

# La-related 蛋白 1 在胆囊癌疾病进展中作用的研究

方德宝<sup>1</sup>, 黄大可<sup>2</sup>, 江飞<sup>3</sup>, 余宏铸<sup>3,4</sup>

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.025

**摘要** 目的 探讨 La-related 蛋白 1 (LARP1) 在胆囊癌疾病进展中的作用及其意义。方法 收集行胆囊癌根治术的胆囊癌组织标本 76 例, 胆囊腺瘤行胆囊切除术的胆囊腺瘤组织标本 27 例和肝血管瘤联合胆囊切除的胆囊组织标本 21 例。用免疫组化的方法检测石蜡标本中 LARP1 的表达水平, 统计分析 3 组组织标本中 LARP1 的表达差异以及 LARP1 与胆囊癌患者临床病理资料和预后的关系。结果 非疾病胆囊、胆囊腺瘤、胆囊癌 3 组 LARP1 表达的平均光密度分别为 0.166 (0.157, 0.192)、0.219 (0.185, 0.281)、0.294 (0.217, 0.368); 3 组间 LARP1 表达的平均光密度差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 48.076, P < 0.001$ ); 胆囊癌组与胆囊腺瘤组或非疾病胆囊组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 胆囊腺瘤组与非疾病胆囊组间差异有统计学意义 ( $Z = -3.118, P = 0.002$ )。② 进展期 (TNM II-III B) 胆囊癌组织中的 LARP1 表达水平显著高于早期 (TNM 0-I 期) 胆囊癌组织中的 LARP1 表达水平 ( $Z = -2.361, P = 0.018$ ), 并且胆囊癌组织中的 LARP1 表达水平和肿瘤的组织学分级相关 ( $Z = -2.849, P = 0.004$ )。③ 52 例胆囊癌患者获得完整随访资料。进一步的 Kaplan-Meier 分析显示胆囊癌组中 LARP1 高表达亚组的术后生存期明显短于 LARP1 低表达亚组 (Log Rank = 7.132,  $P = 0.008$ ); TNM II-III B 胆囊癌亚组的术后生存期明显短于 TNM 0-I 期胆囊癌亚组 (Log Rank = 18.972,  $P < 0.001$ )。单因素及多因素分析结果显示 LARP1 表达水平是胆囊癌患者的独立预后因素 [ $HR = 2.552, 95\% CI (1.235, 5.271), P = 0.011$ ]。结论 LARP1 在非疾病胆囊、胆囊腺瘤、胆囊癌中的表达呈进行性升高; LARP1 表达水平与胆囊癌 TNM 分期及组织分级呈正相关; LARP1 表达水平与胆囊癌患者的预后相关。

**关键词** 胆囊癌; LARP1; 肿瘤分期; 预后

**中图分类号** R 735.8

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2020)02-0282-05

2020-01-09 接收

**基金项目**: 安徽省高校自然科学基金项目(编号: KJ2017A205); 安徽医科大学校科研基金项目(编号: 2018xkj057)

**作者单位**: <sup>1</sup>安徽医科大学第四附属医院普外科, 合肥 230012

<sup>2</sup>安徽医科大学, 合肥 230022

<sup>3</sup>安徽医科大学附属阜阳医院普外科, 阜阳 236000

<sup>4</sup>安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230031

**作者简介**: 方德宝, 男, 主治医师;

余宏铸, 男, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hongzhu.620929@aliyun.com

