

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.006

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.006

淋巴增强因子 1 及细胞周期蛋白 D1 在肝门部胆管癌中的表达及其临床意义

田立斌¹, 张海光², 鲁鑫¹, 刘春玲¹

(唐山市人民医院 1. 病理科; 2. 肝胆外科, 河北 唐山 063001)

[摘要] 目的: 研究淋巴增强因子1(lymphoid enhancer factor-1, LEF-1)及细胞周期蛋白D1(cyclin D1, CCND1)在肝门部胆管癌(hilar cholangiocarcinoma, HC)中的表达及其临床意义。方法: 应用免疫组织化学方法检测43例HC及对应癌旁正常组织中LEF-1及CCND1的表达, 分析两者表达情况及其与临床病理参数的相关性。结果: LEF1在HC组织中的吸光度(OD)值为 9.156 ± 1.014 , 明显高于正常组织(2.132 ± 0.906 ; $P < 0.05$); LEF1的表达与HC的肿瘤分化程度、TNM分期、淋巴结转移有关(均 $P < 0.05$); CCND1在胆管癌组织中的OD值为 11.204 ± 0.075 , 明显高于正常组织(7.012 ± 2.743 ; $P < 0.05$); CCND1的表达与HC的肿瘤分化程度、TNM分期、淋巴结转移有关(均 $P < 0.05$); Spearman相关分析显示LEF-1与CCND1蛋白表达呈正相关($r = 0.338$, $P = 0.005$)。结论: LEF-1和CCND1在HC组织中高表达, LEF-1/CCND1信号通路可能在HC的发生发展中发挥重要作用。

[关键词] 肝门部胆管癌; 淋巴增强因子1; 细胞周期蛋白D1; 临床病理参数

Expression and clinical significance of lymphoid enhancer factor-1 and cyclin D1 in patients with hilar cholangiocarcinoma

TIAN Libin¹, ZHANG Haiguang², LU Xin¹, LIU Chunling¹

(1. Department of Pathology; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Tangshan People's Hospital, Tangshan Hebei 063001, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of lymphoid enhancer factor-1 (LEF-1) and cyclin D1 (CCND1) in patients with hilar cholangiocarcinoma (HC). **Methods:** Immunohistochemistry was used to analyze the expressions of LEF-1 and CCND1 in 43 cases of HC specimens and matched paratumorous normal specimens. The correlation of LEF-1 and CCND1 expression with clinicopathological variables of HC was carried out. **Results:** The OD value of LEF-1 expression in tumor tissue was 9.156 ± 1.014 ; which was higher than that in adjacent tissue (2.132 ± 0.906 , $P < 0.05$). The OD value of CCND1 in tumor tissue was higher than that in adjacent tissue (11.204 ± 0.075 vs 7.012 ± 2.743 , $P < 0.05$). LEF-1 or CCND1 expression was significantly associated

收稿日期 (Date of reception): 2018-01-11

通信作者 (Corresponding author): 刘春玲, Email: lcl.1983.hi@163.com

基金项目 (Foundation item): 河北省 2017 年度医学科学研究重点课题计划 (20171275)。This work was supported by the Hebei Provincial Medical Science Research Key Project Foundation, China (20171275).

with lymph node metastasis, histological grade, and TNM stage, respectively (all $P < 0.05$). Correlation test showed that LEF1 and CCND1 were positively correlated in HC ($r = 0.338$, $P = 0.005$). **Conclusion:** The expressions of LEF-1 and CCND1 are higher in HC than those in the matched paratumorous normal specimens, which suggests that LEF1/CCND1 pathway may play an important role in the development of HC.

