

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00155

精氨酸酶 2 在肝细胞癌组织中的表达及临床病理意义

肖 锋¹, 邵建国², 钱 铮¹, 孙 艳¹, 顾春燕^{1*}

1. 南通大学附属南通第三医院病理科, 南通 226006

2. 南通大学附属南通第三医院消化内科, 南通 226006

[摘要] **目的** 研究精氨酸酶 2(Arg-2)在肝细胞癌(HCC)组织中的表达及临床病理意义。**方法** 收集 113 例 HCC 组织及癌旁肝组织,其中 29 例伴有癌旁异型增生结节(DN),另取 12 例正常肝组织。运用蛋白质印迹分析法检测 Arg-2 蛋白在 15 例 HCC 组织、癌旁肝组织和 12 例正常肝组织中的表达;运用免疫组织化学方法检测 Arg-2 在 113 例 HCC、癌旁肝组织及 DN 中的表达情况,并分析其与 HCC 各临床病理特征间的关系以及鉴别诊断价值。**结果** 蛋白质印迹分析结果显示,Arg-2 在正常肝组织和癌旁肝组织中均不表达,在 HCC 组织中表达升高($P<0.01$);免疫组织化学结果显示,Arg-2 阳性表达于肝癌细胞质内,阳性率为 77.0%(87/113),其表达与 HCC 组织学分级相关($P<0.05$);Arg-2 在低级别 DN 中无表达,在高级别 DN 中阳性表达率为 14.3%(2/14),而在高分化 HCC 中阳性表达率为 66.7%(8/12),差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Arg-2 在 HCC 中高表达,并且与 HCC 组织学分级相关,其可能参与 HCC 的发生、发展过程。检测 Arg-2 表达有助于鉴别高分化 HCC 与 DN。

[关键词] 精氨酸酶 2;肝细胞癌;组织学分级;免疫组织化学

[中图分类号] R 735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)02-0155-05

Expression of arginase-2 in hepatocellular carcinoma tissues and its clinicopathological significance

XIAO Feng¹, SHAO Jian-guo², QIAN Zheng¹, SUN Yan¹, GU Chun-yan^{1*}

1. Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu, China

2. Department of Gastroenterology, Third Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of arginase-2 (Arg-2) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and to discuss its clinicopathological significance. **Methods** Totally 113 HCC samples and corresponding adjacent liver tissues were collected. Among them 29 cases were characterized by the presence of dysplastic nodules (DN). Another 12 samples of normal liver tissues were collected as controls. Western blotting analysis was used to detect the Arg-2 protein expression in 15 HCC samples, corresponding adjacent liver tissues and 12 control samples. Immunohistochemical staining was performed to detect the Arg-2 expression in 113 HCC samples, corresponding adjacent liver tissues and DN samples. The correlation of Arg-2 expression with clinicopathological features of HCC was analyzed. **Results** Western blotting analysis revealed no Arg-2 expression in adjacent liver tissues and normal liver tissues, while the expression was significantly increased in HCC tissues ($P<0.01$). Immunohistochemical staining showed that Arg-2 was expressed in the cytoplasm of HCC cells, with a positive rate of 77.0% (87/113). Arg-2 expression was found to be correlated with the histological grades of HCC tissue ($P<0.05$). Arg-2 was not expressed in low-grade DN; its positive rate was 14.3% (2/14) in the high-grade DN and 66.7% (8/12) in well-differentiated HCC ($P<0.05$). **Conclusion** Arg-2 is highly expressed in the HCC tissues and its expression is associated with histological grades of HCC, and it may be involved in the development and progression of HCC. Detecting Arg-2 expression may help to differentiate HCC from DN.

[Key words] arginase-2; hepatocellular carcinoma; histological grading; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2): 155-159]

[收稿日期] 2012-12-24 **[接受日期]** 2013-01-20

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK2012653),南通市社会事业科技创新与示范计划(HS2011049). Supported by Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2012653) and Technological Innovation and Demonstration Project of Social Affair of Nantong, China (HS2011049).