胆囊癌是胆道系统恶性肿瘤中较常见、最具侵袭性的一种<sup>[1]</sup>。在中国, 胆囊癌发病率约占新发肿瘤病例的 1.37%, 其发病率高达 3.82/100 000<sup>[2]</sup>。因为无特异性的症状、诊断发现迟、缺乏有效的治疗方式和预后指标, 胆囊癌的预后不尽如人意。流行病学统计显示胆囊癌的总生存期约为 6 个月, 5 年生存率低于 10%<sup>[3]</sup>。因此, 研究胆囊癌的发癌机制具有重要的理论和临床意义。La-related 蛋白 1 (La-related protein 1, LARP1) 是一种 RNA 结合蛋白。LARP1 是 5' TOP mRNA 翻译的关键调控因子<sup>[4]</sup>, 并在细胞内 mTOR 活性的响应中作为磷酸化感应分子开关调控核糖体 mRNA 翻译和核糖体生物效应<sup>[5]</sup>。它通过肿瘤信号通路中 mTOR 等基因的转录后调控参与了肿瘤的进展<sup>[6-7]</sup>。但目前 LARP1 在胆囊癌中的表达情况及其临床价值尚不明确, 现通过检测 LARP1 在非疾病胆囊、胆囊腺瘤和胆囊癌组织中的表达水平; 统计分析 3 组组织标本中 LARP1 的表达差异以及 LARP1 表达水平与胆囊癌患者临床病理资料和预后的关系, 探讨 LARP1 在胆囊癌疾病发展中的作用及其临床意义。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2011 年 1 月 ~ 2016 年 11 月经安徽医科大学第一附属医院病理科确诊的胆囊癌组织标本 76 例, 胆囊腺瘤组织标本 21 例, 肝血管瘤联合胆囊切除的非疾病胆囊组织标本 27 例。采用切片机以 4  $\mu\text{m}$  厚度进行连续切片制成组织切片, 所得的组织切片均经过病理科医师诊断。电话随访胆囊癌病例至 2018 年 11 月, 获得完整随访 52 例, 随访 1 ~ 24 个月。76 例胆囊癌患者中, 男 24 例, 女 52 例; 年龄 36 ~ 88 (63.91  $\pm$  11.94) 岁; G1-G2 (高-中分化) 者 51 例, G3-G4 (差-未分化) 者 25 例; 肿瘤 TNM 分期: 0-I 期 20 例, II-III B 期 56 例。肿瘤的 TNM 分期和组织分级依据美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 胆囊癌分期<sup>[8]</sup>。本研究经医院伦理委员会的批准。

**1.2 试剂** LARP1 多克隆一抗购自英国 abcam 公司; 鼠抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司; 柠檬酸抗原修复液、磷酸盐缓冲液( phosphate buffered saline , PBS)、内源性过氧化氢酶阻断剂、二氨基联苯胺( diaminobenzidine ,DAB) 试剂盒、苏木精染色液、中性树胶购自北京中杉金桥生物有限公司。

**1.3 研究方法** 免疫组化( streptAvidin-biotincomplex SABC) 法测定每组组织标本 LARP1 的表达水平, 并以细胞质中有明显黄色/棕黄色颗粒判定为阳性细胞。在 Nikon Eclipse 8ic 显微镜下, 每张切片随机选取 5 个 400 倍不连续视野, 用 Nikon Digital camera 摄像并保存待测量图片, Image Pro Plus 6.0 图像分析系统测量所得图片中 LARP1 染色的平均光密度( optical density , OD) 值, 取平均 OD 值作为测量值。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件( SPSS Inc. , Chicago, IL, USA) 处理, 实验数据以  $M(P25, P75)$  表示, 多组间采用 Kruskal-Wallis H 检验分析, 两组间差异采用 Mann-Whitney U 检验分析。分类资料采用卡方检验分析。应用 Kaplan-Meier 法计算累积生存率, 生存率差异比较采用 Log-rank 检验。应用 Cox 回归进行单因素及多因素分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 LARP1 在非疾病胆囊组、胆囊腺瘤组和胆囊癌组中的表达** LARP1 在非疾病胆囊组、胆囊腺瘤组和胆囊癌组中表达的平均 OD 值呈进行性增高, 3 组间比较和各两组间比较的差异均有统计学意义( 图 1、表 1)。非疾病胆囊或胆囊腺瘤与胆囊癌组间的年龄差异有统计学意义( 表 1)。

**2.2 LARP1 的表达水平随胆囊癌疾病进展逐渐增高** LARP1 蛋白在 T2-T4 期胆囊癌原发灶中的表达水平明显高于 Tis-T1 期, 两组间差异有统计学意义(  $Z = -2.177, P = 0.029$ ); 在进展期胆囊癌亚组( TNM II-III 期) 中表达水平明显高于早期胆囊癌亚组( TNM 0-I 期), 两组间差异有统计学意义(  $Z = -2.361, P = 0.018$ )。另外, LARP1 在 G3-G4( 差-未分化) 亚组的表达水平高于 G1-G2( 高-中分化) 亚组, 两者差异有统计学差异(  $Z = -2.849, P = 0.004$ ), 见表 2。

