



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.02.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2018.02.010
Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(2):193-198.

· 基础研究 ·

黏蛋白 3 和黏蛋白 4 在结石相关肝内胆管细胞癌中的表达及意义

刘鑫宇, 贺彦宇, 彭创, 彭沙勇, 刘苏来, 杨平洲

(湖南师范大学第一附属医院 / 湖南省人民医院 肝胆外科, 湖南长沙 410005)

摘要

目的: 探讨黏蛋白 3 (MUC3) 和黏蛋白 4 (MUC4) 在结石相关肝内胆管细胞癌 (ICC) 组织中的表达及临床意义。

方法: 用免疫组化法检测 MUC3、MUC4 在 24 例正常胆管组织、44 例肝内肝管结石胆管组织、38 例结石相关 ICC 组织中的表达, 分析两者表达与 ICC 患者临床病理因素及预后的关系。

结果: MUC3 与 MUC4 在 3 种组织中的表达均有统计学差异 (均 $P < 0.05$)。在正常胆管组织、结石患者胆管组织, 结石相关 ICC 组织中 MUC3 的表达阳性率依次降低 (79.2%、56.8%、36.8%), 而 MUC4 的表达阳性率则相反 (29.2%、79.5%、86.8%)。两者的表达均与结石相关 ICC 患者的肿瘤组织学分级、有无淋巴结转移有关, 且 MUC4 的表达与门静脉有无浸润有关 (均 $P < 0.05$)。结石相关 ICC 患者中, MUC3 阳性表达者术后生存率明显高于阴性患者, MUC4 阳性表达患者术后生存率明显低于阴性表达患者 (均 $P < 0.05$)。

结论: 在结石相关 ICC 组织中, MUC3 表达降低, 而 MUC4 的表达升高, 两者表达的变化与结石相关 ICC 的进展、侵袭及转移紧密相关。

关键词

胆管肿瘤; 胆结石; 胆管, 肝内; 黏蛋白 3; 黏蛋白 4
中图分类号: R735.8

Mucin-3 and -4 expressions in hepatolithiasis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and their significance

LIU Xinyu, HE Yanyu, PENG Chuang, PENG Shayong, LIU Sulai, YANG Pingzhou

(Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial People's Hospital/the First Affiliated Hospital, Hunan Normal University, Changsha 410005, China)

Abstract

Objective: To investigate the expressions of mucin-3 (MUC3) and -4 (MUC4) in tissues of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) associated with hepatolithiasis and their clinical significance.

Methods: The MUC3 and MUC4 expressions in the 24 specimens of normal bile duct tissue, 44 specimens of bile duct tissue from hepatolithiasis patients, and 38 specimens of hepatolithiasis-associated ICC were determined by immunohistochemical staining. The relations of MUC3 and MUC4 expressions with clinical factors and

基金项目: 湖南省科技厅科技计划资助项目 (2009SK3079); 湖南省教育厅科学研究资助项目 (17C0963); 湖南省长沙市科技局科技计划资助项目 (kq1706031); 中国博士后科学基金资助项目 (2017M620347)。

收稿日期: 2017-11-27; **修订日期:** 2018-01-16。

作者简介: 刘鑫宇, 湖南师范大学第一附属医院 / 湖南省人民医院硕士研究生, 主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通信作者: 彭创, Email: pengchuangcn@163.com

prognosis of the patients with hepatolithiasis-associated ICC were analyzed.

Results: The positive expression rates of both MUC3 and MUC4 were significantly different in the three different tissues (both $P < 0.05$); in normal bile duct tissue, bile duct tissue from hepatolithiasis patients and hepatolithiasis-associated ICC tissue, the positive MUC3 expression rates were ranked in a decreasing order (79.2%, 56.8% and 36.8%), while the opposite was true for MUC4 (29.2%, 79.5% and 86.8%). In patients with hepatolithiasis-associated ICC, both MUC3 and MUC4 expressions were significantly related to the tumor histological differentiation and the presence or absence of lymph node metastasis, and MUC4 expression was also significantly related to the presence or absence of portal vein invasion (all $P < 0.05$). In patients with hepatolithiasis-associated ICC, the postoperative survival rate in patients with positive MUC3 expression was significantly higher than that in patients with negative MUC3 expression, and in patients with positive MUC4 expression was significantly lower than that in patients with negative MUC4 expression (all $P < 0.05$).

