

◇临床医学研究◇

Kindlin-2在肝细胞癌中的表达及其与肿瘤血管生成的关系

刘冬 葛勇胜 许戈良 李建生 马金良 荚卫东 余继海 刘文斌

摘要 目的 探讨黏着斑蛋白(Kindlin-2)在肝细胞癌(简称肝癌)中表达的临床意义及其与肝癌血管生成的关系。方法

采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测12例原发性肝癌及癌旁配对组织和6例正常肝组织中Kindlin-2基因的表达水平。采用免疫组化方法检测69例原发性肝癌患者癌组织及癌旁组织中Kindlin-2蛋白的表达情况,以及肝癌组织中血管内皮生长因子(VEGF)和CD34的表达量。结果

Kindlin-2在肝癌组织中的表达明显高于癌旁及正常肝组织;Kindlin-2的表达与肿瘤直径($P=0.010$)、门静脉侵犯($P=0.025$)相关;肝癌组织中Kindlin-2表达与VEGF表达呈正相关($r=0.401$, $P=0.001$),且Kindlin-2阳性者微血管密度(MVD)值高于阴性者,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 肝癌组织中异常表达增高的Kindlin-2与肿瘤微血管生成正相关,提示Kindlin-2可能成为肝癌抗血管治疗的潜在靶点。

关键词 肝癌; Kindlin-2; 血管内皮生长因子; 微血管密度
中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0206-04

肝细胞癌(简称肝癌)是我国常见的恶性肿瘤,其病死率高,疗效差,频繁的复发与转移是影响肝癌患者预后的首要因素^[1]。黏着斑蛋白(Kindlin-2)广泛参与整合素的活化、细胞增殖和迁移的调控^[2],研究多种人类肿瘤发现Kindlin-2与肿瘤的侵袭、耐药、新生血管关系密切^[3-5]。然而,国内外关于Kindlin-2在肝癌组织中的表达及其与肝癌新生血管的关系鲜有报道。该研究通过检测肝癌及癌旁组织中Kindlin-2的表达及其与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、微血管密度(microvascular density, MVD)的关系,探讨Kindlin-2在肝癌血管生成中的潜在作用。

2013-08-06 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81272398);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH147);安徽省“115”产业创新团队项目

作者单位:安徽医科大学附属省立医院肝脏外科,肝胆胰外科安徽省重点实验室 合肥 230001

作者简介:刘冬 男,硕士研究生;
葛勇胜 男,博士,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任
作者 E-mail: ahslyygys@163.com

1 材料与方法

1.1 样本来源 收集2006年1月~2010年12月在安徽医科大学附属省立医院肝脏外科行手术切除且经病理证实为肝细胞癌的标本69例,其中男56例,女13例,年龄22~74(50.7 ± 1.6)岁;肿瘤直径 ≤ 5 cm有27例, > 5 cm有42例;Edmondson标准分级:Ⅰ~Ⅱ级36例,Ⅲ~Ⅳ级33例;无门静脉侵犯59例,有门静脉侵犯10例。所选择的患者术前均未行介入、化疗等辅助治疗。另外18例新鲜标本取自2012年6月~12月在安徽医科大学附属省立医院肝脏外科手术切除的原发性肝癌、癌旁组织及肝血管瘤周围的正常肝组织。在癌组织与正常组织交界线2 cm内取样作为肝癌组织,交界线2 cm以外取样为癌旁组织。新鲜标本均于切除后20 min内置于含RNA保存液的冻存管中,然后迅速转入-80℃超低温冰箱中冻存备用。所有肝癌组织均经术后病理证实为肝细胞癌,且该患者术前未接受任何形式的抗肿瘤治疗。

