

• 论 著 •

肝癌患者 WNT 通路分子 C-myc 和 β -catenin 表达水平与恶性程度的关系分析*

冯 喆¹, 檀喜玲², 高 芳³

1. 邯郸市中心医院普外科, 河北邯郸 056001; 2. 邯郸市人民医院消化内科, 河北邯郸 056009;
3. 邯郸市第一医院普外科, 河北邯郸 056002

摘 要:目的 探究 WNT 通路分子 C-myc 癌基因(C-myc)和 β -连环蛋白(β -catenin)与原发性肝癌患者肝癌的恶性程度、临床分级、转移及患者的预后关系。**方法** 选择 2019 年 1 月至 2022 年 1 月在邯郸市中心医院收治的肝癌患者 84 例作为观察组,同时收集肝硬化患者和乙型肝炎患者共 60 例作为对照组,收集患者病理组织标本,采用免疫组化法检测两组患者组织中 C-myc 和 β -catenin 的表达水平,分析 C-myc、 β -catenin 与原发性肝癌患者临床病理特征的关系及患者预后的关系。**结果** 观察组 C-myc 和 β -catenin 的阳性率均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);高甲胎蛋白(AFP)水平、无包膜或包膜不完整、低中分化肿瘤、临床分期为Ⅲ~Ⅳ期、病理类型为胆管上皮癌、混合型肝癌及出现肝内外转移的肝癌患者 C-myc 和 β -catenin 阳性率较高,差异有统计学意义($P<0.01$);肝癌患者 1、2、3 年生存率分别为 71.31%、52.35%、36.20%,随访 3 年存活患者的 C-myc 和 β -catenin 阳性率低于 1 年及 2 年存活患者,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 组织中 C-myc 和 β -catenin 阳性率与原发性肝癌患者 AFP 水平、肿瘤包膜情况、分化程度、临床分期、组织学类型及预后具有一定关系。

关键词:肝癌; 恶性程度; C-myc 癌基因; β -连环蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.01.010 **中图法分类号:**R735.7

文章编号:1673-4130(2023)01-0054-05 **文献标志码:**A

Relationship between Wnt pathway molecular C-myc and β -catenin expression and malignancy in patients with liver cancer*

FENG Zhe¹, TAN Xiling², GAO Fang³

1. Department of General Surgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China;
2. Department of Gastroenterology, Handan People's Hospital, Handan, Hebei 056009, China;
3. Department of General Surgery, Handan First Hospital, Handan, Hebei 056002, China

Abstract: Objective To explore the relationship between WNT pathway molecule C-myc oncogene (C-myc) and β -catenin and the malignant degree, clinical grade, metastasis and prognosis of patients with primary liver cancer. **Methods** A total of 84 patients with liver cancer treated in Handan Central Hospital from January 2018 to January 2019 were selected as the observation group, and 60 patients with liver cirrhosis and hepatitis B were collected as the control group. The pathological tissue samples were collected, and the expression levels of C-myc and β -catenin in the tissues of the two groups were detected by immunohistochemistry. Relationship between the expression levels of C-myc β -catenin and clinical features and prognosis of patients with primary liver cancer were analyzed. **Results** The positive rates of C-myc and β -catenin in the observation group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). The positive rates of C-myc and β -catenin were higher in patients with high alpha fetoprotein (AFP) level, no capsule or incomplete capsule, low and moderately differentiated tumor, clinical stage of Ⅲ—Ⅳ, pathological type of cholangioepithelial carcinoma, mixed liver cancer and liver cancer with extrahepatic and extrahepatic metastasis, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). The 1-year, 2-year and 3-year survival rates of patients with liver cancer were 71.31%, 52.35% and 36.20%, respectively. The positive rates of C-myc and β -catenin in patients who survived for 3 years were lower than those in patients who survived for

* 基金项目:河北省医学科学研究课题(20200191)。
作者简介:冯喆,女,主治医师,主要从事肝癌方面的研究。

1 and 2 years, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** The positive rates of C-myc and β -catenin had some relationship with AFP level, tumor envelope, degree of differentiation, clinical stage, histological type and prognosis in patients with primary liver cancer.