Conclusion: The MUC3 expression is decreased and the MUC4 expression is increased in hepatolithiasis-associated ICC tissue, and the changes of their expressions are closely related to the development, invasion and metastasis of hepatolithiasis-associated ICC.

Key words

Bile Duct Neoplasms; Cholelithiasis; Bile Ducts, Intrahepatic; Mucin-3; Mucin-4

CLC number: R735.8

肝内胆管细胞癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是一种来源于二级以上分支肝内胆管上皮细胞的肝脏原发性恶性肿瘤, 发病率逐年增高, 中位生存时间为 18 个月^[1-3]。虽然 ICC 病因尚不明确, 但伴随着实验技术的发展, 研究^[4-6]发现黏蛋白 3 (MUC3)、黏蛋白 4 (MUC4) 等可评价肿瘤患者的预后。本研究通过应用免疫组织化学的方法检测 38 例结石相关胆管细胞癌中 MUC3、MUC4 的表达, 目的在于探讨以结石为诱因而产生的 ICC 在进展过程中, 患者生存预后与 MUC3 及 MUC4 之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本与试剂

收集湖南省人民医院 2006 年 6 月—2016 年 6 月间来源于肝脏外伤及肝血管瘤行手术切除的正常胆管组织 24 例, 因清除结石而行肝部分切除的胆管组织 44 例, 行肝部分切除、最终病理确诊为结石相关 ICC 的 38 例存档蜡块, 全部患者入选前均未经放化疗及中医中药等治疗, 均行根治性切除手术, 研究中术后随访死亡病例均为本疾病所致, 排除非本疾病死亡病例。鼠抗人 MUC3 多克隆抗体, 工作浓度为 1:200, 鼠抗人 MUC4 多克隆抗体, 工作浓度为 1:200, SP 免疫组织化学检测试剂盒 (SP-0024, 6.0ML), 上述试剂均从北京博奥

森公司购买。

1.2 方法

组织切片, 染色 (步骤: 按 SP 免疫组化产品所介绍方式进行), 烤片, 去蜡, 脱水, 内源性过氧化物酶灭活 30 min, 修复抗原; 一抗 4 °C 冰箱过夜; 二抗经 30 min 孵育, 上述相关步骤进行后均以蒸馏水及 MPBS 分别冲洗 3 min × 3 次。DAB 显色, 复染, 冲洗, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察及拍照。阳性对照以预试验证实为阳性的组织切片, 阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.3 结果判断

MUC3 及 MUC4 染色在胆管上皮细胞胞浆中出现黄色或棕黄色遂判定结果为阳性。以半定量方法对实验结果进行判断: 染色强度逐渐递减为 3 分 (棕褐色)、2 分 (棕黄色)、1 分 (浅黄色)、0 分 (无色); 以染色细胞所占的百分比定义染色范围进行评分, 按总细胞中阳性细胞所占比例分 5 组: >75% 为 4 分, ≤75% 为 3 分, ≤50% 为 2 分, <25% 为 1 分, 无表达细胞为 0 分。阳性细胞所占比例得分与染色强度得分乘积为免疫组化结果, ≥1 分为阳性, 0 分为阴性。

1.4 随访

主要以住院病历, 门诊电话等方式获得患者预后资料, 随访时间截止日期为 2016 年 11 月, 自行手术切除后第 1 天为起始计算生存时间, 随访终止点为对患者进行最后 1 次随访的时间或患者死亡

时间,统计其手术后生存时间及相关情况。

1.5 统计学处理

计数资料应用 χ^2 检验及确切概率法检测,应用SPSS 17.0统计数据包软件行数据处理,制作生存曲线及生存率的计算应用Kaplan-Meier法,生存时间差异应用Log-rank检验进行比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结石相关 ICC 患者随访结果

