

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.009

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.009>

内质网钙离子结合蛋白在肝细胞癌中的表达及临床意义

张婷, 李淳

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院消化内科, 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者癌组织中内质网钙离子结合蛋白(reticulocalbin-1, RCN1)的表达及临床意义。方法: 回顾性分析华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院2012年1月至2014年1月间收治的95例HCC患者临床资料, 采用免疫组织化学法检测HCC癌组织中RCN1表达, 根据免疫组织化学评分将患者分为RCN1高、低表达两组, 采用Kaplan-Meier法和log-rank检验比较RCN1高、低表达组患者无瘤生存率和总生存率的差异, 采用Cox比例风险模型分析影响HCC患者无瘤生存率和总生存率的危险因素。结果: 95例HCC患者中RCN1高表达组有61例(64.2%), RCN1低表达组有34例(35.8%); RCN1表达与性别($P=0.031$)、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)($P<0.001$)、肿瘤大小($P=0.032$)、肿瘤结节数($P=0.028$)、癌栓($P=0.011$)和分化程度($P=0.001$)显著相关; RCN1高表达组患者无瘤生存率($P=0.001$)和总生存率($P<0.001$)显著低于RCN1低表达组患者。单因素分析显示: RCN1表达($P<0.01$)、AFP($P<0.01$)、肿瘤大小($P<0.01$)、肿瘤结节数($P=0.03$)、癌栓($P<0.01$)、TNM分期($P<0.01$)和分化程度($P=0.04$)为影响HCC患者无瘤生存率的危险因素; 多因素分析显示RCN1($P=0.01$)是影响HCC患者无瘤生存率的独立危险因素。单因素分析表明RCN1表达($P<0.01$)、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)($P<0.01$)、AFP($P=0.01$)、癌栓($P=0.01$)和TNM分期($P<0.01$)是影响HCC总生存率的危险因素, 多因素分析显示RCN1表达($P<0.01$)和TNM分期($P=0.02$)是影响HCC患者总生存率的独立危险因素。结论: RCN1在HCC中高表达, RCN1高表达的HCC患者无瘤生存率和总生存率显著低于RCN1低表达患者, 为影响HCC预后的分子标志物。

[关键词] 内质网钙离子结合蛋白; 肝细胞癌; 临床意义

Expression of reticulocalbin-1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

ZHANG Ting, LI Zhun

(Department of Gastroenterology, Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract Objective: To investigate the expression of reticulocalbin-1 (RCN1) in cancer tissues of patients with

收稿日期 (Date of reception): 2019-07-17

通信作者 (Corresponding author): 李淳, Email: zhunli880@163.com

基金项目 (Foundation item): 武汉市科技局课题 (2018404010306)。This work was supported by Wuhan Science and Technology Bureau Project, China (2018404010306).

hepatocellular carcinoma and its clinical significance. **Methods:** The clinical data of 95 patients with hepatocellular carcinoma admitted to our hospital from January 2012 to January 2014 were reviewed. The expression of RCN1 in hepatocellular carcinoma pathological specimens was detected by immunohistochemistry. According to the results of immunohistochemistry, the patients were divided into two groups, RCN1 high and low expression group. The Kaplan-Meier curve method and the log-rank test were used to compare the difference between the tumor-free survival rate and the overall survival rate of patients with high and low RCN1 expression. The Cox proportional hazard model was used to analyze the risk factors for tumor-free survival and overall survival in hepatocellular carcinoma. **Results:** Of the 95 patients with HCC, 61 (64.2%) had high RCN1 expression and 34 (35.8%) had low RCN1 expression. RCN1 expression was significantly associated with gender ($P=0.031$), alpha-fetoprotein (AFP) ($P<0.001$), tumor Size ($P=0.032$), number of tumor nodules ($P=0.028$), tumor thrombus ($P=0.011$), and degree of differentiation ($P=0.001$). Tumor-free survival ($P=0.001$) and overall survival rate of high RCN1 expression group ($P<0.001$) was significantly lower than that of patients with low RCN1 expression group. Multivariate analysis showed that RCN1 expression ($P=0.01$) was an independent prognostic factor predicting tumor-free survival in HCC patients. Analysis showed that RCN1 expression ($P<0.01$) and TNM staging ($P=0.02$) were independent prognostic factors predicting overall survival in patients with HCC. **Conclusion:** The tumor-free survival rate and overall survival rate of patients with high RCN1 expression in HCC are significantly lower than those with low RCN1 expression, which is a molecular marker for predicting the prognosis of HCC.