Key words: liver cancer; malignancy degree; C-myc oncogene; β -catenin

肝癌是全球最常见的癌症死亡原因,发展中国家的肝病发病率更高,其风险因素包括乙型肝炎病毒感染、丙型肝炎病毒感染、脂肪肝、酒精相关肝硬化、吸烟、肥胖、糖尿病、铁超载和各种饮食暴露^[1-2]。约有 5%~15% 的肝癌患者可以接受手术切除,但患者的预后较差^[3]。肝癌的发生中伴随着多种基因的异常表达和信号通路的调控,细胞学研究表明 WNT 信号通路在肝癌的进展中发挥着重要调控作用, WNT/ β -连环蛋白信号的异常促进了肝癌的发展和进展,原发性肝癌如肝细胞癌(HCC)和胆管癌(CCA)均与 WNT 信号通路的关键分子的异常表达有关^[4-5]。C-myc 癌基因是 WNT 信号通路的重要分子,与多种肿瘤发生发展有关^[6],研究表明通过下调 C-myc 表达水平可以抑制肝癌细胞的增殖分化和迁移,也有研究表明肝癌细胞 C-myc 的表达水平与肿瘤微环境 T 细胞的激活和杀伤调控有关,可以通过与免疫系统的相互作用对肝癌细胞的增殖凋亡发挥调控作用^[7-8],但当前研究多集中于细胞表达水平的研究,临床上 C-myc 的表达水平与肝癌患者的关系研究较少,尤其是与肝癌恶性程度相关性研究较少。 β -连环蛋白(β -catenin)是一种多功能蛋白,是 WNT 通路的重要信号分子,通过与细胞骨架的相互作用协助细胞对细胞外的信号和影响作出反应。研究表明 Wnt/ β -catenin 信号通过依赖 CTNNBIP1 的方式驱动激活和肝肿瘤细胞的进展, β -cateni 的翻译也可以受到 crRNA 的调控促进肝癌细胞生长^[9-10],然而 β -catenin 的表达是否与临床肝癌的分期、病理程度相关尚不明确。因此本研究将通过临床获取的肝癌患者肝癌组织以及相应对照组织,探究组织中 C-myc 与 β -catenin 的表达水平与临床患者 AFP 表达水平、肿瘤包膜情况、分化程度、临床分期、组织学类型及预后的关系进行分析,为肝癌筛查及预后预判提供可能的分子生物标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 1 月至 2022 年 1 月于邯郸市中心医院原发性肝癌患者 84 例,作为观察组,年龄 36~79 岁,平均(59.2±10.4)岁,临床收集手术后的肝癌病理存样样本用于本研究,另收集肝硬化及乙型肝炎患者共 60 例作为对照组,年龄 35~77 岁,平均(59.8±9.6)岁。本研究患者纳入标准:(1)病理诊断明确为肝癌的患者;(2)所有患者术前未接受放疗、抗肿瘤药物治疗及其他治疗;(3)肿瘤未发生远处转移患者;(4)临床资料及病理资料完整患者。排

除标准:(1)心脏、肝脏、肾脏等器官具有器质性功能障碍的患者;(2)术前接受放疗、化疗及其他治疗的患者;(3)肿瘤发生远处转移的患者;(4)临床资料及病理资料不完整的患者;(5)合并有全身性疾病的患者;(6)自身免疫功能障碍的患者。本研究中所有参与者均签署知情同意书并通过医院伦理委员会审核。

1.2 仪器与试剂 二甲苯购于济南凤鸣化工有限公司、无水乙醇、甲醇购于天津市化学试剂研究所有限公司,过氧化氢购于河南亿丰化学有限公司, DAB 显色试剂盒(货号:DA1010) 购于美国 Solarbio 公司,封闭血清(货号:SL050)购于美国 Solarbio 公司; Motic 全自动沉降式制片系统,型号: Motic(型号 Asps), DZK-6050 台式真空烘箱购于上海笃特科研仪器有限公司, Primo Star iLED 显微镜购于德国蔡司公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 将组织标本置于 10% 中性甲醛溶液固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡标本经切片机切为 4 μ m 连续切片,蒸馏水漂洗后将载玻片放入二甲苯-二甲苯-100%乙醇-100%乙醇-95%乙醇-90%乙醇-80%乙醇-70%乙醇进行脱蜡,在清水中冲洗,加入 3% H₂O₂ 浸泡 10 min,去内源性的过氧化氢酶,于清水中洗两次,加入柠檬酸缓冲液,放入微波炉中蒸煮 3 min,冷却至室温后,去除柠檬酸缓冲液,清水洗 2 次,并将载玻片置于 PBS 中 5 min,洗 2 次,擦干组织周围的 PBS 液,用血清封闭样本非特异性的位点,置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中 30 min,将温箱中的载玻片取出,用吸水纸擦干载玻片反面和正面组织周围的血清,加入特异性一抗 Anti-C-myc antibody (货号:ab32072,英国 abcam 公司,稀释比 1:100)和 Anti-beta Catenin antibody (货号 ab32572,英国 abcam 公司,稀释比 1:250),将载玻片从冰箱中取出,放入 PBS 中洗 3 次,每次 5 min,擦干组织周围的 PBS 后加上二抗,然后置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中 30 min, DAB 显色并复染,与显微镜下观察,确定病理阳性程度,病理判定阳性标准如表 1 所示。