1.2 主要试剂 兔抗人Kindlin-2多克隆抗体购自美国Abcam公司;鼠抗人VEGF单克隆抗体、鼠抗人CD34单克隆抗体、SP免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自Thermo公司;Kindlin-2基因PCR引物由上海生工公司代为设计与合成;其余实验试剂及仪器由肝胆胰外科安徽省重点实验室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化SP法 4%多聚甲醛溶液固定的标本行常规石蜡包埋,制成2 μm厚切片。切片经二甲苯脱蜡水化后,柠檬酸高温修复抗原,分别加入兔抗人Kindlin-2多克隆抗体(1:100)、鼠抗人VEGF单克隆抗体(1:100)、鼠抗人CD34单克隆抗体(1:150)工作液,4℃孵育过夜;通用型二抗室温孵育15 min,DAB显色;随后苏木精复染,酒精梯度脱水、中性树胶封片。用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3.2 RT-PCR 检测Kindlin-2 mRNA在肝癌、癌旁组织以及正常肝组织中的表达情况:取50 mg待

测组织,参照 TRIzol 说明书提取组织 RNA,取 2 μ g RNA 进行 RT 及 PCR 反应。PCR 反应扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 34 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在凝胶成像系统中拍照分析。目的基因条带灰度值与管家基因(GAPDH) 灰度值的比值用于统计学分析。Kindlin-2 上游引物序列: 5'-AAAGAAACCCAGAGATCCAACA-3', 下游引物序列: 5'-CCTTCACATCTT-GTTCCATGAG-3', 扩增产物大小 374 bp; GAPDH 上游引物序列: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTG-3', 下游引物序列: 5'-GTCCACCACCCCTGTTGCTG-TAG-3', 扩增产物大小 496 bp。

1.4 结果判定 免疫组化结果的判读由两名不知患者临床资料的病理医师双盲读片。在排除非特异性染色的前提下, Kindlin-2、VEGF 在细胞质中出现明显黄色、棕黄色、棕褐色为阳性。根据染色强度和阳性细胞数分别评分, 两者评分乘积 ≥ 2 分确定为阳性。染色强度: 按切片中细胞染色的深浅, 无着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 阳性细胞数: 每例随机观察 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算 500 个细胞中阳性细胞所占百分比, 阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为 0 分, 6% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分。按 Weidner et al^[6] 报道的方法计数 MVD, 将每一染成棕黄色、可与周围组织区分开来的内皮细胞或内皮细胞群作为 1 个单一的微血管。管腔面积大于 8 个红细胞直径或带有较厚肌层的微血管均不计数。先在低倍镜(40 \times)下选取高血管密度区, 然后在高倍镜(400 \times)下计数 3 个视野内被 CD34 染成棕黄色的血管数, 取其平均值作为该病例的 MVD 值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验、 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法进行检验分析; 相关分析采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 Kindlin-2 在不同肝组织中的表达 RT-PCR 结果分析显示 Kindlin-2 mRNA 在肝癌组织中的表达水平为 0.93 ± 0.12 , 而相应的癌旁及正常肝组织的表达水平分别为 0.18 ± 0.10 、 0.13 ± 0.06 , 表明 Kindlin-2 基因在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁及正常肝组织, 差异有统计学意义($F = 233.87$, $P < 0.01$)。见图 1。免疫组化结果显示, Kindlin-2 阳性表达呈黄色或棕黄色, 定位于细胞质, 见图 2。

Kindlin-2 在肝癌组织中阳性表达率为 69.6% (48/69), 而在癌旁组织中的阳性表达率为 17.4% (12/69), 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