Keywords reticulocalbin-1; hepatocellular carcinoma; clinical significance

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是种常见的肝脏恶性肿瘤,也是全球,特别东亚和东南亚地区,癌症相关死亡的常见原因之一^[1-2]。HCC的主要治疗方法包括肿瘤切除、射频消融和肝移植^[3-4]。然而,传统疗法,包括放化疗和手术切除,对晚期HCC效果欠佳^[5-6]。因此,鉴定影响HCC患者预后的相关因素有重要的意义。内质网钙离子结合蛋白(reticulocalbin-1, RCN1)是存储在內质网中的Ca²⁺结合蛋白,在Ca²⁺依赖性细胞黏附中发挥作用。最近研究^[7]发现:癌症、心血管疾病和神经肌肉疾病中RCN1蛋白表达异常。在肝癌^[8]和肾癌^[9]中发现RCN1上调表达,并与癌细胞侵袭性相关。然而,RCN1在HCC中的表达及与预后的关系尚不清楚,本研究旨在探讨HCC患者癌组织中RCN1的表达及临床意义。

1 材料与方法

1.1 患者组织样本

所有组织样本均来自2013年7月至2014年12月在华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院接受肝切除术的HCC患者,共95例。纳入标准:1)术前经过CT、MRI或病理活检诊断为HCC;2)患者除HCC外,不存在其他部位的原发性肿瘤;3)患者具有完整的病历和随访信息。排除标准:不

符合上述纳入标准者。本研究通过华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院医学伦理委员会批准。所有切除后的新鲜标本均快速冷冻后存储在-80℃冰箱中。

1.2 患者临床资料和随访

从全部患者临床病历中提取如下信息:性别、年龄、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)水平、病毒感染信息、肿瘤大小、肿瘤数目、是否存在癌栓、美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)第八版TNM分期等信息。通过定期门诊和电话方式进行随访。随访期间每半年1次行腹部超声、CT和MRI检查,失访共3人。所有患者随访至2019年1月。无瘤生存时间定义为手术至肿瘤复发之间的时间间隔;总生存率为手术至死亡或最后一次随访间的时间间隔。

1.3 免疫组织化学染色

将95例HCC患者的病理组织标本固定在甲醛溶液中并包埋在石蜡中用于RCN1免疫组织化学染色。步骤如下:在完成脱蜡、水合和封闭后,加入RCN1一抗(1:200)并在4℃下与样品一起孵育过夜,漂洗3次后,与羊抗兔二抗在37℃孵育2h,苏木精染色,在出现浅黄色后终止染色,并在显微镜下观察。

1.4 免疫组织化学评分

由2位病理医生在双盲下独立评估患者病理切片。免疫组织化学评分由染色强度和阳性细胞百分比2个维度组成。染色强度评分如下：0，无染色；1，比背景略黄；2，黄褐色；3，棕色。阳性细胞评分如下测定：0，0%~5%；1，6%~25%；2，26%~50%；3，51%~75%；4，>75%。IHC总分计算为阳性细胞评分×染色强度评分。最终免疫评分得分在0~12之间。总得分为4个等级：0为阴性(-)；1~4为弱阳性(+); 5~8为阳性(++); 9~12为强阳性(+++)。根据免疫组织化学评分结果将患者分为高低表达两组，其中≤8分为低表达组，>8分为高表达组。

