]</sup>。

1.2 免疫组织化学染色 采用 EnVision 方法。简单步骤为: 切片脱蜡, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中室温孵育 20 min, 洗涤后在 0.01 mol/L 柠檬酸中 100℃ 微波炉加热 20 min, 1% BSA 封闭 30 min。加入抗兔 E-cadherin 和 P120 抗体 (Santa Clauze Corp, USA, 稀释度均为 1:200) 4℃ 过夜。羊抗兔二抗 37℃ 30 min, PBS 漂洗后 DAB (显色 5 min, 苏木精衬染, 脱水, 封片。取 10 例正常肝组织做抗体阳性对照, PBS 做阴性对照。

1.3 染色评估 参照 Gamallo 等<sup>[3]</sup> 免疫组化评分方法进行染色结果评估。评分标准包括染色强度和染色范围两方面: (1) 染色强度分为 0~3 分 (0 分: 与非实质细胞的染色背景相同; 1 分: 淡黄色; 2 分: 黄褐色; 3 分: 红褐色, 强度与正常肝内胆管上皮细胞的染色一致)。 (2) 染色范围指阳性染色细胞占总

细胞的百分比, 分为 0~4 分 (0 分: 阳性染色细胞 < 5%; 1 分: 5%~25%; 2 分: 26%~50%; 3 分: 51%~75%; 4 分: 76%~100%)。染色强度积分与染色范围积分之和 ≥ 6 定义为表达阳性 (+), < 6 定义为表达阴性 (-)。

1.4 统计学处理 应用  $\chi^2$  和 Fisher 检验对蛋白表达与组织学特征以及临床指标间的关系进行统计学处理。Log-rank 检验进行生存分析。Kaplan-Meier 显示生存曲线, E-cadherin 和 P120 表达的预后价值应用 log-rank 检验, Cox 回归模型进行多因素分析。所有统计学处理均采用 SPSS 软件系统。

## 2 结果

2.1 免疫组化染色 在非肿瘤肝脏组织中, E-cadherin 和 P120 均在肝细胞的胞膜上强烈表达。但是从非肿瘤区到肿瘤区其表达呈逐渐减弱趋势。另外, 小胆管、增生胆管以及血管均在内皮细胞膜上强烈表达 2 种分子。其他类型细胞中未见到分子表达。在 ICC 区, E-cadherin 和 P120 的表达下调率分别为 27 例 (64.3%) 和 31 例 (73.8%), 其中完全表达缺失者分别为 8 例和 10 例。另外, 17 例 (40.5%) 中见到 P120 在胞质中表达。

2.2 ICC 中 E-cadherin / P120 表达与组织学特征间的关系 如表 1 所示, E-cadherin 和 P120 的膜表达与肿瘤分级显著相关 (分别为  $P=0.009$  和  $P=0.003$ ), 分化差的肿瘤细胞中的表达比高分化和中等分化的肿瘤细胞更容易发生异常。另外, E-cadherin 和 P120 的表达与肿瘤 TNM 分期呈负相关 (分别为  $P=0.035$  和  $P=0.004$ )。

表 1 E-cadherin/P120 蛋白表达与肿瘤组织学特征间的关系

Tab 1 Relationship between expression of E-cadherin/P120 protein and histological characteristics of tumors

Index	N	E-cadherin			P120		
		+	-	P	+	-	P
Differentiation grade							
Highly	3	3(100)	0(0)	0.009	3(100)	0(0)	0.003
Intermediately	14	7(50.0)	7(50.0)		5(35.7)	9(64.3)	
Poorly	25	5(20.0)	20(80.0)		3(12.0)	22(88.0)	
pTNM							
I	2	2(100)	0(0)	0.035	2(100)	0(0)	0.004
II	9	5(55.6)	4(44.4)		5(55.6)	4(44.4)	
III	25	8(32.0)	17(68.0)		4(16.0)	21(84.0)	
IV	6	0(0)	6(100)		0(0)	6(100)	

2.3 E-cadherin/P120 表达与临床指标间的关系 如表 2 所示, E-cadherin 或 P120 的表达减弱均与 ICC 的肝内转移显著相关 (分别为  $P=0.007$  和

$P=0.041$ )。两者表达与肿瘤大小、包膜侵袭、淋巴结浸润以及卫星结节之间未发现相关性。

表 2 E-cadherin/P120 mRNA 表达与肿瘤临床病例参数间的关系

Tab 2 Relationship between expression of E-cadherin/P120 mRNA and clinicopathological parameters of tumors

[n(%)]

