·论著·

原发性肝癌患者的 PEBP4 和 CD146 表达与肝动脉化学治疗栓塞术疗效的关系及临床意义

徐元丰　沈　涛　宋　蒨　巢浩强

【摘要】 目的　探讨原发性肝癌(PHC)患者的磷脂酰乙醇胺结合蛋白4(PEBP4)和CD146表达与肝动脉化学治疗栓塞(TACE)术疗效的关系及临床意义。方法　选择江苏大学附属武进人民医院接受TACE术治疗的80例PHC患者作为研究对象,采用免疫组织化学法检测肝癌组织中PEBP4、CD146的表达情况,并分析PHC患者的EBP4、CD146表达与其临床病理特征、预后及TACE术疗效之间的相关性。结果　患者的PEBP4高表达率为32.50%(26/80),低表达率为67.50%(54/80);CD146高表达率为37.50%(30/80),低表达率为62.50%(50/80)。PEBP4高表达组更多见于低分化、浸润深度更深、Ⅲ～Ⅳ期的患者,更易发生淋巴结转移。CD146高表达组更多见于低分化、合并血管内癌栓、浸润深度更深的患者,更易发生淋巴结转移。PEBP4低表达组患者的2年生存率为53.70%(29/54),高于PEBP4高表达组[38.46%(10/26)],差异有统计学意义($\chi^2=7.179$, $P=0.007$)。CD146低表达组的2年生存率为62.00%(31/50),高于CD146高表达组[46.67%(14/30)],差异有统计学意义($\chi^2=5.443$, $P=0.020$)。单因素和多因素分析显示,PEBP4、CD146为影响PHC患者生存时间的独立因素($P<0.05$)。PEBP4和CD146低表达组经TACE术治疗的临床有效率均显著高于高表达组(P均<0.05)。结论　PHC患者的PEBP4、CD146表达状态与其临床病理特征具有相关性,且PEBP4、CD146是PHC患者预后的独立影响因素。PEBP4和CD146低表达的患者经TACE术治疗效果更好。

【关键词】 磷脂酰乙醇胺结合蛋白4;CD146;原发性肝癌;肝动脉化学治疗栓塞术;临床意义

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2019.06.006

Relationship between expression of PEBP4 and CD146 in patients with primary liver cancer and efficacy of transcatheter hepatic arterial chemoembolization and its clinical significance

XU Yuanfeng, SHEN Tao, SONG Qian, CHAO Haoqiang. Department of Interventional Vascular, Wujin People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, Wujin Clinical College Affiliated to Xuzhou Medical College, Changzhou 213000, *China*

【Abstract】 Objective　This paper aimed to investigate the relationship between the expression of phosphatidylethanolamine binding protein 4 (PEBP4) and CD146 and the efficacy of transcatheter hepatic arterial chemoembolization (TACE) in patients with primary hepatic carcinoma (PHC) and its clinical significance. **Methods**　Eighty patients with PHC who received TACE treatment in Wujin People's Hospital Affiliated to Jiangsu University were selected as the research subjects. The expression of PEBP4 and CD146 in liver cancer tissues was detected by immunohistochemistry. The correlations between the expressions of EBP4 and CD146, and their clinicopathological features, prognosis, and efficacy of TACE in patients with PHC were analyzed. **Results**　The high expression rate of PEBP4 in

作者单位:213000　江苏常州,江苏大学附属武进人民医院　徐州医科大学武进临床学院介入血管科

patients was 32.50%(26/80) while the low expression rate was 67.50%(54/80). The high expression rate of CD146 was 37.50%(30/80) whereas the low expression rate was 62.50%(50/80). Besides, the PEBP4 high expression group was more common in patients with low differentiation, deeper infiltration depth, stage Ⅲ～Ⅳ, and more prone to lymph node metastasis. However, the CD146 high expression group was more common in patients with low differentiation, intravascular tumor thrombus, and deeper invasion, and was more prone to lymph node metastasis. In addition, the 2-year survival rate of patients with low PEBP4 expression was 53.70%(29/54), which was higher than that of PEBP4 high expression (38.46%(10/26)), and the difference was statistically significant ($\chi^2 = 7.179$, $P = 0.007$). Moreover, the 2-year survival rate of the CD146 low expression group was 62.00%(31/50), which was higher than the CD146 high expression group (46.67%(14/30)), and the difference was statistically significant ($\chi^2 = 5.443$, $P = 0.020$). Furthermore, univariate and multivariate analysis showed that PEBP4 and CD146 were independent factors affecting the survival time of patients with PHC ($P < 0.05$). The clinical response rate of PEBP4 and CD146 low expression group after TACE treatment was significantly higher than that of high expression group (all $P < 0.05$). **Conclusions** The expression of PEBP4 and CD146 in PHC patients is related to its clinicopathological characteristics, and PEBP4, CD146 are independent factors affecting the prognosis of PHC patients. Patients with low expression of PEBP4 and CD146 are better treated by TACE.