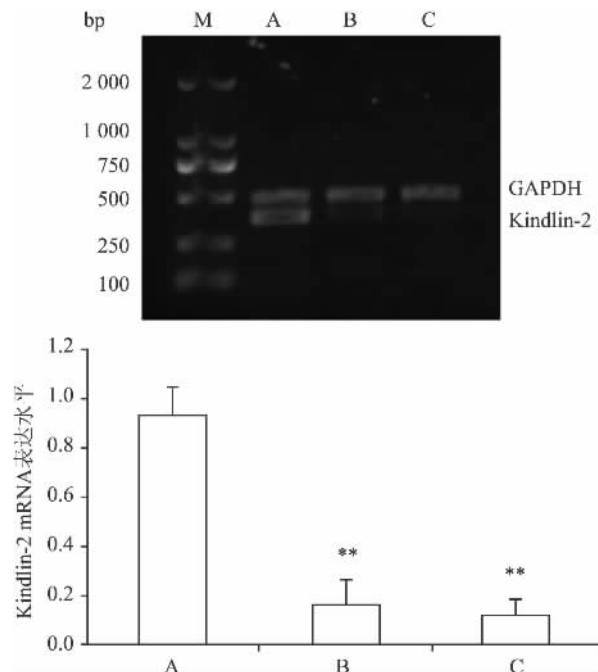


图 1 RT-PCR 法检测 Kindlin-2 mRNA 在不同肝组织中的表达

M: Marker; A: 肝癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常肝组织; 与肝癌组织比较: ** $P < 0.01$

2.2 Kindlin-2 在肝癌组织中的表达及与临床病理特征的关系 Kindlin-2 蛋白的表达与临床病理特征的关系见表 1, 统计学分析提示在肿瘤直径 > 5 cm、有门静脉侵犯组中 Kindlin-2 阳性率高于肿瘤直径 ≤ 5 cm、无门静脉侵犯组($P = 0.01$, $P = 0.025$)。而 Kindlin-2 的表达与性别、年龄、肿瘤数目、Edmondson 分级、血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP) 水平等临床病理特征未见明显的相关性。

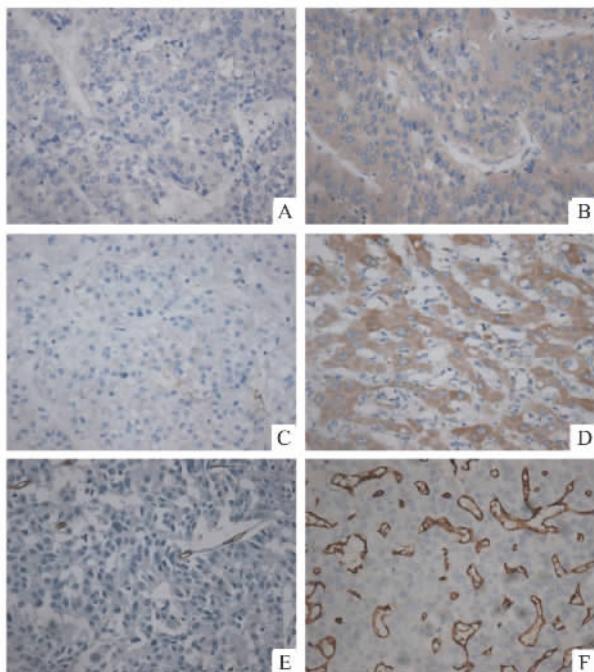
2.3 肝癌组织中 Kindlin-2 的表达与血管生成的关系 肝癌组织中 VEGF 与 CD34 的免疫组化结果显示, VEGF 染色呈棕黄色或棕褐色, 定位于细胞质, 阳性率为 66.7% (46/69); CD34 在肝癌组织中均有阳性表达, 呈棕褐色, 定位于血管内皮细胞, 见图 2。经 Pearson 相关分析检验, 肝癌中 Kindlin-2 表达与 VEGF 表达呈正相关($r = 0.401$, $P = 0.001$), 见表 2。Kindlin-2 和 VEGF 阳性者 MVD 值均高于阴性者, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 3。

3 讨论

Kindlin-2 是由 Wick et al^[7] 在细胞周期调控的研究中发现的, 目前已明确其基因定位于染色体

表 1 Kindlin-2 的表达与临床病理参数之间的关系(n)

临床指标	n	Kindlin-2		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
性别					
男	56	16	40	0.487	0.485
女	13	5	8		
年龄(岁)					
≤45	33	12	21	1.050	0.305
>45	36	9	27		
肿瘤直径(cm)					
≤5	27	13	14	6.574	0.010
>5	42	8	34		
肿瘤数量					
单个	40	11	29	0.387	0.534
多发	29	10	19		
Edmonson 分级					
I ~ II	36	12	24	0.299	0.585
III ~ IV	33	9	24		
门静脉侵犯					
无	59	21	38	5.042	0.025
有	10	0	10		
AFP (ng/ml)					
≤400	31	8	23	0.570	0.450
>400	38	13	25		