Index	N	E-cadherin			P120		
		+	-	P	+	-	P
Size(d/cm)							
<5	17	10(58.8)	7(41.2)	0.123	8(47.1)	9(52.9)	0.405
5-10	16	5(31.3)	11(68.7)		5(31.3)	11(68.7)	
>10	9	2(22.2)	7(77.8)		2(22.2)	7(77.8)	
Capsular invasion							
Present	6	4(66.7)	2(33.3)	0.202	3(50.0)	3(50.0)	0.649
Absent	36	13(36.1)	23(63.9)		12(33.3)	24(66.7)	
Satellite nodules							
Present	11	5(45.5)	6(54.5)	0.733	3(27.3)	8(72.7)	1.000
Absent	31	12(38.7)	19(61.3)		10(32.3)	21(67.7)	
Vascular invasion							
Present	13	3(23.1)	10(76.9)	0.179	3(23.1)	10(76.9)	0.314
Absent	29	14(48.3)	15(51.7)		12(41.4)	17(58.6)	
Lymph node involvement							
Present	7	1(14.3)	6(85.7)	0.210	1(0)	6(100)	0.390
Absent	35	16(45.7)	19(54.3)		14(40)	21(60)	
Intrahepatic metastasis							
Present	10	1(10)	9(90)	0.031	0(0)	10(100)	0.007
Absent	32	16(50)	16(50)		15(46.9)	17(53.1)	

2.4 E-cadherin 和 P120 表达间的相关性 E-cadherin 和 P120 共同阳性和共同阴性表达分别为 9 例和 25 例。6 例 E-cadherin 阳性表达者 P120 却表达阴性,2 例 P120 阳性表达者 E-cadherin 表达阴性。E-cadherin 和 P120 表达之间存在显著相关性( $P < 0.001$ )。

2.5 E-cadherin/P120 表达与患者生存预后间的关系 随访的 42 例 ICC 患者中有 37 例得到了有效的生存资料。随访时间 4~72 个月。37 例具有随访资料的患者中,26 例患者在随访期间肿瘤复发,其中 17 例(45.9%)死于 ICC 复发,3 例死于其他疾病,17 例在 72 个月后仍然存活。17 例 E-cadherin 阳性表达和 25 例阴性表达患者的平均生存期分别为 54.6 和 35.9 个月;中位生存时间分别为 51.0 和 32.0 个月。3 年生存率分别为 82.5%和 32.6%,5 年生存率 33.0%和 14.6%。15 例 P120 阳性表达和 27 例阴性表达患者的平均生存期分别为 58.9 个月和 36.6 个月,中位生存时间分别为 63.0 个月和 34.0 个月。3 年生存率分别为 88.9%和 39.2%,5 年生存率分别为 43.2%和 16.0%。所有患者的生存分析显示,E-cadherin 和 P120 表达异常与患者的不良生存显著相关(分别为  $P = 0.024$  和  $P = 0.004$ )。表 3 显示了 37 例获得随访的 ICC 患者的 Cox 模型回归分析,结果显示只有 P120 和肿瘤大小是 ICC 患者的独立预后指标(分别为  $P = 0.049$  和

$P = 0.037$ )。

表 3 37 例患者生存的 Cox 多变量分析

Tab 3 Cox multivariate analysis for survival of 37 patients

Index	Sig	RR	95.0% CI	
			Lower	Upper
E-cadherin expression	0.724	1.525	0.147	15.827
P120 expression	0.049	0.088	0.008	0.991
Differentiation	0.194	0.407	0.105	1.583
pTNM stage	0.073	2.898	0.904	9.288
Tumor size	0.037	0.387	0.159	0.944
Capsular invasion	0.052	17.046	0.981	296.166
Satellite nodules	0.709	1.597	0.137	18.578
Vascular invasion	0.948	0.961	0.284	3.247
Lymph node invasion	0.087	4.720	0.800	27.855
Intrahepatic metastasis	0.786	1.352	0.154	11.899

Sig: Significance; RR: Relative risk; CI: Confidence interval

### 3 讨论

与其他肿瘤的报道<sup>[4~6]</sup>相似,本研究证实:E-cadherin 和 P120 的表达减弱或缺失与肝内胆管癌的组织学分级显著相关。在分化差的肿瘤中,染色呈局部和异质性分布,伴随沿胞膜的斑点状的特征。因此,E-cadherin 和 P120 均可以视为肿瘤分化标志。另外,该复合物的染色强度从癌旁向癌灶呈逐渐减弱趋势,表明 P120 在 ICC 的发展过程中可能发挥着重要作用。

E-cadherin 只位于肿瘤细胞或正常细胞的胞膜上,然而 P120 却可以在胞膜或细胞质中出现染色。Roczniak-Ferguson 等<sup>[7]</sup>观察了不同的 E-cadherin 突变体与不同 P120 突变体之间的相互作用情况,显示 P120 有一种内在的胞核、胞质间穿梭活性,这种活性至少部分受到一些外在因素的影响,比如微管网系统和 cadherin。Mayerle 等<sup>[8]</sup>报道,P120 在胰腺癌中呈现细胞核染色和表达上调,但在我们的实验中并未发现这种情况,可能与抗原修复条件有关,因此进一步研究 P120 在细胞核中的表达和作用机制是非常重要的。

