

原发性肝癌 TACE 后 FAK、NF- κ Bp65 表达及意义

王惠文, 刘瑞宝, 刘 岩, 沈海洋, 杨 奕, 孙厚宾, 李 凯

【摘要】 目的 探讨原发性肝癌(HCC)经动脉化疗栓塞术(TACE)后 FAK、NF- κ Bp65 表达的水平及其意义。**方法** 收集经 TACE 后手术切除的肝癌组织标本 28 例(TACE 组)和未经任何治疗直接手术切除的肝癌组织标本 30 例(单纯手术组)。采用免疫组化 SP 法,检测残癌组织中 FAK、NF- κ Bp65 的表达水平。**结果** TACE 组肝癌组织标本 FAK 表达阳性率 75.0%,较单纯手术组阳性率(46.7%)高,差异有统计学意义($P < 0.05$);TACE 组肝癌组织标本 NF- κ Bp65 表达阳性率为 78.6%,较单纯手术组(53.3%)高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TACE 组残癌组织中 FAK、NF- κ Bp65 表达呈正相关($r = 0.503, P = 0.006$)。TACE 次数及碘油沉积分型对 FAK、NF- κ Bp65 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** HCC 行 TACE 后残癌组织中 FAK、NF- κ Bp65 表达明显升高,FAK 和 NF- κ Bp65 的高表达可能是 TACE 后肿瘤复发率较高的主要原因之一。

【关键词】 肝细胞癌; 经导管动脉化疗栓塞术; 局部黏着斑激酶; 核因子 κ Bp65; 免疫组织化学法
中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2011)-08-0621-04

The expression and significance of FAK and NF- κ Bp65 in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization WANG Hui-wen, LIU Rui-bao, LIU Yan, SHEN Hai-yang, YANG Yi, SUN Hou-bin, LI Kai. Department of Interventional Radiology, the Third Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Corresponding author: LIU Rui-bao, E-mail: ruibaoliu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and significance of FAK and NF- κ Bp65 in the residual tumor tissues of hepatocellular carcinoma (HCC) after transcatheter arterial chemoembolization (TACE). **Methods** The surgical specimens of HCC after TACE were collected in 28 cases (TACE group), and surgical specimens of HCC without having received any other treatments were obtained in 30 cases (pure surgery group). The expression of FAK and NF- κ Bp65 in the residual tumor tissues was determined by using immunohistochemical SP method. **Results** The positive rate of FAK expression in TACE group was 75.0%, which was much higher than that in pure surgery group (46.7%), and the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). The positive rate of NF- κ Bp65 expression in TACE group was 78.6%, which was 53.3% in pure surgery group, and the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). In TACE group the FAK expression in residual cancerous tissues showed a positive correlation with the expression of NF- κ Bp65 ($r = 0.503, P = 0.006$). Both the number of performing TACE and the Lipiodol deposition pattern classification showed no statistically significant correlation with the expression of FAK or NF- κ Bp65 ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of FAK and NF- κ Bp65 in the residual cancerous tissues of hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization is markedly increased. The higher expression of FAK and NF- κ Bp65 may be one of the main reasons for high recurrence rate after TACE. (J Intervent Radiol, 2011, 20: 621-624)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; transcatheter arterial chemoembolization; FAK; NF- κ Bp65; immunohistochemistry

原发性肝癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤之

一,具有侵袭性强,易复发、转移等生物学特性。经导管动脉化疗栓塞术(TACE)是目前治疗中晚期 HCC 非手术治疗首选方法,然而 TACE 治疗后复发率较

作者单位:150086 哈尔滨医科大学附属第三医院介入科
通信作者:刘瑞宝 E-mail: ruibaoliu@hotmail.com

高,远期疗效尚不令人满意。文献报道黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和 NF- κ B 与多种肿瘤的侵袭、转移及复发密切相关^[1-2]。我们采用免疫组化方法,观察 TACE 治疗后残留肝癌组织中 FAK、NF- κ Bp65 的表达情况,旨在探讨 FAK、NF- κ Bp65 的表达对 TACE 后复发的影响,为 HCC TACE 治疗的预后评估及进一步临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集我院 2005 年 1 月—2010 年 6 月行 TACE 后 II 期手术切除(TACE 组)的肝癌组织标本 28 份,

及同期直接手术切除(单纯手术组)的肝癌组织标本 30 份。病例纳入标准:①符合 2001 年中国抗癌协会肝癌专业委员会制定的肝癌诊断标准。②患者末次 TACE 治疗后至外科手术切除间隔时间为 21~35 d。两组患者在年龄、性别、HBsAg 阳性率、肿瘤直径、肿瘤数目、AFP 值及肝功能 Child-Pugh 分级等差异无统计学意义。其中 TACE 组患者手术前接受 1~4 次的 TACE 治疗,其中行单次 TACE 者 13 例, ≥ 2 次者 15 例。TACE 术中药物及栓塞材料有:表阿霉素 20~40 mg、丝裂霉素 10~20 mg、羟喜树碱 5~10 mg、氟尿苷 250~1 000 mg、液化碘油 10~30 ml 和明胶海绵碎屑。两组患者一般资料比较见表 1。