**2.3 LARP1 与胆囊癌预后的关系** Kaplan-Meier analysis 提示的胆囊癌 LARP1 高表达亚组( OD 值  $\geq 0.294$ ) 的术后生存期低于低表达亚组, 差异有统计学意义( Log Rank = 7.132,  $P = 0.008$ )。LARP1 高表达亚组的术后中位生存期为 5 个月, 而 LARP1 低表

表 1 LARP1 在非疾病胆囊、胆囊腺瘤和胆囊癌 3 组组织中表达情况

变量	非疾病胆囊组	胆囊腺瘤组	胆囊癌组	$\chi^2$ 值或 Z 值	P 值
年龄(岁)					
( $\geq 60 / < 60$ )	3/18 <sup>##</sup>	6/21 <sup>#</sup>	49/27	25.004	<0.001
性别					
(男/女)	7/14	8/19	24/52	0.077	0.962
LARP1 平均 OD 值					
$M(P25, P75)$	0.166 <sup>*△</sup> (0.157, 0.192)	0.219 <sup>**</sup> (0.185, 0.281)	0.294(0.217, 0.368)	48.076	<0.001

与胆囊腺瘤组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与胆囊癌组比较: #  $P < 0.05$ ; 与胆囊癌组比较: \*\*  $P < 0.05$ ; 与胆囊癌组比较: ##  $P < 0.05$ ; 与胆囊癌组比较: △  $P < 0.05$

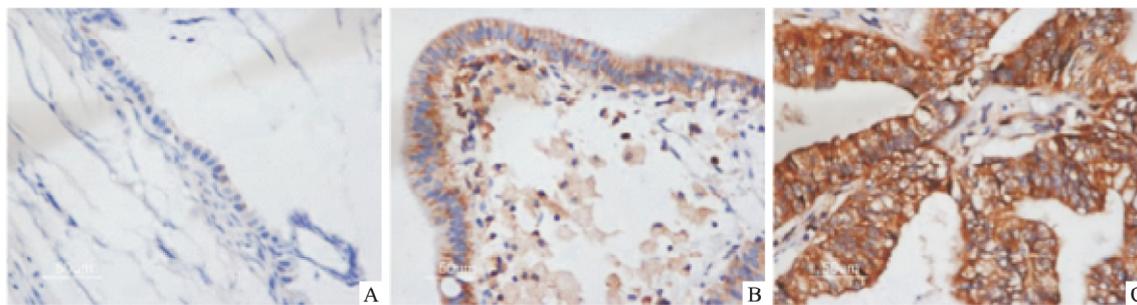


图 1 LARP1 在 3 组中的表达情况免疫组化  $\times 40$

A: 非疾病胆囊组织; B: 胆囊腺瘤组织; C: 胆囊癌组织

表2 胆囊癌各临床病理亚组中 LARP1 的表达情况

变量	n	LARP1 表达的平均 OD 值		
		M( P25 , P75)	Z	P
年龄(岁)			-0.722	0.470
<60	49	0.296(0.209, 0.368)		
≥60	27	0.291(0.215, 0.359)		
性别			-1.289	0.197
男	24	0.280(0.209, 0.379)		
女	52	0.267(0.208, 0.335)		
原发灶(T)			-2.177	0.029
Tis-T1	22	0.227(0.191, 0.336)		
T2-T4	54	0.309(0.250, 0.388)		
区域转移淋巴结(N)			-0.408	0.683
N0	52	0.275(0.207, 0.384)		
N1	24	0.303(0.232, 0.361)		
TNM 分期			-2.361	0.018
0-I	20	0.226(0.330, 0.165)		
II-III B	56	0.309(0.250, 0.385)		
组织学分级			-2.849	0.004
G1-G2(高-中分化)	51	0.270(0.201, 0.335)		
G3-G4(差-未分化)	25	0.336(0.266, 0.427)		

