

• 临床检验研究论著 •

# HER-2/neu 基因在肝癌高发区原发性肝癌表达和意义\*

周志忠, 林奎生, 叶惠珍, 吴 彬, 黄东联, 葛 玲, 徐丽艳, 黄淑芳, 黄信德, 黄水发  
(福建中医药大学附属厦门市第三医院, 福建同安 361100)

**摘 要:**目的 分析 HER-2/neu 基因在肝癌高发区厦门市同安区原发性肝细胞癌(PHC)中的表达及其与临床病理特征和预后的关系。方法 应用荧光定量 PCR 技术检测 53 例原发性肝癌 HER-2/neu 的扩增, 免疫组化对照, 分析 HER-2/neu 的表达与临床病理特征及预后的相关性。结果 在 53 例肝癌中有 15 例 HER-2/neu 表达, 占 28.3%, 其中高拷贝扩增有 2 例(3.77%), 中拷贝表达有 4 例(7.54%), 低拷贝表达有 9 例(17.0%), HER-2/neu 的表达与性别、年龄、AFP 水平、HBV-DNA 比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 而与肿瘤大小、病理类型、生存期(术后 1 年)、癌旁组织比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ); HER-2/neu 在肝硬化及正常肝组织中的表达率分别为 8.3%(1/12)和无表达。结论 HER-2/neu 基因在 PHC 的生长和转移中可能具有一定的促进作用, 可作为 PHC 的预后指标。

**关键词:** 肝肿瘤; 基因表达; 聚合酶链反应; 免疫组织化学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0941-02

## Clinical significance and expression of HER-2/neu gene in PHC patients in high incidence hepatocellular carcinoma\*

Zhou Zhizhong, Lin Kuisheng, Ye Huizhen, Wu Bin, Huang Donglian, Ge Ling,

Xu Liyan, Huang Shufang, Huang Xinde, Huang Shui fa

(Xiamen Municipal the Third Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Tong'an, Fujian 361100, China)

**Abstract:** Objective To investigate the expression of HER-2/neu gene in patients of primary hepatocellular carcinoma(PHC) in high incidence hepatocellular carcinoma in Tong'an of Xiamen and its relationships with clinicopathological parameters and prognosis. **Methods** 53 surgical samples from patients with primary PHC were detected for their HER-2/neu gene by FQ-PCR technique, and then the correlations between expression of HER-2/neu and clinicopathological characteristics, prognosis were analyzed. **Results** HER-2/neu gene of 53 surgical samples from patients with primary PHC was detected, 15 of 53 (28.3%) primary PHC, including 2 (3.77%) cases with high copies and 4 (7.54%) with middle copies, 9 (17.0%) with low copies. It was significantly difference after 1 year survival time, tumor size, type of PHC, histological grade and Adjacent tissues with expression of HER-2/neu of PHC patients ( $P<0.05$ ) but no to sex, age, AFP level, HBV-DNA copies of PHC patients ( $P>0.05$ ). expression of HER-2/neu in cirrhosis and normal liver tissue were 8.3% (1/12) and free expression. **Conclusion** It was found that there were a expression of HER-2 genes might be a involved factor in the development and proliferation of PHC patients, and seemed to be a valuable independent prognosis index predicting postoperative survival of patients with PHC.

**Key words:** liver neoplasms; gene expression; polymerase chain reaction; immunohistochemistry

原发性肝癌(PHC)高发区是临床最常见的恶性肿瘤之一, 厦门同安区原发性肝细胞癌肝癌高发区, 分析 HER-2/neu 与原发性肝癌临床病理特征的关系, 为在全国原发性肝癌高发区寻找敏感而特异的原发性肝癌早期诊断标志, 为基因治疗药物靶标寻找提供重要线索和依据具有重要意义。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2008 年 7 月至 2012 年 9 月, 收集本院病理诊断为原发性肝癌的患者肝癌组织标本 53 例, 均来自厦门市同安区患者。男 35 例, 女 18 例; 年龄 27~70 岁, 中位 43 岁; 血清 AFP $\geq 20$  ng/mL 的 36 例, HBV-DNA(+) 47 例; 肿瘤直径 1~19 cm, 平均 7.2 cm;  $\leq 5$  cm 21 例,  $> 5$  cm 32 例; 高分化 6 例, 中分化 24 例, 低分化 23 例; 22 例有肝内转移; 18 例伴有肝硬化, 13 例均伴有不同程度的慢性肝炎改变。

