

CFTR 在原发性肝细胞癌中的表达及临床意义^①

谭超^{1ab②}, 曾西^{1ab②}, 何永华^{1ab}, 张硕², 谭盛葵^{1ab③}

(1. 桂林医学院 a. 公共卫生学院, b. 广西环境暴露组学与全生命周期健康重点实验室, 广西 桂林 541199; 2. 徐州医科大学公共卫生学院, 江苏 徐州 221004)

摘要 目的: 探究细胞囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)在原发性肝细胞癌(HCC)中的表达水平及其与患者临床特征及预后的关联。方法: 收集 HCC 患者癌组织和癌旁组织, 检测样本中 CFTR 的基因表达, 分析 CFTR 表达水平与 HCC 患者临床病理特征及预后的关联。结果: CFTR 在 HCC 癌组织中的表达水平低于癌旁组织($P < 0.05$); 患者的各种临床病理特征在 CFTR 低表达组与 CFTR 高表达组间的分布比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 生存分析显示, CFTR 低表达患者的平均生存时间低于 CFTR 高表达患者, 但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); Cox 回归模型分析显示, 癌组织中 CFTR 的表达与 HCC 患者死亡风险无统计学意义($P > 0.05$)。结论: CFTR 在 HCC 中可能是一个抑癌基因, 但尚未发现 CFTR 表达水平与 HCC 患者的临床病理特征及预后的关联。

关键词: 肝细胞癌; 细胞囊性纤维化跨膜转导调节因子; 临床特征

中图分类号: R735.7

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)02-0024-07

Expression and clinical significance of CFTR in the primary hepatocellular carcinoma^①

TAN Chao^{1ab②}, ZENG Xi^{1ab②}, HE Yonghua^{1ab}, ZHANG Shuo², TAN Shengkui^{1ab③}

(1. a. School of Public Health, b. Guangxi Key Laboratory of Environmental Exposomics and Entire Lifecycle Health, Guilin Medical University, Guilin 541199; 2. School of Public Health, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

Abstract Objective: To investigate the expression level of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the primary hepatocellular carcinoma (HCC), and the association between CFTR and clinical characteristics and prognosis of HCC patients. Methods: Cancer and para-cancer tissues of HCC patients were collected. The gene expressions of CFTR was detected, and the correlation between the expression level of CFTR and the clinicopathological features and the prognosis of HCC patients was

① 基金项目: 广西高校中青年教师(科研)基础能力提升项目(2019KY0540)。

② 第一作者简介: 谭超, 博士, 助理研究员, 研究方向为肝细胞癌分子流行病学; 曾西, 博士, 讲师, 研究方向为肝细胞癌分子流行病学。

③ 通信作者: 谭盛葵, E-mail: sktan2008@sina.cn。

analyzed. Results: The expression level of CFTR in HCC tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues ($P < 0.05$); there was no statistical significance in the distribution of various clinicopathological features between the low-expression CFTR group and the high-expression CFTR group ($P > 0.05$); survival analysis showed that the mean survival time of patients with low-expression CFTR group was lower than that of patients with high-expression CFTR group, but the difference was no statistical significance between two groups ($P > 0.05$); Cox regression model analysis showed that there was no statistical significance between the expression of CFTR in HCC tissues and the risk of death in HCC patients ($P > 0.05$). Conclusion: CFTR may be a tumor suppressor gene in HCC, but no correlation has been found between the CFTR expression level and clinicopathological features and prognosis of HCC patients.

Keywords: hepatocellular carcinoma; cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; clinical features

细胞囊性纤维化跨膜转导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白家族的一员,是环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)介导的ATP门控跨膜氯离子通道蛋白,具有调节氯离子跨膜转运的功能^[1]。CFTR在体内多种生物学过程中发挥重要的调控作用,如胚胎发育、上皮细胞分化和上皮间充质转变等。CFTR所调控的生物学功能中大部分与恶性肿瘤的生物学特性密切相关。因此,研究者们认为CFTR不仅仅是一个离子调控蛋白,还是一个与癌症密切相关的因子^[2]。目前已有研究发现,CFTR在胃肠道癌^[3]、乳腺癌^[4]、卵巢癌^[5]等多种恶性肿瘤的发生发展中存在调控作用。在已报道的研究中,一部分结果显示,CFTR是抑癌因子,但是也有一部分研究发现,CFTR的异常高表达与肿瘤发生、癌细胞增殖、侵袭等恶性表型相关,可见CFTR是致癌因子还是抑癌因子仍存在争议。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的消化系统恶性肿瘤,是原发性肝癌中最常见的类型。HCC预后差、死亡率高,严重威胁人类健康,是全球范围内的重大公共卫生问题,进行早期预防与控制尤为重要,但HCC的致病机制尚未完全阐明。目前,关于CFTR在HCC中的作用研究较少。鉴于此,本研究通过探讨CFTR在HCC患者癌组织和癌旁组织中的表达水平,分析CFTR表达水平与

