

·临床研究·

伴门静脉癌栓的肝癌手术预后相关基因的筛选

邹如海^{1*}, 韩峰¹, 李安华¹, 洪健², 石明², Kam M. Hui³, 元云飞²

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 1.超声科 2.肝胆科,广东广州 510060;3.新加坡国立癌症中心 Humphrey Oei 肿瘤研究所 169610)

摘要:【目的】全基因芯片技术筛选伴肉眼门静脉癌栓(PVTT)肝细胞癌患者的基因谱,并进一步分析筛选出的基因的临床预测价值。【方法】40例伴有PVTT的肝癌根据术后中位生存期分为2组:长生存期组与短生存期组,采用全基因芯片技术和交叉检验重复抽样方法筛选出具有表达差异的基因谱,并进一步采用免疫组织化学方法验证筛选出的基因的临床意义。【结果】本研究共筛选出的10个表达差异显著的基因,包括AKR1C1、TARDBP、EIF4E、MFN1、SNRNP25、LOC55908、ARPP19、RORC、PEX11B和EGFR2,对伴有PVTT的肝癌术后长生存期患者的预测准确性达95%,特异性100%,假阳性率0。其中肝癌相关基因TD26(Hepatocellular carcinoma associated-gene TD26)在长生存期组中表达明显上调($P < 0.001$),免疫组化染色验证TD26蛋白在长生存期组病例中表达显著高于短生存期组($P = 0.016$)。【结论】本研究筛选出的10个基因有可能作为伴有PVTT的肝细胞癌患者手术预后的预测指标;TD26在伴PVTT的肝癌术后长期生存患者中表达增高。

关键词:肝肿瘤;肝切除术;基因表达谱;肝癌相关基因TD26;预后**中图分类号:**R735.9**文献标志码:**A**文章编号:**1672-3554(2011)03-0342-06

Identification and Validation of a Novel Gene Signature Associated with Surgical Outcome of Human Hepatocellular Carcinoma with Portal Vein Tumor Thrombus

ZOU Ru-hai^{1*}, HAN Feng¹, LI An-hua¹, HONG Jian², SHI Ming², Kam M. Hui³, YUAN Yun-fei²

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Hepatobiliary Oncology, Key Laboratory of Oncology in South China//Cancer Center of Sun Yat-sun University, Guangzhou 510060, China; 3. Bek Chai Heah Laboratory of Cancer Genomics, Division of Cellular and Molecular Research, Humphrey Oei Institute of Cancer Research, National Cancer Centre 169610, Singapore)

Abstract:【Objective】To identify and validate a gene signature to predict prognosis and select suitable surgical candidate for HCC with PVTT (portal vein tumor thrombus) by microarray gene profiling. 【Methods】Forty HCC with PVTT cases were divided into two groups: long-term survival and short-term survival, according to their median survival. Gene profiling study and a 3-fold cross-validation and resampling method were performed to pick up candidate genes, and then immunohistochemistry (IHC) study was used to validate the microarray results. 【Results】Ten candidate genes including AKR1C1, TARDBP, EIF4E, MFN1, SNRNP25, LOC55908, ARPP19, RORC, PEX11B, and EGFR2 were selected by microarray. The sensitivity, specificity, and false positive rates for selecting postoperative longer survivor in HCC patients with PVTT were 95%, 100%, and 0%, respectively. Hepatocellular carcinoma associated gene TD26 (LOC55908) was the most significant up-regulated gene in longer survivors (fold-change=9.51, $P < 0.001$). The expression of TD26 in longer survivors was validated by IHC study ($P = 0.016$).【Conclusion】Our data demonstrate that these 10 genes expression signature could be a novel biomarker to predict prognosis for HCC patients with PVTT.