38例肝内胆管细胞癌患者术后门诊及电话随访至2016年11月,随访结束点为患者最后1次随访

时间或死亡时间,最终随访成功35例,92.1%的随访率,随访中位时间为33(16~62)个月。至随访截止日,有11例患者存活。

2.2 组织形态学及免疫组化检测

正常胆管组织、因清除结石而行肝部分切除的胆管组织、结石相关ICC组织中MUC3表达阳性率各为79.2%、56.8%、36.8%,在3种组织中MUC3表达阳性率差异有统计学意义($P=0.005$);正常胆管组织、因清除结石而行肝部分切除的胆管组织、结石相关ICC中MUC4表达阳性率各为29.2%、79.5%、86.8%,在3种组织中MUC4表达阳性率差异有统计学意义($P<0.001$)(图1)(表1)。

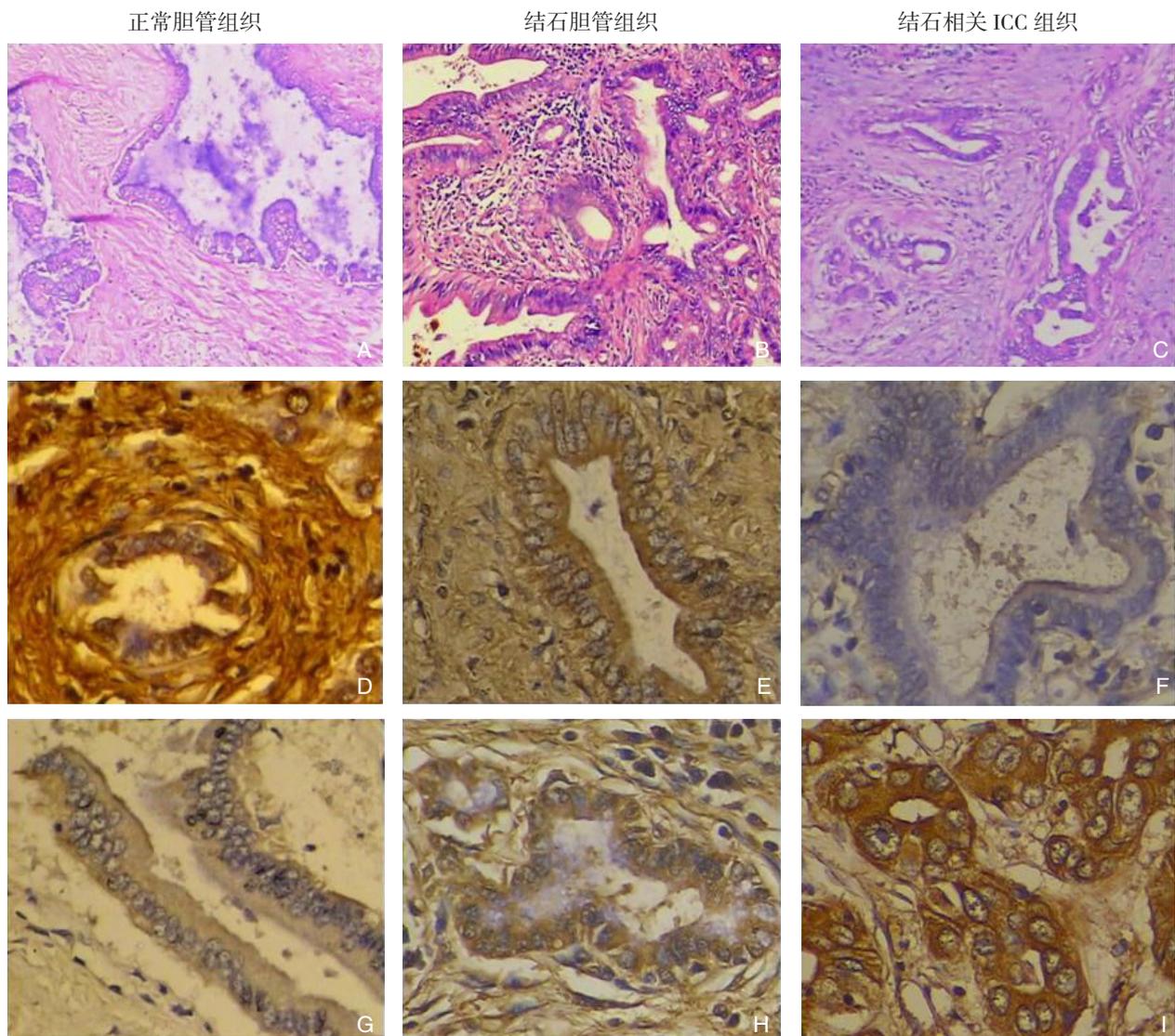


图1 组织形态学及免疫组化检测 A-C: HE染色($\times 100$); D-F: MUC3免疫组化检测($\times 400$); G-I: MUC4免疫组化检测($\times 400$)

Figure 1 Histomorphological and immunohistochemical determination A-C: HE staining($\times 100$); D-F: Immunohistochemical staining for MUC3($\times 400$); G-I: Immunohistochemical staining for MUC4

表 1 MUC3 和 MUC4 在不同组织中的表达 [n (%)]

Table 1 MUC3 and MUC4 expressions in different types of tissues [n (%)]

组织	n	MUC3		MUC4	
		阳性	阴性	阳性	阴性
正常胆管组织	24	19 (79.2)	5 (20.8)	7 (29.2)	17 (70.8)