【Key words】 Phosphatidylethanolamine binding protein 4; CD146; Primary hepatic carcinoma; Transcatheter arterial chemoembolization; Clinical significance

近年来原发性肝癌(PHC)的发病率逐渐升高[1-2],仅次于肺癌和胃癌,居第 3 位。早期 PHC 无明显症状,大多数患者确诊时已为中晚期,无法手术切除,因此肝动脉化学治疗栓塞(TACE)术已成为治疗 PHC 的主要治疗手段。目前 PHC 患者总的 5 年生存率仍较低,其原因可能与癌细胞间的信号转导以及细胞的增殖、黏附等功能的变化有关。脂酰乙醇胺结合蛋白 4(PEBP4)为 PEBP 家族成员,其核苷酸序列高度保守,可与脂酰乙醇胺结合,在细胞膜的重塑和构建、级联信号转导、细胞凋亡等过程中发挥重要的作用[3]。CD146 为非免疫球蛋白家族成员,其编码的单链跨膜糖基化蛋白,具有加强细胞与细胞、细胞外基质之间的相互作用,调控细胞游走、增殖、黏附及侵袭等功能[4]。研究显示 PEBP4、CD146 与多种肿瘤的发生、发展有关[5-6],但其在 PHC 中的作用未见报道。本研究将探讨 PHC 患者的 PEBP4、CD146 表达及其与临床病理特征、预后、TACE 术疗效的相关性,以期为 PHC 患者的诊疗及预后评估提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选择 2012 年 1 月至 2016 年 9 月在江苏大学附属武进医院接受 TACE 术治疗的 80 例 PHC 患者作为研究对象。患者年龄 35～63 岁,平均年龄(49.1±9.23)岁。入组标准:(1)临床资料完整;(2)术前经皮肝脏穿刺活组织病理检查诊断为 PHC;(3)为初治,术前未接受放射治疗或化学治疗;(4)诊断及分期符合美国癌症联合委员会(AJCC)第七版标准[6]。

1.2 免疫组织化学法检测 PHC 组织中 PEBP4、CD146 蛋白表达

经肝穿刺取得 PHC 组织,采用免疫组织化学法测定 PEBP4、CD146 蛋白的表达情况,具体步骤是:将标本用 40 g/L 的甲醛固定,石蜡包埋,按 4 μm的厚度连续切片,放入恒温烤箱烤片。常规脱蜡脱水,PBS 冲洗,柠檬酸高压修复,滴加对应一抗 CD146(美国 CST 公司)和 PEBP4(美国 SanTa Cruz Biotechnology 公司),4 ℃冰箱过夜,PBS 冲洗,滴加对应二抗,PBS 冲洗,滴加 DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。

1.3 免疫组织化学检测结果判定

PEBP4、CD146 蛋白均为细胞质和细胞膜表达。结果判断标准:(1)按阳性细胞所占比例进行评分,无阳性细胞为 0 分,阳性细胞≤10%为 1 分,11%～50%为 2 分,51%～75%为 3 分,>76%为 4 分;(3)对染色程度进行评分,棕褐色为 3 分,棕黄色为 2 分,淡黄色为 1 分,无色为 0 分;(4)两项评分的乘积≥2 分为该蛋白高表达,<2 分为低表达。

1.4　TACE 术方法

应用 Seldinger 法经皮股动脉穿刺，将导丝置入导管鞘，在 X 线透视下插管。将导管插入肿瘤供血动脉后，行动脉造影，经导管灌注奥沙利铂（100 mg/m²）和表柔比星（30 mg/m²）后，再用 40% 碘化油进行栓塞。间隔 3～4 周重复 1 次，共治疗 2～3次。