图 2 免疫组化染色检测 Kindlin-2、VEGF、CD34 在肝癌组织中的表达 SP $\times 400$

A: Kindlin-2 蛋白阴性表达; B: Kindlin-2 蛋白阳性表达; C: VEGF 蛋白阴性表达; D: VEGF 蛋白阳性表达; E: 低 MVD; F: 高 MVD

14q22.1。Kindlin-2 通常由 F1、F2、F3 3 个亚结构域组成,在核心序列前通常存在 F0 亚结构域。Kindlin-2 的蛋白序列含恒定区和可变区,在恒定区具有

表 2 Kindlin-2 与 VEGF 在肝癌组织中表达的相关性

Kindlin-2	VEGF		r 值	P 值
	+	-		
+	38	10	0.401	0.001
-	8	13		

表 3 Kindlin-2、VEGF 与 MVD 的关系($\bar{x} \pm s$)

指标	n	MVD	t 值	P 值
Kindlin-2				
阳性	48	34.46 ± 3.35	11.848	<0.001
VEGF				
阳性	46	34.24 ± 2.30	26.973	<0.001
阴性	23	19.09 ± 1.98		

特征性的结构是 FERM 结构域,这种结构多见于细胞骨架蛋白^[8]。Gozgit et al^[3]通过检测 Kindlin-2 在不同侵袭力乳腺癌细胞株 (MCF-7、TMX2-28、MAD-MB-231) 中的表达及基底膜完整性测定发现,高侵袭性乳腺癌细胞株 TMX2-28 中 Kindlin-2 表达较低侵袭性乳腺癌细胞株 MCF-7 表达升高 17 倍。Pluskota et al^[5]研究发现,Kindlin-2 基因敲除小鼠对比野生型小鼠,其体内肿瘤新生血管更不成熟,通透性较高。本研究显示,Kindlin-2 在肝癌组织中的表达高于相应的癌旁和正常肝组织,且 Kindlin-2 表达增加与肿瘤大小、有无门静脉侵犯有关,推测 Kindlin-2 可能具有促进肝癌细胞增殖和侵袭的作用。

新生血管在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要的作用^[9]。新生血管不仅为肿瘤的生长提供营养和氧气,而且还是其向远处播散和转移的基础。作为富血供肿瘤,肝癌具有生长快、易转移等特点,究其原因,肿瘤血管生成在上述恶性生物学行为中发挥了重要作用^[10]。因此,以血管生成为靶向的抗血管治疗可能是一种很有潜力的治疗方法。然而血管生成受到多种细胞因子的调节,参与血管生成过程的诸多分子机制目前还不清楚。为了弄清 Kindlin-2 在肝癌血管生成中的作用,笔者进一步探讨了肝癌组织中 Kindlin-2 的表达与 VEGF 及 MVD 的关系。VEGF 作为血管生成诱导分子,其促血管作用已经被广泛证实。Park et al^[11]研究发现正常肝细胞和肝癌细胞中都有 VEGF 的表达,且 VEGF 的表达水平与肝癌的 MVD 呈正相关。Tseng et al^[12]通过免疫组化法发现人肝癌组织中 VEGF 的表达与血清 AFP 水平、肿瘤分化、临床分期相关,且 VEGF 的表达是影响肝癌患者预后的独立因素。MVD 通常

用于反映肿瘤 MVD, 本研究中采用 CD34 抗体标记肿瘤组织微血管计数肝癌的 MVD。结果显示, 肝癌组织中 Kindlin-2 的表达与 VEGF 的表达呈正相关, Kindlin-2 和 VEGF 阳性者 MVD 值均高于阴性者, 推测 Kindlin-2 可能是通过促进 VEGF 的表达而发挥诱导血管生成的作用, 从而在肝癌的复发转移中发挥作用。