1.5 统计学处理

使用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。 χ^2 检验用于分析RCN1的表达与临床病理因素的关系，Kaplan-Meier法和log-rank检验用于分析RCN1高低表达组的生存分析和比较，单因素和多因素分析影响无瘤生存率和总生存的影响因素， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 患者癌组织中 RCN1 的表达

免疫组织化学示：95例HCC患者中RCN1高表达有61例(64.2%)，RCN1低表达有34例(35.8%)，HCC患者癌组织中RCN1免疫组织化学典型表达见图1。

2.2 RCN1 表达与临床病理因素的关系

RCN1表达与性别($P=0.031$)、AFP($P<0.001$)、肿瘤大小($P=0.032$)、肿瘤数目($P=0.028$)、癌栓($P=0.011$)和分化程度($P=0.001$)显著相关，RCN1表达与HCC患者性别、年龄和乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HbsAg)差异无统计学意义($P>0.05$ ，表1)。

2.3 HCC 患者癌组织中 RCN1 表达与预后间的关系

RCN1高表达组患者无瘤生存率($P=0.001$)和总生存率($P<0.001$)显著低于RCN1低表达组患者，其中RCN1低表达组患者5年无瘤生存率和总生存率分别为21.9%和31.4%，而RCN1高表达组患者5年无瘤生存率和总生存率分别为10.4%和15.1%(图2)。

2.4 影响 HCC 患者无瘤生存率的危险因素分析

单因素分析显示：RCN1表达($P<0.01$)、AFP($P<0.01$)、肿瘤大小($P<0.01$)、肿瘤结节数($P=0.03$)、癌栓($P<0.01$)、TNM分期($P<0.01$)和分化程度($P=0.04$)为影响HCC患者无瘤生存率的危险因素；多因素分析显示：RCN1($P=0.01$)是影响HCC患者无瘤生存率的独立危险因素(表2)。

2.5 影响 HCC 患者总生存率的危险因素分析

单因素分析表明：RCN1表达($P<0.01$)、HbsAg($P<0.01$)、AFP($P=0.01$)、癌栓($P=0.01$)和TNM分期($P<0.01$)是影响HCC总生存率的危险因素；多因素分析示：RCN1表达($P<0.01$)和TNM分期($P=0.02$)是影响HCC患者总生存率的独立危险因素(表3)。

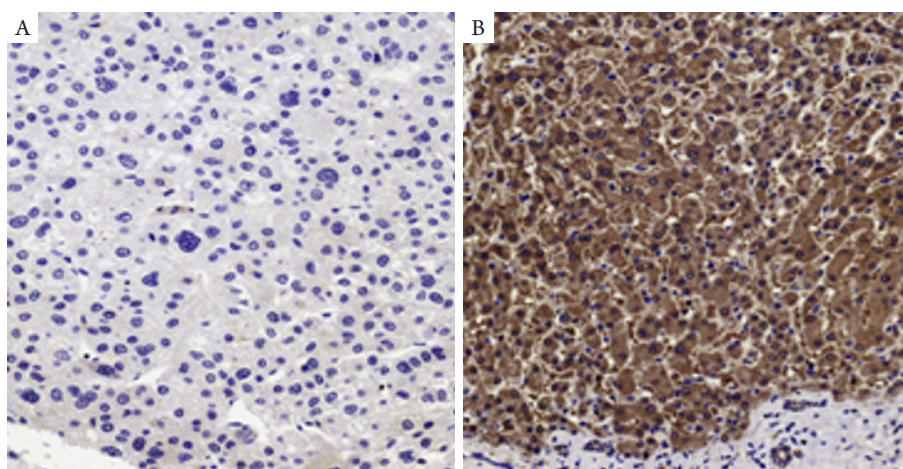


图1 HCC患者癌组织中RCN1的表达(IHC, ×200)

Figure 1 RCN1 expression in cancer tissues of HCC patients (IHC, ×200)

(A)RCN1低表达；(B)RCN1高表达。

(A) Low-expression of RCN1; (B) High-expression of RCN1.