1.5　疗效观察

参照实体瘤疗效评定标准，分为完全缓解、部分缓解、无变化、进展[7]。有效率为完全缓解和部分缓解的患者占所有患者的比例。

1.6　随访

对患者进行随访，每 3 个月 1 次，记录患者是否生存，生存的时间等，随访截止日期为 2018 年 9 月。

1.7　统计学处理

应用 SPSS 21.0 软件对资料进行统计学分析。计数资料比较采用 χ^2 检验。Kaplan-Meier 法绘制生存曲线图，比较应用 Log-rank 检验。单因素及多因素分析采用 Cox 比例风险模型。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　PHC 组织中 PEBP4、CD146 蛋白的表达情况

共有 26 例患者的 PEBP4 蛋白高表达，高表达率为 32.50%（26/80），低表达率为 67.50%（54/80）；共有 33 例患者的 CD146 蛋白高表达，高表达率为 37.50%（30/80），低表达率为 62.50%（50/80）。见图 1。

2.2　PEBP4、CD146 蛋白表达与 PHC 患者临床病理特征的关系

PEBP4 高表达组与低表达组在肿瘤分化程度、浸润深度、分期、淋巴结转移方面，差异有统计学意义（P 均<0.05）；PEBP4 高表达组更多见于低分化、浸润深度更深、Ⅲ～Ⅳ期的患者，更易发生淋巴结转移。CD146 高表达组与低表达组在肿瘤分化程度、是否合并血管内癌栓、浸润深度、淋巴结转移方面，差异有统计学意义（P 均<0.05）；CD146 高表达组更多见于低分化、合并血管内癌栓、浸润深度更深的患者，更易发生淋巴结转移。见表 1。

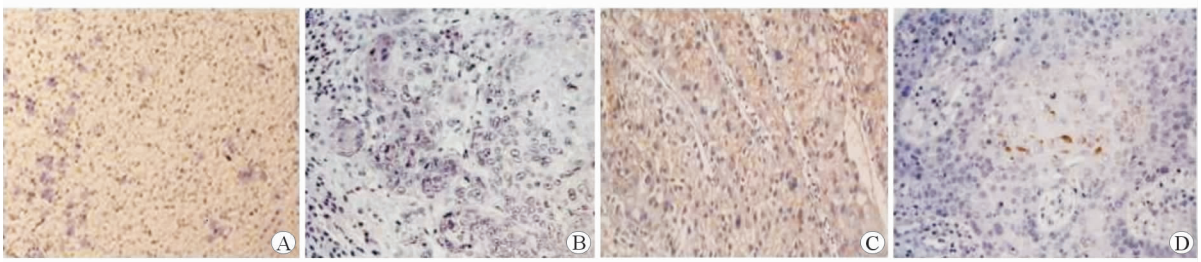


图 1　PHC 组织中 PEBP4、CD146 蛋白的表达情况　免疫组织化学　×100　**A**　PEBP4 蛋白高表达　**B**　PEBP4 蛋白低表达　**C**　CD146 蛋白高表达　**D**　CD146 蛋白低表达

表 1　PEBP4、CD146 蛋白表达与 PHC 患者临床病理特征的关系/例

项目	PEBP4				CD146			
	高表达	低表达	χ^2 值	P 值	高表达	低表达	χ^2 值	P 值
性别			0.015	0.902			0.222	0.637
男	16	34			17	31		
女	10	20			13	19		
病灶大小			0.465	0.495			0.031	0.860
≥10 cm	9	23			12	21		
<10 cm	17	31			18	29		
浸润深度			11.168	0.001			6.519	0.011
T1～T2	6	34			8	28		
T3～T4	20	20			22	22		
分期			5.788	0.016			0.655	0.418
Ⅰ～Ⅱ期	7	30			14	28		
Ⅲ～Ⅳ期	19	24			16	22		