HCC患者临床病理特征及预后的关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016—2018年在广西医科大学附属肿瘤医院行手术治疗的新发HCC患者67例为研究对象,其中男58例,女9例;平均年龄(51.09±11.04)岁;最小年龄16岁,最大83岁;有肿瘤家族史的16例,有HBV感染史的57例,42例存在肝硬化,29例有微血管侵犯。本研究已获得桂林医学院医学伦理委员会审核通过(审核编号:2022120901)。

纳入标准:①术后经病理学检验诊断为原发性HCC。②手术治疗前未经过化疗、放疗或其他抗肿瘤治疗。

排除标准:①合并其他恶性肿瘤的患者。②合并自身免疫疾病的患者。

1.2 临床资料获取

编制专门的调查问卷,由调查员从广西医科大学附属肿瘤医院病历系统收集所有研究对象的基本信息和临床病理特征信息。基本信息包括:姓名、性别、出生日期、肿瘤家族史、饮酒史等。临床信息包括:肝硬化、乙肝两对半、肿瘤数目、肿瘤大小、术前各项肿瘤标志物及肝功能指标化验结果、肿瘤分期、组织分化程度等。

1.3 患者随访

自患者出院之日起接受定期随访,随访问隔为6

个月,随访方式为电话随访和当面访视相结合的主动随访。随访内容主要包括生存状态、生存时间、是否转移或复发等,如果电话随访发现患者已死亡,须明确患者的死亡时间和死亡原因。本研究中所有研究对象随访时间截止至 2021 年 12 月 27 日。

1.4 实验方法

1.4.1 组织样本采集及总 RNA 提取 在组织样本离体 30 min 内,切取适量组织放入冻存管后立即置于液氮中保存。使用 Trizol 试剂[购自广西(南宁)卓一生物技术有限公司]按照说明书操作步骤提取组织总 RNA,用 SynergyH1 多功能酶标仪检测样本

的浓度及纯度。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 检测 首先使用 TAKARA 逆转录试剂盒(购自南宁科迪生物技术有限公司)将组织总 RNA 逆转录为 cDNA。然后使用 TAKARA 荧光定量 PCR 试剂盒(购自南宁科迪生物技术有限公司)在 Step One Plus 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪[购自赛默飞尔科技(北京)有限公司]上进行 qRT-PCR,以 β -actin 作为内参基因,所有引物由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 的引物序列

基因名称	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
CFTR	ACTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCC	CGAAGGCACGAAGTGTCATAGTC
β -actin	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAAGGCA

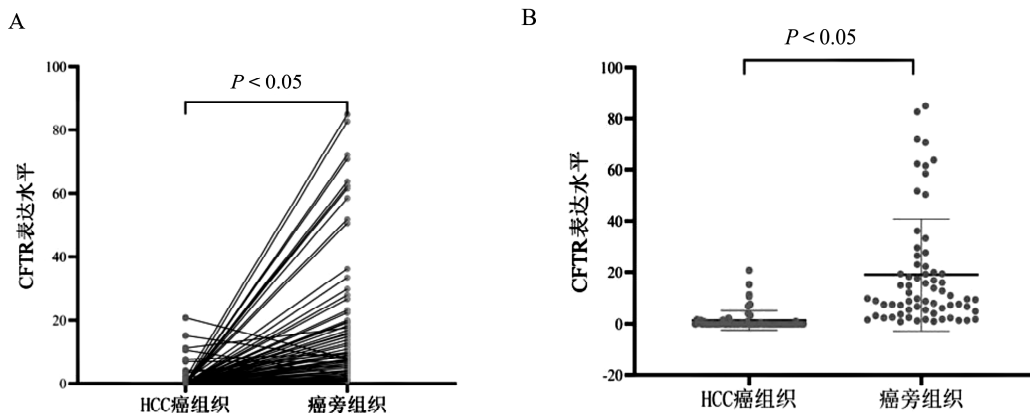
1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,使用 GraphPad Prism 8.0 软件作图,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;计数资料以 n 、% 表示,采用 χ^2 检验;运用 K-M 法分别绘制两组的生存曲线,用 Logrank 法检验生存曲线的差异;采用 Cox 回归模型对肝癌组织中 CFTR 表达量与 HCC 患者死亡风险的关系进行多因素分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CFTR 在 HCC 患者癌组织和癌旁组织中的表达水平