[作者简介] 肖 锋, 硕士, 住院医师. E-mail: xfeng_1981@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0513-89093913, E-mail: guchunyan143@yahoo.com.cn

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,而我国 HCC 的发病率明显高于世界平均水平。深入研究 HCC 患者蛋白质谱的变化对揭示其发生、发展规律和致病机制具有重要意义。精氨酸酶 2(arginase-2, Arg-2)与癌症关系密切,研究发现 Arg-2 在肺癌、前列腺癌以及乳腺癌等肿瘤中表达水平增加^[1-3];并且通过抑制肿瘤细胞中 Arg-2 的表达,降低肿瘤细胞的增殖活性^[4]。但 Arg-2 在 HCC 中的表达情况还缺乏相关研究。因此,本研究应用蛋白质印迹法和免疫组织化学技术检测 Arg-2 在 HCC 及癌旁肝组织中的表达情况,探讨其与 HCC 临床病理学特征间的关系,以进一步认识其临床意义。

1 材料和方法

1.1 临床资料 选取我院病理科 2009 年 8 月至 2011 年 12 月 HCC 手术标本 113 例,术前均未行化学及放射治疗,诊断均经术后病理证实。其中男 89 例,女 24 例;年龄 28~75 岁,平均(53.1±9.6)岁。切取所有患者癌组织及距肿瘤 2~3 cm 的癌旁肝组织,并在其癌旁选出异型增生结节(dysplastic nodules, DN)29 例,其中低级别异型增生结节(low-grade DN, L-DN)15 例,高级别异型增生结节(high-grade DN, H-DN)14 例;经中性甲醛固定,石蜡包埋。另取 12 例肝血管瘤患者手术切除的瘤旁正常肝组织以及上述 113 例 HCC 患者中 15 例的癌组织及相应癌旁肝组织新鲜标本,液氮冻存储备用。

1.2 主要试剂 兔抗人 Arg-2 抗体购自 Santa Cruz 公司,二抗工作液及免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 蛋白质印迹分析检测 Arg-2 蛋白在 HCC 及相应癌旁肝组织、正常肝组织中的表达 在新鲜 HCC 组织及相应癌旁肝组织和正常肝组织中加入蛋白裂解液,冰浴匀浆,4℃、12 000×g 离心 20 min,取上清,测定蛋白含量。分别取蛋白样品各 40 μg,加入 4×十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)上样缓冲液,于沸水中加热 5 min,行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后,进行湿式电转移。将转移后的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜用含 10%脱脂奶粉的三羟甲基胺基甲烷-盐酸盐缓冲液(trisaminomethane-hydrochloric acid buffer saline and Tween, TBST)室温包被 2 h,然后用抗 Arg-2(1:800)抗体室温孵育 1 h,4℃过夜,以 β-actin 作为内参

对照。TBST 漂洗 5 min×5 次,转入辣根过氧化物酶交联的免疫球蛋白 G(horseradish peroxidase-Immunglobulin G, HRP-IgG)中,室温孵育 2 h, TBST 漂洗 5 min×5 次,化学发光试剂(electrochemiluminescence, ECL)发光,显影,定影。

1.4 免疫组织化学检测及结果判定 所有标本经 10%中性甲醛溶液固定后常规组织处理,4 μm 厚连续切片,分别行 H-E 和免疫组化染色。其中免疫组化染色采用 MaxVision 二步法,参照试剂盒说明书进行。PBS 液代替一抗作阴性对照,已知阳性的组织作阳性对照。免疫组化染色以肝细胞质棕黄色颗粒为阳性,按阳性细胞所占百分比并参考着色强度确定分级如下:无明显阳性细胞(-),阳性细胞数≤25%为弱阳性(+),阳性细胞数 25%~50%为中度阳性(++),阳性细胞数≥50%为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 15.0 统计软件分析处理数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法;Arg-2 表达与 HCC 患者临床病理特征的关系采用 Spearman 秩相关分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 蛋白质印迹分析结果 蛋白质印迹分析结果显示,Arg-2 在癌旁肝组织和正常肝组织不表达,在癌组织中的表达高于癌旁肝组织和正常肝组织($P < 0.01$, 图 1)。

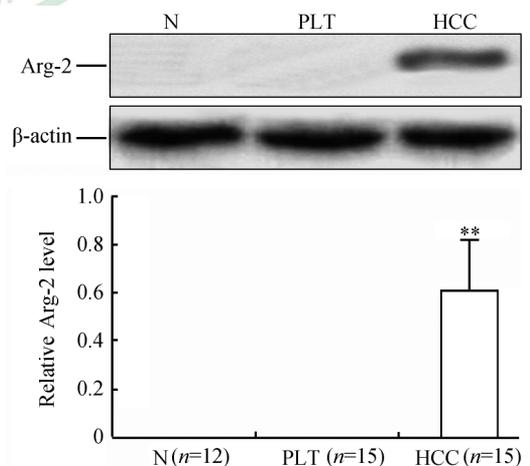


图 1 蛋白质印迹分析检测 Arg-2 蛋白的表达
Fig 1 Western blotting analysis of Arg-2 protein expression