**1.2 免疫组化** HER-2/neu 蛋白的免疫组化试剂由福州迈新

公司提供, 所有患者术前未经过任何治疗, 4 $\mu$ m 石蜡切片行 HE 染色, 组织学诊断按照 2000 年世界卫生组织(WHO)分级标准, 每例肿瘤的病理诊断由 2 名病理医师独立完成。+ 为大于 10% 的区域有阳性表达, 胞膜显色不连续; 2+ 为大于 10% 的区域有阳性表达, 胞膜显色, 连续, 强度中等; 3+ 为大于 10% 的区域有阳性表达胞膜呈连续强阳性表达。如同一切片中同时存在 1+, 2+, 3+ 的情况, 以高级别评分。1+ 为弱阳性, 一般无基因扩增, 被认为是正常表达; 3+ 为过度表达, 一般存在基因表达, 有预测意义。

### 1.3 基因扩增

**1.3.1 标本收集** 手术切下肿瘤后立即收集, 原发性肝癌癌组织及癌旁正常组织各两块, (2 cm $\times$ 2 cm), HE 染色确定, 作 PCR 用的标本手术切除后-70 $^{\circ}$ C 冰箱保存至分析, 作免疫组化用的标本进行石蜡包埋及病理切片, 进行对比。

\* 基金项目: 厦门同安区社会发展软科学研究计划项目(2011T0709)。 作者简介: 周志忠, 男, 副主任技师, 主要从事分子生物学与临床输血学研究。

**1.3.2 RNA 提取新鲜肿瘤组织** 取 500 mg 肿瘤组织,加入 1 mL 生理盐水,充分研磨成组织匀浆(或用液氮研磨),取 100  $\mu$ L 匀浆液加 500  $\mu$ L RNA 提取液 A 充分震荡,室温放置 5min,加入 100  $\mu$ L 氯仿,用力震荡 15 s,室温静置 5min,4  $^{\circ}$ C 13 000 r/min 离心 5 min,小心将上层水相转移到干净离心管中,加 300  $\mu$ L 无水乙醇,另加 10  $\mu$ L RNA 提取液 B(内含不溶物,使用前室温溶解并充分混匀)充分混匀,13 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加入 500  $\mu$ L 75%的焦碳酸二乙酯,充分混匀,混匀,13 000 r/min 离心 1 min,小心吸去大部分乙醇,取管敞口在室温空气中干燥 5 min 待乙醇挥发干净,20  $\mu$ L 焦碳酸二乙酯 H<sub>2</sub>O 溶解沉淀。

**1.3.3 PCR 扩增** 上游引物:TGA ATC TTG GTT GTA AAC TTG ACC,下游引物:CTC ATG ATT ACC GCA GCA AA,基因序列 TGA ATC TTG GTT GTA AAC TTG ACC TAA AGA CCA tTTG CAC TTC GTG CCC GAAACG CCG AAT ATA ATC CCA AGC GGT TTG CTG CGG TAA TCA TGA G,取 HER-2/neuPCR Mix 酶系(1 倍的缓冲液,4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>),0.2 mmol/L dNTPs,100 pmol/L 引物,0.5  $\mu$ g 的模板 DNA,1 U<sup>Taq</sup> 酶);室温融化并振荡混匀后,10 000 r/min 瞬时离心 10 s.向样品管(cDNA)、标准品(1 $\times$ 10<sup>6</sup>、1 $\times$ 10<sup>5</sup>、1 $\times$ 10<sup>4</sup> copies/mL)、阴性和质控品分别加入 4  $\mu$ L,10 000 r/min 瞬时离心 30 s.将各反应管放入定量 PCR 仪器的反应槽内,循环条件:PCR 扩增的条件 94  $^{\circ}$ C 变性 3 min,然后 9 4  $^{\circ}$ C 变性 30 s,48~56  $^{\circ}$ C 退火 60 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,45 个循环;72  $^{\circ}$ C 再延伸

10 min。  
**1.4 统计学处理** 采用 SPSS10.0 统计软件包进行分析, $\chi^2$  及校正检验,以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结 果