结石胆管组织	44	25 (56.8)	19 (43.2)	35 (79.5)	9 (20.5)
结石相关 ICC 组织	38	14 (36.8)	24 (63.2)	33 (86.8)	5 (13.2)
P		0.005		<0.001	

2.3 MUC3 和 MUC4 的表达与临床病理参数之间的关系

ICC 患者年龄、性别、肿瘤大小与 MUC3 及 MUC4 的表达均无明显关系 (均 $P>0.05$)，而肿瘤组织学分级、有无淋巴结转移均与 MUC3 及 MUC4 表达有关 ($P<0.05$)；此外，有无门静脉浸润与 MUC3 表达无关 ($P>0.05$)，而与 MUC4 的表达有关 ($P<0.05$) (表 2)。

2.4 MUC3 和 MUC4 的表达与 ICC 患者生存时间的关系

38 例结石相关 ICC 患者中，MUC3 的阳性和阴性表达者分别为 14 和 24 例，MUC4 的阳性和阴性表达者分别为 33 和 5 例。MUC3 阳性及阴性组术后中位总生存期各为 28、19 个月，1、3、5 年生存率各为 92.9%、42.8%、14.3% 和 79.2%、33.3%、4.2%，MUC3 阳性表达组术后生存率较阴性组高 ($P=0.026$)；MUC4 阳性及阴性组术后中位生存期各为 21、44 个月，1、3、5 年生存率各为 81.8%、30.3%、0.06% 和 100.0%、80.0%、40.0%，MUC4 阳性表达组术后生存率较阴性表达组低 ($P=0.04$) (图 2)。

表 2 MUC3 和 MUC4 表达与结石相关 ICC 临床病理参数的关系 [n (%)]

Table 2 Relations of MUC3 and MUC4 expressions with clinical variables of hepatolithiasis-associated ICC [n (%)]

