

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170871

丝切蛋白1表达水平与原发性肝细胞肝癌患者预后的相关性

赵 瀛^{1△}, 张春燕^{1,2△}, 郭奕超¹, 戴 谦¹, 王蓓丽^{1*}, 郭 玮¹, 潘柏申^{1,2}

1. 复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200032

2. 复旦大学附属中山医院厦门医院检验科, 厦门 361015

[摘要] **目的:**探讨丝切蛋白1(cofilin 1)对原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)预后判断的价值。**方法:**收集2012年12月至2014年5月诊断为HCC且在复旦大学附属中山医院接受HCC切除术患者术后肿瘤组织标本126例。采用免疫组织化学染色检测肿瘤组织中cofilin 1的表达,分析cofilin 1表达水平与肿瘤患者临床指标的相关性。采用GraphPad软件分析cofilin 1表达水平与患者术后复发与生存时间的相关性。采用Cox回归风险比例模型分析HCC切除术后复发的相关危险因素。**结果:**Cofilin 1免疫组织化学染色评分与术前甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)、肿瘤大小及巴塞罗那临床肝癌分组方案(BCLC分期)正相关($P<0.05$, $R<0.3$)。生存曲线分析显示:cofilin 1高表达组、低表达组患者术后无病生存时间、总生存时间差异均有统计学意义($P<0.05$);不同BCLC分期和肿瘤大小HCC患者术后无病生存时间、总生存时间差异均有统计学意义($P<0.05$),而不同AFP水平和侵袭发生与否患者亚组间术后无病生存时间、总生存时间差异无统计学意义。Cox回归风险比例模型的单因素分析发现:cofilin 1表达水平对患者术后复发和生存情况均有预测价值($P<0.05$);多因素分析显示:cofilin 1是HCC患者行切除术后复发的独立危险因素($HR=1.647, 95\%CI 1.015\sim 2.672$),也是术后生存的独立危险因素($HR=2.412, 95\%CI 1.696\sim 4.940$)。**结论:**Cofilin 1高表达与HCC患者术后复发及较短生存时间相关,是肝癌术后复发的独立危险因素,可用于评估HCC切除术后患者的预后。

[关键词] 癌,肝细胞;丝切蛋白1;预后;免疫组织化学**[中图分类号]** R 446.1**[文献标志码]** A

The correlation between cofilin 1 and prognosis of patients with primary hepatocellular carcinoma

ZHAO Ying^{1△}, ZHANG Chun-yan^{1,2△}, GUO Yi-chao¹, DAI Qian¹, WANG Bei-li^{1*}, GUO Wei¹, PAN Bai-shen^{1,2}

1. Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Department of Clinical Laboratory, Xiamen Branch, Zhongshan Hospital, Fudan University, Xiamen 361015, Fujian, China

[Abstract] **Objective:** To evaluate the prognosis value of cofilin 1 in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** A total of 126 postoperative specimens of the patients who were diagnosed as HCC and accepted resection in Zhongshan Hospital from December 2012 to May 2014 were collected in this study. The expression of cofilin 1 in specimens were detected by immunohistochemistry and ranked. The correlation between cofilin 1 and other clinical characteristics was analyzed. The GraphPad software was used to do survival analysis for the cofilin 1-low group and cofilin 1-high group in order to determine their impact on the disease free survival (DFS) and overall survival (OS). The risk factors of recurrence and survival after HCC resection were analyzed by Cox proportional hazard regression model. **Results:** The score of cofilin 1 expression was proved to be weakly positive correlated to preoperative AFP, tumor size, and BCLC grade ($P<0.05$). The survival analysis showed the statistically significant difference (both $P<0.05$) of the postoperative OS and disease free survival time between cofilin 1-high group and cofilin 1-low group; they were the same in the BCLC grade 0/A (both $P<0.05$) and tumor size <5 cm sub-group (both $P<0.05$), but not statistically significant in $AFP\leq 20$ ng/mL sub-group and no invasion sub-group. The single factor analysis of Cox proportional hazard regression model showed that the level of cofilin 1 was valuable in the judgment

[收稿日期] 2017-10-15**[接受日期]** 2018-01-09

[基金项目] 上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目(2015ZB0201),上海市卫生和计划生育委员会科研课题(201540052,201440389),上海市科学技术委员会基金(16411952100). Supported by Construction Project of Key Developing Disciplines of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2015ZB0201), Research Fund of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (201540052,201440389), and Fund of Science and Technology Commission of Shanghai (16411952100).