表 1 蛋白免疫组织化学检测的临床诊断标准			
显色强度计分	标记	阳性细胞比例	标记
无显色	0 分	<10%	0 分
淡黄色	1 分	10%~30%	1 分
棕黄色	2 分	>30%~60%	2 分
棕褐色	3 分	>60%	3 分

1.3.2 研究方法 完整收集本研究所需的所有肝癌患者的临床基本信息,包括性别、年龄、乙型肝炎病毒感染情况、血清甲胎蛋白(AFP)检测水平、肿瘤最大径、肿瘤数目、肿瘤分化程度、肿瘤包膜情况、临床分期判定、病理类型分型、肝内外转移及术后 3 年随访生存情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用百分率表示;计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学。

2 结 果

2.1 入组样本 C-myc 和 β -catenin 阳性率的分析
观察组 C-myc 和 β -catenin 阳性率均显著高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.2 入组样本 C-myc 和 β -catenin 阳性率与肝癌临

床病理资料的关系 C-myc 和 β -catenin 阳性率在不同性别、年龄、肿瘤最大径、肿瘤数目及是否合并乙型肝炎病毒感染患者之间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而不同 AFP 水平、包膜完整程度、肿瘤分化程度、临床分期水平、病理类型分型与患者的 C-myc 和 β -catenin 阳性率相关,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 两组 C-myc 和 β -catenin 阳性率比较[n(%)]			
组别	n	C-myc	β -catenin
观察组	84	51(60.71)	60(71.42)
对照组	60	11(18.33)	16(26.67)
χ^2		21.364	24.401
P		<0.01	<0.01

注: χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 3 C-myc 和 β -catenin 与肝癌临床病理参数的关系[n(%)]

临床资料	n	C-myc	χ^2	P	β -catenin	χ^2	P
性别			0.085	0.797		0.414	0.527
男	60	45(75.00)			36(60.00)		
女	24	17(70.83)			16(66.67)		
年龄(岁)			0.226	0.543		0.228	0.648
≥60	34	23(67.64)			20(58.82)		
<60	50	38(76.00)			32(64.00)		
乙型肝炎病毒感染			0.095	0.766		0.018	0.880
是	64	48(75.00)			40(62.50)		
否	20	15(75.00)			12(60.00)		
AFP(ng·mL ⁻¹)			12.539	<0.01		26.535	<0.01
≤400	36	20(55.56)			11(30.55)		
>400	48	43(89.58)			40(83.33)		
肿瘤最大径(cm)			0.196	0.534		0.004	0.939
<5	23	16(69.56)			14(60.86)		
≥5	61	47(75.80)			38(62.29)		
肿瘤数目			0.357	0.557		0.079	0.757
单发	62	47(75.81)			38(61.29)		
多发	22	15(68.18)			14(63.63)		
肿瘤包膜			25.761	<0.01		28.716	<0.01
有包膜	21	7(33.33)			3(14.28)		
无包膜或包膜不完整	63	56(88.89)			49(77.78)		
分化程度			26.282	<0.01		32.232	<0.01
低分化	32	30(93.75)			28(87.50)		
中分化	34	27(79.41)			23(67.64)		
高分化	18	5(27.78)			1(5.56)		
临床分期			6.452	0.041		6.452	0.011
I~II期	55	36(65.45)			29(52.72)		
III~IV期	29	27(93.19)			23(79.31)		

续表 3 C-myc 和 β -catenin 与肝癌临床病理参数的关系[n(%)]

临床资料	<i>n</i>	C-myc	χ^2	<i>P</i>	β -catenin	χ^2	<i>P</i>
组织学分型				0.016			0.043
肝细胞癌	52	36(69.23)			28(53.84)		
胆管上皮癌	26	24(92.30)			20(76.92)		
混合型肝癌	4	4(100.00)			4(100.00)		
肝内外转移			18.623	<0.01		28.673	<0.01
是	44	40(90.91)			39(88.63)		
否	40	21(52.50)			13(32.50)		

