

应^[5]。另外,索非布韦为口服制剂,可有效避免皮下注射引发的不良反应如皮疹、皮肤感染等。在本研究中,我们发现索非布韦与利巴韦林联用能够有效抑制 HCV 慢性感染的患者的 HCV-RNA 载量,口服治疗 4 周内即有 91.3% 的患者 HCV-RNA 阴性,并且在治疗完成后 12 周随访时的 SVR-12 率达 71.7%。我们发现持续 12 周或 24 周用药患者的 SVR-12 率并无明显差异,提示说明索非布韦与利巴韦林的联合用药在用药早期即发挥强有效的抗 HCV 病毒效应、并能长期维持抗病毒效应。此外 Child-Pugh B 级患者的 SVR-12 率与 Child-Pugh A 级患者无统计学差异,提示索非布韦联合利巴韦林在肝功能分级为 Child-Pugh B 级的丙型肝炎患者中同样具有较高的临床有效性。

肝硬化后的门静脉高压引起的侧支循环血流增加可直接表现为食管胃底静脉曲张,在肝硬化代偿期和失代偿期均可发生,而 HVPG 的升高可用于预测肝硬化并发症的发生风险^[6]。本研究中我们证实了索非布韦与利巴韦林联用能够有效降低患者的 HVPG,并且在治疗结束后能够继续降低或维持患者的 HVPG,有效减轻患者的门静脉压力而进一步改善肝功能。

以索非布韦为基础的无干扰素治疗 HCV 慢性感染的治疗相关的不良反应较轻,常见有疲劳、失眠、皮肤瘙痒、头痛等,但多数患者耐受性较好,因严重不良反应而中止治疗率较低(0%~5%)^[7]。在本研究中,

仅有 10 例患者在治疗期间出现皮肤红斑、恶心呕吐、头痛、失眠等轻度不良反应,中止治疗率为 0%,患者的依从性较好。

综上所述,本研究证实了 DAA 药物索非布韦与利巴韦林联用能够有效降低慢性丙型肝炎肝硬化患者的 HVPG 和改善肝功能状态,并且能够在治疗后获得较长期的持续性病毒应答效应,具有较高的临床安全性和有效性。

参 考 文 献

- [1] 张明, 诸葛宇征, 邹晓平, 等. 肝静脉压力梯度与肝硬化患者临床特征的相关性. 中华消化杂志, 2015, 35:530-533.
- [2] 曹甸甸, 陆伦根. 肝静脉压力梯度在肝硬化门静脉高压症患者中的临床应用. 临床肝胆病杂志, 2013, 29:715-718.
- [3] Mandorfer M, Kozbial K, Schwabl P, et al. Sustained virologic response to interferon-free therapies ameliorates HCV-induced portal hypertension. J Hepatol, 2016, 65:692-699.
- [4] 赵西太, 聂青和. 直接抗病毒药物治疗丙型肝炎的毒副作用、药物相互作用及安全性. 临床肝胆病杂志, 2017, 33:1067-1074.
- [5] 屈慧新, 王玉泽, 王彩霞, 等. 新型抗丙型肝炎病毒索非布韦的研究进展. 沈阳药科大学学报, 2016, 33:334-338.
- [6] Vorobioff JD, Groszmann RJ. Hepatic venous pressure gradient measurement in pre-primary and primary prophylaxis of variceal hemorrhage. Ann Hepatol, 2013, 12:22-29.
- [7] Lawitz E. Nucleotide Polymerase inhibitor Sofosbuvir plus Ribavirin for hepatitis C. N Engl J Med, 2013, 368:34-44.

(收稿日期:2018-09-11)

(本文编辑:张妙)

骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白在原发性肝癌组织中的表达及其与临床特征和预后的相关性

张洪川 张玉玺 段丛迪

【摘要】目的 研究骨桥蛋白和埃兹蛋白(Ezrin 蛋白)在原发性肝癌组织中的表达及其与临床特征和预后的相关性。**方法** 将 2012 年 1 月至 2014 年 12 月于濮阳市油田总医院治疗的原发性肝癌手术切除标本 46 例作为研究对象(A 组),进行回顾性分析,同时选取不典型增生肝组织标本 46 例为 B 组,以及正常肝组织标本 46 例作为 C 组,采用原位杂交以及免疫组化法检测骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白在三组中的表达及其与临床特征和预后的相关性。**结果** A 组患者骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白阳性表达率明显高于 B 组与 C 组($P < 0.05$),B 组患者骨桥蛋白阳性表达率高于 C 组($P < 0.05$);骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白的表达水平与患者性别、年龄、HBsAg 阳性表达、有无肝硬化、肿瘤大小、肿瘤分化程度、AFP 水平、肿瘤数目、TNM 分期等临床病理特征无明显相关性($P > 0.05$),而在发生转移与癌组织累计肝被膜患者中骨桥蛋白的阳性表达率明