CFTR 在 HCC 患者癌组织和癌旁组织中的表达水平见图 1。CFTR 在 92.5% (62/67) 患者的癌组织中表达水平均低于其癌旁组织,见图 1A。CFTR 在 HCC 癌组织中的平均表达水平为 (1.39 ± 3.74) ,在癌旁组织中的平均表达水平为 (19.08 ± 21.77) ,CFTR 在 HCC 癌组织中显著下调 ($t = -6.397, P < 0.05$),见图 1B。



A. CFTR 表达水平的连线图;B. CFTR 表达水平的散点图

图 1 CFTR 在 HCC 癌组织和癌旁组织中的表达水平

2.2 CFTR 表达水平与 HCC 患者临床病理特征之间的关联

以 CFTR 在 67 例 HCC 患者癌组织中表达量的中位数($M=0.033$)为界,将 67 例患者分为 CFTR 低表达组和 CFTR 高表达组,分析各个临床病理特征

在两组间的分布差异。研究结果显示,两组年龄、性别、肿瘤家族史、HBV 感染史、肝硬化、微血管侵犯、肿瘤个数、肿瘤最大直径、BCLC 分期、Child-Pugh 分级、Edmondson 分级比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 HCC 患者临床病理特征分析($\bar{x}\pm s, n$)

临床病理特征	n	CFTR 表达量		χ^2 / t	P
		低表达组(n=33)	高表达组(n=34)		
年龄(岁)	67	53.2±10.5	49.0±11.3	1.591	>0.05
性别				3.039	>0.05
男	58	31	27		
女	9	2	7		
肿瘤家族史				0.412	>0.05
有	16	9	7		
无	51	24	27		
HBV 感染史				0.003	>0.05
有	57	28	29		
无	10	5	5		
肝硬化				0.120	>0.05
有	42	20	22		
无	25	13	12		
微血管侵犯				1.268	>0.05
有	29	12	17		
无	38	21	17		
肿瘤个数				0.165	>0.05
单个	58	28	30		
多个	9	5	4		
肿瘤最大直径(cm)		7.7±3.8	7.5±3.9	0.262	>0.05
BCLC 分期				3.692	>0.05
A 期	33	20	13		
B 期	11	5	6		
C 期	23	8	15		
Child-Pugh 分级				0.185	>0.05
A	62	31	31		
B	5	2	3		
Edmondson 分级				0.009	>0.05
I + II	26	13	13		
III + IV	41	20	21		

2.3 CFTR 表达水平与 HCC 患者预后关联分析

以 Log-rank 法检验 CFTR 低表达组和 CFTR 高表达组生存曲线的差异。结果显示,CFTR 高表达组的中位生存期(44 个月)略高于 CFTR 低表达组(37

个月),但两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.403$, $P>0.05$),见图 2。

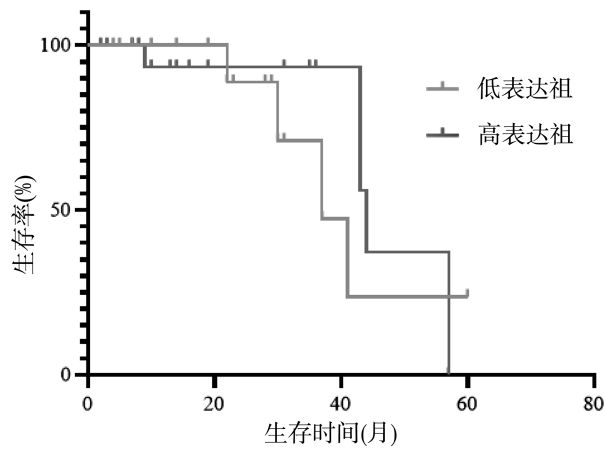


图 2 HCC 患者不同 CFTR 表达水平的生存曲线

Cox 回归模型显示,微血管侵犯、肿瘤最大直径均增加患者死亡风险 ($P < 0.05$),但 HCC 癌组织中 CFTR 表达与 HCC 患者死亡风险无统计学关联 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 HCC 癌组织中 CFTR 表达与 HCC 患者预后关系的多因素 Cox 回归模型分析

因素	B	SE (β)	Wald χ^2	P	RR	95%CI
HCC 癌组织中 CFTR 表达量	-0.061	0.059	1.064	>0.05	0.941	0.837~1.057
年龄	0.016	0.026	0.415	>0.05	1.017	0.967~1.069
性别	-0.289	0.618	0.219	>0.05	0.749	0.223~2.512
肿瘤家族史	0.631	0.432	2.139	>0.05	1.880	0.807~4.379
饮酒史	0.568	0.597	0.904	>0.05	1.765	0.547~5.688
HBV 感染	-0.165	0.889	0.034	>0.05	0.848	0.148~4.846
肝硬化	0.847	0.483	3.069	>0.05	2.332	0.904~6.015
微血管侵犯	1.488	0.537	7.669	<0.05	4.428	1.545~12.692
肿瘤个数	0.607	0.575	1.114	>0.05	1.835	0.594~5.665
肿瘤最大直径	0.154	0.060	6.638	<0.05	1.166	1.037~1.311
BCLC 分期	-0.219	0.562	0.152	>0.05	0.804	0.267~2.416
Child-Pugh 分级	1.300	0.706	3.397	>0.05	3.671	0.921~14.635
Edmondson 分级	0.750	0.514	2.129	>0.05	2.116	0.773~5.792