Key words: hepatocellular carcinoma; hepatic resection; gene profiling expression; hepatocellular carcinoma associated gene TD26; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(3): 342-347]

收稿日期:2011-01-25

基金项目:国家自然科学基金(30872489)

作者简介:邹如海,博士,研究方向:肝癌分子生物学,E-mail: zourh@sysucc.org.cn, * 通信作者:邹如海

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 通常起病隐匿,病情进展迅速,多数病例就诊时已属晚期,且多伴有肉眼可见的门静脉癌栓 (portal vein tumor thrombus, PVTT)。部分可接受手术治疗的伴 PVTT 的肝癌患者术后 1、3 及 5 年生存率仅为 45%、17% 和 10%^[1], 美国肝病学会的临床指引 (American Association for the Study of Liver Disease, AASLD) 和巴塞隆拿肝癌临床分期 (Barcelona-clinic liver cancer classification, BCLC) 均不建议该类患者接受外科手术治疗, 而应选择姑息性治疗, 如 TACE (transcatheter arterial chemoembolization) 和抗血管生成药物治疗^[2-4]; 而国际肝癌合作研究组 (The International Cooperative Group on HCC) 的研究发现, 部分伴 PVTT 的肝癌患者接受手术, 能显著提高中位生存期 (延长 9 个月) 以及改善生存质量^[5]。伴有 PVTT 的肝癌手术预后差, 复发率高。目前临床上尚缺乏用于预测伴 PVTT 肝癌患者接受手术切除疗效的预测指标, 如何筛选适合手术治疗伴 PVTT 的肝癌患者并预测其预后是目前研究的热点^[5-7]。PVTT 是肝癌转移及复发的高危因素, PVTT 的研究对于提高 HCC 患者的疗效有重要的意义。本研究采用人全基因芯片技术筛选伴 PVTT 的肝癌基因谱, 分析筛选出的候选基因的临床预测价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本研究所用的病例资料来源于中山大学肿瘤

防治中心肝胆科数据库, 选取 2002 年 9 月至 2009 年 3 月的伴 PVTT 的 HCC 病例。入组标准: 术后病理证实为肝细胞癌; 术中肉眼与术后病理均证实存在 PVTT; 行肝肿瘤并 PVTT 一并切除术, 肉眼及术后病理均显示切缘无肿瘤残留 (R0 切除); 所有患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗; 术后生存期超过 3 个月。排除标准: 合并其它肿瘤或术前伴其它脏器转移等可能影响患者入组和评估结果的因素。本研究共获得组织标本保存完好、临床和随访资料完整的病例 40 例。所有病例均为 HBV 阳性, HCV 阴性; 全部患者肝功能分级为 Child-Pugh A 级。术后中位生存期为 9.3 个月; 按术后中位生存期将入选患者分为 2 组, 长生存期组 (long survival group, LSG) 20 例, 患者术后中位生存期长于 9.3 个月; 短生存期组 (short survival group, SSG) 20 例, 患者术后中位生存期短于 9.3 个月。所有患者均进行以下术前检查, 包括: 常规体查, 血液生化检查 (包括 AFP、CEA、CA19-9), 腹部增强 CT 或 MRI 检查, 胸部 X 线检查。门脉癌栓根据癌栓位置分为主干癌栓、主分支癌栓、叶级和段级癌栓。门静脉癌栓位置根据术前影像学检查和术中检查确定。根据术前影像学检查和应用术中超声确定癌栓的定位, 并由此决定施行术式: 对于段级和叶级门静脉癌栓, 进行肝部分切除术或半肝切除术, 一并切除受侵犯的门静脉分支; 对于主分支和主干癌栓施行半肝切除术或扩大半肝切除术, 一并切除受累的门静脉主分支。两组病例的临床资料详见表 1。

表 1 伴 PVTT 的肝癌术后长生存期组和短生存期组临床数据比较
Table 1 Comparison of clinical variables of long survival group and short survival group

