

险性增加 3.53 倍(OR 19.42), 与其相似, 使用 NSAID 会使 Hp 感染相关危险性增加 3.55 倍(OR 18.06). 本文结果亦表明 Hp 和消炎痛有相互作用, 消炎痛的应用使接种 Hp 后的胃黏膜炎症较对照组明显加重, 增加了胃黏膜对 Hp 的敏感性增加, 使胃溃疡发生的危险性, 二者有协同和相加的作用, 根除 Hp 感染可有效地防止消化性溃疡的发生. 但 Hp 相关性溃疡是否就是 NSAID 相关性溃疡, 是 NSAID 加重 Hp 相关性溃疡, 或者溃疡仅由 NSAID 引起, 还需要进一步的研究^[12].

4 参考文献

- 1 黄品川, 陈彩凤, 程荣耀, 叶蕤, 卢惟纯. 消化性溃疡及胃癌患者血清 CagA VacA 抗体研究. 世界华人消化杂志 1999;7:917-919
- 2 陈登登, 林志辉, 彭孝伟, 潘秀珍. 幽门螺杆菌 SG 与消化性溃疡的关系. 华人消化杂志 1998;6:362-364
- 3 于长青, 邹全明, 谢庆华, 郭学青, 罗平. 幽门螺杆菌 VacA⁺ 株感染于消化疾病的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:439

- 4 王广文, 李栓位, 马蜂, 郭呈学, 叶历. 幽门螺杆菌与胃十二指肠疾病. 新消化病学杂志 1997;5:177-178
- 5 张玲霞, 张沥, 张宁霞, 刘永国, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 幽门螺杆菌 CagA 与胃十二指肠溃疡发病关系的病例对照研究. 世界华人消化杂志 1999;7:700-701
- 6 徐洁萍, 陆和平, 卫波, 俞信祥. 消化性溃疡及糜烂性胃炎患者前列腺素及血栓素与幽门螺杆菌的关系. 华人消化杂志 1998;6:799-800
- 7 梁后杰, 高晋华, 刘为纹, 房殿春, 门荣甫. 幽门螺杆菌培养滤液长期作用下大鼠胃黏膜组织学的变化. 世界华人消化杂志 1999;7:861-863
- 8 Grymer J, Watson GL, Coy CH, Prindle LV. Healing of experimentally induced wounds of mammary papilla (teat) of the cow: comparison of closure with tissue adhesive versus nonsutured wounds. *Am J Vet Res* 1984;45:1979-1983
- 9 Astaha. *Helicobacter pylori* and non-steroidal anti-inflammatory drugs: uncomfortable partners in peptic ulcer disease. *Gut* 1993;34:580-583
- 10 Atherton JC. *H. pylori* and risk of ulcer bleeding among users of NSAIDs. *Gastroenterology* 2000;118:451-452
- 11 迟晶, 傅宝玉, 九岛亮治, 中岛滋美, 服部隆则. 沙土鼠幽门螺杆菌感染胃炎、胃溃疡动物模型的建立及除菌治疗前后炎症和细胞增生的变化. 世界华人消化杂志 1999;7:557-560
- 12 David Y, Martin D, Annalee M. Long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug use and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1991;100:1653-1657

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

原发性肝癌乙酰肝素酶 mRNA 的表达及其意义

陈晓鹏, 刘颖斌, 时开网, 彭淑牖, 彭承宏, 史留斌, 沈宏伟

陈晓鹏, 皖南医学院弋矶山医院普外科, 安徽省芜湖市 241001
 陈晓鹏, 时开网, 南京医科大学附属南京第一医院普外科
 江苏省南京市 210006
 刘颖斌, 彭淑牖, 彭承宏, 史留斌, 沈宏伟, 浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
 项目负责人: 陈晓鹏, 241001, 安徽省芜湖市赭山西路 92 号, 安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院普外科. drcxp@sohu.com
 电话: 0553-5738856-2346
 收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-14

结论: HCC 有较高的 HPA mRNA 表达率, HPA 阳性者术后转移复发的可能性较大, 可作为 HCC 转移活性的可靠标志之一.

陈晓鹏, 刘颖斌, 时开网, 彭淑牖, 彭承宏, 史留斌, 沈宏伟. 原发性肝癌乙酰肝素酶 mRNA 的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2003;11(11):1797-1799
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1797.asp>

摘要

目的: 探讨乙酰肝素酶(HPA)mRNA 在肝细胞性肝癌(HCC)中的表达及其意义.