临床病理参数	n	MUC3 阳性	P	MUC4 阳性	P
年龄 (岁)					
< 60	20	6 (30.0)	0.279	18 (90.0)	0.448
≥ 60	18	8 (44.4)		15 (83.3)	
性别					
男	22	9 (40.9)	0.396	20 (90.9)	0.346
女	16	5 (31.3)		13 (81.3)	
肿瘤大小 (cm)					
≥ 2	23	7 (30.4)	0.251	19 (82.6)	0.332
< 2	15	7 (46.7)		14 (93.3)	
组织学分级					
高分化	8	6 (75.0)	0.027	5 (62.5)	0.049
中分化	18	6 (33.3)		16 (88.9)	
低分化	12	2 (16.7)		12 (100.0)	
门静脉浸润					
有	18	6 (33.3)	0.565	18 (100.0)	0.031
无	20	8 (40.0)		20 (100.0)	
淋巴结转移					
有	26	6 (23.1)	0.013	26 (100.0)	0.027
无	12	8 (66.7)		12 (100.0)	

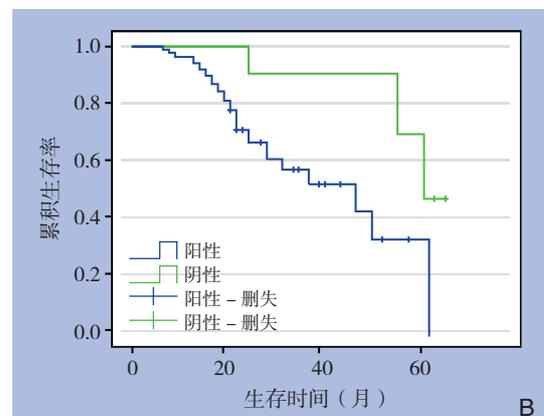
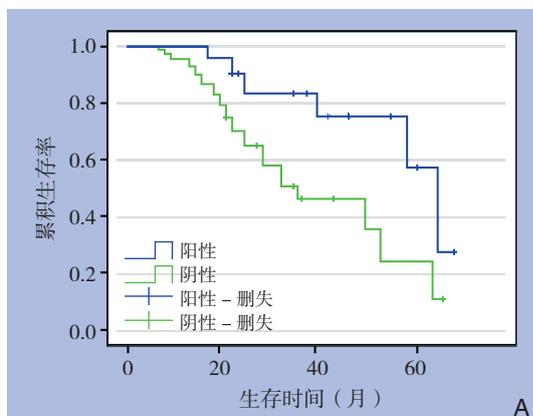


图 2 结石相关 ICC 患者的生存曲线 A: 不同 MUC3 表达患者比较; B: 不同 MUC4 表达患者比较

Figure 2 Postoperative survival curves of patients with hepatolithiasis-associated ICC A: Comparison between patients with different MUC3 expressions; B: Comparison between patients with different MUC4 expressions

3 讨论

MUC3是黏多糖组成的糖蛋白家族中的一员,是人体部分凝胶状分泌物的关键组成部分,主要生理作用包括提供润滑、保护黏膜及作为细胞信号通路等^[7-8]。在关于人类乳腺癌^[9]等研究中,多次揭示MUC3的膜性表达是一个潜在的预后不良特征。但同样有研究^[10]显示,MUC3是健康组织细胞中的成分,在正常的胆管组织、不伴肝硬化的肝细胞癌、胆管癌及胰腺导管腺癌组织中也可表达^[11-12]。据相关报道^[13],在肝内胆管及胆囊细胞中,控制MUC3表达基因的生物学机制非常复杂,并且在结石相关ICC中的相关机制尚不清楚。

本研究中,MUC3多在正常胆管组织细胞中表达,在结石引起炎症的胆管细胞中MUC3表达降低,在结石相关ICC组织细胞中MUC3表达明显降低,提示肿瘤的发生与MUC3含量相关。MUC3具有保护细胞防止被破坏的作用,而炎症抑制了MUC3的表达,其表达降低使细胞防御功能受损导致炎症损伤更重,最终在结石引起的恶变中起到作用。同时,患者年龄、性别、肿瘤大小、门静脉有无浸润与MUC3表达无关,而肿瘤组织学分级、有无淋巴结转移与MUC3表达有关,术后总生存中位时间在MUC3表达阳性组是28个月,同时1、3、5年生存率在MUC3阳性表达组各为92.9%、42.8%、14.3%,生存率比MUC3表达阴性组更高($P=0.026$),提示更高的MUC3表达与更好的预后相伴随。