Clinical Variables	Total	Short	Long	P value
Gender (male; female)	36; 4	19; 1	17; 3	0.305
Age (< 60; ≥ 60) years	35; 5	18; 2	17; 3	0.643
AFP (< 400; ≥ 400) ng/mL	15; 25	6; 14	9; 11	0.340
PVTT (Segmental/lobe; main branch; trunk)	19; 19; 2	9; 9; 2	10; 10; 0	0.232
Tumor No. (Single; Multiple)	16; 24	6; 14	10; 10	0.206
Tumor Size (<10; ≥10) cm	21; 19	9; 11	12; 8	0.355
Cirrhosis (None; mild; moderate; Poor)	2; 21; 11; 6	2; 9; 7; 2	0; 12; 4; 4	0.568
Regional Lymph Node (+n; -n)	4; 36	3; 17	1; 19	0.305
Tumor Capsule (None; Partial; Complete)	14; 20; 6	7; 11; 2	7; 9; 4	0.651
Surgery Type (PR; Hemi-Hepatectomy)	27; 13	13; 7	14; 6	0.744
Resection Margin (< 2; ≥2) cm	30; 10	16; 4	14; 6	0.478
TNM Staging (II; IIIa; IIIc)	6; 30; 4	2; 15; 3	4; 15; 1	0.214

Student *t* test; Short: short survival group; Long: long survival group; PR: partial resection.

1.2 基因芯片制作及信号获得

肝癌手术切除后,所取材的肿瘤组织立即经 RNeasy (Ambion, 美国) 处理,4 ℃过夜,之后转移到-80 ℃保存备用。本研究采用 Affymetrix 公司(美国)生产的 HG-U133 Plus 2.0 表达谱芯片进行研究。肿瘤 RNA 纯化、裂解、芯片制作及扫描按照 Affymetrix 公司提供的实验步骤进行操作。芯片信号以 Cel 文件格式存储。

1.3 免疫组化染色与结果评定

免疫组织化学方法采用 ABC 方法进行操作^[8]。采用的抗体为抗肝癌相关基因 TD26 抗体 (Anti-hepatocellular carcinoma associated gene TD26 antibody, Clone B01, 1:400, Abnova),阳性对照为鼠 Ki-67 抗体 (Clone MIB-1, Dako),阴性对照为鼠 IgG1 抗体 (Clone X9301, Dako)。采用 Image Pro Plus (Vision 6.3, Media cybernetics, 美国)软件测量对免疫组织化学染色强度。入组的切片在光镜下进行 200 倍光镜照相采样,采用手动曝光条件,光圈和曝光时间一致,无白平衡,每个切片拍摄 3 个染色强度最高的不同区域。测量每个图片的累积光密度(Integrate Optical Density, IOD)和阳性细胞数目,然后计算每个阳性细胞的染色强度。

1.4 统计分析

SPSS 软件包 (Version 16.0)分析临床病理数据,采用 Kaplan-Meier 方法分析术后生存期, $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。采用 Partek Genomics Suite 软件 (Version 6.4)分析基因数据,采用 GCRMA 标准化。本研究样本量较少,因此采用适合小样本分析的基因分析技术——三重交叉检验和重复抽

样方法 (3-fold Cross-validation and resampling method 或称为 rotation estimation)进行候选基因的筛选^[9-10]。候选基因筛选标准: $P < 0.05$,转录倍数 (Fold Change, FC) $\geq |1.25|$,假发现率 (False Discovery Rate, FDR) < 0.1 , $> 75\%$ 预测准确性。