注：—表示无数据。

2.3 不同生存率患者 C-myc 和 β -catenin 阳性率分析 入组的肝癌患者均进行 3 年随访,结果表明肝癌患者 1、2、3 年生存率分别为 71.31%、52.35%、36.20%,随患者生存时间的延长,C-myc 和 β -catenin 阳性率降低,随访 3 年存活的患者 C-myc 和 β -catenin 阳性率显著高于 1 年生存与 2 年生存的患者,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 4。

表 4 不同生存率患者 C-myc 和 β -catenin 阳性率的比较分析[n(%)]

生存	<i>n</i>	C-myc	β -catenin
1 年	59	23(38.98)	24(40.67)
2 年	44	9(20.45)	7(15.91)
3 年	31	3(9.67)	2(6.45)
χ^2		12.611	13.918
<i>P</i>		<0.01	<0.01

3 讨 论

肝癌是肝脏恶性肿瘤,原发性肝癌多起源于肝脏的上皮或间叶组织,肝癌主要发病原因为慢性乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染^[11]。中国的肝癌发病率占全球肝癌发病率的一半以上,建立公共无烟环境,减少吸烟与二手烟暴露,还有控制肥胖和改善生活方式,积极开展肿瘤筛查等,可显著降低肝脏癌症疾病负担^[12]。肝癌早期通常没有明显的症状,因此患者发现的时候大多数已经处于中晚期,探究肝癌的诊断标志物和特异性表达分子对临床具有重要意义。当前通过基因组学、转录组学筛选的大量肝癌恶性程度相关基因,但结合临床数据进行大数据分析对肝癌发生机制的各种分子生物学、遗传学和免疫组织化学研究较少;因此,确定肝癌发生发展过程中特异性表达的分子作为诊断、预后和预测性生物标志物具有较好的研究价值和应用前景^[13-14]。

WNT 信号通路分子 C-myc 和 β -catenin 在肝癌进展中会发生异常表达,是肝细胞再生所必需的,并且在肝细胞稳态、细胞更新过程、血管分泌调节中发挥关键作用,Wnt/ β -catenin 信号通路参与肝脏疾病

进展的所有阶段,从最初的肝损伤到炎症、纤维化、肝硬化以及肿瘤的发生及进展均有所参与,异常的 Wnt/ β -catenin 信号会促进包括癌症在内的不同肝脏疾病的发生和进展^[15],细胞学实验证实肝癌细胞中 C-myc 的表达水平可以受到 ACSL4/SREBP1 途径的调控,从而对重组肝癌细胞中的脂肪酸代谢产生影响^[16],也有研究证实 C-myc 是调控肝癌细胞增殖分化的靶向基因,prostate 1 的六种跨膜上皮抗原通过靶向肝癌细胞中的 C-myc 加速肝癌细胞增殖与分化^[17],临床实验通过多组学联合分子筛选重要特征分子,发现 C-myc 和 wnt/ β -catenin 通路是主要富集的信号通路^[18], β -catenin 可以受到 PPAR γ 共激活因子-1 α 的调控,通过 PPAR γ 依赖的 WNT/PDK1 抑制 Warburg 效应抑制肝癌转移^[19], β -catenin 也可以通过 KIF2C/mTORC1 信号参与肝癌的转移,并且与患者的不良预后相关^[20],但与高甲胎蛋白水平、无包膜或包膜不完整、低中分化肿瘤、临床分期为Ⅲ~Ⅳ期、病理类型等完善的病理分析的关系上未得到充分的研究,因此本研究通过临床收集临床资料详尽的 84 例肝癌患者,采用免疫组化分析 C-myc 和 β -catenin 的阳性表达水平与原发性肝癌患者肝癌的恶性程度、临床分级、转移及患者的预后关系,证实了本研究发现,原发性肝癌患者 C-myc 和 β -catenin 阳性率较肝硬化及肝炎患者高,且 C-myc 和 β -catenin 阳性率与肝癌病理类型、临床分期、分化程度、肿瘤包膜情况均存在一定关系,表明 C-myc 和 β -catenin 可能参与肝癌患者肿瘤的浸润生长过程。其机制为:癌细胞与内皮细胞产生黏附作用,进而通过内皮细胞间隙移行至内皮下导致肿瘤转移,其对应配体可与癌细胞表面整合素结合,促进癌细胞黏附,由于 WNT 信号通路会对基质金属蛋白酶 2(MMP2)和 MMP9 进行调控^[21],促进 MMP 降解基质,导致癌细胞向间质浸润,引起肿瘤转移,同时本研究通过对患者进行了 3 年的跟踪随访发现,随患者生存率的提升,其癌组织 C-myc 和 β -catenin 阳性率均降低,提示二者可能存在负相关关系,表明上述各因子异常表达均参与原发性肝癌发病及病理过程,同时可能对肝癌患者预后有预测作用。