续表 1　PEBP4、CD146 蛋白表达与 PHC 患者临床病理特征的关系/例

项目	PEBP4				CD146			
	高表达	低表达	χ^2 值	*P* 值	高表达	低表达	χ^2 值	*P* 值
肿瘤部位			0.001	0.971			0.943	0.624
左肝	10	21			10	15		
右肝	16	33			20	35		
分化程度			5.698	0.017			8.049	0.005
高～中分化	8	32			10	33		
低分化	18	22			20	17		
淋巴结转移			4.953	0.026			6.963	0.008
无	10	35			12	35		
有	16	19			18	15		
大体类型			0.412	0.814			0.349	0.840
块状型	8	13			9	12		
结节型	13	30			16	29		
弥漫型	5	11			5	9		
肝内血管癌栓			0.980	0.322			6.015	0.014
无	17	29			12	34		
有	9	25			18	16		

2.3　PEBP4 和 CD146 表达与 PHC 患者预后的关系

PEBP4 低表达组的 2 年生存率为 53.70%(29/54)，高于 PEBP4 高表达组[38.46%(10/26)]，差异有统计学意义($\chi^2 = 7.179$，$P = 0.007$)。CD146 低表达组的 2 年生存率为 62.00%(31/50)，高于 CD146 高表达组[46.67%(14/30)]，差异有统计学意义($\chi^2 = 5.443$，$P = 0.020$)。见图 2、图 3。

2.4　单因素和多因素分析

单因素分析显示，PEBP4、CD146、肿瘤分化程度、浸润深度、分期、淋巴结转移、合并肝内血管癌栓与 PHC 患者的预后显著相关($P<0.05$)。多因素分析显示，PEBP4、CD146 为 PHC 患者生存时间的独立影响因素($P<0.05$)。见表 2、表 3。

2.5　PEBP4 和 CD146 高表达和低表达患者经 TACE 术疗效的比较

PEBP4 低表达患者经 TACE 术后临床有效率为 85.19%(46/54)，显著高于高表达患者[57.69%(15/26)]，差异有统计学意义($P = 0.007$)。CD146 低表达患者经 TACE 术后临床有效率为 76.00%(38/50)，显著高于高表达患者[53.33%(16/30)]，差异有统计学意义($P = 0.036$)。见表 4。

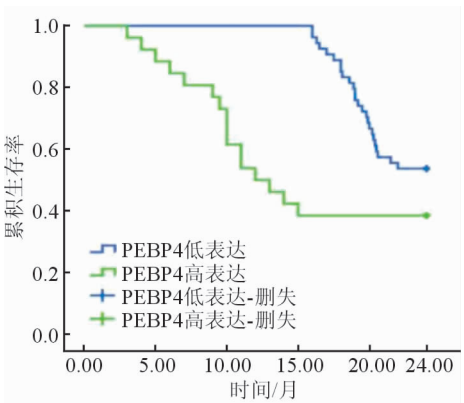


图 2　PEBP4 低表达组与 PEBP4 高表达组的生存时间比较

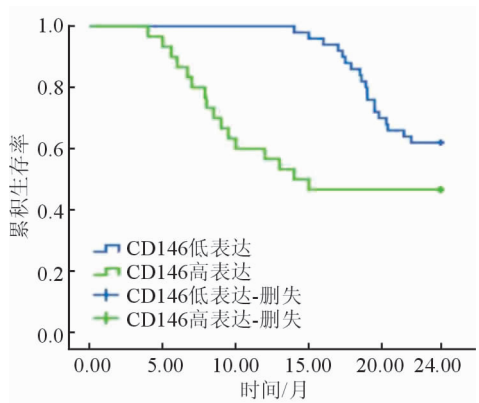


图 3　CD146 低表达组与 CD146 高表达组的生存时间比较

表 2　影响 PHC 患者生存时间的单因素 COX 回归分析

变量	生存时间				
	β	SE	Wald χ^2 值	P 值	RR(95%CI)
性别	0.058	0.247	0.055	0.813	0.944(0.582～1.531)
病灶大小	0.454	0.246	3.391	0.198	1.574(0.971～2.551)
浸润深度	0.759	0.288	6.967	0.006	2.137(1.216～3.756)
大体类型	0.263	0.249	1.112	0.292	0.769(0.472～1.253)
肿瘤部位	0.086	0.248	0.120	0.726	0.918(0.564～1.492)
分期	0.658	0.163	16.277	0.000	1.930(1.402～2.657)
淋巴结转移	0.058	0.647	7.055	0.011	0.944(0.503～1.422)
分化程度	0.940	0.154	6.139	0.010	0.401(0.396～1.335)
肝内血管癌栓	1.412	0.516	7.482	0.003	0.241(0.089～0.670)
PEBP4 状态	0.496	0.353	5.108	0.005	0.933(0.511～1.430)
CD146 状态	1.303	0.571	5.973	0.008	3.682(1.294～10.470)