2 结 果

本研究生存期组与短生存期组各 20 例,两组的各项临床病理资料分布无显著性差异 ($P > 0.05$),因此两组数据分布平衡,具有可比性(表 1)。

2.1 基因谱筛选结果

采用三重交叉检验重复抽样方法,本研究共筛选出 1 108 个基因,在长生存期组与短生存期组中表达有差异。其中选择 10 个表达差异最显著的基因进一步进行研究($P \leq 0.01$,表 2),包括 4 个基因表达上调,6 个基因表达下调。这 10 个基因包括:Aldo-keto reductase family 1, member C1、TAR DNA binding protein、Eukaryotic translation initiation factor 4E、Mitofusin 1、Small nuclear ribonucleoprotein 25 ku (U11/U12)、Hepatocellular carcinoma-associated gene TD26、cAMP-regulated phosphoprotein, 19 ku、RAR-related orphan receptor C、Peroxisomal biogenesis factor 11 beta 和 Fibroblast growth factor receptor 2。其中,肝癌相关基因 TD26 (Hepatocellular carcinoma associated gene TD26 或 LOC55908,以下简称 TD26)是上调转录倍数最高的基因 ($P < 0.001$)。采用无监督聚类图

表 2 本研究筛选的 10 个基因
Table 2 Ten candidate genes was selected in this study

Gene title	Gene symbol	P value	Fold change
Aldo-keto reductase family 1, member C1	AKR1C1	0.0002	-7.09
TAR DNA binding protein	TARDBP	< 0.0001	-1.31
Eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E	< 0.0001	-1.6
Mitofusin 1	MFN1	0.0001	-1.53
Small nuclear ribonucleoprotein 25 ku (U11/U12)	SNRNP25	0.002	-1.81
Hepatocellular carcinoma-associated gene TD26	LOC55908	0.0001	9.51
cAMP-regulated phosphoprotein, 19 ku	ARPP19	0.0004	-1.77
RAR-related orphan receptor C	RORC	< 0.0001	7.27
Peroxisomal biogenesis factor 11 beta	PEX11B	< 0.0001	1.88
Fibroblast growth factor receptor 2	FGFR2	0.0005	2.65

Candidate genes were selected by a 3-fold cross-validation and resampling method

(Unsupervised clustering)分析,可以将本研究入组病例分成2个独立的基因型(图1),对长生存病例(LSG)筛选的准确性75%(15/20),假阳性率为11.7%(2/17)。进一步采用Fisher's线性判别分析(Fisher's Discriminant Analysis),显示本研究10个候选基因筛选长生存期患者的预测准确性为95%,特异性100%,假阳性率0(图2)。

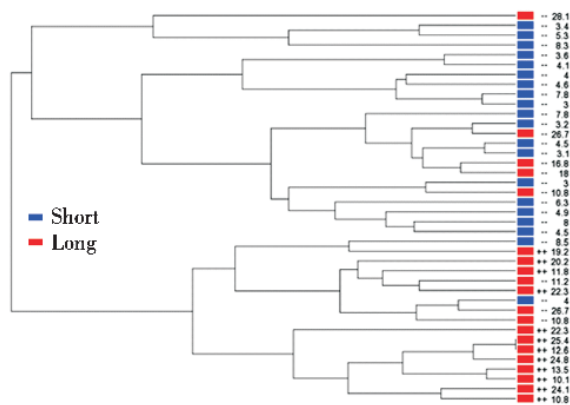


图1 无监督聚类图筛选伴PVTT的肝癌术后长生存期患者

Fig.1 Unsupervised clustering using a 10 member genes signature shows two distinct clusters with 75% detection sensitivity for long survivors and a false positive rate of 12%.

Short: short survival group; Long: long survival group

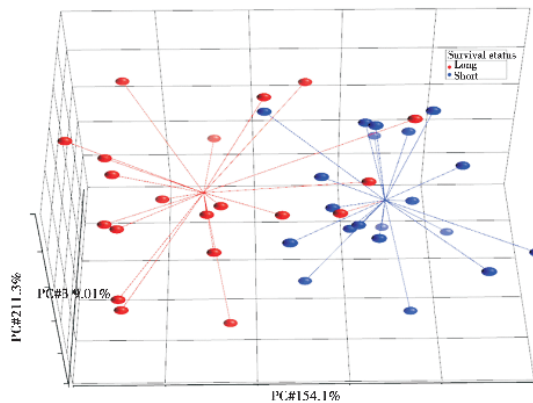


图2 Fisher's线性判别分析

Fig.2 Fisher's linear discriminant analysis

The accuracy of the gene signature was used for classifying long and short survivors. The gene signature had a sensitivity of 95% and a specificity of 100% with a false positive rate of 0%