表 1 两组 HCC 患者的一般临床资料比较

组别	平均年龄(岁)	性别(男/女)	HBsAg(+/-)	肿瘤最大径(mm)	肿瘤数目(≤ 2 / > 2 个)	AFP[ng/ml(≤ 400 / > 400)]	Child-pugh(A/B/C)
TACE 组 ($n=28$)	52.5 \pm 9.5	20/8	19/9	69.5 \pm 17.9	13/15	9/19	16/12/0
单纯手术组 ($n=30$)	51.2 \pm 7.9	21/9	19/11	63.5 \pm 15.9	16/14	12/18	16/14/0
P 值	0.585	0.905	0.717	0.585	0.599	0.534	0.771

1.2 方法

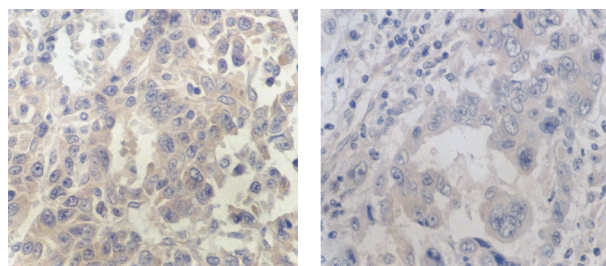
1.2.1 检测方法 ①主要试剂:FAK 单克隆抗体(型号 sc-1688)、NF- κ Bp65 单克隆抗体(型号 sc-8008)浓缩液以及抗鼠二抗(PV-6002),均购自北京中杉金桥生物公司。②切片准备:每个肝癌组织蜡块标本 4 μ m 厚连续切片 3 张。③实验步骤按照试剂说明书进行。

1.2.2 判读标准 光镜下 FAK、NF- κ Bp65 主要位于胞质,出现棕黄色颗粒为阳性细胞(图 1、2)。高倍镜($\times 200$ 倍)下分别选取阳性染色最明显的 5 个视野,每视野统计 200 个细胞,共 1 000 个细胞,计算每张切片阳性细胞百分率,阳性细胞 $< 10\%$ 为阴性; $10\% \sim 50\%$ 为弱阳性, $> 50\%$ 为强阳性。

1.2.3 评价标准 根据介入术后首次复查影像资料将病灶内碘油充填情况及残灶大小分为 4 型^[3]: I 型,轮廓完整,病灶内碘油均匀密实; II 型,轮廓基本完整,病灶内碘油欠密实; III 型,轮廓有残缺或碘油沉积较淡; IV 型,无或仅有少量碘油沉积。

1.3 统计方法

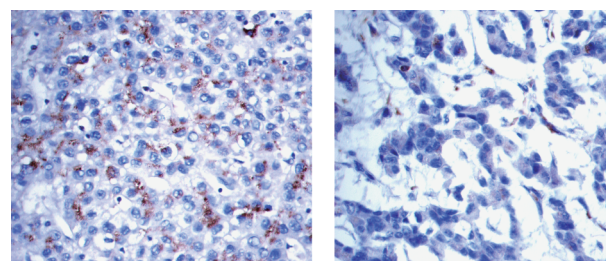
使用 SPSS13.0 软件包,计数资料采用 χ^2 检验(TACE 次数及碘油沉积分型对 FAK、NF- κ Bp65 蛋白表达的影响分析采用 Fisher 确切概率法);计量资料(两组临床资料中年龄、病灶大小)以($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本 t 检验;FAK、NF- κ Bp65 表达的相关性分析采用 Spearman 等级相关检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



1a TACE 组

1b 单纯手术组

图 1 TACE 术后残癌组织及单纯手术切除癌组织 FAK 蛋白表达(SP $\times 400$)



2a TACE 组

2b 单纯手术组

图 2 TACE 术后残癌组织及单纯手术切除癌组织 NF- κ Bp65 蛋白表达(SP $\times 400$)

2 结果

2.1 两组标本 FAK、NF- κ Bp65 蛋白表达情况

TACE 组肝癌组织标本中 FAK 蛋白表达阳性率 75.0%,较单纯手术组(46.7%)高,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。TACE 组肝癌组织标本中 NF- κ Bp65 蛋白表达阳性率为 78.6%,较单纯手术组(53.3%)高,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$),

见表 2。

表 2 两组 FAK、NF-κBp65 蛋白表达的比较 (n[%])