表1 RCN1表达与HCC临床病理因素间的关系

Table 1 Correlation between RCN1 expression with clinicopathological characteristics of HCC

临床参数	n	RCN1 表达 / 例		P
		低表达 (n=34)	高表达 (n=61)	
性别				0.031
男	81	25	56	
女	14	9	5	
年龄/岁				0.672
<50	48	16	32	
≥ 50	47	18	29	
AFP/(ng·L ⁻¹)				<0.001
<400	50	28	22	
≥ 400	45	6	39	
HbsAg				0.084
阴性	41	19	22	
阳性	54	15	39	
肿瘤大小/cm				0.032
≤ 5	49	23	26	
>5	46	11	35	
肿瘤结节数				0.028
单个 (<1)	58	26	32	
多个 (≥ 2)	37	8	29	
癌栓				0.011
无	65	29	36	
有	30	5	25	
TNM分期				0.286
I+II	51	21	30	
III+IV	44	13	31	
肿瘤分化				0.001
高 / 中	64	30	34	
低	31	4	27	

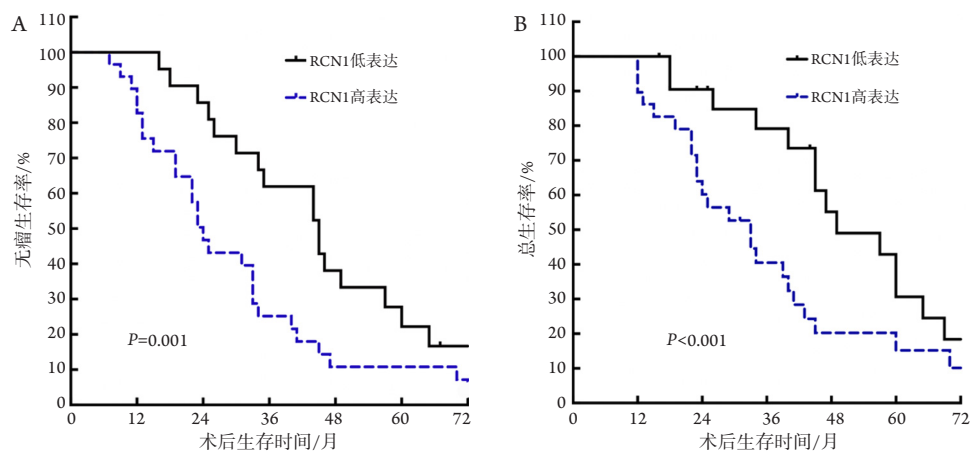


图2 RCN1高低表达组的HCC患者无瘤生存率(A)和总生存率(B)比较

Figure 2 Comparison of disease-free survival (A) and overall survival (B) in patients with high and low RCN1 expression group in hepatocellular carcinoma patients

表2 与无瘤生存率相关的风险因素的单变量和多变量Cox回归分析

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis of risk factors associated with tumor-free survival

临床参数	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
RCN1 表达 (高 vs 低)	3.39	1.55~7.41	<0.01	3.20	1.26~8.12	0.01
性别 (男 vs 女)	2.14	0.76~6.04	0.15	—	—	—
年龄 (≥ 50 岁 vs <50 岁)	1.00	0.55~1.84	0.99	—	—	—
HBsAg(阳性 vs 阴性)	1.49	0.79~2.81	0.21	—	—	—
AFP (≥ 400 ng/mL vs <400 ng/mL)	2.59	1.37~4.90	<0.01	1.34	0.63~2.88	0.45
肿瘤大小 (>5 cm vs ≤ 5 cm)	2.88	1.47~5.62	<0.01	1.93	0.94~3.96	0.07
肿瘤结节数 (多个 vs 单个)	1.96	1.06~3.62	0.03	0.87	0.42~1.80	0.71
癌栓 (有 vs 无)	2.43	1.31~4.52	<0.01	1.23	0.57~2.64	0.60
TNM 分期 (III+IV vs I+II)	2.94	1.56~5.53	<0.01	2.29	0.99~5.28	0.05
分化程度 (低 vs 高 / 中)	0.73	0.54~0.99	0.04	0.78	0.39~1.56	0.48