根据TD26基因表达信号强度(Log2值)中位数将入组的病例分为TD26高表达组和低表达组,Kaplan-Meier方法分析两组术后生存期,有显著性差异($P = 0.011$),TD26高表达组术后中位生存期为12.6个月,TD26低表达组术后中位生存期为

5.3个月(图3)。

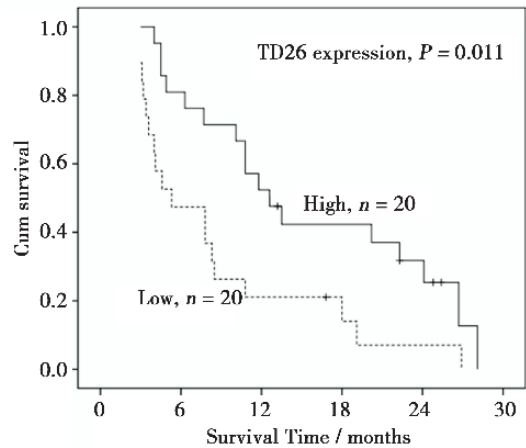


图3 肝癌相关基因TD26高表达与低表达患者的生存曲线

Fig.3 Kaplan-Meier survival curves of HCC patients with PVTT

High: Low expression of hepatocellular carcinoma-associated gene TD26

2.2 肝癌相关基因TD26在伴PVTT肝癌组织中表达

从两组中各随机抽取10个病例进行免疫组织化学验证。采用Image Pro Plus软件比较两组阳性细胞TD26免疫组化染色强度,长生存期组(术后生存期 ≥ 9.3 个月)具有更高的TD26表达($P = 0.0157$,图4,5)。TD26高表达见于术后长生存期组(图5A),TD26低表达见于术后短生存期组(图5B)。

3 讨论

肝癌侵犯门静脉形成门静脉癌栓发生率约40%~70%,晚期肝癌伴门静脉癌栓的发生率高达90%^[11]。目前研究认为,门静脉癌栓生长具有一定的特征:95%以上癌栓以主瘤为基部在同侧门静脉内生长,而对侧门静脉内生长较少;绝大多数癌栓具有以门静脉壁作为支架离心式向门静脉主干方向生长蔓延的倾向性;癌栓的平均生长速度为 $(0.5 \pm 0.1)\text{cm}^3/\text{月}$,即每月发展进度为 $(1.2 \pm 0.4)\text{cm}$,生长相对缓慢,这为临床干预治疗创造了机会^[1]。伴有PVTT的肝癌患者自然生存期约3个月。伴有PVTT的肝癌切除术后复发率高达60%,预后差,术后1、3及5年生存率仅为45%、17%和10%^[1]。

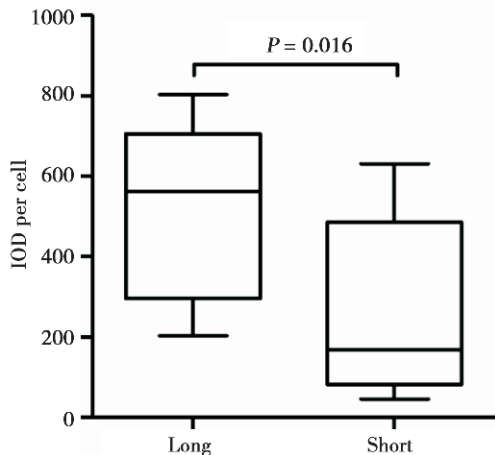


图 4 肝癌相关基因 TD26 免疫组化结果比较

Fig.4 Different expression of hepatocellular carcinoma-associated gene TD26 in long survival group and short survival group using Image Pro Plus software