[作者简介] 赵 瀛,主管技师. E-mail: zhao.ying@zs-hospital.sh.cn

张春燕,副主任技师. E-mail: zhang.chunyan@zs-hospital.sh.cn

△共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990-2376, E-mail: wang.beili1@zs-hospital.sh.cn

of postoperative recurrence and survival (both $P<0.05$). The homologous multiple-factor analysis showed that cofilin 1 was an independent risk factor for postoperative recurrence (HR=1.647, 95%CI 1.015-2.672) and survival (HR=2.412, 95%CI 1.696-4.940) of the patients with HCC. **Conclusions:** The expression level of cofilin 1 has significant correlation to the postoperative recurrence and poor survival. The high expression level of cofilin 1 is an independent risk factor for the postoperative recurrence of HCC, which can be used to assess the prognosis of patients with HCC resection.

[Key Words] carcinoma, hepatocellular; cofilin 1; prognosis; immunohistochemistry

原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,约占肝癌的80%,恶性程度高,患者生存率较低^[1]。2016年的全球数据表明,肝癌发病率在所有恶性肿瘤中排名第4位,死亡率位居第2位^[2]。目前HCC最有效的治疗手段仍然是手术。但HCC患者早期症状不典型,确诊时一般处于中晚期,基本丧失了手术机会或手术预后不佳。因此,寻找有效的早期诊断及预后判断生物标志物是HCC临床诊治的关键。

肿瘤转移是肿瘤致死的主要原因,在肿瘤早期就已存在,与肿瘤的基因编码改变有关^[3],且在病变极早期就可通过血行转移^[4],与肿瘤细胞动力密切相关。丝切蛋白1(cofilin 1)是一种肌动蛋白结合蛋白,能调控细胞伪足的形成过程,是调控细胞动力的重要环节,与胃癌^[5]、前列腺癌^[6]和乳腺癌^[7]等多种肿瘤的预后密切相关。我们的预实验发现HCC患者循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)与HCC组织细胞中cofilin 1蛋白表达存在显著差异,提示cofilin 1蛋白表达与HCC预后相关。因此,本研究进一步探讨HCC组织cofilin 1蛋白表达水平与患者预后的相关性,为HCC的临床诊治提供新的研究靶标,改善患者预后。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2012年12月至2014年5月确诊为HCC,并于复旦大学附属中山医院接受肝癌切除术的126例患者作为研究对象。其中,男性101例,女性25例;年龄(54±11)岁,>50岁73例、小于或等于50岁53例,患者人口学特征及基线资料详见表1。根据所选病例手术切除标本病理号将其相应的石蜡包埋标本取出,挑选组织完整清晰的部分。本研究通过复旦大学附属中山医院伦理委员会审核批准,所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 免疫组织化学染色 HCC组织切片在二甲苯脱蜡、乙醇水化后,置于抗原修复液(50×EDTA 抗原修复液,江苏凯基生物技术股份有限公司)中微波修复9 min,3%过氧化氢溶液中浸泡15 min以

抑制内源性过氧化物酶活性;PBS漂洗3次,5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭30 min,加入小鼠抗人 cofilin 1 单克隆抗体(一抗, OriGene Technologies),4℃孵育过夜。PBS代替一抗,作为空白对照。次日 PBS 漂洗3次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(二抗,工作液体积稀释比例为1:5 000, OriGene Technologies),室温孵育60 min。DAB显色液(福州迈新生物技术开发有限公司)显色8 min,苏木精对比染色20 s,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶固封。

表1 两组患者人口学特征及基线资料比较

临床指标	Cofilin1		P 值
	低表达组	高表达组	
性别			
女	17	8	0.599
男	74	27	
年龄(岁)			
≤50	42	11	0.134
>50	49	24	
HBsAg			
阴性	14	8	0.322
阳性	77	27	
AFP ρ _B /(ng·mL ⁻¹)			
≤20	42	13	0.361
>20	49	22	
肝硬化			
否	29	7	0.187
是	62	28	
肿瘤大小 d/cm			
≤5	52	17	0.387
>5	39	18	
微血管侵犯			
无	47	12	0.115
有	45	22	
BCLC 分期			
0/A	67	26	0.940
B/C	24	9	