53 例原发性肝癌,免疫组化法有 11 例(20.7%)出现 HER-2/neu 表达,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。瘤周肝组织均阴性。荧光定量 PCR 法有 15 例 HER-2/neu 表达,占 28.3%,其中高拷贝扩增有 2 例(3.77%),中拷贝表达有 4 例(7.54%)低拷贝表达有 9 例(17.0%),见图 2。HER-2/neu 表达在不同病理类型、肿瘤大小、存活期、部位比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

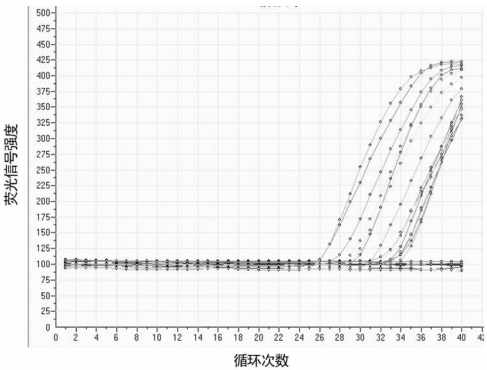


图 1 肝癌组织 HER-2 扩增曲线

表 1 荧光定量 PCR 法检测

| 项目      | 病理类型 |                 | 大小    |       | 存活期  |      | 部位   |      | AFP       |           | 年龄    |       | HBV-DNA |      | 性别   |      |
|---------|------|-----------------|-------|-------|------|------|------|------|-----------|-----------|-------|-------|---------|------|------|------|
|         | HCC  | 其他 <sup>#</sup> | >5 cm | ≤5 cm | <1 年 | ≥1 年 | 癌    | 癌旁组织 | <25 ng/mL | ≥25 ng/mL | <50 岁 | ≥50 岁 | -       | +    | 男    | 女    |
| 拷贝阴性(n) | 22*  | 16*             | 19*   | 19*   | 23*  | 15*  | 38*  | 50*  | 14        | 24        | 22    | 16    | 7       | 31   | 24   | 14   |
| 拷贝阳性(n) | 14   | 1               | 13    | 2     | 14   | 1    | 15   | 3    | 4         | 11        | 10    | 5     | 2       | 13   | 11   | 4    |
| 阳性率(%)  | 38.9 | 5.88            | 40.6  | 9.5   | 37.8 | 6.25 | 28.3 | 5.66 | 22.2      | 31.4      | 31.2  | 23.8  | 22.2    | 29.5 | 31.4 | 22.2 |

<sup>#</sup>:混合型肝癌和肝内胆管癌。\*: $P<0.05$ ,与拷贝阳性比较。

3 讨 论

HER-2/neu 是一种原癌基因,该基因定位于人染色体 17q21,编码 185kD 的跨膜糖蛋白(p185)。p185 蛋白是由 1 255 个氨基酸组成的酪氨酸激酶受体,在羧基端有自身磷酸化位点。主要在胚胎发育时开始表达,成年后正常组织中可检出少量的 P185 蛋白<sup>[1]</sup>。临床中乳腺癌组织表达 HER-2/neu 采用 Herceptin 药靶治疗证明有较好疗效,也证明其与这些肿瘤的发生也有一定相关性。

Nakopoulou 等<sup>[2]</sup>应用免疫组化染色显示 71 例 HCC 中有 21 例表达 HER-2/neu。Heinze 等<sup>[3]</sup>报道 HER-2/neu 与 HCC 的预后相关。Hsu 等<sup>[4]</sup>也发现仅 1 例巨大 HCC 伴肺多发转移患者有 1+ HER-2/neu 的表达。有学者用标准 HER-2/neu 检测 HercepTest 试剂盒,显示仅 4.84%(42/868)的 HCC 有 HER-2/neu 蛋白过度表达,表明 HER-2/neu 蛋白的过度表达不是 HCC 的一个重要预后指标,仅个别病例有可能应用抗 HER-2/neu 单克隆抗体 trastuzumab 治疗<sup>[5]</sup>。曾志武等<sup>[6]</sup>采用免疫组织化学的方法检测肝癌、肝硬化及正常肝组织中 HER-2/neu 蛋白的表达。结果 HER-2/neu 在 PHC、肝硬化及正常肝组织中的表达率分别为 37.5%(15/40)、10%(1/10)和无表达。黄必军等<sup>[7]</sup>应用双色荧光原位杂交技术检测 42 例原