Long: long survival group; Short: short survival group; IOD: integrate optical density

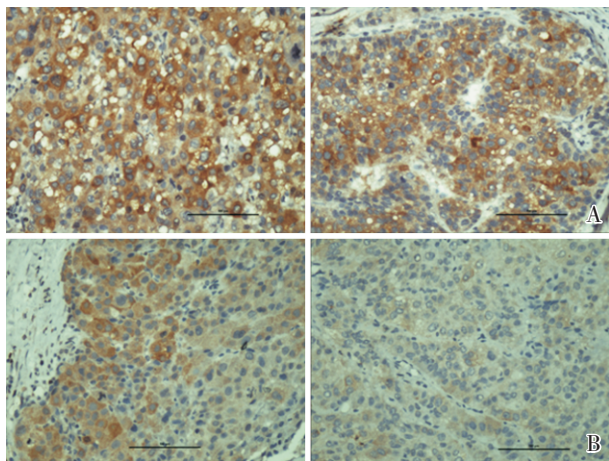


图 5 肝癌相关基因 TD26 在肝癌组织中的表达

Fig.5 Expression of hepatocellular carcinoma-associated gene TD26

A: long survival group; B: short survival group. Scale bar = 50 μm

在 AASLD 和 BCLC 的临床指引中,均不建议采用外科手术切除肝癌原发灶及癌栓^[2-4]。但有临床报道,部分伴有 PVTT 的肝癌通过手术切除肿瘤及癌栓,能提高术后生存期^[1,6]。对于合并 PVTT 的肝癌患者,只要肝功能尚能代偿,肿瘤局限,主张积极行肿瘤切除联合癌栓取出术,其疗效优于化疗栓塞或其他内科治疗。伴 PVTT 的肝癌治疗是临床的难点,目前临床上缺乏可用于预测伴有 PVTT 的肝癌手术预后和进行手术适应症筛选的指标,如何筛选这部分适合进行外科手术切除的

病例具有较大的临床意义。

本研究采用全基因芯片技术,分析伴有 PVTT 的肝癌基因表达谱,筛选出 10 个与伴 PVTT 的肝癌切除术后预后相关基因,包括 AKR1C1、TARDBP、EIF4E、MFN1、SNRNP25、LOC55908、ARPP19、RORC、PEX11B 和 EGFR2。采用 Fisher's 判别分析,本组 10 个候选基因作为筛选指标,筛选手术切除伴 PVTT 的肝癌的长生存期患者,诊断准确性为 95%,特异性 100%,假阳性率 0%(图 2)。Tanaka 等研究显示,无血管侵犯与伴血管侵犯的肝癌具有不同的基因型,采用 132 个基因可以将具有血管侵犯的肝癌筛选出来,并认为基因分析能更准确地预测预后^[12]。Hui 等^[13]研究显示,采用 57 个基因联合血管侵犯、肝硬化两个临床指标,可以预测术后早期复发的肝癌病例。另有研究认为,基因 Kiss-1、MMP-9、PD-ECGF、VEGF 与 PVTT 的形成有关^[14-16]。各研究所报道的入组标准、基因筛选条件和采用的基因筛选方法不同,所获得的候选基因存在很大差异,但认为基因谱分析能为肝癌的诊治提供有力的理论支持。肿瘤是正常细胞不断积累的遗传/表观遗传学的改变的结果,肿瘤细胞在形态学、临床行为和分子结构上具有极大的异质性^[17]。伴 PVTT 的肝癌手术切除后,各个病例间临床过程变异度大,提示他们可能存在不同的分子分型。在本研究中,采用无监督聚类图可将本组病例分为 2 个与生存期相关的基因型(图 1)。