表3 单因素及多因素 Cox 回归模型分析影响术后生存时间的因素

变量	B	SE	Wald	相对危险度(95% CI)	P 值
单因素分析					
年龄	0.089	0.334	0.070	1.093(0.568 2.102)	0.791
性别	0.017	0.353	0.002	1.017(0.510 2.031)	0.961
原发灶(T)	2.392	0.735	10.598	10.933(2.590 46.147)	0.001
区域转移淋巴结(N)	0.833	0.342	5.922	2.300(1.176 4.500)	0.015
TNM 分期	2.506	0.742	11.416	12.259(2.865 52.459)	0.001
组织学分级	1.228	0.350	12.297	3.414(1.719 6.780)	<0.014
LARP1	0.863	0.349	6.104	2.371(1.195 4.701)	0.013
多因素分析					
TNM 分期	2.474	0.760	10.587	11.871(2.674 52.687)	0.001
组织学分级	0.841	0.353	5.695	2.319(1.162 4.628)	0.017
LARP1	0.937	0.370	6.407	2.552(1.235 5.271)	0.011

达亚组的术后中位生存期为 18 个月(图 2); 胆囊癌亚组 TNM II-III B 期的术后生存期明显短于胆囊癌亚组 TNM 0-I 期, 差异有统计学意义(Log Rank = 18.972, P < 0.001)(图 3)。Cox proportional hazard regression model 单因素分析提示 LARP1 表达上调、原发灶(T)分期、TNM 分期和组织学分级是胆囊癌术后之预后的危险因素, 进一步的多因素分析表明 LARP1 表达上调、TNM 分期和组织学分级是影响胆囊癌预后的独立因素(表 3)。

### 3 讨论

阐述胆囊癌发生的胆囊腺瘤-胆囊癌假说在形态学<sup>[9]</sup>和 DNA 测序研究<sup>[10]</sup>中都得到了验证。近期的研究<sup>[11]</sup>提示: 在年轻韩国胆囊癌患者的肿瘤形成中, 胆囊腺瘤-胆囊癌假说较化生-异常增生-胆

囊癌假说扮演着更为重要的角色。本实验基于正常胆囊-胆囊腺瘤-胆囊癌假说, 利用免疫组化的方法检测了手术病理确诊的非疾病胆囊、胆囊腺瘤和

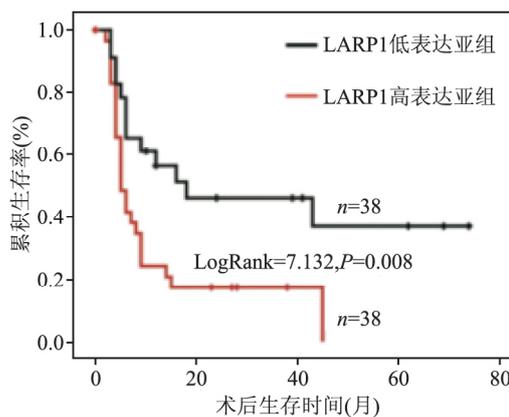


图2 胆囊癌不同 LARP1 表达水平亚组的术后生存曲线

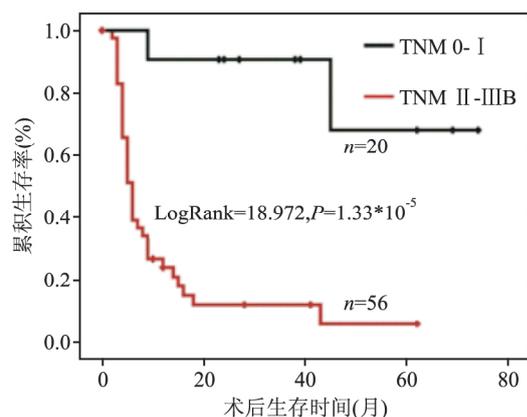


图3 胆囊癌不同 TNM 分期亚组的术后生存曲线

胆囊癌 3 组石蜡标本组织中 LARP1 的表达水平, 统计分析了 3 组 LARP1 表达水平的差异, 结果发现 LARP1 在非疾病胆囊组、胆囊腺瘤组和胆囊癌组中的表达水平呈进行性增高, 差异有统计学意义。这提示 LARP1 可能参与了胆囊癌的发生。本实验中胆囊癌组与非疾病胆囊组或胆囊腺瘤组组间的年龄差异有统计学意义, 提示年龄可能是 1 个胆囊癌发病的危险因素。1 份近期的大样本统计也提示胆囊癌的发病率随年龄的增长而增高, 其中 40.5% 的患者年龄  $\geq 75$  岁<sup>[12]</sup>。