组别	FAK		NF-κBp65	
	阳性	阴性	阳性	阴性
TACE 组 (n = 28)	21(75.0%)	7(25.0%)	22(78.6%)	6(21.4%)
单纯手术组 (n = 30)	14(46.7%)	16(53.3%)	16(53.3%)	14(46.7%)
χ ²	4.859		4.083	
P 值	0.028		0.043	

2.2 TACE 组残癌组织中 FAK、NF-κBp65 蛋白阳性表达的相关情况

FAK 蛋白阳性表达与 NF-κBp65 蛋白阳性表达呈正相关($r = 0.503, P = 0.006$),见表 3。

表 3 TACE 组 FAK 与 NF-κBp65 相关性分析

NF-κBp65	FAK	
	阳性	阴性
阳性	19	3
阴性	2	4
r 值	0.503	
P 值	0.006	

2.3 TACE 次数对 FAK、NF-κBp65 蛋白表达的影响

TACE 治疗次数对 FAK、NF-κBp65 蛋白表达的影响差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

表 4 TACE 次数对 FAK、NF-κBp65 蛋白表达影响的分析

组别	FAK		NF-κBp65	
	阳性	阴性	阳性	阴性
单次数(n = 13)	8(61.5%)	5(38.5%)	10(76.9%)	3(23.1%)
多次数(n = 15)	13(86.7%)	2(13.3%)	12(80.0%)	3(20.0%)
P 值	0.198		1.000	

2.4 碘油沉积分型对 FAK、NF-κBp65 蛋白表达的影响

本组病例按照碘油沉积分型 I 型 9 例, II 型 11 例, III 型 7 例, IV 型 1 例。不同栓塞程度对 FAK、NF-κBp65 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 5。

表 5 碘油沉积分型对 FAK、NF-κBp65 蛋白表达影响的分析

碘油沉积分型	FAK		NF-κBp65	
	阳性	阴性	阳性	阴性
I + II(n = 20)	16(80.0%)	4(20.0%)	15(75.0%)	5(25.0%)
III + IV(n = 8)	5(62.5%)	3(37.5%)	7(87.5%)	1(13.5%)
P 值	0.371		0.640	

3 讨论

FAK 是一非受体酪氨酸蛋白激酶(PTK),与肿瘤细胞的存活、增殖、粘附、侵袭和转移都密切相关,多种恶性肿瘤中均可发现 FAK 的表达异常增高^[1,4]。研究发现 FAK 在肝细胞肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织和正常肝组织。FAK 的表达与肝癌的侵

袭、转移密切相关^[5]。研究 TACE 后残癌组织中 FAK 的表达情况及其对 TACE 后肝癌复发的影响具有重要的临床价值。

NF-κB 是一种广泛存在于哺乳动物中的转录因子,能够与 B 淋巴细胞免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κB 序列(GGGACTTTCC)特异结合,是近年发现的最重要的转录因子之一。近年的研究表明 NF-κB 与多种肿瘤的发生、发展、转移以及抗凋亡等密切相关^[6-7]。研究发现活化的 NF-κB 可以上调细胞间黏附相关因子、VEGF、MMP-2、MMP-9 及 caspase-3 等多种因子,与肿瘤的发生、发展及侵袭转移密切相关^[8-9]。

TACE 治疗肝癌远期疗效并不令人满意,具有较高的复发率,需多次治疗,成为目前 TACE 面临的难题^[10-11]。FAK 可能是评估 TACE 疗效的一个重要因子,而 NF-κBp65 是评估的另一个重要因子。另外, TACE 组 FAK 与 NF-κBp65 之间相关性分析显示:FAK 阳性表达率与 NF-κBp65 阳性表达率呈正相关($r = 0.503, P = 0.006$),推测 FAK 与 NF-κBp65 之间可能存在协同作用。

晏维等^[12]报道,在缺氧环境中,人肝癌细胞株 SMMC-7721 FAK 表达显著增高, SMMC-7721 细胞侵袭能力也随之增强,认为 FAK 表达的上调可能是缺氧促进肝癌细胞侵袭转移机制之一。相反,王华等^[13]在动物实验研究中发现,在高氧环境下 FAK mRNA 和蛋白表达都有不同程度的下降,高氧抑制 FAK 的表达。而 TACE 在阻断肿瘤供血血管的同时也会造成缺氧环境,本组研究显示 TACE 组 FAK 表达阳性率高于单纯手术组,与晏维等人研究结果一致,缺氧可能是促使 TACE 后 FAK 表达上调的机制之一。近年来 NF-κB 与肿瘤的发生、发展、浸润转移及化疗耐药方面成为研究的热点。研究表明,在多种耐药的肿瘤细胞系中存在着异常的 NF-κB 表达。一方面,化疗能够导致 DNA 损伤,可造成细胞以凋亡的方式出现死亡。另一方面,化疗所导致的 DNA 的破坏能够激活 NF-κB 进而阻滞凋亡。Lavon 等^[14]应用阿霉素诱导的 DNA 损伤肝脏模型的研究发现,阿霉素诱导的毒性反应能够引起 NF-κB 的激活。Yeh 等^[15]研究肿瘤耐药机制中也发现阿霉素、5-氟尿嘧啶、顺铂、紫杉醇 4 种药物可以导致肿瘤细胞中 NF-κB 的激活。本组研究显示 TACE 组 NF-κBp65 表达阳性率明显高于单纯手术组。介入治疗中所用的化疗药物的刺激可能会激活 NF-κBp65 的表达。