AFP:甲胎蛋白;BCLC分期:巴塞罗那临床肝癌分组方案

1.3 染色结果判定标准 采用 Panoramic Viewer 软件对细胞染色结果进行检测和半定量评分。细胞质内出现棕黄色颗粒,判断为 cofilin 1 阳性细胞。根据染色强度(强,3 分;中,2 分;弱,1 分;无,0 分)和阳性细胞百分率(4 分,>80%;3 分,51%~80%;2 分,11%~50%;1 分,≤10%;0 分,无阳性细胞)的乘积计算总评分^[8](图 1)。总分 8 分及以上列为 cofilin 1 高表达组,未达 8 分则为 cofilin 1 低表达组。

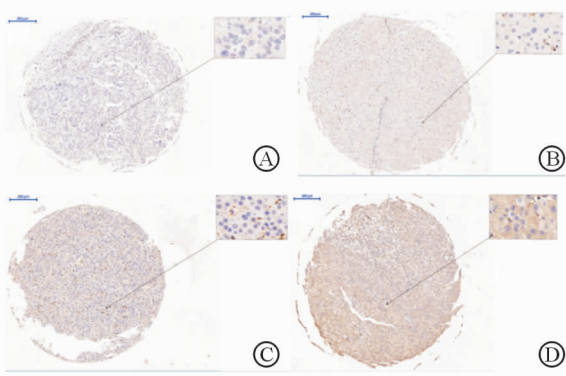


图 1 免疫组织化学染色评分标准(DAB 染色)
A: 0 分; B: 1 分; C: 2 分; D: 3 分. Original magnification: ×160(基础图片), ×1 100(放大部分)

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 和 GraphPad prism 6 软件进行统计分析。采用 Spearman 相关分析法分析 cofilin 1 蛋白表达与 HCC 患者临床参数的相关性。采用生存分析法绘制无病生存(disease-free survival, DFS)与总生存(overall survival, OS)曲线图,探讨 cofilin 1 蛋白表达与 HCC 患者术后复发或生存相关性。采用 Cox 回归风险比例模型分析影响 HCC 患者在肿瘤切除术后生存与早期复发的独立危险因素,计算风险比(hazard ratio, HR)和 95%可信区间(confidence interval, CI)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 肝癌组织 cofilin 1 蛋白的表达 免疫组织化学染色结果(图 2)表明:HCC 组织 cofilin 1 高表达组 35 例;cofilin 1 蛋白低表达组 91 例。

2.2 Cofilin 1 蛋白表达与 HCC 患者临床参数的 Spearman 相关性 结果(表 2)表明:cofilin 1 蛋白表达评分与患者术前甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)水平、肿瘤大小及巴塞罗那临床肝癌分组方案(BCLC 分期)正相关,差异有统计学意义($P<0.05$);而 cofilin 1 蛋白表达评分与术后 AFP 水平、术前术后

γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyltranspeptidase, γ -GT)、谷氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)、肿瘤包膜完整性和肝硬化及血管侵犯等临床指标无明显相关性。

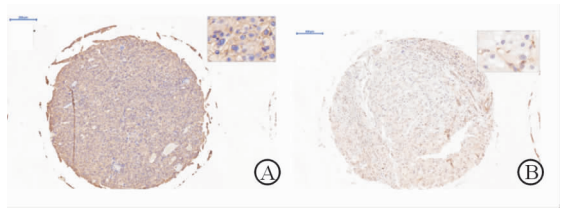


图 2 免疫组织化学染色测定肝癌组织 cofilin 1 蛋白的表达(DAB 染色)
A:肝癌组织 cofilin 1 蛋白高表达; B:肝癌组织 cofilin 1 蛋白低表达. Original magnification: ×160(基础图片), ×1 100(放大部分)

表 2 Cofilin 1 蛋白表达评分与 HCC 患者临床参数的 Spearman 相关性分析

临床指标	Cofilin 1 蛋白表达	
	P 值	R 值
术前 AFP	0.043	0.186
术后 1 周 AFP	0.100	0.152
术前 γ -GT	0.297	0.097
术后 1 周 γ -GT	0.075	0.165
术前 ALT	0.281	0.100
术后 1 周 ALT	0.440	0.072
肿瘤大小	0.019	0.216
BCLC 分期	0.005	0.270
术前 HBsAg	0.191	-0.121
肝硬化	0.310	-0.940
肿瘤包膜	0.159	0.130
微血管侵犯	0.149	0.134