显高于未发生转移及未累及肝被膜患者($P < 0.05$),且肿瘤越大 Ezrin 蛋白在癌组织中的阳性表达率越高($P < 0.05$);骨桥蛋白阳性患者中位生存时间为 32.10 个月,阴性患者平均生存时间为 37.10 个月,差异具有统计学意义($P < 0.05$),Ezrin 蛋白阳性患者中位生存时间为 30.10 个月,阴性患者平均生存时间为 38.10 个月,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论 骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白在原发性肝癌患者具有较高的阳性表达率,提示骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白在原发性肝癌的发生、发展以及转移中起重要作用;骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白与患者预后不良有密切关系,可通过检测这两种蛋白的阳性表达情况,来监测患者病情变化。

【关键词】 骨桥蛋白;Ezrin 蛋白;原发性肝癌;预后;临床特征

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤之一^[1]。骨桥蛋白是一种带负电的非胶原性骨基质糖蛋白,广泛的分布于多种组织和细胞中^[2-3]。骨桥蛋白被认为与肿瘤的发生具有一定的相关性^[4]。Ezrin 蛋白是细胞骨架与细胞膜之间的连接蛋白,参与了微绒毛的形成并与细胞形态的维持、运动、黏附及生存有关^[5]。近年来骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白在早期细胞免疫应答、肉芽肿炎症、肿瘤发生与转移的作用中倍受关注^[6]。本研究探讨骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白在原发性肝癌组织中的表达及其与临床特征和预后的相关性,旨在为原发性肝癌患者的治疗提供理论依据。

资料与方法

一、一般资料

将 2013 年 1 月至 2016 年 12 月于濮阳市油田总医院治疗的原发性肝癌手术切除标本 46 例作为研究对象(A 组),同时选取不典型增生肝组织标本 46 例(B 组)以及正常肝组织标本 46 例(C 组)。共选取 138 例存档石蜡包埋标本,年龄在 27~76 岁,平均年龄为(45.21 ± 9.34)岁。纳入标准:所有患者均经手术切除治疗,术后病理学确诊为肝癌,患者临床资料齐全,具有术后随访资料;本研究经医院伦理委员会批准,所有患者及家属均知情同意并签署知情同意书。排除标准:(1)存在原发性肾功能障碍者;(2)存在其他系统组织器官恶性肿瘤者;(3)患者术前接受过放疗治疗等。

二、研究方法

(一)免疫组化试剂 浓缩型属鼠抗人骨桥蛋白单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物科技公司;鼠抗人 Ezrin 基因蛋白单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司;免疫试剂盒购自基因科技有限公司。所有操作方式均按照试剂盒说明执行。

(二)免疫组化 SP 法 按照 1:100 稀释骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白抗体,DAB 显色,苏木素复染。一抗用 PBS 缓冲液代替作为空白对照。棕黄色信号表示

阳性,定位于细胞与胞质中。

(三)原位杂交步骤 先在无 RNA 酶的环境中进行操作,用二甲苯组织切片进行脱蜡处理,再经过梯度乙醇水化,在 37℃ 下蛋白酶消化 30 min,在无水乙醇中脱水 10 s,分别滴一滴探针溶液于各切片上,盖上盖玻片,保持 37℃ 室温不变过夜。

(四)TBS 浸泡步骤 先打开盖玻片,TBS 洗片 3 次 3 min。同时于 37℃ 下滴 2~3 滴高辛抗体等待 30 min。TBS 浸泡 3 min。DAB 显色,苏木素复染。如果出现棕黄色颗粒信号表示杂交阳性,定位于胞质,以 TBS 缓冲液代替探针作阴性对照,原发性肝癌中骨桥蛋白与 Ezrin 蛋白阳性于细胞核内表达,DAB 显色,呈棕黄色颗粒,肝癌组织中蛋白质免疫组化染色位于细胞膜与胞质内,呈棕黄色。参照染色强度和阳性表达细胞数来确定判定结果。