Keywords hilar cholangiocarcinoma; lymphoid enhancer factor-1; cyclin D1; clinicopathological parameter

肝门部胆管癌(hilar cholangiocarcinoma, HC)是位于左右胆管交叉部的胆管上皮细胞的恶性肿瘤^[1]。在我国,HC约占胆管癌发病率的40%~60%^[2]。因其早期起病隐匿,恶性程度较高,且临床尚无较好的治疗手段,胆管癌的总5年生存率并不乐观^[3]。Wnt通路在包括HC在内的多种肿瘤中呈持续激活状态,淋巴增强因子1(lymphoid enhancer factor-1, LEF-1)是Wnt信号通路中的关键分子,可通过与 β -连环蛋白(β -catenin)结合,进而激活下游多个癌基因,促进肿瘤的发生、发展^[4-5]。细胞周期蛋白D1(cyclin D1, CCND1)是细胞周期的正调节因子,控制细胞从G期过渡到S期,其表达增加可提高细胞生长的潜在优势,是LEF-1下游众多靶基因之一,在多种肿瘤组织中高表达^[6-8]。目前关于LEF-1与CCND1在胆管癌中的相关报道较少,因此本研究拟采用免疫组织化学方法分析LEF-1及CCND1在HC组织标本中的表达,探讨其与HC临床病理参数的相关性,为胆管癌的靶向治疗提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2010年1月至2016年12月在唐山市人民医院行胆管癌手术治疗且临床资料完整的HC患者43例,其中男29例,女14例,年龄45~85(中位63.3)岁;肿瘤最大径: ≤ 3 cm 15例, > 3 cm 28例;肿瘤细胞分化程度:高分化5例,中分化26例,低分化12例。神经侵犯19例,无神经侵犯24例,浸润深度在浆膜层和浆膜外层分别为7例和36例,有淋巴结转移28例,无淋巴结转移15例,HC TNM分期:I~II期20例,III~IV期23例。患者术前均未接受化疗、放疗及其他药物治疗。本研究经唐山市人民医院伦理委员会审核批准,患者均签署知情同意书。

1.2 方法

采用免疫组织化学SP法,LEF-1购自美国SantaCruz生物技术公司,CCND1购自北京中杉金

桥生物技术有限公司。染色操作步骤严格按照说明书进行。阳性对照用已知阳性切片,阴性对照用PBS代替一抗。

1.3 统计学处理

每个样本均在高倍镜下随机计数10个视野,采用Image Pro Plus 6.0图像分析系统高倍镜($\times 400$)计数积分吸光度(OD)值,OD值反映所测结构吸光度与面积的综合变化,OD值越大,表达水平越高。LEF-1及CCND1的表达均以胞核显示棕黄色颗粒为阳性。采用SPSS 22.0统计软件进行分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间LEF-1和CCND1的表达水平采用独立样本 t 检验,两者的相关性分析采用Spearman法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LEF-1在胆管癌及癌旁组织中的表达

LEF-1阳性表达主要位于胆管癌细胞的细胞核内,少量位于细胞质,散在分布,其在癌组织中的OD值为 9.156 ± 1.014 ,显著高于癌旁正常组织(2.132 ± 0.906),差异有统计学意义($P < 0.05$,图1)。在不同年龄、性别、浸润深度、肿瘤大小、神经侵犯分组中,LEF-1的表达并无差异,而在HC分化程度及临床病理分期中存在显著差异;T3/4期患者LEF-1蛋白的OD值亦明显高于T1/2期患者($P < 0.01$,表1)。

2.2 CCND1在胆管癌及癌旁组织中的表达

CCND1蛋白阳性染色者大部分在胞核内可见棕黄色颗粒沉着,少数情况在细胞质中亦可见棕黄色颗粒沉着。在胆管癌中,CCND1的OD值为 1.1204 ± 0.9075 ,对应癌旁组织为 0.7012 ± 0.2743 ,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2)。CCND1蛋白的OD值在不同年龄、性别及肿瘤直径、神经侵犯及浸润深度分组中无明显统计学意义(均 $P > 0.05$);在肿瘤分级、分期及淋巴结转移方面,CCND1蛋白表达与LEF-1类似,T3/4期患者CCND1的OD值明显高于T1/2期患者($P < 0.01$,表1)。