发性肝癌间期细胞核中 HER-2/neu 的扩增,结果在 42 例肝癌中有 9 例 HER-2/neu 扩增,占 21.4%。Vlasoff 等在 HCC、肝细胞腺瘤和正常肝组织中未发现有 HER-2/neu 过度表达和扩增<sup>[8-9]</sup>。阳性结果的不一致,可能与方法学和操作不统一,地域差异有关。“未发现过度表达和扩增”,可能与方法学或操作有关,实验过程降解,必要时与荧光 PCR 法对照,避免漏检。

厦门同安区原发性肝癌高发区,高、中拷贝中,荧光 PCR 法与免疫组化法阳性率一致 11.3%;低拷贝数阳性率(16.9%)高于免疫组化法。可能与荧光 PCR 法敏感度高,免疫组化方法不足引起其重复性不稳定。由于荧光 PCR 法敏感度高、可定量及可标准操作,从基因水平检测,是较好方法,可与免疫组化法联合检测。正常肝组织无表达,肝硬化低表达率(8.3%)弱表达(1+),原发性肝癌表达率 28.3%;生存期、肿瘤大小、病理类型、癌旁组织与 HER-2/neu 的表达差异有统计学意义;正常肝组织无表达,肝硬化和癌旁组织低表达,可见 HER-2/neu 基因在 PHC 的生长、转移可能具有一定的促进作用,可作为 PHC 的预后指标。HER-2/neu 是 Herceptin 药靶基因,原发性肝癌高发区肝癌高、中表达 HER-2/neu 基因,可考虑应用 Herceptin 对 PHC 进行药靶向治疗。

(下转第 944 页)

0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组一般情况比较 T2DM 认知正常组[BMI(24.61±2.22)kg/m²、TG(1.91±0.43) mmol/L、和 HbA1c(9.50±2.47)%]和认知障碍组患者[BMI(25.58±1.73)kg/m²、TG(1.91±0.51)mmol/L、和 HbA1c(10.21±2.61)%]与对照组[BMI(21.24±2.83)kg/m²、TG(1.35±0.25) mmol/L、和 HbA1c(4.92±0.31)%]比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.2 3 组认知功能及炎症因子比较 T2DM 认知障碍组 MMSE 总分(19.13±3.47)分以及表定向力(7.27±2.55)分、记忆力(1.42±0.13)分、语言能力(5.13±0.97)分、注意力和计算力(2.90±1.24)分以及视觉空间能力得分(1.52±0.37)分及血清中炎症因子[IL-6(46.41±5.71)μg/mL、IL-8(0.61±0.15)ng/mL、TNF-α(2.42±0.37)ng/mL]明显高于对照组和 T2DM 认知正常组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.3 炎症因子与 MMSE 评分相关分析 T2DM 患者血清中炎症因子 IL-6、IL-8 和 TNF-α 水平与 MMSE 总分间存在相关性,MMSE 总分随着炎症因子含量的升高而降低。

3 讨 论

认知功能障碍是指各种原因引起的不同程度的认知功能损害<sup>[6]</sup>。流行病学研究发现,糖尿病是认知功能降低的危险因素之一<sup>[7-8]</sup>。动物实验表明,糖尿病小鼠尤其是 2 型糖尿病小鼠存在轻度认知功能障碍且随着病程延长明显加重<sup>[9-10]</sup>。本研究 53.01% 的 T2DM 患者存在不同程度的认知障碍,进一步证实糖尿病可以引起认知功能障碍。

近年来研究表明 T2DM 是一种自身免疫性和炎症性疾病<sup>[11]</sup>。糖尿病认知功能障碍患者血清中 IL-6、TNF-α 水平较高,且与认知功能损伤程度存在一定的相关性;患者血清炎症因子水平升高出现早于临床诊断痴呆,提示炎症反应可能参与认知功能障碍的病理生理过程<sup>[12]</sup>。本研究发现,T2DM 患者认知正常和认知障碍患者血清中 IL-6、IL-8 和 TNF-α 水平明显高于对照组,且 T2DM 认知障碍患者明显高于 T2DM 认知正常患者;血清中 IL-6、IL-8 和 TNF-α 水平与患者认知功能间存在显著的负相关关系,表明炎症因子 IL-6、IL-8 和 TNF-α 可能在 T2DM 认知功能损害中起到非常重要的作用。