三、术后随访

随访方式采用电话、上门、门诊或住院等方式进行,记录肝癌患者术后复发、转移以及死亡情况。

四、统计方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料采用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,计数资料采用率表示, χ^2 进行检验;患者生存时间采用中位数表示,组间比较采用 Log-rank 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、骨桥蛋白在三组标本中的表达情况比较

A 组患者骨桥蛋白阳性率为 76.09%(35 例)、Ezrin 蛋白阳性表达率为 73.91%(34 例)明显高于 B 组的 39.13%(18 例)、50.00%(23 例)与 C 组的 19.57%(9 例)、21.74%(10 例)($P < 0.05$),B 组患者骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白阳性表达率高于 C 组($P < 0.05$)。

二、骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白在肝癌组织中的表达与临床病理特征的关系

骨桥蛋白和 Ezrin 蛋白表达水平与患者性别、年龄、HBsAg 的阳性表达、有无肝硬化、肿瘤大小、肿瘤分化程度、AFP 水平、肿瘤数目、TNM 分期等临床病理特征无明显相关性 ($P > 0.05$), 而在发生转移与癌

组织累及肝被膜患者中骨桥蛋白的阳性表达率明显高于未发生转移与未累及肝被膜患者 ($P < 0.05$), 且肿瘤越大 Ezrin 蛋白在癌组织中的阳性表达率越高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 骨桥蛋白与临床特征的关系(例, %)

临床特征	例数	骨桥蛋白表达		Ezrin 蛋白	
		阳性	阴性	阳性	阴性
性别					
男	37	27(72.97)	10(27.03)	28(75.68)	9(24.32)
女	9	8(88.89)	1(11.11)	6(66.67)	3(33.33)
年龄					
>50 岁	24	18(75.00)	6(25.00)	19(79.17)	5(20.83)
≤50 岁	22	17(77.27)	5(22.73)	15(68.18)	7(31.82)
HBsAg					
阳性	33	24(72.73)	9(27.27)	25(75.76)	8(24.24)
阴性	13	11(84.62)	2(15.38)	9(69.23)	4(30.77)
肝硬化					
无	16	11(68.75)	5(31.25)	10(65.50)	6(37.50)
有	30	24(80.00)	6(20.00)	24(80.00)	6(20.00)
肿瘤大小					
>5 cm	28	21(75.00)	7(25.00)	24(85.71)	4(14.29)
≤5 cm	18	14(77.78)	4(22.22)	10(55.56)	8(44.44)
肿瘤分化程度					
低分化	9	7(77.78)	2(22.22)	4(44.44)	5(55.56)
中分化	31	23(74.19)	8(25.81)	28(90.23)	3(9.68)
高分化	6	5(83.33)	1(16.67)	2(33.33)	4(66.67)
AFP 水平($\mu\text{g/L}$)					
<400	29	21(72.41)	8(27.59)	21(72.41)	8(27.59)
≥400	17	14(82.35)	3(17.65)	13(76.47)	4(23.53)
有无转移					
有	25	21 ^a (84.00)	4(16.00)	23 ^a (92.00)	2(8.00)
无	21	14(66.67)	7(33.33)	11(52.38)	10(47.62)
肿瘤数目					
单个	36	29(80.56)	7(19.44)	28(77.78)	8(22.22)
多发	10	6(60.00)	4(40.00)	6(60.00)	4(40.00)
TNM 分期					
I ~ II 期	32	24(75.00)	8(25.00)	26(81.25)	6(18.75)
III ~ IV 期	14	11(78.57)	3(41.43)	8(57.14)	6(42.86)
累及肝被膜					
是	26	23 ^b (88.46)	3(11.54)	23 ^b (88.46)	3(11.54)
否	20	12(60.00)	8(40.00)	11(55.00)	9(45.00)

注: 与无转移比较, ^a $P < 0.05$, 与未累及肝被膜比较, ^b $P < 0.05$, 与肿瘤 ≤5 cm 比较, ^c $P < 0.05$

三、骨桥蛋白与患者预后状况相关性分析

骨桥蛋白在阳性患者中位生存时间为 32.10 个月,阴性患者平均生存时间为 37.10 个月,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

四、Ezrin 蛋白与患者预后状况相关性分析

Ezrin 蛋白在阳性患者中位生存时间为 30.10 个月,阴性患者平均生存时间为 38.10 个月,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