T 分期<sup>[13-14]</sup>和组织学分级<sup>[15]</sup>是胆囊癌的两个重要预后因素, 本实验对不同 TNM 分期和组织学分级亚组的胆囊癌组织中 LARP1 表达水平进行了检测和统计分析。结果发现: LARP1 在胆囊癌亚组 TNM II-III B 期中表达水平明显高于胆囊癌亚组 TNM 0-I 期 ( $Z = -2.361, P = 0.018$ ); 同样在 G3-G4 亚组中的表达水平高于 G1-G2 亚组 ( $Z = -2.849, P = 0.004$ )。这提示 LARP1 可能参与了胆囊癌的进展。对非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的研究发现: 与正常对照细胞相比, NSCLC 细胞中 LARP1 的 mRNA 水平增加; 敲除 LARP1 可抑制 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭; 而且非小细胞肺癌组织中 LARP1 的过表达与肿瘤进展和不良生存相关。

在直肠癌<sup>[16]</sup>中, LARP1 表达升高与肿瘤的 TNM 分期和分化程度相关, 敲除 LARP1 可抑制 CRC 细胞的增殖; 多因素分析提示 LARP1 是影响直肠癌总生存率的独立预后因素。为了解 LARP1 表达水平与胆囊癌患者术后生存时间之间的关系, 课题组根据 LARP1 表达水平的不同将患者分为高表达亚组和低表达亚组, 并以此制作了 Kaplan-Meier

生存曲线。结果表明 LARP1 表达越高的患者术后生存时间越短, 而且 2 组间差异有统计学意义 ( $\text{Log Rank} = 7.132, P = 0.008$ )。进一步的单因素和多变量 COX 回归统计分析显示 LARP1、TNM 分期和组织学分级是影响胆囊癌术后之生存时间的独立危险因素。

综上所述, LARP1 作为一种潜在的生物标志物, 为胆囊癌的诊断和预后分析提供了新的手段, 为胆囊癌的治疗提供了新的见解和研究思路, 但如何有效调控 LARP1 细胞内表达的具体机制, 尚需要进一步的探索。

### 参考文献

- [1] Sharma A, Sharma K L, Gupta A, et al. Gallbladder cancer epidemiology, pathogenesis and molecular genetics: recent update [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(22): 3978-98.
- [2] 虞吉妤, 张敏, 郑荣寿, 等. 中国 2014 年胆囊癌发病与死亡情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(12): 894-9.
- [3] Hundal R, Shaffer E A. Gallbladder cancer: epidemiology and outcome [J]. Clin Epidemiol, 2014, 6: 99-109.
- [4] Tcherkezian J, Cargnello M, Romeo Y, et al. Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5' TOP mRNA translation [J]. Genes Dev, 2014, 28(4): 357-71.
- [5] Hong S, Freeberg M A, Han T, et al. LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs [J]. Elife, 2017, 6: e25237.
- [6] Mura M, Hopkins T G, Michael T, et al. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression [J]. Oncogene, 2015, 34(39): 5025-36.
- [7] Hopkins T G, Mura M, Al-Ashtal H A, et al. The RNA-binding protein LARP1 is a post-transcriptional regulator of survival and tumorigenesis in ovarian cancer [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(3): 1227-46.
- [8] Chun Y S, Pawlik T M, Vauthey J N. 8th edition of the AJCC cancer staging manual: pancreas and hepatobiliary cancers [J]. Ann Surg Oncol, 2018, 25(4): 845-7.
- [9] Nakajo S, Yamamoto M, Tahara E. Morphometrical analysis of gall-bladder adenoma and adenocarcinoma with reference to histogenesis and adenoma-carcinoma sequence [J]. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1990, 417(1): 49-56.
- [10] Yanagisawa N, Mikami T, Saegusa M, et al. More frequent beta-catenin exon 3 mutations in gallbladder adenomas than in carcinomas indicate different lineages [J]. Cancer Res, 2001, 61(1): 19-22.
- [11] Do S I, Lee H W, Sohn J H, et al. Clinicopathologic characteristics of young patients with gallbladder cancer [J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(3): 189-93.
- [12] Jaruvongvanich V, Yang J D, Peerapattit T, et al. The incidence rates and survival of gallbladder cancer in the USA [J]. Eur

