

胆管癌中 GPR120 蛋白的表达及其临床意义

孟府陶, 黄 强, 刘臣海, 黄 玫

摘要 目的 检测 GPR120 在胆管癌中的表达,并探讨其在胆管癌发生进展中的作用和意义。方法 通过免疫组织化学法分别检测 60 例经病理确诊的胆管癌患者的石蜡切片以及其中 20 例可获得的癌旁正常胆管组织石蜡切片中 GPR120 蛋白的表达情况,并研究其与胆管癌临床病理因素及生存时间之间的关系。结果 免疫组化结果表明 GPR120 蛋白在胆管癌中的阳性表达率(68.3%)比癌旁正常胆管组织(25%)高,差异有统计学意义($P < 0.05$);GPR120 的高表达程度与胆管癌的分化程度、TNM 分期、神经浸润以及淋巴结转移有关($P < 0.05$);GPR120 的阳性表达与阴性表达患者的中位生存期分别为 27 个月和 40 个月,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 GPR120 的表达失调可能与胆管癌的发生进展密切相关,有望成为胆管癌早期诊断的一个有效标志物及临床治疗药物研究的新靶点。

关键词 胆管癌; GPR120; 免疫组化; 预后

中图分类号 R 735.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1076-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.018

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是起源于胆道树上不同位置的上皮细胞恶性肿瘤,是消化道恶性疾病中侵袭性极高、预后极差的肿瘤之一^[1]。由于常规放化疗对改善长期生存作用有限,根治性手术目前仍是 CCA 患者获得长期生存的唯一机会。不幸的是,由于严重的侵袭转移,许多患者在被诊断为 CCA 时已错过根治性手术的最佳时机^[1-3]。所以,为了提高 CCA 患者的早期诊断,必须更深入的研究 CCA 的进展机制。G 蛋白偶联受体(G-protein couple receptors, GPCRs)表达不受控制和 GPCRs 信号传导失调是肿瘤的生物特性之一^[4]。GPR120 是体内重要的 G 蛋白偶联受体之一,近年

来发现 GPR120 在很多恶性肿瘤中异常表达,且与肿瘤的发生、发展及侵袭转移有关^[5]。然而, GPR120 在 CCA 中的表达以及在 CCA 进展中的作用国内外鲜有研究。该研究主要通过免疫组织化学法检测 GPR120 在人 CCA 中的表达情况,并分析其在 CCA 进展中及生存预后的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究选取安徽医科大学附属安徽省立医院 2010 年 1 月~2015 年 1 月经病理诊断确诊的 60 例 CCA 患者的肿瘤组织石蜡切片作为实验组,选择其中 20 例可获得癌旁组织的石蜡切片作为对照组。所有患者接受了根治性手术切除,病理诊断为 CCA。手术前均未接受化疗或放射治疗。石蜡包埋的组织样本,包括肿瘤组织标本及其相应的癌旁组织标本,均从病理科获得,超过肿瘤边缘 2 cm 的 CCA 组织被定义为癌旁组织。回顾性病史获得的临床病理资料包括年龄、性别、肿瘤位置、组织学分级、淋巴结转移(LNM)、神经周围浸润(PNI)、肿瘤 TNM 分期。其中男 39 例,女 21 例;年龄 36~80 岁,中位年龄在 66 岁。上段胆管癌(肝门部胆管癌)24 例,中下段胆管癌 36 例。经病理检查证实属高分化腺癌 16 例,中分化腺癌 32 例,低分化腺癌 12 例,手术中探查及切除标本术后病理切片证实无癌周及远处淋巴结转移者 41 例,已发生转移者 19 例,转移的部位为淋巴结、肝脏、胰腺、大网膜、肝十二指肠韧带。有神经浸润的 23 例,无神经浸润的 37 例。TNM 分期依照 2010 年美国癌症联合委员会(AJCC)制定的第七版 TNM 分期标准, T1-T2 期 37 例, T3-T4 期 23 例。

1.2 试剂与方法

1.2.1 主要试剂 GPR120 兔抗人多克隆抗体(稀释比 1:100)购自美国 Abcam 生物公司; SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 实验方法 采用免疫组化 SP 法,以 PBS 代替一抗作阴性对照。操作步骤:①石蜡包埋 4 μ m

2018-01-09 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MKL70)

作者单位:安徽医科大学附属安徽省立医院普通外科,肝胆胰安徽省重点实验室,合肥 230001

作者简介:孟府陶,男,硕士研究生;