方法: 收集 33 例 HCC 标本, 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 HCC 癌及癌旁肝组织中 HPA mRNA 的表达, 并与 HCC 临床病理学指标进行统计学分析.

结果: 33 例 HCC 中有 16 例癌组织 HPA mRNA 表达阳性, 阳性率为 48.5%, 显著高于癌周肝组织和对照肝组织($P < 0.01$). HCC 癌组织 HPA mRNA 表达与肿瘤大小、包膜形成、AFP 水平、HBsAg 状态及肝硬化无关, 而与肿瘤转移复发有关. 高转移复发倾向组癌组织 HPA 表达阳性率(71.4%, 10/14)显著高于低转移复发倾向组(31.6%, 6/19)($P < 0.05$). 术后随访转移复发者 HPA 表达阳性率(78.6%, 11/14)显著高于无转移复发者(21.4%, 3/14)($P < 0.01$). 此外, HPA mRNA 表达多见于分化较差($P < 0.05$)、TNM 分期较晚($P < 0.05$)的患者.

0 引言

近 20 a 来, 原发性肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)手术切除率虽有所提高, 但总的治疗效果仍不够理想, 其主要原因为术后转移复发^[1,2], 且缺乏有效的监测指标和防治措施. 另一方面, 在过去十几年中, 有关肿瘤包括 HCC 转移的研究大多集中在底物为结构蛋白(包括胶原蛋白、层粘蛋白与玻璃体结合素等)的一些蛋白酶上(如基质金属蛋白酶、胶原蛋白酶和丝氨酸蛋白酶等)^[3,4], 而对以肿瘤转移屏障(细胞外基质和基底膜)的另一种重要成分即硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)^[5]为底物的乙酰肝素酶(heparanase, HPA)的研究则相对较少^[4]. 我们应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 33 例 HCC 标本中 HPA 的 mRNA 基因表达, 并结合患者的临床病理和随访资料, 以探讨 HPA mRNA 表达的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 33例新鲜冷冻的HCC标本,包括癌和癌旁肝组织,为2000-08/2001-04浙江大学医学院附属第二医院外科手术切除并经病理证实。另取9例肝脏良性肿瘤周肝组织作正常对照。HCC组中,男28例,女5例;年龄29-73岁,平均49.2岁。其中肿瘤最大径小于或等于5 cm者8例,大于5 cm者25例;肿瘤包膜完整14例,不完整19例;AFP阳性21例,阴性12例;HBsAg阳性24例,阴性9例;合并明显肝硬化18例,无肝硬化15例;肿瘤Edmondson I、II级13例,III、IV级20例;TNM I、II期18例,III、IV期15例。根据手术记录、术后病理报告等,将有癌栓和(或)肝内播散即卫星癌灶和(或)淋巴结转移的14例HCC患者定为高转移复发倾向组。反之,无癌栓、肝内卫星癌灶和(或)淋巴结转移的19例HCC患者为低转移复发倾向组。全组有28例术后6-16 mo内获得随访,占84.8%(28/33)。随访有、无转移复发者各14例。肝脏良性肿瘤9例中,男4例,女5例;年龄32-65岁,平均41.2岁;其中肝海绵状血管瘤8例,肝局灶性结节性增生1例。Trizol总RNA分离试剂盒为Gibco公司产品,AMV和TagTM DNA聚合酶均为TaKaRa产品。dNTP购自上海生工生物工程公司。采用 β -actin作为内参照,其引物由上海博亚生物公司合成,上游为5'-TTCCAGCCTTCCTCCTGG-3',下游为5'-ATTGCTCCTCCTGAGCGCAA-3',扩增片段长度为224 bp。HPA引物参照文献[6]设计,由上海生物工程公司合成,上游为5'-TTCGATCCCAAGAAGGAATCAAC-3',下游为5'-GATTCAGTTACATGGCATCACTAC-3',其扩增片段长度为585 bp。所有引物均按要求将其浓度稀释为10 pmol/L。

1.2 方法 Trizol一步法提取组织总RNA,甲醛变性胶电泳鉴定及紫外分光光度仪测定A值后,逆转录合成cDNA。取2 μ L cDNA按50 μ L反应体系行PCR扩增。HPA扩增条件为94 $^{\circ}$ C预变性4 min,后转入94 $^{\circ}$ C变性30 s,57 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共35个周期,然后再72 $^{\circ}$ C延伸5 min。取10 μ L产物于12 g/L的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭紫外灯下观察拍照。