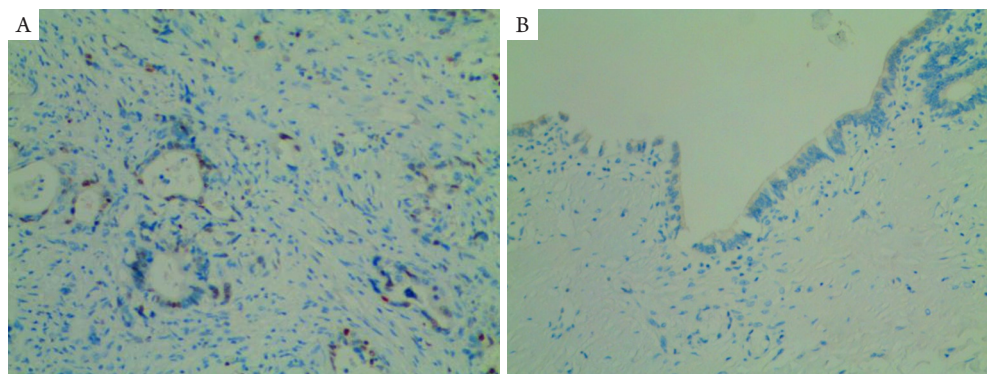


图1 LEF-1在胆管癌及癌旁组织的表达情况(IHC, ×100)

Figure 1 Expression of LEF-1 in hilar cholangiocarcinoma (IHC, ×100)

(A)胆管癌组织; (B)癌旁组织。

(A) Hilar cholangiocarcinoma specimens; (B) Paratumorous normal specimens.

表1 LEF-1及CCND1表达与肝门部胆管癌患者临床病理参数的相关性($n=43$)

Table 1 Correlation between expression of LEF-1 and CCND1 and clinicopathological characteristics ($n=43$)

| 临床参数 | <i>n</i> | LEF1 | | CCND1 | |
|----------|----------|---------------|----------|----------------|----------|
| | | 表达量 | <i>P</i> | 表达量 | <i>P</i> |
| 年龄/岁 | | | 0.32 | | 0.49 |
| ≤60 | 22 | 8 146 ± 1 720 | | 12 102 ± 4 082 | |
| >60 | 25 | 7 205 ± 1 021 | | 12 081 ± 6 987 | |
| 性别 | | | 0.09 | | 0.24 |
| 男 | 29 | 8 013 ± 2 941 | | 11 725 ± 6 032 | |
| 女 | 14 | 6 041 ± 2 173 | | 10 882 ± 5 595 | |
| 肿瘤最大径/cm | | | 0.29 | | 0.37 |
| ≤3 | 15 | 7 155 ± 2 088 | | 11 853 ± 5 045 | |
| >3 | 28 | 7 498 ± 3 752 | | 12 017 ± 6 224 | |
| 组织学分级 | | | <0.001 | | <0.001 |
| 高中分化 | 31 | 4 982 ± 1 021 | | 6 993 ± 1 310 | |
| 低分化 | 12 | 9 624 ± 2 017 | | 11 231 ± 5 004 | |
| TNM分期 | | | <0.001 | | <0.001 |
| I~II | 20 | 5 024 ± 1 842 | | 4 736 ± 1 194 | |
| III~IV | 23 | 8 183 ± 1 942 | | 10 982 ± 1 323 | |
| 淋巴结转移 | | | 0.03 | | <0.001 |
| 有 | 28 | 7 423 ± 2 025 | | 9 452 ± 2 792 | |
| 无 | 15 | 5 539 ± 1 217 | | 4 785 ± 1 006 | |
| 神经侵犯 | | | 0.33 | | 0.19 |
| 有 | 19 | 6 324 ± 1 736 | | 11 982 ± 6 257 | |
| 无 | 24 | 5 002 ± 2 014 | | 9 453 ± 4 527 | |
| 浸润深度 | | | 0.47 | | 0.35 |
| 浆膜层 | 7 | 6 817 ± 1 994 | | 8 353 ± 4 033 | |
| 浆膜外 | 36 | 7 315 ± 1 595 | | 9 745 ± 4 782 | |