黄 强,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: 963feixia@163.com

连续切片后置于载玻片上,在 60 °C 烤箱中加热 20 min 脱蜡,经二甲苯脱水,分级浓度乙醇(分别为 100%、95%、75%)水化,再经 PBS 溶液漂洗;② 切片放入柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中,同容器一起放入高压锅中加热煮沸,盖上压力气阀至喷气后持续 5 min;③ 通过 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性,阻断时间为 10 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;④ 将 1:100 浓度稀释的 GPR120 兔多克隆抗体加入后,4 °C 孵育过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;⑤ 显微镜控制下进行 DAB 显色;⑥ 最后,使用苏木精复染,酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片,镜检并照相记录。此外,对于阴性对照组,在相同条件下用 PBS 替代主要抗体。

1.3 免疫组织化学结果分析 结果判定: GPR120 蛋白主要定位于胆管癌细胞膜和细胞质中,在胆管癌细胞核周围出现弥漫性棕黄色或黄色,而在肿瘤间质细胞中染色相对较少。评价免疫组化结果的方法是按阳性细胞百分比评分:随机选择 5 个 400 倍视野,每个视野计数 100 个细胞,高于 60% 细胞阳性计 3 分,31%~60% 计 2 分,11%~30% 计 1 分,低于 10% 计 0 分;按染色强弱等级评分:未着色计 0 分,淡黄色计 1 分,黄色计 2 分,棕黄色计 3 分,由同一位病理科医师评价统计完成,每张切片 2 项得分总计 >3 分即认定为 GPR120 阳性表达^[6]。

1.4 随访 以电话随访的形式对 60 例 CCA 患者均进行了随访,随访终止时间为发生事件或患者因疾病死亡或随访截止日,其中失访 7 例,随访率为 88.3%。使用 Kaplan-Meier 法绘制患者生存曲线,分析 GPR120 在胆管癌组织中的表达与预后的关系。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。分类变量通过 χ^2 检验或精确概率算法检验;通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,两组比较通过 Log-Rank 检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPR120 蛋白在胆管癌及癌旁正常胆管组织中的表达 GPR120 主要定位于胆管癌细胞膜和细胞质中,阳性表达定义为胞质内有黄色或棕黄色颗粒,而间质细胞无染色情况。60 例胆管癌组织中,GPR120 阳性表达率为 68.3% (41/60); 20 例癌旁正常胆管组织中,GPR120 阳性表达率为 25% (5/20),见图 1。经过统计分析表明,正常胆管组织中的阳性表达比例明显低于 GPR120 在胆管癌中的阳

性表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 胆管癌组织中 GPR120 表达与临床病理特征的关系 GPR120 的表达与 CCA 的病理分化等级、神经是否浸润、淋巴有无转移、TNM 分期有关($P < 0.05$)。在病理中低分化组(34/44)中表达明显高于病理高分化组(7/16)、神经浸润组(20/23)中表达明显高于无神经浸润组(21/37),淋巴结转移组(17/19)中表达亦明显高于无转移组(24/41),差异有统计学意义($P < 0.05$)。但与患者的年龄、性别、肿瘤所处位置并无显著相关性。见表 2。

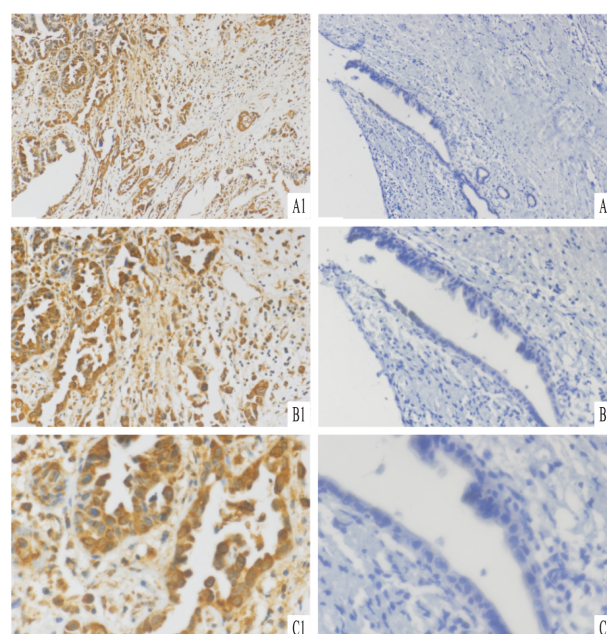


图 1 胆管癌组织与癌旁正常胆管组织中 GPR120 的表达

A: 胆管癌组织; B: 癌旁正常胆管组织; 1: SP $\times 100$; 2: SP $\times 200$; 3: SP $\times 400$