AFP: 甲胎蛋白; γ -GT: γ -谷氨酰转肽酶; ALT: 谷丙转氨酶; BCLC 分期:巴塞罗那临床肝癌分组方案

2.3 Cofilin 1 蛋白表达水平与 HCC 患者术后复发的相关性 结果(图 3)表明:cofilin 1 高表达患者术后 DFS 明显短于低表达组,差异有统计学意义($P=0.000 1$)。临床亚组分析结果表明:BCLC 分期 0/A 期亚组($P=0.000 4$)和肿瘤直径 <5 cm 亚组($P=0.000 1$)中 cofilin 1 高表达患者术后 DFS 明显短于低表达患者;而 AFP <20 ng/mL 亚组($P=0.050 0$)和未侵袭亚组($P=0.179 3$)中 cofilin 1 高低表达患者术后 DFS 差异无统计学意义。

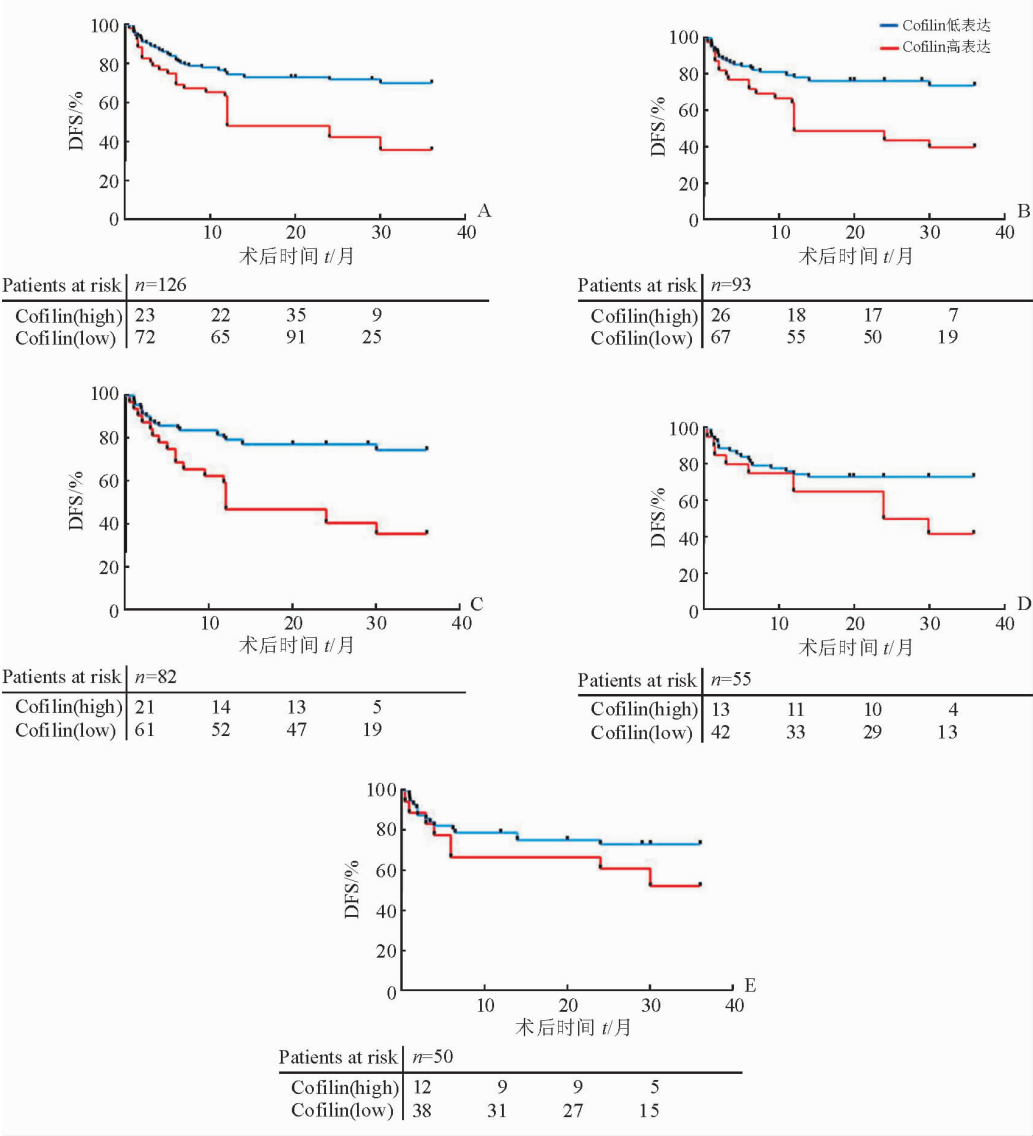


图3 Cofilin 1 蛋白表达水平与各组患者 HCC 切除术后复发的相关性

A: 全组 ($P=0.0001$); B: BCLC 分期 0/A 期亚组 ($P=0.0004$); C: 肿瘤直径 <5 cm 亚组 ($P=0.0001$); D: AFP <20 ng/mL 亚组 ($P=0.05$); E: 未侵袭亚组 ($P=0.1793$)

2.4 Cofilin 1 蛋白表达水平与 HCC 患者生存情况的相关性 结果(图 4)表明:Cofilin 1 蛋白低表达组 HCC 患者术后 OS 明显长于高表达组患者($P=0.0041$);临床亚组分析结果表明:BCLC 分期 0/A 