研究发现 TACE 次数及碘油沉积分型对 FAK 与 NF- κ Bp65 蛋白表达无明显影响。张智坚等^[16]认为术前 TACE 次数显著影响无瘤生存率,术前行多次 TACE 治疗较单次者无瘤生存率高。也有人认为随着 TACE 次数的增加会加重肝脏的损伤。随着多次 TACE 治疗,在大量杀伤肿瘤细胞的同时也刺激 FAK 与 NF- κ Bp65 蛋白表达,两种作用的相互抵消可能是 TACE 次数对 FAK 与 NF- κ Bp65 蛋白表达未见明显影响的原因。同理,碘油填充良好的病灶缺血、缺氧相对较重,但同时杀伤肿瘤也较彻底,两种作用相互抵消。这也解释了临床上栓塞较彻底的病例近期疗效好,而远期仍出现复发的原因。

存在的问题:①本组病例相对较少,需进一步大样本病例研究证实。②本试验属于回顾性研究,介入用药采用同一方案,未做单药对比分析。③从介入治疗到外科手术切除间隔时间选择 21 ~ 35 d,待肝功能恢复良好后尽快手术切除,没有间隔时间太短或太长者,未做时间间隔对 FAK 与 NF- κ Bp65 蛋白表达影响的分析。

综上所述,HCC 行 TACE 后造成的乏氧环境及肿瘤耐药机制等原因可能是促使残癌组织中 FAK、NF- κ Bp65 高表达的主要原因,以 FAK、NF- κ Bp65 为靶点的靶向治疗结合介入治疗的综合治疗可能提高肝癌患者的生存率,降低肝癌的复发。这将是今后介入研究的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Lim ST, Chen XL, Lim Y, et al. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation[J]. Mol Cell, 2008, 29: 9 - 22.
- [2] Aggarwal S, Takada Y, Singh S, et al. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling [J]. Int J Cancer, 2004, 111: 679 - 692.
- [3] 周大勇, 王建华, 钱 晟, 等. 肝动脉化疗栓塞术对富血供肝转移瘤的疗效分析[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 165 - 167.
- [4] Rodrigo JP, Dominguez F, Suárez V, et al. Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 133: 145 - 150.
- [5] Chen JS, Huang XH, Wang Q, et al. FAK is involved in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Exp Metastasis, 2010, 27: 71 - 82.
- [6] Loercher A, Lee TL, Ricker JL, et al. Nuclear factor-kappaB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2004, 64: 6511 - 6523.
- [7] Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B activation mediates cellular transformation, proliferation, invasion angiogenesis and metastasis of cancer [J]. Cancer Treat Res, 2004, 119: 139 - 173.
- [8] 郑成军, 王 健, 邓靖宇, 等. NF-kappa Bp65 和 VEGF 在原发性肝癌中的表达及意义[J]. 现代预防医学, 2008, 35: 930 - 932.
- [9] Karin M, Cao Y, Greten FR, et al. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 301 - 310.
- [10] 陈自谦, 杨 利, 杨熙章, 等. 肝癌介入治疗现状与进展[J]. 介入放射学杂志, 2008, 17: 223 - 227.
- [11] 王建华. 呼唤规范化的肝癌介入治疗[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 145 - 147.
- [12] 晏 维, 田德安, 廖家智, 等. 缺氧环境中黏着斑激酶对 SMMC-7721 细胞侵袭能力的影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17: 284 - 287.
- [13] 王 华, 常立文, 李文斌, 等. 黏着斑激酶在早产大鼠高氧肺损伤组织中的表达变化和意义[J]. 临床儿科杂志, 2006, 24: 320 - 323.
- [14] Lavon I, Pikarsky E, Gutkovich E, et al. Nuclear factor-kappaB protects the liver against genotoxic stress and functions independently of p53[J]. Cancer Res, 2003, 63: 25 - 30.
- [15] Yeh PY, Lu YS, Chuang SE, et al. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63: 1709 - 1716.
- [16] 张智坚, 吴孟超, 刘 崎. 术前肝动脉化疗栓塞对肝细胞癌术后无瘤生存的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 1999, 21: 214 - 216.

(收稿日期:2011-03-17)