综上所述,本研究证实肝癌组织中 C-myc 和 β -catenin 阳性率与原发性肝癌患者 AFP 水平、肿瘤包膜情况、分化程度、临床分期、组织学类型及预后均有一定关系,且可能参与肝癌的侵袭、转移。本研究可以进一步扩大样本量,绘制受试者工作特征曲线,分析灵敏度和特异度,探究 C-myc 和 β -catenin 作为分子标志物的可能性,为临床早诊或预测肝癌患者的生物学标志物提供基因集,并为临床诊断和治疗提供新思路。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.

[2] MARCO S, FLORIAN H, LUANA D, et al. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer[J]. Nature, 2018, 562(7725): 69-75.

[3] YU L L, JINCHUL KIM, LEI J, et al. MTR4 drives liver tumorigenesis by promoting cancer metabolic switch through alternative splicing[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 708.

[4] HE S A, TANG S L. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 110851.

[5] KUMARDEEP C, OLIVIER B P, LU L Q, et al. Deep learning-based multi-omics integration robustly predicts survival in liver cancer[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(6): 1248-1259.

[6] YANG X Y, SHAO F, GUO D, et al. WNT/ β -catenin-suppressed FTO expression increases m 6 A of c-Myc mRNA to promote tumor cell glycolysis and tumorigenesis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 462.

[7] YANG P Y, JIANG Y, PAN Y, et al. Mistletoe extract Fraxini inhibits the proliferation of liver cancer by down-regulating c-Myc expression[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6428.

[8] J DAVID ANWANWAN, SANTOSH KUMAR SINGH, SHRITI SINGH, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1873(1): 188314.

[9] LIANG W C, WONG C W, LIANG P P, et al. Translation of the circular RNA circ β -catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway[J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 84.

[10] FU X M, ZHU X Y, QIN F J, et al. Linc00210 drives Wnt/ β -catenin signaling activation and liver tumor progression through CTNNBIP1-dependent manner[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 73.

[11] LIU Y, GUO L W, XU H A, et al. Risk of liver cirrhosis

in HBV/HCV-infected individuals with first-degree relatives who have liver cancer; development and validation of a simple model[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2021, 15(2): 111-120.

[12] SHI J F, CAO M M, WANG Y T, et al. Is it possible to halve the incidence of liver cancer in China by 2050? [J]. Int J Cancer, 2021, 148(5): 1051-1065.

[13] AMIT G SINGAL, YUJIN HOSHIDA, DAVID J PINATO, et al. International liver cancer association (ILCA) white paper on biomarker development for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2021, 160(7): 2572-2584.

[14] SÉBASTIEN T, MATTHEW G A, ANTHOULA L, et al. Claudin-2 promotes colorectal cancer liver metastasis and is a biomarker of the replacement type growth pattern[J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 657.

[15] DONATO I, SHI J J, KI HONG L, et al. A spatial vascular transcriptomic, proteomic, and phosphoproteomic atlas unveils an angiocrine Tie-Wnt signaling axis in the liver[J]. Dev Cell, 2021, 56(11): 1677-1693.

[16] CHEN J R, DING C F, CHEN Y H, et al. ACSL4 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma via c-Myc/SREBP1 pathway[J]. Cancer Lett, 2021, 502: 154-165.

[17] KAZUTAKA I, HAJIME N, KOHICHI T, et al. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 accelerates cell proliferation by targeting c-Myc in liver cancer cells[J]. Oncol Lett, 2021, 22(1): 546.

[18] LIU Z C, LI Y Q, LIU Y, et al. Expression and clinical significance of BDH1 in liver cancer[J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(48): e28013.

[19] ZUO Q Z, HE J, ZHANG S, et al. PPAR γ coactivator-1 α suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting warburg effect by PPAR γ -dependent WNT/ β -catenin/pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1 axis[J]. Hepatology, 2021, 73(2): 644-660.

[20] WEI S, DAI M M, ZHANG C. KIF2C: a novel link between Wnt/ β -catenin and mTORC1 signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. Protein Cell, 2021, 12(10): 788-809.

[21] ISHMAT A Y, S MOHANA SUNDARAM, ANASUYA BANERJEE, et al. Netrin-like domain of sFRP4, a Wnt antagonist inhibits stemness, metastatic and invasive properties by specifically blocking MMP-2 in cancer stem cells from human glioma cell line U87MG[J]. Exp Cell Res, 2021, 409(2): 112912.