骨桥蛋白是目前临床上新提出的一种监测肝癌转移与复发的指标^[7]。白治苗等^[8-9]研究了骨桥蛋白在子宫内膜异位中的表达情况,结果证实骨桥蛋白在子宫内膜异位症中具有较高表达水平,并且是诱导子宫内膜异位症发生的关键,为子宫内膜异位症的治疗提供了一种新的治疗思路。胡雪等^[10]研究证实,骨桥蛋白也参与胃癌的发病,可较好预测胃癌的生长/浸润以及转移过程所发生的基因以及分子变化。本研究结果显示,骨桥蛋白在肝癌组织中的阳性表达率明显高于正常组织与不典型增生患者,提示骨桥蛋白在肝癌的预测中具有一定作用,并且参与肝癌的转移,这与以上研究结果相似。且骨桥蛋白阳性表达率越高越影响肝癌患者的预后,这与李颖利^[11]、李欣遥等^[12]学者的研究结果相似。本研究结果证实,肝癌患者可通过检测骨桥蛋白的表达情况来判断肿瘤转移、复发以及预后情况。

Ezrin 蛋白是一种细胞骨架连接蛋白,其对调节细胞活动,如生存、黏附、迁移等具有重要作用^[13]。本研究结果显示,Ezrin 蛋白在肝癌组织中表达率明显上升,并且在术后的随访中发现,患者的生存时间与 Ezrin 蛋白的表达情况有密切相关性,这与黄涛等^[16]研究结果一致。证实了 Ezrin 蛋白在肝癌的发生、发展具有重要意义,对肝癌的治疗起到一定的指导意义。

参 考 文 献

[1] Quaglia A. Hepatocellular carcinoma: a review of diagnostic

challenges for the pathologist. *J Hepatocell Carcinoma*, 2018, 5: 99-108.

- [2] 朱鹤远,雷光华,高曙光,等. 骨桥蛋白干预体外培养人膝关节炎软骨细胞蛋白多糖和 II 型胶原的表达. *中国组织工程研究*, 2016, 20:173-178.
- [3] Sharma CG, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease. *J Periodontol*, 2006, 77: 1674-1680.
- [4] Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem*, 2018, 59:17-24.
- [5] 倪喆,尚希福,孙永进. Ezrin 蛋白及 IL-18 表达与骨肉瘤肺转移患者生存期关系的研究. *中华全科医学*, 2016, 14: 1442-1444.
- [6] 王兴苗,李孟圈,王丽娟等. 乳腺浸润性导管癌中 Caspase-3、OPN 和 Ezrin 蛋白的表达及临床意义. *山东大学学报:医学版*, 2011, 49:141-145.
- [7] 李天然,黄晓斌,黄楚恒,等. 骨髓间充质干细胞对经转化生长因子 β_1 、骨桥蛋白基因沉默肝癌细胞 MHCC97-H 的影响. *中国组织工程研究*, 2017, 21:687-692.
- [8] 白治苗,姚卫卫,李望舒,等. 骨桥蛋白在子宫内膜异位症中介导细胞迁移与依赖核转录因子 κB 通路促进基质金属蛋白酶及尿激酶型纤溶酶原激活物表达中的作用研究. *中国全科医学*, 2016, 19:2930-2934.
- [9] 白治苗,卢玉凤,杨眉,等. OPN 干预子宫内膜异位症腺上皮细胞中 NF- $\kappa B p65$ 表达及其对细胞侵袭性的影响. *重庆医学*, 2016, 45:1163-1166.
- [10] 胡雪,马静静,董卫国. 骨桥蛋白在幽门螺杆菌感染相关性胃癌中的研究进展. *实用医学杂志*, 2017, 33:851-853.
- [11] 李颖利,张宝妮,马为,等. 血浆骨桥蛋白对冠心病诊断及预后的评价作用. *中国介入心脏病学杂志*, 2016, 24:181-185.
- [12] 李欣遥,张良荣,张硕,等. 急性脑梗死患者血清骨桥蛋白水平的改变及其对预后的影响. *中风与神经疾病杂志*, 2016, 33: 211-214.
- [13] 杨旭凯,王养民,李双明. Ezrin 与磷酸化 Ezrin 蛋白在肾透明细胞癌中表达及意义. *临床军医杂志*, 2017, 45:1258-1260.
- [14] 黄涛,梁荣班,陈娟,等. 原发性肝癌组织中 Ezrin 蛋白表达的临床意义及其与预后相关性研究. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32:1400-1402.

(收稿日期:2019-01-04)

(本文编辑:钱燕)