N: Normal liver tissues; PLT: Paracancerous liver tissues; HCC: Hepatocellular carcinoma; Arg-2: Arginase-2. ** $P < 0.01$ vs N and PLT group; $\bar{x} \pm s$

2.2 免疫组化检测 Arg-2 在 HCC 中的表达 免疫组化检测结果显示,Arg-2 的阳性染色见于肝癌细胞的胞质内,正常肝组织及癌旁肝组织中均不表达(图

2A、2B、2E、2F)。113 例 HCC 组织中 87 例 Arg-2 阳性表达,阳性率为 77.0%。

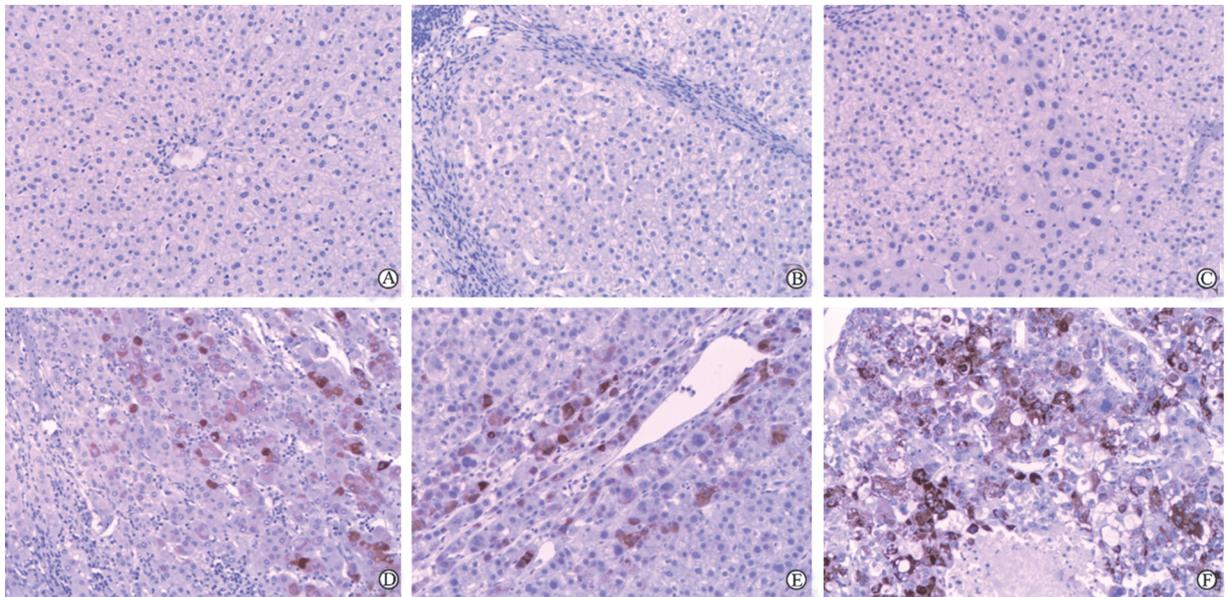


图 2 Arg-2 表达的免疫组化检测结果(MaxVision 二步法)

Fig 2 Immunohistochemical staining of Arg-2 protein expression (MaxVision method)

A: Normal liver tissues; B: Paracancerous cirrhotic liver tissues; C: Low-grade dysplastic nodules; D: High-grade dysplastic nodules; E: Hepatocellular carcinoma tissues of histological grading I; F: Hepatocellular carcinoma tissues of histological grading III. Original magnification: $\times 100$

2.3 HCC 组织中 Arg-2 表达与临床病理因素的关系 Arg-2 表达与临床病理因素之间的相关性分析显示,随着组织学分级等级升高,Arg-2 表达水平升

高($r=0.2862$, $P=0.0019$);与年龄、性别、乙型肝炎病毒感染、肿瘤最大径、肿瘤数目、肝硬化与否、微血管侵犯、术后复发等均无关(表 1)。

表 1 Arg-2 表达与 HCC 患者临床病理特征的关系

Tab 1 Correlation of Arg-2 expression with clinicopathological features of patient with primary hepatocellular carcinomas