本研究探讨了 E-cadherin 和 P120 表达减弱与一些临床病理学指标间的关系。Osada 等<sup>[9]</sup>证实,E-cadherin 与肝细胞癌的肝内转移有关。Asayama 等<sup>[10]</sup>评估了 E-cadherin 在混合型肝癌中的表达,提示 E-cadherin 的表达减弱与明显与 ICC 组分的肝内转移、肿瘤分级有关,与本研究结果一致。因此,E-cadherin 和 P120 不仅在 ICC 的发生过程中有着重要的作用,而且也与肿瘤的进展相关,可以视为一个侵袭转移标志。

从本研究结果来看,P120 与 E-cadherin 表达之间存在显著一致性,E-cadherin 表达异常者常同时伴随 P120 表达的异常,但是 6 例 E-cadherin 阳性表达者 P120 却表达阴性,可见 P120 表达异常可能较 E-cadherin 更为频繁,其表达异常并不总是依赖于 E-cadherin。Thoreson 等<sup>[11]</sup>认为,由于 P120 发生表达缺失和序惯性 E-cadherin 降解,某些肿瘤可以发生形态学和行为上的改变。

其他肿瘤的研究评估了 E-cadherin/P120 表达与患者生存期间的关系<sup>[12~16]</sup>,但是结论一直充满争议。本研究发现 E-cadherin 和 P120 表达减弱均与患者的生存率明显相关。尽管如此,用 Cox 回归模型分析发现只有 P120 的异常表达是 ICC 患者的一个独立的预后指标。因此,P120 可以视为预测 ICC 患者生存预后的有价值的分子生物学指标。总之,ICC 中常发生 E-cadherin 和 P120 的异常表达。两者的异常表达与肿瘤分化、TNM 分期、肝内转移以及生存预后密切相关。两者在 ICC 的发生发展过程中均发挥着重要的作用。

#### [参考文献]

[1] Liver Cancer Study Group of Japan. General rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer[M]. 3rd ed.

Tokyo:Kanehara Press, 1992:96-109.

- [2] Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, et al. TNM Atlas, UICC[M]. 4 ed. Berlin:Springer Press, 1997:115-123.
- [3] Gamallo C, Palacios J, Suarez A, et al. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma[J]. Am J Pathol, 1993, 142:987-993.
- [4] Scholten AN, Aliredjo R, Creutzberg CL, et al. Combined E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin expression is a favorable prognostic factor in endometrial carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16:1379-1385.
- [5] Wang EH, Liu Y, Xu HT, et al. Abnormal expression and clinicopathologic significance of p120-catenin in lung cancer[J]. Histol Histopathol, 2006, 21:841-847.
- [6] Thoreson MA, Renolds AB. Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression[J]. Differentiation, 2002, 70(9-10):583-589.
- [7] Roczniak-Ferguson A, Reynolds AB. Regulation of p120 nucleocytoplasmic shuttling activity[J]. J Cell Sci, 2003, 116 (Pt 20):4201-4212.
- [8] Mayerle J, Friess H, Buchler MW, et al. Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein P120 in pancreatic cancer[J]. Gastroenterology, 2003, 124:949-960.
- [9] Osada T, Sakamoto M, Ino Y, et al. E-cadherin is involved in the intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1996, 24:1460-1467.
- [10] Asayama Y, Taguchi ki K, Aishima Si S, et al. The mode of tumor progression in combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: an immunohistochemical analysis of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin[J]. Liver, 2002, 22:43-50.
- [11] Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, et al. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion[J]. J Cell Biol, 2000, 148:189-202.
- [12] Wijnhoven BP, Pignatelli M, Dinjens WN, et al. Reduced p120ctn expression correlates with poor survival in patients with adenocarcinoma of the gastroesophageal junction[J]. J Surg Oncol, 2005, 92:116-123.
- [13] Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, et al. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease[J]. Cancer Res, 2005, 65:10938-10945.
- [14] Syrigos KN, Karayiannakis A, Syrighou EI, et al. Abnormal expression of p120 correlates with poor survival in patients with bladder cancer[J]. Eur J Cancer, 1998, 34:2037-2040.
- [15] Nakopoulou L, Zervas A, Gakiopoulou H, et al. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, P120ctn in patients with transitional cell bladder cancer[J]. Anticancer Res, 2000, 20 (6B):4571-4578.
- [16] Bantis A, Giannopoulos A, Gonidi M, et al. Expression of p120, Ki-67 and PCNA as proliferation biomarkers in imprint smears of prostate carcinoma and their prognostic value[J]. Cytopathology, 2004, 15:25-31.

[收稿日期] 2006-08-31

[修回日期] 2006-11-08

[本文编辑] 尹 荼