统计学处理 结果采用 χ^2 检验或四格表确切概率法分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 HPA mRNA在肝癌组织中的表达 经RT-PCR扩增后电泳观察发现33例HCC癌组织中有16例于585 bp处可见阳性条带(图1),余17例阴性,HCC癌组织HPA mRNA表达阳性率为48.5%;而癌周肝组织仅1例HPA表达呈阳性。9例对照肝组织全部阴性。经统计学处理二者P值均小于0.01,差异有显著意义。

2.2 HPA mRNA表达与肝癌临床病理特征的关系 结果发现,肿瘤最大径小于或等于5 cm组和大于5 cm组分别有3例和13例、包膜完整组和不完整组分别有5

例和11例、AFP及HBsAg阳性和阴性组均分别有12例和4例、伴或不伴肝硬化组各有8例HPA mRNA表达阳性。HPA mRNA表达在对应各组间差异无显著意义($P > 0.05$)。Edmondson I、II级组和III、IV级组分别有3例和13例HPA mRNA表达阳性,差异有显著意义($P < 0.05$);TNM I、II期组有6例,III、IV期组10例阳性,差异亦有显著意义($P < 0.05$)。

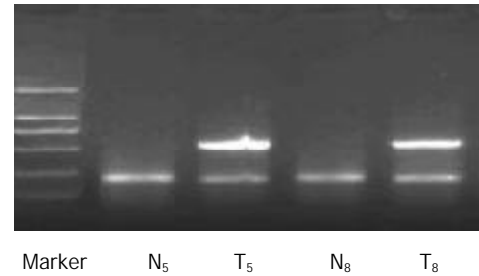


图1 肝素酶 mRNA 在 HCC 癌及癌周肝组织中的表达。图示: Marker: DL2 000, 自上而下分别为 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp 的 6 个条带; T₅ 和 T₈ 分别为第 5 和 8 号癌组织标本, 于 585 bp 处均有条带出现, HPA 表达为阳性, 其中 T₈ 条带最亮; N₅ 和 N₈ 为相应癌周肝组织标本, HPA 表达均阴性。

2.3 HPA mRNA表达与转移复发的关系 高转移复发倾向组14例中有10例(71.4%)HPA mRNA表达阳性,低转移复发倾向组19例中仅6例(31.6%)阳性,二者有显著性差异($P < 0.05$)。经28例随访,14例有明确转移复发的患者中11例(78.6%)HPA mRNA阳性,另外14例未发现转移复发的患者中仅有3例(21.4%)HPA表达,差异亦有显著意义($P < 0.01$)表1。

表1 HPA mRNA表达与肝细胞癌转移复发的关系

项目	n	HPA 阳性(n)	HPA 阴性(n)	P 值
转移复发倾向				
高	14	10	4	0.023
低	19	6	13	
随访结果				
有转移复发	14	11	3	0.003
无转移复发	14	3	11	

3 讨论

1999年前后,哺乳类动物包括人HPA^[6-12]基因已得以成功克隆和鉴定,现认为该基因编码3.7 kb的人cDNA,跨度达50 kb以上,含有14个外显子和13个内含子,位于染色体4q22^[13]。在正常状态下,HPA主要分布在胎盘、血小板及部分免疫细胞内,在胚胎形成、创伤愈合和炎症过程中发挥重要的生理作用。

在肿瘤状态下,很多癌及其基质细胞亦可获得产生或分泌HPA的能力。转移的恶性肿瘤细胞普遍表达HPA,恶性黑色素瘤、结肠癌和肝癌等具高转移潜能的肿瘤细胞表达水平较高,而低或无转移潜力的肿瘤细胞无或仅有少量表达^[6,7]。最近,日本学者El-Assal et al^[14]报告了他们关于HPA在HCC中的表达研究,发现有

47%的HCC癌组织HPA mRNA表达阳性。我们用RT-PCR方法检测33例HCC标本HPA mRNA的表达情况,结果发现有16例癌组织中HPA mRNA表达阳性,占总数的48.5%,与El-Assal et al研究的结果相似。此外,我们还同步检测了癌周和对照肝组织中HPA mRNA的表达情况,结果表明近半数HCC癌组织具有合成或分泌HPA的功能,而癌周和对照肝组织则不产生HPA。