表 1 GPR120 蛋白在胆管癌组织和癌旁正常胆管组织中的表达(n)

组别	n	GPR120 阳性	GPR120 阴性	χ^2 值	P 值
		表达数	表达数		
胆管癌组织	60	41	19	11.526	0.001
癌旁正常胆管组织	20	5	19		

2.3 GPR120 的表达与胆管癌患者生存期的关系

60 例 CCA 患者中 GPR120 阳性表达者 41 例,阴性表达者 19 例,失访 7 例患者(其中 4 例失访者为 GPR120 阳性表达者,3 例为 GPR120 阴性表达者)。Kaplan-Meier 生存分析显示阳性表达者的中位生存期为 27 个月,阴性表达者的中位生存期 40 个月,经 Log-Rank 检验显示,GPR120 蛋白表达阳性患者组与阴性患者组生存率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

表2 胆管癌组织中 GPR120 蛋白的表达与临床病理关系(n)

临床病理特征	n	GPR120 阳性 表达数	GPR120 阴性 表达数	χ^2 值	P 值
性别					
男	39	27	12	0.041	0.839
女	21	14	7		
年龄(岁)					
≤60	18	12	6	0.033	0.856
>60	42	29	13		
肿瘤位置					
肝门部	24	15	9	0.629	0.428
远端胆总管	36	26	10		
分化程度					
高	16	7	9	6.093	0.014
中低	44	34	10		
TNM 分期					
I ~ II	37	21	16	4.265	0.019
III ~ IV	23	20	3		
神经浸润					
有	23	20	3	5.539	0.014
无	37	21	16		
淋巴结转移					
有	19	17	2	5.742	0.017
无	41	24	17		

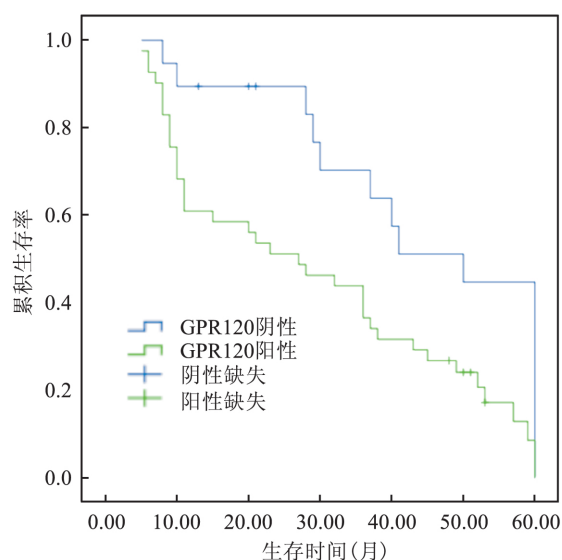


图2 胆管癌中 GPR120 阳性患者、阴性患者的生存曲线

3 讨论

GPR120 是近年来发现的一个具有重要功能的 G 蛋白偶联受体,属于进化保守的视紫红质家族受体,目前的研究^[5]表明,饱和与不饱和的长链游离脂肪酸(LCFAs)通过激活 GPR120 受体参与调节一系列的代谢过程,如激素分泌、细胞增殖及脂质生成等。GPR120 在脂质代谢平衡中起到了至关重要的

作用。近年来由于对 GPR120 研究热度和深度的增加,越来越多的文献报道表明,GPR120 也在肿瘤发生、迁移和转移发生中发挥重要作用^[4]。在消化系统肿瘤中,研究^[6-7]显示 GPR120 在结直肠癌和胰腺癌细胞中表达显著增高,并对肿瘤细胞的增殖、迁移等能力起着明显的上调效应作用。研究^[6]表明,GPR120 作为一个人类结直肠癌中的肿瘤促进受体,在被配体刺激后,GPR120 作为 PI3K/Akt-NF- κ B 信号通路传导过程中的重要环节通过介导调节促血管生成因子白介素-8(IL-8)、血管内皮生长因子(VEGF)和环氧合酶-2(COX-2)衍生的前列腺素 E2(PGE2),促进血管生成。同时也发现 GPR120 的激活促进结直肠癌细胞(CRC)迁移和诱导上皮间充质化(EMT)。这一发现提供了 GPR120 在人体中发挥作用机制的新思路,将最近的脂质组学与癌症的发展联系起来^[6]。但是,GPR120 在黑色素瘤中有着不同的作用效应。研究^[8]表明通过具有皮肤致癌作用的肿瘤促进剂 12-O-十四酰基糠醇-13-乙酸酯(TPA)长期刺激,在黑素瘤细胞中,GPR120 负性调节可以促进黑素瘤细胞迁移侵袭活性增强。以上研究说明 GPR120 在不同肿瘤中发挥的作用似乎各不相同。