表3 与总生存率相关的风险因素的单变量和多变量Cox回归分析

Table 3 Univariate and multivariate Cox regression analysis of risk factors associated with overall survival

参数	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
RCN1 表达 (高 vs 低)	4.60	1.91~11.09	<0.01	4.11	1.53~11.01	<0.01
性别 (男 vs 女)	2.89	0.89~9.40	0.08	—	—	—
年龄 (≥ 50 岁 vs <50 岁)	1.09	0.59~2.00	0.79	—	—	—
HBsAg(阳性 vs 阴性)	2.58	1.38~4.83	<0.01	1.56	0.80~3.07	0.19
AFP (≥ 400 ng/mL vs <400 ng/mL)	2.44	1.30~4.58	0.01	1.12	0.53~2.37	0.76
肿瘤大小 (>5 cm vs ≤ 5 cm)	1.44	0.77~2.71	0.26	—	—	—
肿瘤结节数 (多个 vs 单个)	1.5	0.81~2.75	0.20	—	—	—
癌栓 (有 vs 无)	2.39	1.28~4.43	0.01	1.15	0.56~2.37	0.71
TNM 分期 (III+IV vs I+II)	2.58	1.38~4.83	<0.01	2.80	1.22~6.43	0.02
分化程度 (低 vs 高 / 中)	1.37	0.98~1.86	0.05	—	—	—

3 讨论

HCC是我国常见恶性肿瘤之一^[10], 近年来HCC的发病率和病死率在亚洲、非洲和西方国家有增加的趋势, 给社会造成沉重的经济负担^[11-12]。

RCN1是一种位于内质网的钙结合蛋白质, 其由人11p13染色体上的RCN1基因编码, 全长331个氨基酸残基, 含有6个与高亲和力钙结合基序相似的保守结构域。最近的研究^[13]发现: RCN1也定位于前列腺癌细胞表面。一项体外细胞实验^[14]发

现: RCN1在浸润性乳腺癌细胞系和侵袭性结直肠癌细胞系中高表达, 提示RCN1与肿瘤细胞侵袭性有关。与正常肺组织相比, RCN1在肺癌组织中过表达, 且在癌症中的淋巴管内皮细胞中高表达, RCN1已被证明是一种与淋巴转移相关的肿瘤标志物^[13]。尽管如此, 其在HCC中的表达和临床意义尚未见报道。

本研究免疫组织化学染色显示: 95例HCC患者中RCN1高表达61(64.2%)例, RCN1低表达34(35.8%)例。研究^[15]报道: 在158例非小细胞肺

癌的癌组织中RCN1高表达92例, 低表达66例, 与本研究结果类似, 结果显示RCN1在HCC和非小细胞肺癌中存在差异性表达。本研究发现RCN1高表达患者男性居多、AFP浓度更高、肿瘤大小和数目更多、分化程度越高, 上述指标均显示RCN1高表达患者病情更为严重。在肾细胞癌中, 蛋白质组学证实RCN1高表达是潜在的分子标志物, 且与肾细胞癌TNM分期密切相关^[9]。研究^[15]发现: 在非小细胞肺癌患者中, 免疫组织化学发现RCN1高表达与非小细胞肺癌更高的TNM分期和淋巴结转移密切相关。上述结果表明RCN1表达参与癌症的进展。

本研究发现RCN1高表达的HCC患者无瘤生存率和总生存率显著低于RCN1低表达的HCC患者, 且Cox单因素和多因素模型分析均显示RCN1表达是影响HCC患者无瘤生存率和总生存率的独立危险因素, 提示RCN1表达是可预测HCC患者预后的分子标志物。在HCC^[8]和肾细胞癌^[9]中, 作者均通过临床蛋白质组学证实HCC和肾细胞癌中RCN1表达显著高于癌旁组织, 可能是潜在的与癌症相关的分子标志物。在非小细胞肺癌中, 研究者^[15]发现RCN1表达是影响非小细胞肺癌总生存率的独立危险因素, 与本研究结果类似。同样, 研究^[16]发现RCN1表达是前列腺癌预后不良的独立危险因素。