综上所述, 肝癌组织中 Kindlin-2 的高表达与肿瘤微血管的异常增生相关。当前阻断肿瘤血管生成已成为肿瘤临床研究的热点, 如何选择有效的阻断靶点是亟待解决的问题。本研究结果显示 Kindlin-2 阳性表达的肝癌组织具有较高的 MVD 和较强的 VEGF 表达, 抑制肝癌中 Kindlin-2 的表达可能起到下调 VEGF 和抑制肿瘤血管生成的效果, 提示 Kindlin-2 可能成为肝癌抗血管治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] Forner A, Llovet J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet* 2012; 379 (9822): 1245–55.
- [2] Lai-Cheong J E, Parsons M, McGrath J A. The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42 (5): 595–603.
- [3] Gozgit J M, Pentecost B T, Marconi S A, et al. Use of an aggressive MCF-7 cell line variant, TMX2-28, to study cell invasion in breast cancer [J]. *Mol Cancer Res* 2006; 4(12): 905–13.
- [4] Gong X, An Z, Wang Y, et al. Kindlin-2 controls sensitivity of prostate cancer cells to cisplatin-induced cell death [J]. *Cancer Lett* 2010; 299(1): 54–62.
- [5] Pliskota E, Dowling J J, Gordon N, et al. The integrin coactivator kindlin-2 plays a critical role in angiogenesis in mice and zebrafish [J]. *Blood* 2011; 117 (18): 4978–87.
- [6] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36 (2): 169–80.
- [7] Wick M, Bürger C, Brüsselbach S, et al. Identification of serum-inducible genes: different patterns of gene regulation during G0→S and G1→S progression [J]. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 1): 227–39.
- [8] Lai-Cheong J E, Parsons M, McGrath J A. The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42 (5): 595–603.
- [9] 马金良, 许戈良, 荚卫东, 等. 诱导性大鼠肝癌模型中 HIF-1 α 、VEGF 的表达 [J]. 安徽医科大学学报 2010; 45(4): 455–8.
- [10] Bishayee A, Darvesh A S. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: a potential target for chemoprevention and therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12 (9): 1095–118.
- [11] Park Y N, Kim Y B, Yang K M, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis [J]. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124 (7): 1061–5.
- [12] Tseng P L, Tai M H, Huang C C, et al. Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients [J]. *J Surg Oncol* 2008; 98 (5): 349–57.

The expression of Kindlin-2 in hepatocellular carcinoma and its relationship with tumor angiogenesis

Liu Dong, Ge Yongsheng, Xu Geliang, et al

(Dept of Hepatic Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Anhui Province Key Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery, Hefei 230001)

Abstract Objective To explore the clinical significance of Kindlin-2 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) and its relationship with HCC angiogenesis. **Methods** RT-PCR was performed to detect the gene expression of Kindlin-2 in 12 cases of primary HCC tissues and adjacent tissues, and 6 cases of normal liver tissues. Immunohistochemistry was used to determine the protein expression of Kindlin-2 in HCC and adjacent tissues from 69 primary HCC patients. Furthermore, vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD34 were also examined in HCC tissues mentioned above. **Results** Kindlin-2 expression appeared at a high level compared to adjacent tissues and normal liver tissues. The expression of Kindlin-2 was associated with tumor diameter ($P = 0.010$) and portal venous invasion ($P = 0.025$). The expression of Kindlin-2 in HCC was positively correlated with VEGF expression ($r = 0.401, P = 0.001$); besides, tumors with Kindlin-2 positive expression exhibited higher MVD than that negative expression tumors ($P < 0.01$). **Conclusion** Aberrant overexpression of Kindlin-2 in HCC is closely associated with tumor angiogenesis, and Kindlin-2 can be the potential targets of anti-angiogenesis therapy of HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; Kindlin-2; vascular endothelial growth factor; microvascular density