MUC4与MUC3相似,也是黏多糖组成的糖蛋白家族中的一员,但与MUC3的区别是,MUC4通常在某些正常组织,如呼吸道、胃、小肠、结肠和乳腺中发现^[14-16]。它作为受体酪氨酸激酶ErbB2的一种新型的膜内配体被证实^[17]。通过形成与受体结合的MUC4复合物及MUC4的跨膜亚基对ErbB2的特异性结合,从而诱导ErbB2的酪氨酸磷酸化^[18-19]。此外,MUC4的过度表达可以促进肿瘤细胞的转移,因为其可引起组织紊乱及降低肿瘤细胞与其他细胞和细胞外基质的黏附^[20-21]。另据报道^[22-23],在肿瘤细胞上的MUC4会将表面位点掩盖在细胞毒性免疫细胞上,从而帮助肿瘤细胞从免疫攻击中逃脱。综上所述的特点和机制解释了当MUC4阳性或高表达时,患者总生存期更短的原因。

本研究中,相较于正常胆管组织及因清除结石切除的胆管组织,MUC4更多于结石相关ICC的

胆管组织中表达,提示MUC4作为促进因素存在于胆管细胞的癌变过程中,而细胞在结石引起的炎症中,MUC4也表达出高阳性率,提示慢性炎症也可使MUC4表达增强,从而导致恶变的产生。同时,患者年龄、性别、肿瘤大小与MUC4表达程度无关,而肿瘤组织学分级、有无淋巴结转移及门静脉有无浸润与MUC4表达有关,术后总生存中位时间在MUC4表达阳性组是21个月,同时1、3、5年生存率在MUC4阳性表达组各为81.8%、30.3%、0.06%,生存率比MUC4表达阴性组更低($P=0.04$),提示更高的MUC4的表达与结石相关ICC患者更低的生存率相伴随。

总结,结石相关ICC的发展往往是多因素的结果^[24-25],其中MUC3的更低表达及MUC4的更高表达与结石相关ICC的进展、侵袭及转移紧密相关;检测结石相关ICC组织中MUC3和MUC4的表达程度,可判断结石相关ICC患者预后及作为选择临床治疗手段的相关指标。

参考文献

- [1] Zhang H, Yang T, Wu M, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: Epidemiology, risk factors, diagnosis and surgical management[J]. *Cancer Lett*, 2016, 379(2):198-205. doi: 10.1016/j.canlet.2015.09.008.
- [2] 杭轶, 杨小勇, 李文美. 肝内胆管癌与肝细胞癌临床特征的比较研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2):175-179. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.004.
Hang Y, Yang XY, Li WM. Comparative study of clinical features between intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(2):175-179. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.004.
- [3] 周少君, 黄志勇. 肝内胆管癌根治性切除术后肿瘤复发转移的预后因素分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(8):1024-1029. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.002.
Zhou SJ, Huang ZY. Prognostic factors for tumor recurrence and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma after radical resection[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2014, 23(8):1024-1029. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.002.
- [4] Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, 23(1-2):77-99.
- [5] Velcich A, Yang W, Heyer J, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2[J]. *Science*, 2002, 295(5560):1726-1729.
- [6] Niv Y, Ho SB, Fass R, et al. Mucin Expression in the Esophageal