表 3　PHC 患者生存时间的多因素 COX 回归分析

变量	生存时间				
	β	SE	Wald χ^2 值	P 值	RR(95%CI)
分期	0.171	0.254	0.454	0.253	1.186(0.722～1.951)
分化程度	0.127	0.794	1.101	1.014	0.483(0.271～0.861)
浸润深度	0.624	0.251	5.796	0.023	1.251(0.765～2.047)
肝内血管癌栓	0.270	0.252	1.154	0.283	1.310(0.800～2.146)
淋巴结转移	1.531	0.413	6.334	0.011	0.591(0.643～0.731)
PEBP4 状态	1.423	0.526	7.431	0.006	0.239(0.085～0.668)
CD146 状态	0.921	0.437	5.551	0.013	0.398(0.171～0.927)

表 4　PEBP4 和 CD146 高表达和低表达患者经 TACE 术疗效的比较

组别	例数	完全缓解/例	部分缓解/例	无变化/例	进展/例	有效率/%	χ^2 值	P 值
PEBP4 低表达	54	0	46	5	3	85.19	7.325	0.007
PEBP4 高表达	26	0	15	7	4	57.69		
CD146 低表达	50	0	38	9	3	76.00	4.391	0.036
CD146 高表达	30	0	16	7	7	53.33		

3　讨论

PHC 的发病率及病死率呈逐渐上升趋势，且由于肝脏血供较丰富，因此病情发展较快，患者确诊时往往已失去了完整切除的手术机会。TACE 术已被证明对 PHC 患者有较好的疗效，可改善病情，延长生存时间，其技术成熟，应用越来越广泛。然而，经 TACE 术治疗的患者的临床疗效与预后差异较大，且肿瘤细胞的增殖和侵袭、细胞因子的作用以及癌细胞间的相互作用机制仍未完全清楚。PEBP4 在多种生理过程中发挥作用，如级联信号转导、细胞凋亡等。研究显示，PEBP4 在多种肿瘤组织中表达上调，PEBP4 高水平表达可引起细胞内蛋白酶体降解功能减低，影响细胞正常的凋亡过程，异常细胞汇聚，引起肿瘤发生[8]。此外，PEBP4 可影响 JNK 信号通路的正常功能，JNK 通路抑制变异细胞生长的功能变弱，导致肿瘤发生。CD146 参与体内多种生理病理过程，如细胞间的黏附聚集、细胞正常形态的维持、细胞正常生长周期的调控等。研究显示，多种肿瘤组织中 CD146 的表达水平上调，肿瘤细胞浸润、迁移的能力加强，影响预后。

研究显示，PEBP4 和 CD146 与多种肿瘤的临床病理特征具有明显相关性[9-10]。本研究显示，PEBP4 和 CD146 与 PHC 患者的临床病理特征有明显的相关性。PEBP4 高表达组与低表达组在肿瘤分化程度、浸润深度、分期、淋巴结转移方面，差异有统计学意义(P 均<0.05)；PEBP4 高表达组更多见于低分化、浸润深度更深、Ⅲ～Ⅳ期的患者，更易发生淋巴结转移。CD146 高表达组与低表达组在肿瘤分化程度、是否合并血管内癌栓、浸润深度、淋巴结转移方面，差异有统计学意义(P 均<0.05)；

CD146 高表达组更多见于低分化、合并血管内癌栓、浸润深度更深的患者，更易发生淋巴结转移。PEBP4 及 CD146 高表达的 PHC 患者的肿瘤分期较晚、分化程度更低、浸润深度更深、淋巴结转移较多，均影响预后。PEBP4 和 CD146 的表达状态与 PHC 病灶的直径无明显相关性，提示肿瘤的大小可能与肿瘤发生的时间长短有关。