- J Cancer Prev, 2019, 28(1): 1–9.
- [13] Mazer L M, Losada H F, Chaudhry R M, et al. Tumor characteristics and survival analysis of incidental versus suspected gallbladder carcinoma[J]. *J Gastrointest Surg*, 2012, 16(7): 1311–7.
- [14] Okada K, Kijima H, Imaizumi T, et al. Wall-invasion pattern correlates with survival of patients with gallbladder adenocarcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(2): 685–91.
- [15] D'Hondt M, Lapointe R, Benamira Z, et al. Carcinoma of the gallbladder: patterns of presentation, prognostic factors and survival rate. An 11-year single centre experience[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2013, 39(6): 548–53.
- [16] Ye L, Lin S T, Mi Y S, et al. Overexpression of LARP1 predicts poor prognosis of colorectal cancer and is expected to be a potential therapeutic target[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 14585–94.

## The role of La-related protein 1 in the progression of gallbladder cancer

Fang Debao<sup>1</sup>, Huang Dake<sup>2</sup>, Jiang Fei<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of General Surgery, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230012;

<sup>2</sup>Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>3</sup>Dept of General Surgery, Fuyang Affiliated Hospital of

Anhui Medical University, Fuyang 236000; <sup>4</sup>Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230031)

**Abstract Objective** To investigate the role and significance of La-related protein 1 (LARP1) in gallbladder cancer progression. **Methods** We selected 76 cases of gallbladder cancer tissue specimens underwent radical cholecystectomy, 27 cases of gallbladder adenoma tissue specimens underwent cholecystectomy, and 21 cases of gallbladder tissue specimens underwent hepatectomy and cholecystectomy for hepatic hemangioma. The expression level of LARP1 in paraffin samples was detected by immunohistochemistry, and the difference of LARP1 expression in tissue samples of three groups was statistically analyzed, as well as the relationship between LARP1 and clinicopathological data and prognosis of patients with gallbladder cancer. **Results** ① The average optical density of LARP1 expression in three groups of non-disease gallbladder, gallbladder adenoma and gallbladder cancer were 0.166 (0.157–0.192), 0.219 (0.185–0.281) and 0.294 (0.217–0.368), respectively. There was significant difference in average optical density of LARP1 expression among three groups ( $\chi^2 = 48.076, P \leq 0.001$ ). There were statistically significant differences between the gallbladder cancer group and the gallbladder adenoma group or the gallbladder non-disease group ( $P < 0.001$ ), and there was statistically significant difference between the gallbladder adenoma group and the gallbladder non-disease group ( $Z = -3.118, P = 0.002$ ). ② The expression level of LARP1 in advanced (TNM II–III B) gallbladder cancer tissues was significantly higher than that in early (TNM 0–I) gallbladder cancer tissues ( $Z = -2.361, P = 0.018$ ), and the expression level of LARP1 in gallbladder cancer tissues was correlated with the histological grade of the tumor ( $Z = -2.849, P = 0.004$ ). ③ The complete follow-up data were obtained for 52 patients with gallbladder cancer. Further Kaplan-Meier analysis showed that the post-operative survival period of the LARP1 high-expression subgroup in the gallbladder cancer group was significantly shorter than that of the LARP1 low-expression subgroup (Log Rank = 7.132,  $P = 0.008$ ). The survival time of progress (TNM stage II–III B) gallbladder cancer subgroup was obviously shorter than the early (TNM stage 0–I) gallbladder subgroup (Log Rank = 18.972,  $P < 0.001$ ). Furthermore, univariate and multivariate analyses showed that LARP1 expression level was an independent prognostic factor for patients with gallbladder cancer [ $HR = 2.552, 95\% CI(1.235–5.271), P = 0.011$ ]. **Conclusion** The expression of LARP1 in non-disease gallbladder, gallbladder adenoma and gallbladder cancer shows a progressive increase. The expression level of LARP1 is positively correlated with gallbladder cancer TNM stage and tissue grade. The expression level of LARP1 is correlated with the prognosis of gallbladder cancer patients.

**Key words** gallbladder cancer; LARP1; tumor stage; prognosis