HPA的主要病理作用是促进肿瘤细胞转移和血管生成。HPA通过水解断裂糖苷键而降解HSPG^[15],与其他蛋白水解酶协同破坏、降解细胞外基质和基底膜屏障,促进肿瘤细胞侵袭和转移^[6, 15];HPA还可激活纤溶酶原,活化金属基质蛋白酶(MMPs),促进碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)的释放^[16],以发挥其促细胞转移和血管生成作用。研究证明癌组织产生的HPA与肿瘤侵袭转移、血管生成等因素密切相关^[4, 6, 7, 17-22]。HPA表达活性升高的肿瘤转移复发的可能性及肿瘤微血管密度均增加。El-Assal et al^[14]将HPA mRNA表达与HCC患者临床和病理指标进行分析,发现HPA表达与肿瘤的大小、分期、分级、丙型肝炎病毒(HCV)感染、微血管形成、术后转移及预后有关,而与其他临床病理因素无关。

本研究发现HPA表达与肝癌的病理分级、TNM分期和转移复发有关,均与El-Assal et al^[14]的结论相似。HPA阳性多见于肿瘤分化程度较低、病理分期较晚的患者。高转移复发倾向组癌组织HPA表达阳性率(71.4%, 10/14)显著高于低转移复发倾向组(31.6%, 6/19),初步表明HPA与肝癌侵袭转移的关系。术后随访转移复发者HPA表达阳性率(78.6%, 11/14)显著高于无转移复发者(21.4%, 3/14),进一步提示HPA表达阳性患者有较高的肿瘤侵袭性和术后复发倾向,检测HPA可为临床预测HCC术后转移复发提供有价值的指标。

与El-Assal et al^[14]的研究不同的是,本研究未发现HPA表达与肿瘤大小和包膜完整度有关,可能是由于本组5 cm以下病例较少(仅8例)的缘故。此外,本研究亦未发现HPA表达与病毒感染(HBsAg状态)、AFP和肝硬化等因素有关,可能是由于感染的病毒类型不同,El-Assal研究的HCC患者以丙型肝炎病毒(HCV)感染为主,而我国HCC的发生大多与乙型肝炎病毒(HBV)感染、肝硬化有关,少有HCV感染。

4 参考文献

- 1 陈晓鹏,彭淑牖. 原发性肝癌肝外复发转移的研究进展. 国外医学外科学分册 2000;27:329-331
- 2 汤钊猷. 汤钊猷临床肝癌学. 第1版. 上海:上海科技教育出版社, 2001:41-222
- 3 金博. 细胞外基质与肝脏肿瘤. 世界华人消化杂志 2002;10:63-64
- 4 陈晓鹏,彭淑牖,刘颖斌,朱晓祥. 肝素酶及其抑制剂在肿瘤转移中的作用. 中华外科杂志 2002;40:153-155

- 5 刘超群,叶剑雄,金博. 细胞外基质的构成. 世界华人消化杂志 2002;10:53-54
- 6 Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 1999;5:793-802
- 7 Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 1999;5:803-809
- 8 Toyoshima M, Nakajima M. Human heparanase. Purification, characterization, cloning and expression. *J Biol Chem* 1999;274:24153-24160
- 9 Kussie PH, Hulmes JD, Ludwig DL, Patel S, Navarro EC, Seddon AP, Giorgio NA, Bohlen P. Cloning and functional expression of a human heparanase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:183-187
- 10 Fairbanks MB, Mildner AM, Leone JW, Cavey GS, Mathews WR, Drong RF, Slightom JL, Bienkowski MJ, Smith CW, Bannow CA, Heinrichson RL. Processing of the human heparanase precursor and evidence that the active enzyme is a heterodimer. *J Biol Chem* 1999;274:29587-29590
- 11 Dempsey LA, Brunn GJ, Platt JL. Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions. *Trends Biochem Sci* 2000;25:349-351
- 12 Freeman C, Parish CR. Human platelet heparanase: Purification characterization and catalytic activity. *Biochem J* 1998;330(Pt 3):1341-1350
- 13 Dong J, Kukula AK, Toyoshima M, Nakajima M. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene* 2000;253:171-178
- 14 El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1299-1305
- 15 Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase. *Cancer Res* 2000;60:4767-4770
- 16 Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanase. *J Biol Chem* 1996;271:10079-10086
- 17 Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Pappo O, Pecker I, Vlodavsky I. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB J* 2001;15:1661-1663
- 18 Parish CR, Freeman C, Hulett MD. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta* 2001;1471:M99-M108
- 19 Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Aviv A, Pecker I, Friedmann Y. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J* 2000;2(Suppl):37-45
- 20 Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, Friedmann Y, Pappo O, Aviv A, Elkin M, Pecker I, Peretz T, Vlodavsky I. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and mammary gland morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:311-322
- 21 Vlodavsky I, Goldshmidt O, Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, Atzmon R, Guatta-Rangini Z, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and normal development. *Biochimie* 2001;83:831-839
- 22 Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* 2001;108:341-347