- Malignant and Premalignant States: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2018, 52(2):91–96. doi: 10.1097/MCG.0000000000000863.
- [7] Li H, Limenitakis JP, Ganai SC, et al. Penetrability of the inner mucus layer: who is out there?[J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(2):127–129. doi: 10.15252/embr.201439943.
- [8] Pickard JM, Chervonsky AV. Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis[J]. *J Immunol*, 2015, 194(12):5588–5593. doi: 10.4049/jimmunol.1500395.
- [9] Rakha EA, Boyce RW, Abd El-Rehim D, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(10):1295–1304.
- [10] van Putten JPM, Strijbis K. Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer[J]. *J Innate Immun*, 2017, 9(3):281–299. doi: 10.1159/000453594.
- [11] Sierzega M, Młynarski D, Tomaszewska R, et al. Semiquantitative immunohistochemistry for mucin (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, and MUC6) profiling of pancreatic ductal cell adenocarcinoma improves diagnostic and prognostic performance[J]. *Histopathology*, 2016, 69(4):582–591. doi: 10.1111/his.12994.
- [12] Baeckström D, Karlsson N, Hansson GC. Purification and characterization of sialyl-Le(a)-carrying mucins of human bile: evidence for the presence of MUC1 and MUC3 apoproteins[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(20):14430–14437.
- [13] Vandenhoute B, Buisine MP, Debailleul V, et al. Mucin gene expression in biliary epithelial cells[J]. *J Hepatol*, 1997, 27(6):1057–1066.
- [14] Vancamelbeke M, Vanuytsel T, Farré R, et al. Genetic and Transcriptomic Bases of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(10):1718–1729. doi: 10.1097/MIB.0000000000001246.
- [15] Mercogliano MF, Inurrigarro G, De Martino M, et al. Invasive micropapillary carcinoma of the breast overexpresses MUC4 and is associated with poor outcome to adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1):895. doi: 10.1186/s12885-017-3897-x.
- [16] Rokutan-Kurata M, Yoshizawa A, Sumiyoshi S, et al. Lung Adenocarcinoma With MUC4 Expression Is Associated With Smoking Status, HER2 Protein Expression, and Poor Prognosis: Clinicopathologic Analysis of 338 Cases[J]. *Clin Lung Cancer*, 2017, 18(4):e273–281. doi: 10.1016/j.clcc.2016.11.013.
- [17] Carraway KL 3rd, Rossi EA, Komatsu M, et al. An intramembrane modulator of the ErbB2 receptor tyrosine kinase that potentiates neuregulin signaling[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(9):5263–5266.
- [18] Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, et al. Cell signaling through membrane mucins[J]. *Bioessays*, 2003, 25(1):66–71.
- [19] Wang L, Zhi X, Zhu Y, et al. MUC4-promoted neural invasion is mediated by the axon guidance factor netrin-1 in PDAC[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32):33805–33822. doi: 10.18632/oncotarget.5668.
- [20] Pino V, Ramsauer VP, Salas P, et al. Membrane mucin Muc4 induces density-dependent changes in ERK activation in mammary epithelial and tumor cells: role in reversal of contact inhibition[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(39):29411–29420.
- [21] Huang X, Wang X, Lu SM, et al. Clinicopathological and prognostic significance of MUC4 expression in cancers: evidence from meta-analysis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7):10274–10283.
- [22] Komatsu M, Yee L, Carraway KL. Overexpression of sialomucin complex, a rat homologue of MUC4, inhibits tumor killing by lymphokine-activated killer cells[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(9):2229–2236.
- [23] Zhu Y, Zhang JJ, Peng YP, et al. NIDO, AMOP and vWD domains of MUC4 play synergic role in MUC4 mediated signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6):10385–10399. doi: 10.18632/oncotarget.14420.
- [24] Maroni L, Pierantonelli I, Banales JM, 等. 遗传学在胆管细胞癌发展中的重要性[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2):151–162. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.001.
- Maroni L, Pierantonelli I, Banales JM, et al. The significance of genetics for cholangiocarcinoma development[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(2):151–162. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.001.
- [25] Maroni L, Pierantonelli I, Banales JM, et al. The significance of genetics for cholangiocarcinoma development[J]. *Ann Transl Med*, 2013, 1(3):28. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2012.10.04.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 刘鑫宇, 贺彦宇, 彭创, 等. 黏蛋白3和黏蛋白4在结石相关肝内胆管细胞癌中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(2):193–198. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.02.010

Cite this article as: Liu XY, He YY, Peng C, et al. Mucin-3 and -4 expressions in hepatolithiasis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and their significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2018, 27(2):193–198. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.02.010