Item	N	Arg-2 expression <i>n</i>				χ^2 test		Spearman rank correlation analysis	
		-	+	++	+++	χ^2 value	<i>P</i> value	<i>r</i> value	<i>P</i> value
Age (year)						3.134 7	0.371	0.081 9	0.388 6
$\leq 53.1^a$	62	17	24	20	1				
> 53.1	51	9	24	15	3				
Sex						3.417 2	0.332	-0.116 2	0.218 3
Male	88	19	35	30	4				
Female	25	7	13	5	0				
HBsAg						1.002 8	0.801	0.010 5	0.911 9
Negative	14	4	5	4	1				
Positive	99	22	43	31	3				
Serum AFP $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$						1.675 6	0.642	0.077 8	0.412 5
< 20	49	14	19	14	2				
≥ 20	64	12	29	21	2				

续表

Item	N	Arg-2 expression n				χ^2 test		Spearman rank correlation analysis	
		-	+	++	+++	χ^2 value	P value	r value	P value
Liver cirrhosis						1.133 6	0.769	0.062 0	0.513 9
Present	100	24	42	31	3				
Absent	13	2	6	4	1				
Tumor size d/cm						8.357 1	0.213	0.166 3	0.077 0
≤ 3	45	15	19	11	0				
>3 but ≤ 5	37	6	14	15	2				
>5	31	5	15	9	2				
Tumor number						0.355 0	0.949	0.034 0	0.720 7
Single	82	20	34	25	3				
Multiple	31	6	14	10	1				
Grades						15.835 0	0.015	0.286 2	0.001 9
I	12	4	8	0	0				
II	56	16	25	14	1				
III	45	6	15	21	3				
Vascular invasion						0.962 6	0.810	-0.071 2	0.453 3
Present	35	7	14	13	1				
Absent	78	19	34	22	3				
Relapse ^b						2.904 7	0.406	0.014 6	0.886 9
Yes	45	14	15	13	3				
No	53	12	24	16	1				

^a: Mean age; ^b: Fifteen patients were not included due to lost in follow-up

2.4 免疫组化检测 Arg-2 在肝 DN 中的表达 由于观察到 Arg-2 在正常肝组织及癌旁肝组织均不表达,为进一步分析 Arg-2 的鉴别诊断价值,本研究选出癌旁组织中 L-DN 15 例,H-DN 14 例,行免疫组化 Arg-2 染色,结果显示: Arg-2 在 L-DN 未见着色,在 H-DN 中阳性表达率为 14.3% (2/14),见图 2C、2D,与高分化 HCC(I 级)阳性表达率[66.7% (8/12),表 1]差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

Arg 是肝脏鸟氨酸循环中的一个催化酶,它是三聚体结构,在鸟氨酸循环的最后过程起催化作用。它能水解 L-精氨酸,生成尿素和 L-鸟氨酸。Arg 除在机体尿素生成中发挥关键作用外,还参与催化合成精胺和精脞等多种细胞生长必需的代谢分子。因此,Arg 的表达改变将对细胞代谢水平和生长状态产生显著影响。Arg 有 2 个同工酶,分别为 Arg-1 和 Arg-2。Arg-1 在肝脏中有较高的活性,也称为“肝型 Arg”;Arg-2 也称为“肝外 Arg”,主要在肾脏、小肠、胃、胰腺、脑等组织中表达^[5]。研究表明: Arg-1 在 HCC 组织中表达明显降低^[6];Arg-2 在肺癌、前列腺癌以及乳腺癌等肿瘤中表达水平增加,表

明 Arg-2 参与这些肿瘤的发生、发展过程^[1-3]。通过抑制高生长活性的肿瘤细胞中 Arg-2 的表达,能明显降低细胞的增殖活性,甚至直接导致细胞的凋亡^[4],表明 Arg-2 是部分肿瘤细胞生长、增殖的必需因素。

本研究应用蛋白质印迹分析和免疫组织化学染色检测发现,Arg-2 在 HCC 组织中表达明显升高,这与 Arg-2 在肺癌、前列腺癌以及乳腺癌等肿瘤中的表达趋势一致。通过分析 HCC 中 Arg-2 蛋白表达与临床病理特征间的关系发现,Arg-2 与肿瘤细胞组织学分级密切相关,其表达水平随组织学分级升高而逐渐升高,提示 Arg-2 可能参与 HCC 的发生、发展过程。研究表明,精氨酸是调节 T 细胞活化和增殖的必需氨基酸之一,细胞外的精氨酸被 Arg-2 水解后,T 细胞 CD3 ζ 链表达受到影响,进而抑制 T 细胞增殖,最终影响对肿瘤细胞的免疫抑制功能^[7-8]。同时,Arg-2 能够激活肿瘤诱导的骨髓源性抑制细胞(myeloid-derive suppressor cells, MD-SCs),后者存在于几乎所有肿瘤患者的外周血中,主要发挥免疫抑制作用,介导肿瘤患者系统性免疫功能障碍和局部的肿瘤免疫逃避^[9]。Arg-2 在 HCC 中的异常表达是否通过介导机体免疫抑制而导致