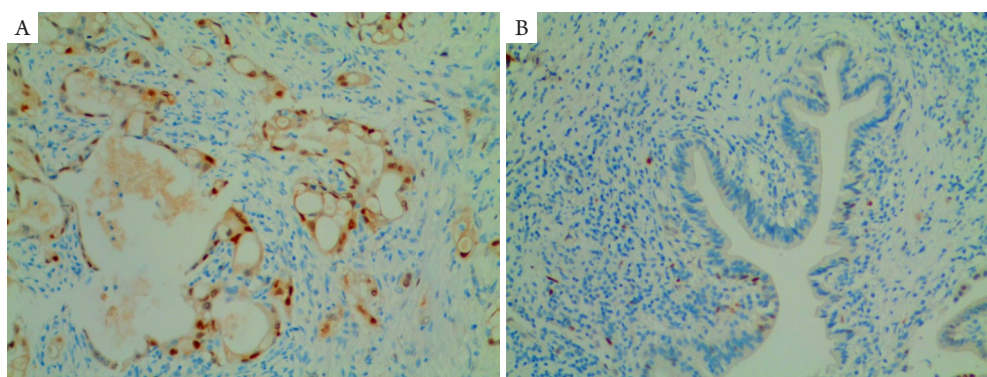


图2 CCND1在胆管癌及癌旁组织的表达情况(IHC, $\times 100$)

Figure 2 Expression of CCND1 in hilar cholangiocarcinoma (IHC, $\times 100$)

(A)胆管癌组织; (B)癌旁组织。

(A) Hilar cholangiocarcinoma specimens; (B) Paratumorous normal specimens.

2.3 LEF-1 及 CCND1 在胆管癌中的相关性

在胆管癌中, LEF-1的表达水平与CCND1的表达呈正相关($r=0.338$, $P=0.005$)。

3 讨论

LEF1是Wnt信号通路中重要核内转录因子,在调控转录中起分子开关作用。LEF1通过募集转录激活因子 β -catenin,形成 β -catenin-LEF/TCF复合物,介导Wnt信号通路激活下游靶基因,在肿瘤的增殖、分化、侵袭和转移中起重要作用^[9-10]。CCND1是LEF1下游重要的靶基因之一,其高表达可导致细胞增殖异常活跃,进而引起肿瘤的发生。本研究采用免疫组织化学技术检测HC组织及对应癌旁组织中LEF1和CCND1的表达情况,结果显示:两者在HC组织中均呈高表达。Nguyen等^[11]研究发现:在肺腺癌中,Wnt/ β -catenin可通过LEF1介导癌细胞转移至骨和脑。Li等^[7]研究报道:LEF1可通过调控雄激素受体的表达促进前列腺癌细胞的生长、增殖和侵袭。郭玉霞等^[12]在卵巢上皮癌亦发现LEF1在癌组织中高表达。有研究^[13]报道:CCND1在舌鳞癌、乳腺癌及白血病样本中也呈高表达。上述研究结果与本研究结果一致,提示LEF1/CCND1信号通路的激活与肿瘤发生有关。

本研究进一步研究发现:淋巴结转移的HC组织中LEF1和CCND1的OD值明显高于无淋巴结转移者,III~IV期患者的OD值明显高于I~II期患者,低分化者OD值亦明显高于分化高者。Wang等^[14]研究证实:LEF1与结肠癌的分期、转移等密切相关。Ramos-García等^[15]的研究显示:CCND1的表达与

口腔鳞状细胞癌TNM分期、组织学分级、细胞分化密切相关。上述研究结果与本研究基本一致,提示LEF1和CCND1表达与HC的转移、进展有关,并在HC的发生与进展中有重要作用。既往研究^[16]发现:在肿瘤的发生发展中,LEF1与CCND1有很多类似的功能;LEF1主要通过抑制细胞周期阻滞,促进肿瘤细胞增殖,而CCND1基因编码的核蛋白,可与细胞周期蛋白依赖性激酶4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)和CDK6形成复合体,该复合体通过磷酸化作用使视网膜母细胞瘤蛋白失活,调控细胞的增殖生长。

CCND1是LEF1一个重要的效应因子,LEF1通过调节CCND1的激活状态,影响肿瘤的增殖及迁移。本研究中,LEF1和CCND1在胆管癌中的表达具有较好的相关性,进一步证实LEF1/CCND1信号通路在胆管癌发生发展中的重要作用。但肿瘤的发生发展是一个多步骤多阶段的异常复杂的过程,受外界致癌因素和机体内在因素的共同影响;同时由于本研究受样本量及实验方法的限制,未来仍需进一步研究以明确LEF1和CCND1在胆管癌中的具体作用机制及其临床意义。