本团队在 GPR120 研究的现有基础之上,初步探讨分析了 GPR120 在 CCA 组织以及癌旁正常胆管组织中的表达情况,是否存在差异性表达,是否与临床病理相关特征具有密切相关性。研究结果显示 GPR120 在 CCA 中的表达与癌旁正常胆管黏膜上皮组织有差异,同样与胆管癌组织的分化程度、TNM 分期、淋巴转移、神经侵犯等病理相关因素有密切关系,提示 GPR120 蛋白可能在 CCA 的发生发展和生物学行为中起到正性上调作用。另外,本研究显示 GPR120 阳性表达患者的中位生存期为 27 个月,阴性表达患者的中位生存期为 40 个月,Kaplan-Meier 生存曲线及 Log-Rank 检验提示两组间中位生存期差异有统计学意义,亦说明 GPR120 蛋白可能具有作为胆管癌预后独立因素的潜力。必须承认的是,本研究是一个典型的单一回顾性研究,且研究样本相对较小,是从较浅层面上检测观察 GPR120 在 CCA 中的表达状态高于正常胆管组织,提示 GPR120 蛋白的过表达可能与 CCA 的恶性程度有关,但其促进胆管癌细胞侵袭和转移的潜在机制目前尚不清楚,需扩大样本量进一步证实,并在细胞学、动物实验水平进行验证,并对其具体作用机制进行探索。

总之,CCA作为一种恶性程度高、侵袭转移能力强的消化道肿瘤,常常发现时已是晚期,生活质量较差,且生存时间短,而作为一个新兴发现的重要G蛋白偶联受体,GPR120在CCA发生发展中可能起到促癌作用,并有希望成为胆管癌早期诊断的一个生物标志物和临床药物研发治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Valle J W, Borbath I, Khan S A, et al. Biliary Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol* 2016 27 (Suppl 5): v28 - v37.
- [2] Mansour J C, Aloia T A, Crane C H, et al. Hilar cholangiocarcinoma: expert consensus statement [J]. *HPB (Oxford)*, 2015, 17 (8): 691 - 9.
- [3] Weber S M, Ribero D, O'Reilly E M, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: expert consensus statement [J]. *HPB (Oxford)*, 2015, 17(8): 669 - 80.
- [4] Wu Q, Wang H, Zhao X, et al. Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumorpromoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma [J]. *Oncogene*, 2013, 32(49): 5541 - 50.
- [5] Houthuijzen J M. For better or worse: FFAR1 and FFAR4 signaling in cancer and diabetes [J]. *Mol Pharmacol* 2016 90(6): 738 - 43.
- [6] 吴年付, 汤志刚, 陈炯, 等. 胰腺癌中 MMP-26mRNA 和蛋白的表达及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(7): 981 - 3.
- [7] Fukushima K, Yamasaki E, Ishii S, et al. Different roles of GPR120 and GPR40 in the acquisition of malignant properties in pancreatic cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, 465(3): 512 - 5.
- [8] Fukushima K, Takahashi K, Fukushima N, et al. Different effects of GPR120 and GPR40 on cellular functions stimulated by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in melanoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 475(1): 25 - 30.

Expressions of GPR120 protein in cholangiocarcinoma and its clinical significance

Meng Futao, Huang Qiang, Liu Chenhai, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Hepatobiliary and Pancreas in Anhui Province, Hefei 230001)

Abstract Objective To detect the expression level of GPR120 in cholangiocarcinoma and discuss its role in the progression of cholangiocarcinoma. **Methods** The expression level of GPR120 was detected by immunohistochemistry in paraffin sections of 60 cases who were pathologically confirmed cholangiocarcinoma and 20 cases of paracancerous normal bile ducts, and studied its relationship with clinicopathological factors and survival time of cholangiocarcinoma. **Results** Immunohistochemistry results showed that the positive expression level of GPR120 protein in cholangiocarcinoma was significantly higher than that in normal bile duct tissue (25%), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The high level expression of GPR120 was correlated with the degree of differentiation of cholangiocarcinoma, TNM stage, nerve infiltration and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The median survival time of GPR120 positive and negative expression was 27 months and 40 months, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The dysregulation of GPR120 may be closely related to the occurrence and progression of cholangiocarcinoma, so it is hopeful to become a new target of early diagnosis of cholangiocarcinoma and a new target of clinical therapeutic drug research.

Key words cholangiocarcinoma; GPR120; immunohistochemistry; prognosis