期亚组($P=0.0013$)和肿瘤直径 <5 cm 亚组($P=0.0060$)cofilin 1 蛋白低表达组 HCC 患者术后 OS 时间明显长于高表达组患者($P=0.0060$),而在 AFP <20 ng/mL 亚组($P=0.3248$)和未侵袭亚组($P=0.0755$)中差异无统计学意义。

2.5 HCC 患者术后复发与生存的危险因素分析 Cox 回归风险比例模型单因素分析(表 3)发现:cofilin 1 蛋白表达高低对患者术后复发有预测价值($P=0.025$),肝硬化、肿瘤直径大于 5 cm、微血管侵

犯和 CTC 高是预后不良的复发因素($P<0.05$);cofilin 1 蛋白表达高低对患者术后生存也有预测价值($P=0.004$),肿瘤直径 >5 cm 及 BCLC 分期为 B/C 是影响术后生存的显著因素($P<0.05$)。

多因素分析结果(表 3)显示:cofilin 1 蛋白高表达(HR = 1.647, 95%CI 1.015 ~ 2.672)、肝硬化(HR = 2.044, 95%CI 1.133 ~ 3.688)、肿瘤直径大于 5 cm(HR = 1.989, 95%CI 1.235 ~ 3.203)和高 CTC(HR = 1.795, 95%CI 1.015 ~ 3.173)是导致 HCC 患者肝癌切除术后复发的独立危险因素;而 cofilin 1 蛋白高表达(HR = 2.412, 95%CI 1.696 ~ 4.940)和肿瘤直径 >5 cm(HR = 2.461, 95%CI 1.367 ~ 4.429)是术后生存的独立危险因素。