HCC的发生发展,这需要进一步的实验研究证实。Arg-2与诱导型一氧化氮合酶(inducible NO synthase, iNOS)共用底物精氨酸,Arg-2表达增加能够直接导致精氨酸水解增加,从而导致iNOS底物相对减少,进而NO合成减少^[10],而NO能通过调节肿瘤血管生成、细胞毒性反应以及肿瘤免疫等多种机制影响肿瘤的生物进程。另外,在影响细胞增殖方面,Arg-2通过水解L-精氨酸生成L-鸟氨酸,进而合成精胺,精胺是肿瘤组织持续快速生长所必需的^[11]。可以推测:Arg-2在HCC中表达升高能促进精胺的合成,进而促进癌细胞的快速生长。总之,Arg-2能通过多种途径影响肿瘤的进展,但Arg-2是否参与HCC发生发展过程,以及通过何种机制参与还有待进一步研究。

HCC的发生发展大多是一个从肝炎、肝硬化、DN到癌的渐进过程,在这个过程中,DN尤其是H-DN与高分化HCC的鉴别诊断一直是一个难点。由于观察到Arg-2在正常肝组织及癌旁肝组织均不表达,为进一步分析Arg-2的鉴别诊断价值,本研究选出癌旁组织中L-DN和H-DN,行免疫组化Arg-2染色,结果显示:Arg-2在L-DN未见着色,在H-DN中阳性表达率为14.3%,而在高分化HCC中阳性表达率为66.7%,差异有统计学意义。提示Arg-2免疫组化染色对肝细胞癌的病理诊断,尤其在高分化HCC与DN的鉴别诊断中有一定的帮助。

综上所述,Arg-2可能参与HCC发生发展过程,并且有望成为鉴别DN与高分化HCC的参考指标之一。进一步明确Arg-2在HCC中的作用及具体机制,将有助于更深入认识HCC,也为临床寻找有效的治疗靶点提供新的依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Rotondo R, Mastracci L, Piazza T, Barisione G, Fabbi M, Cassanello M, et al. Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123:1108-1116.

- [2] Mumenthaler S M, Rozengurt N, Livesay J C, Sabaghian A, Cederbaum S D, Grody W W. Disruption of arginase II alters prostate tumor formation in TRAMP mice[J]. *Prostate*, 2008, 68:1561-1569.
- [3] Perez G, Olivares I M, Rodriguez M G, Ceballos G M, Garcia Sanchez J R. Arginase activity in patients with breast cancer: an analysis of plasma, tumors, and its relationship with the presence of the estrogen receptor [J]. *Onkologie*, 2012, 35:570-574.
- [4] Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60:3305-3312.
- [5] Choi S, Park C, Ahn M, Lee J H, Shin T. Immunohistochemical study of arginase 1 and 2 in various tissues of rats[J]. *Acta Histochem*, 2012, 114:487-494.
- [6] Yan B C, Gong C, Song J, Krausz T, Tretiakova M, Hyjek E, et al. Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms [J]. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34:1147-1154.
- [7] Rodriguez P C, Zea A H, Culotta K S, Zabaleta J, Ochoa J B, Ochoa A C. Regulation of T cell receptor CD3 zeta chain expression by L-arginine[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:21123-21129.
- [8] Rodriguez P C, Zea A H, DeSalvo J, Culotta K S, Zabaleta J, Quiceno D G, et al. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2003, 171:1232-1239.
- [9] Zea A H, Rodriguez P C, Atkins M B, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:3044-3048.
- [10] Sousa M S, Latini F R, Monteiro H P, Cerutti J M. Arginase 2 and nitric oxide synthase: pathways associated with the pathogenesis of thyroid tumors[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49:997-1007.
- [11] Cederbaum S D, Yu H, Grody W W, Kern R M, Yoo P, Iyer R K. Arginases I and II: do their functions overlap? [J]. *Mol Genet Metab*, 2004, 81:S38-S44.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群