RCN1表达如何影响HCC患者预后的机制尚不清楚, 可能与其高表达增强癌细胞的侵袭能力相关。在体外细胞实验^[14]中, 发现浸润性乳腺癌细胞系和侵袭性结直肠癌细胞系中RCN1均高表达。非小细胞肺癌细胞系的体外实验^[15]发现敲低RCN1表达显著抑制肺癌细胞系的增殖和侵袭能力。尽管如此, 其是否影响HCC癌细胞侵袭和增殖尚需进一步研究。

本研究存在如下不足: 本研究为单中心回顾性研究, 纳入病例数目较少, 尚需要多中心大样本研究来证实本研究结论; 其次, 本研究并未在细胞系中探讨RCN1表达影响HCC患者预后的确切机制, 值得进一步研究。

综上, 本研究发现RCN1高表达的HCC患者无瘤生存率和总生存率显著低于RCN1低表达患者, RCN1是影响HCC预后的分子标志物。

参考文献

- Kanthaje S, Makol A, Chakraborti A. Sorafenib response in hepatocellular carcinoma: microRNAs as tuning forks[J]. *Hepatol Res*, 2018, 48(1): 5-14.
- Sia D, Villanueva A, Friedman SL, et al. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4): 745-761.
- Lee S, Kang TW, Cha DI, et al. Radiofrequency ablation vs. surgery for perivascular hepatocellular carcinoma: propensity score analyses of long-term outcomes[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(1): 70-78.
- Best J, Schotten C, Theysohn JM, et al. Novel implications in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Gastroenterol*, 2017, 30(1): 23.
- Kudo M, Trevisani F, Abou-Alfa GK, et al. Hepatocellular carcinoma: therapeutic guidelines and medical treatment[J]. *Liver Cancer*, 2016, 6(1): 16-26.
- Zhao Y, Hu X, Wei L, et al. PARP10 suppresses tumor metastasis through regulation of Aurora A activity[J]. *Oncogene*, 2018; 37(22): 2921-2935.
- Fu Q, Wu Y. RCAN1 in the inverse association between Alzheimer's disease and cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1): 54.
- Yu LR, Zeng R, Shao XX, et al. Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(14): 3058-3068.
- Giribaldi G, Barbero G, Mandili G, et al. Proteomic identification of Reticulocalbin 1 as potential tumor marker in renal cell carcinoma[J]. *J Proteomics*, 2013, 91: 385-392.
- Ayuso C, Rimola J, Vilana R, et al. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines[J]. *Eur J Radiol*, 2018, 101: 72-81.
- Sun L, Fahey P, Zhu X, et al. A cohort study to examine the use of Chinese herbal medicine in combination with conventional therapies for patients with hepatocellular carcinoma in China[J]. *Integr Cancer Ther*, 2018, 17(3): 902-911.
- Llovet JM, Montal R, Sia D, et al. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(10): 599-616.
- Yoshida Y, Yamashita T, Nagano K, et al. Limited expression of reticulocalbin-1 in lymphatic endothelial cells in lung tumor but not in normal lung[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(4): 610-614.
- Liu Z, Brattain MG, Appert H. Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(2): 283-289.

15. Chen X, Shao W, Huang H, et al. Overexpression of RCN1 correlates with poor prognosis and progression in non-small cell lung cancer[J]. Hum Pathol, 2019, 83: 140-148.
16. Liu X, Zhang N, Wang D, et al. Downregulation of reticulocalbin-1 differentially facilitates apoptosis and necroptosis in human prostate cancer cells[J]. Cancer Sci, 2018, 109(4): 1147-1157.

本文引用: 张婷, 李淳. 内质网钙离子结合蛋白在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(5): 1129-1135. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.009

Cite this article as: ZHANG Ting, LI Zhun. Expression of reticulocalbin-1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(5): 1129-1135. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.009