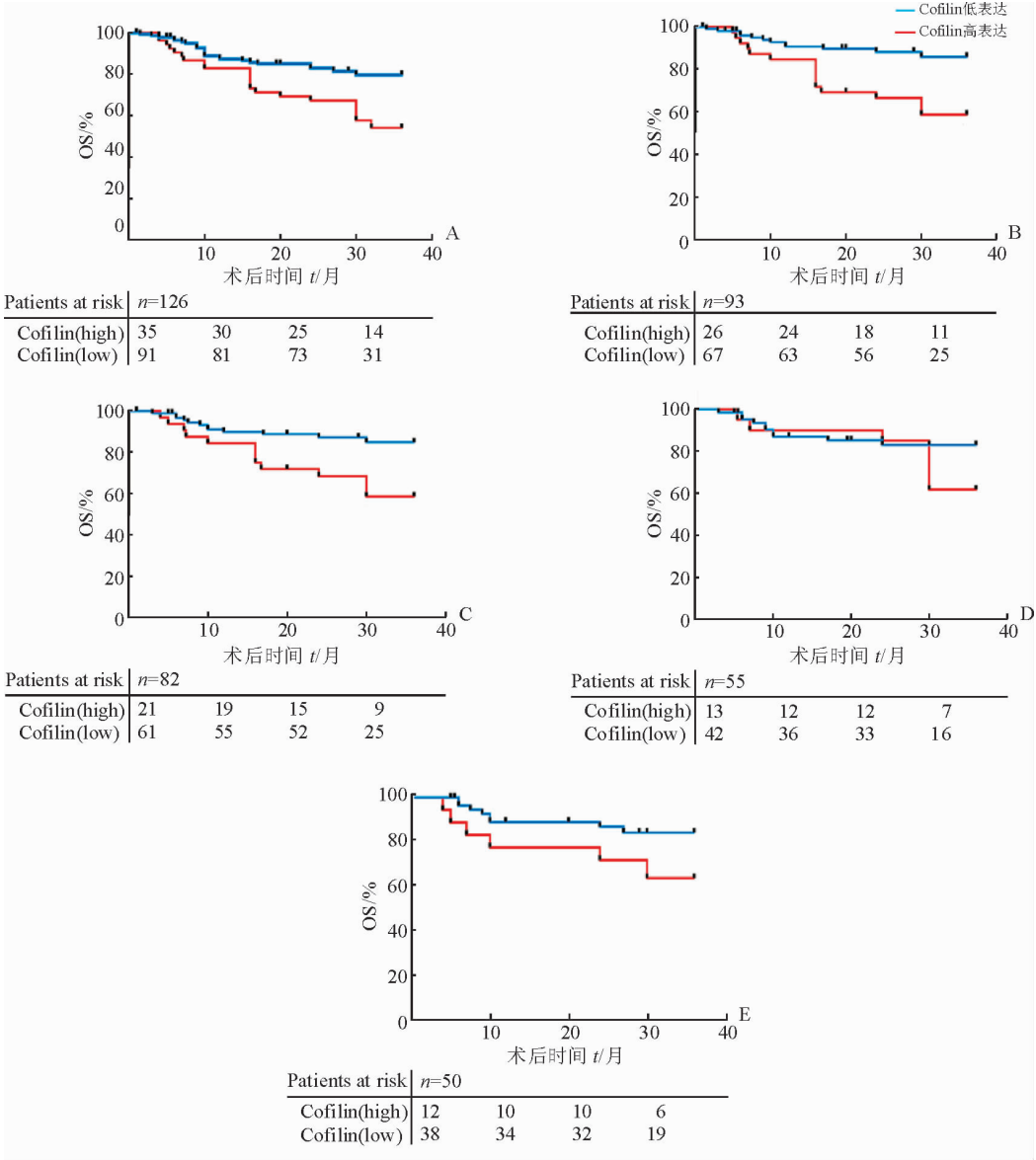


图 4 Cofilin 1 蛋白表达水平与各组 HCC 患者术后生存情况的相关性

A: 全组 ($P=0.0041$); B: BCLC 分期 0/A 期亚组 ($P=0.0013$); C: 肿瘤直径 <5 cm 亚组 ($P=0.0060$); D: AFP <20 ng/mL 亚组 ($P=0.3248$); E: 未侵袭亚组 ($P=0.0755$)

3 讨 论

CTC 作为肿瘤原发灶播散的“种子”，在肿瘤复发及转移的过程中发挥重要作用^[9]。本课题组预实验发现,CTC 可作为 HCC 诊断及预后的标志物;通过对 CTC 高与 CTC 低的两组 HCC 患者原发灶的表达谱芯片进行筛选,发现两组 HCC 患者 cofilin 1 表达差异显著,提示 cofilin 1 可能是导致 CTC 释放入外周血的关键分子,具有重大的研究价值及意义。因此,本研究旨在验证 cofilin 1 在 HCC 根治术后疗效监测和预后评估中的价值。

本研究入组了 2012 年 12 月至 2014 年 5 月于

复旦大学附属中山医院接受肝癌切除术的 HCC 患者 126 例,对患者术后的组织芯片进行免疫组织化学染色,并对相关指标进行回顾性分析。结果发现,cofilin 1 表达与患者术前 AFP、肿瘤大小及 BCLC 分期相关。进一步利用 Cox 比例风险模型进行多因素分析发现:cofilin 1 是 HCC 术后复发的独立预后危险因素;在一些低危亚组,如 BCLC 分期 0/A 期亚组和肿瘤 <5 cm 亚组中,cofilin 1 高低表达的 HCC 患者发生肿瘤复发的差异仍有统计学意义($P<0.05$)。本研究证实 cofilin 1 是良好的预后标志物,且在临床上对患者预后进行评估时,比 BCLC 分期及肿瘤大小更灵敏。