肝癌相关基因 TD26 是本研究中最显著的上调基因($FC = 9.51, P < 0.001$),目前关于该基因的相关研究极少,其功能仍然不清楚。TD26 基因同时也被命名为 PRO1185 和 PVPA599,定位于 19 号染色体,19p13.2,在哺乳动物中编码定位于内质网的特定蛋白,TD26 在正常肝细胞和肝癌细胞内均低表达^[18-19]。通过免疫组织化学验证基因表达谱分析结果,TD26 所编码的蛋白在胞浆中表达,在长生存期组中表达上调($P = 0.016$)。本研究中,根据 TD26 基因表达信号强度将全部病例分为 TD26 高表达组和低表达组,TD26 蛋白高表达组具有更好的术后生存期($P = 0.011$,图 3)。尽管对该基因的功能及机制仍不清楚,本研究通过免疫组织化学验证了本组基因芯片所筛选出的基因 TD26 在肝肿瘤组织中的表达,该基因有可能作为伴有 PVTT 的肝癌患者预测手术预后或进行手术适应症筛选的指标之一。因此,本研究筛选出的 10

个候选基因,有可能作为筛选伴有PVTT的肝癌患者接受手术治疗和预测预后的分子指标,为肝癌的诊治提供新的参考资料。

参考文献:

- [1] Pawlik TM, Poon RT, Abdalla EK, et al. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma with major portal or hepatic vein invasion; Results of a multicenter study [J]. *Surgery*, 2005, 137 (4): 403–410.
- [2] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1907–1917.
- [3] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008 [J]. *J Hepatol* 2008, 48 (Suppl 1): S20–37.
- [4] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2005, 42 (5): 1208–1236.
- [5] Pawlik TM, Poon RT, Abdalla EK, et al. Critical appraisal of the clinical and pathologic predictors of survival after resection of large hepatocellular carcinoma [J]. *Arch Surg*, 2005, 140 (5): 450–457.
- [6] Portolani N, Coniglio A, Ghidoni S, et al. Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: Prognostic and therapeutic implications [J]. *Ann Surg*, 2006, 243 (2): 229–235.
- [7] Tung-Ping Poon R, Fan ST, Wong J. Risk factors, prevention, and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg* 2000, 232 (1): 10–24.
- [8] Prince S, Zeidman A, Dekel Y, et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule in gallbladder carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129 (3): 424–429.
- [9] Braga-Neto UM, Dougherty ER. Is cross-validation valid for small-sample microarray classification? [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20 (3): 374–380.
- [10] Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: Methods and applications [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 54 (2): 95–105.
- [11] Chau GY, Lui WY, Wu CW. Spectrum and significance of microscopic vascular invasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2003, 12 (1): 25–34, viii.
- [12] Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, et al. Gene-expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas [J]. *Surgery*, 2010, 147 (3): 405–414.
- [13] Wang SM, Ooi LL, Hui KM. Identification and validation of a novel gene signature associated with the recurrence of human hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (21): 6275–6283.
- [14] Guo L, Kuroda N, Toi M, et al. Increased expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in human hepatocellular carcinomas correlated with high Edmondson grades and portal vein tumor thrombosis [J]. *Oncol Rep*, 2001, 8 (4): 871–876.
- [15] 侯元凯, 王义, 丛文铭, 等. 肿瘤转移抑制基因 KiSS-1 和基质金属蛋白酶-9 在肝细胞癌门静脉癌栓中的表达 [J]. *癌症*, 2007, 26 (6): 591–595.
- [16] Zhou J, Tang ZY, Fan J, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126 (1): 57–61.
- [17] Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 458 (3): 283–321.
- [18] Suzuki Y, Yamashita R, Shirota M, et al. Sequence comparison of human and mouse genes reveals a homologous block structure in the promoter regions [J]. *Genome Res*, 2004, 14 (9): 1711–1718.
- [19] Clark HF, Gurney AL, Abaya E, et al. The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: A bioinformatics assessment [J]. *Genome Res*, 2003, 13 (10): 2265–2270.

(编辑 张恩健)