研究表明，PEBP4 蛋白与肿瘤患者的生存时间有明显相关性[11]。本研究显示，PEBP4 低表达患者的生存时间较高表达患者的生存时间更长。Wang 等[12]的研究显示，肿瘤组织中 PEBP4 通过使 PI3K/Akt 信号转导通路失活，影响肿瘤细胞的侵袭和迁移，并进一步影响患者的预后。Harhouri 等[13]的研究显示，CD146 通过刺激 EPC 基因的表达，增强血管内皮生长因子受体 2（VEGFR2）表达和血管内皮生长因子（VEGF）分泌，促使新生血管生成，影响患者的生存时间。本研究显示，CD146 低表达组的 2 年生存率高于高表达组，这与 Nodomi 等[14]的结论一致。CD146 高表达患者的预后较差，其原因可能是 CD146 的作用在于调控细胞的生长、迁移等，因此当 CD146 表达上调，肿瘤细胞增殖能力加强，更易发生淋巴结转移及远处转移，患者病情发展较快，影响疗效和预后。单因素和多因素回归分析显示，PEBP4、CD146 均为 PHC 患者生存时间的独立影响因素。因此，PEBP4、CD146 均可能成为治疗 PHC 患者的靶点，通过特异性阻断两者的功能，延缓病情进展，改善预后。此外，对于 PHC 患者，可通过检测 PEBP4、CD146 蛋白的表达状态，对预后进行评估。本研究显示，PEBP4 和 CD146 低表达的患者经 TACE 术治疗的效果更好，有效率更高。

综上所述，PHC 患者的 PEBP4、CD146 蛋白表达状态与其临床病理特征及预后有明显的相关性，PEBP4、CD146 蛋白表达状态为 PHC 患者生存时间的独立影响因素。PEBP4 和 CD146 低表达的患者经 TACE 术治疗的疗效更好。

参 考 文 献

1 Qin QF, Weng J, Xu GX, et al. Combination of serum tumor markers dickkopf-1, DCP and AFP for the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma[J]. Asian Pac J Trop Med, 2017, 10(4): 409-413.

2 Xiang X, Zhong JH, Wang YY, et al. Distribution of tumor stage and initial treatment modality in patients with primary hepatocellular carcinoma[J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(7): 891-897.

3 Li H, Huang F, Fan L, et al. Phosphatidylethanolamine-binding protein 4 is associated with breast cancer metastasis through Src-mediated Akt tyrosine phosphorylation [J]. Oncogene, 2013, 33(37): 4589-4598.

4 Zheng C, Qiu Y, Zeng Q, et al. Endothelial CD146 is required for in vitro tumor-induced angiogenesis: the role of a disulfide bond in signaling and dimerization[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(11): 2163-2172.

5 Zeng Q, Li W, Lu D, et al. CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(4): 1127-1132.

6 An LP, Maeda T, Sakaue T, et al. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(4): 690-696.

7 Edeline J, Boucher E, Rolland Y, et al. Comparison of tumor response by response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) and modified RECIST in patients treated with sorafenib for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2012, 118(1): 147-156.

8 Frayne J, Mcmillen A, Love S, et al. Expression of phosphatidylethanolamine-binding protein in the male reproductive tract: immunolocalisation and expression in prepubertal and adult rat testes and epididymides [J]. Mol Reprod Dev, 2015, 49(4): 454-460.

9 Hernandez R, Sun H, England CG, et al. CD146-targeted immunoPET and NIRF imaging of hepatocellular carcinoma with a dual-labeled monoclonal antibody[J]. Theranostics, 2016, 6(11): 1918-1933.

10 He H, Liu D, Lin H, et al. Phosphatidylethanolamine binding protein 4 (PEBP4) is a secreted protein and has multiple functions [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(7): 1682-1689.

11 Wu Z, Liu B, Zheng X, et al. Role of the PEBP4 protein in the development and metastasis of gastric cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 18177-18184.

12 Wang SC, Zhou F, Zhou ZY, et al. Knockdown of PEBP4 suppresses proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 659-664.

13 Harhouri K, Kebir A, Guillet B, et al. Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia[J]. Blood, 2018, 115(18): 3843-3851.

14 Nodomi S, Umeda K, Saida S, et al. CD146 is a novel marker for highly tumorigenic cells and a potential therapeutic target in malignant rhabdoid tumor [J]. Oncogene, 2016, 35(40): 5317-5327.

（收稿日期：2018-12-03）

（本文编辑：林磊）