表3 HCC患者术后复发与生存的单因素及多因素风险分析

影响因素	TTR				OS			
	单因素分析 (P值)	多因素分析			单因素分析 (P值)	多因素分析		
		HR	95%CI	P		HR	95%CI	P
性别(女 vs 男)	0.319				0.555			
年龄(>50岁 vs ≤50岁)	0.405				0.245			
术前 HBsAg(阳性 vs 阴性)	0.897				0.402			
术前 AFP(≥20 ng/mL vs <20 ng/mL)	0.348				0.187			
术前 ALT(>75 U/L vs ≤75 U/L)	0.796				0.900			
肿瘤包膜完整性(否 vs 是)	0.210				0.744			
微血管侵犯(是 vs 否)	0.048			0.192	0.142			
BCLC分期(B/C vs 0/A)	0.175				0.017			0.240
肝硬化(是 vs 否)	0.047	2.044	1.133~3.688	0.018	0.103			
CTC(高 vs 低)	0.020	1.795	1.015~3.173	0.044	0.100			
肿瘤大小(>5 cm vs ≤5 cm)	0.029	1.989	1.235~3.203	0.005	0.003	2.461	1.367~4.429	0.003
Cofilin 1蛋白表达(高 vs 低)	0.025	1.647	1.015~2.672	0.043	0.004	2.412	1.696~4.940	0.002

HR:风险比(hazard ratio);95%CI;95%可信区间;AFP:甲胎蛋白;ALT:谷氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase);HBsAg:乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen);BCLC分期:巴塞罗那临床肝癌分组方案;TTR:复发时间(time to recurrence);OS:总生存时间(overall survival)

Cofilin 1 主要通过肿瘤转移过程中细胞动力增强、细胞分裂和细胞转化启动对肿瘤细胞起到调控作用^[10]。Wiskott Aldrich 综合征蛋白家族、肌动蛋白相关 2/3 复合体和肌动蛋白单体主导着突触形成的过程^[11],而 cofilin 1 对肌动蛋白单体起到关键的调控作用,提示 cofilin 1 是使肿瘤细胞从静止状态转变为运动状态的重要因素。

综上所述,在肝癌临床诊治中,cofilin 1 可作为一个用来有效筛选具有较高复发风险患者的潜在指标,从而辅助临床采取相应措施,实施不同的治疗策略,制订个体化的医疗方案,实现精准医疗。在后续的研究中,本课题组会针对 cofilin 1 的上游调控因子及相应通路进行深入探索,并且进一步探讨 cofilin 1 与细胞运动相关的分子机制。

参考文献

[1] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer,2010,127(12):2893-2917.

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30.

[3] WANG W, EDDY R, CONDEELIS J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2007,7(6):429-440.

[4] JOYCE J A, POLLARD J W. Microenvironmental regulation of metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(4):239-252.

[5] WANG H, TAO L, JIN F, et al. Cofilin 1 induces the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells by promoting cytoskeletal rearrangement[J]. Oncotarget,2017,8(24):39131-39142.

[6] LU L I, FU N I, LUO X U, et al. Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications [J]. Oncol Lett,2015,9(6):2757-2761.

[7] MAIMAITI Y, LIU Z, TAN J, et al. Dephosphorylated cofilin expression is associated with poor prognosis in cases of human breast cancer: a tissue microarray analysis[J]. Onco Targets Ther,2016,9:6461-6466.

[8] SCHARL A, VIERBUCHEN M, CONRADT B, et al. Immunohistochemical detection of progesterone receptor in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissue using a monoclonal antibody[J]. Arch Gynecol Obstet,1990, 247(2):63-71.

[9] VON FELDEN J, SCHULZE K, KRECH T, et al. Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection[J]. Oncotarget, 2017,8(52):89978-89987.

[10] SHISHKIN S, EREMINA L, PASHINTSEVA N, et al. Cofilin-1 and other ADF/Cofilin superfamily members in human malignant cells [J]. Int J Mol Sci, 2016, 18(1). pii: E10.

[11] YANG C, SVITKINA T. Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins[J]. Cell Adh Migr, 2011, 5(5):402-408.

[本文编辑] 张艺鸣,贾泽军