综上所述,T2DM 患者认知功能损伤与血清中炎症因子密

切相关,炎症因子水平升高可导致认知功能损伤程度增加,其机制有待于进一步研究。

参考文献

[1] Biessels GJ, van der Heide LP, et al. Ageing and diabetes: implications for brain function[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 441(1/2): 1-14.

[2] 高伟, 杨敏, 张秀丽, 等. 2 型糖尿病患者记忆能力的临床研究[J]. 山东大学学报: 医学版, 2006, 44(9): 869-871.

[3] Allen KV, Frier BM, Strachan MW. The relationship between type 2 diabetes and cognitive dysfunction: longitudinal studies and their methodological limitations[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 490(1/3): 169-175.

[4] 陈刚, 刘淑娟, 傅飞还. 2 型糖尿病与认知功能障碍[J]. 内科理论与实践, 2012, 7(3): 160-164.

[5] Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? [J]. Int Rev Neurobiol, 2007, 82(1): 235-246.

[6] 王征宇, 张明园. 中文版简易智能状态检查(MMSE)的应用[J]. 上海精神医学, 1989, 7(3): 108-111.

[7] Luehsinger JA, Reitz C, Patel B, et al. Relation of diabetes to mild cognitive impairment[J]. Arch Neurol, 2007, 64(4): 570-575.

[8] Ebady SA, Arami MA, Shafigh MH. Investigation on the relationship between diabetes mellitus type 2 and cognitive impairment [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 82(3): 305-309.

[9] Li ZG, Zhang W, Sima AA. Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1817-1824.

[10] 王宪玲, 贾建平. 自发性 2 型糖尿病小鼠发病早期认知功能的研究[J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(1): 75-77.

[11] Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes [J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1111-1119.

[12] Weaver JD, Huang MH, Albert M, et al. Interleukin-6 and risk of cognitive decline: MacArthur studies of successful aging[J]. Neurology, 2002, 59(3): 371-378.

(收稿日期: 2012-11-09)

(上接第 942 页)

参考文献

[1] Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene[J]. Science, 1985, 230(4730): 1132-1139.

[2] Nakopoulou L, Stefanaki K, Filaktopoulos D, et al. C-erb-B-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study[J]. Histol Histopathol, 1994, 9(4): 677-682.

[3] Heinze T, Jonas S, Krüster A, et al. Determination of the oncogenes p53 and C-erb B2 in the tumour cytosols of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and correlation to survival time[J]. Anticancer Res, 1999, 19(4A): 2501-2503.

[4] Hsu C, Huang CL, Hsu HC, et al. HER-2/neu overexpression is rare in hepatocellular carcinoma and not predictive of anti-HER-2/

neu regulation of cell growth and chemosensitivity[J]. Cancer, 2002, 94(2): 415-420.

[5] 张树辉, 冼志红, 丛文铭, 等. 肝细胞癌 8 号染色体微卫星变异的研究[J]. 中德临床肿瘤学杂志: 英文版, 2004, 3(1): 5-10.

[6] 曾志武, 易继林, 刘天威, 等. HER-2/neu 基因在原发性肝癌中的表达及意义[J]. 临床外科杂志, 2003, 11(5): 282-284.

[7] 黄必军, 黄铁军, 梁启万, 等. 应用双色 FISH 技术检测肝癌中 HER-2 的定量扩增及其临床意义[J]. 遗传学报: 英文版, 2001, 28(9): 793-800.

[8] 黄必军, 朱振宇, 梁启万, 等. 肝细胞癌中 p53 基因的缺失与 HER-2 基因的扩增及其意义[J]. 中华病理学杂志, 2003, 32(1): 20-24.

[9] Vlasoff DM, Baschinsky DY, De Young BR, et al. C-erb B2 (Her2/neu) is neither overexpressed nor amplified in hepatic neoplasms [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2002, 10(3): 237-241.

(收稿日期: 2012-11-09)