参考文献

1. Park KW, Jung ES, Kim DG, et al. ERCC1 can be a prognostic factor in hilar cholangiocarcinoma and extrahepatic bile duct cancer, but not in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Res Treat*, 2013, 45(1): 63-69.
2. 卿舟,涂兵.肝门部胆管癌的诊疗现状[J].*现代医药卫生*, 2016, 32(10): 1502-1506.

- QING Zhou, TU Bing. Diagnosis and treatment in hilar cholangiocarcinoma[J]. *Modern Medicine Health*, 2016, 32(10): 1502-1506.
3. Suarez-Munoz MA, Fernandez-Aguilar JL, Sanchez-Perez B, et al. Risk factors and classifications of hilar cholangiocarcinoma[J]. *World J Gastrointestinal Oncol*, 2013, 5(7): 132-138.
 4. Boulter L, Guest RV, Kendall TJ, et al. WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(3): 1269-1285.
 5. Noll AT, Cramer T, Olde Damink SW, et al. Cholangiocarcinoma, gone without the Wnt?[J]. *World J Hepatol*, 2016, 18(26): 1093-1096.
 6. Zhao P, Lu Y, Zhong M, et al. Inverse correlation of aberrant expression of fragile histidine triad (FHIT) protein with cyclin D1 protein and prognosis in Chinese patients with cholangiocarcinoma[J]. *Acta Oncol*, 2008, 47(8): 1557-1563.
 7. Li Y, Wang L, Zhang M, et al. LEF1 in androgen-independent prostate cancer: regulation of androgen receptor expression, prostate cancer growth, and invasion[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3332-3338.
 8. Shang D, Bi R, Han T, et al. Expression and proliferation-promoting role of lymphoid enhancer-binding factor 1 in human clear cell renal carcinoma[J]. *Cancer Invest*, 2014, 32(7): 368-374.
 9. Santiago L, Daniels G, Wang D, et al. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(6): 1389-1406.
 10. Sun L, Liu T, Zhang S, et al. Oct4 induces EMT through LEF1/ β -catenin dependent WNT signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2599-2606.
 11. Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH, et al. WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis[J]. *Cell*, 2009, 138(1): 51-62.
 12. 郭玉霞, 马利国, 陈递林, 等. LEF1在卵巢上皮癌中的表达及意义[J]. *山西医科大学学报*, 2016, 47(4): 325-328.
GUO Yuxia, MA Ligu, CHEN Dilin, et al. Expression and significance of LEF1 in epithelial ovarian carcinoma[J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2016, 47(4): 325-328.
 13. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(12): 1313-1326.
 14. Wang WJ, Yao Y, Jiang LL, et al. Increased LEF1 expression and decreased Notch2 expression are strong predictors of poor outcomes in colorectal cancer patients[J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5): 395-405.
 15. Ramos-García P, Bravo M, González-Ruiz L, et al. Significance of cytoplasmic cyclin D1 expression in oral oncogenesis[J]. *Oral Dis*, 2018, 24(1/2): 98-102.
 16. 何黎明, 郭新程, 陶山松, 等. CCND1、ORA0V1、ERCC1在舌鳞状细胞癌中的表达和临床意义[J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(6): 597-600.
HE Liming, GUO Xincheng, TAO Shansong, et al. Expression and clinicopathological significance of CCND1, ORAOV1 and ERCC1 in tongue squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Oral Science Research*, 2015, 31(6): 597-600.

本文引用: 田立斌, 张海光, 鲁鑫, 刘春玲. 淋巴增强因子1及细胞周期蛋白D1在肝门部胆管癌中的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(5): 942-946. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.006

Cite this article as: TIAN Libin, ZHANG Haiguang, LU Xin, LIU Chunling. Expression and clinical significance of lymphoid enhancer factor-1 and cyclin D1 in patients with hilar cholangiocarcinoma[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(5): 942-946. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.006