3 讨论

早期研究认为,CFTR 主要表达在各种上皮组织中,后来研究发现 CFTR 在心脏、平滑肌、神经元、内皮细胞、精子等各种组织和细胞类型中亦广泛表达^[6]。CFTR 所调节的氯离子通道在生物体内具有多种重要功能,包括渗透调节、离子跨上皮细胞运输、细胞极性、细胞代谢、细胞自噬和蛋白质转运、细胞迁移、黏液分泌、免疫反应、细胞间相互作用、膜电位、线粒体功能和相关氧化应激、组织炎症、菌群组成、细胞 pH 值、程序性细胞死亡等^[7],而这些功能均与癌症的典型生物学特征密切相关。目前,对 CFTR

基因最早的认识是 CFTR 基因突变可以导致囊性纤维化(cystic fibrosis, CF),CF 是一种预后极差的隐性遗传性疾病。CFTR 缺陷的上皮细胞会分泌过多的黏液,使得胰管、气管、胆管、生殖管等各种管道器官中黏液过多聚积并导致阻塞,继而引发多种临床表现^[8]。大量队列研究结果表明,导致 CF 患者预期寿命低的最关键因素是 CFTR 基因突变可以大大提升患者的癌症易感性^[9]。

由于 CFTR 突变与各种癌症风险提高显著相关,且 CFTR 所调控的大部分生物学功能均与癌细胞的生物学特性密切相关。因此,研究者们认为

CFTR 不仅是一个离子通道,还是一个能调节肿瘤发生发展相关信号通路的重要蛋白^[10]。CFTR 在大多数肿瘤类型中的表达水平显著下调,表现出抑癌作用,如结直肠癌^[11]、肺癌^[12]、膀胱癌^[13]、鼻咽癌^[14]、前列腺癌^[15]等。但也有研究报道,CFTR 在胃癌^[16]、卵巢癌^[17]、宫颈癌^[18]中的表达水平显著上调,是一个致癌因子。目前关于 CFTR 与 HCC 的研究较少, Moribe 等^[19]研究发现,CFTR 异常高甲基化与早期 HCC 密切相关。Ding 等^[20]研究也发现,CFTR 基因启动子 CpG 岛高甲基化在 HCC 中普遍存在,这可能与 CFTR 在 mRNA 水平上的低表达有关。本研究结果显示,CFTR 在 HCC 癌组织中显著下调,可能是一个抑癌因子,与此前的研究结论大体一致。但本研究尚未发现 CFTR 表达水平与 HCC 患者 HBV 感染状况、肿瘤最大直径、肿瘤个数、肿瘤分期、分化程度等临床病理特征存在关联。近年来的研究结果显示,CFTR 有潜力成为肿瘤预后的生物标志物。Sun 等^[21]研究发现,CFTR 低表达与肠癌患者较差的 TNM 分期有关。Than 等^[22]研究发现,CFTR 表达缺失与肠癌患者无病生存期较差显著相关。目前尚未有研究报道 CFTR 表达水平与 HCC 患者预后的关联。本研究中 CFTR 低表达的 HCC 患者中位生存期虽然低于 CFTR 高表达患者,但两组比较差异无统计学意义。多因素 Cox 回归模型分析也未发现 HCC 癌组织 CFTR 表达与 HCC 患者预后相关,因此尚不能确定 CFTR 表达水平是否与 HCC 患者预后存在关联。

微血管侵犯是 HCC 具有侵袭性生物学行为的标志,肿瘤细胞可以沿着血管迁徙发生肝内或肝外转移,所以微血管侵犯是 HCC 术后复发的一个重要的危险因素,也是影响 HCC 患者预后的重要因素之一^[23]。肿瘤最大直径也是早期 HCC 患者手术治疗预后的重要决定因素之一^[24]。本研究 Cox 回归分析结果显示,微血管侵犯、肿瘤最大直径均与 HCC 死亡风险上升相关,与此前大部分研究结论一致。

综上所述,CFTR 在 HCC 癌组织中显著低表达,是一个潜在的抑癌基因,但结合临床资料分析尚未发现 CFTR 在 HCC 中的预后价值。

参考文献:

- [1] SHEPPARD D N, WELSH M J. Structure and function of the CFTR chloride channel[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(1 Suppl): S23-S45.
- [2] BHATTACHARYA R, BLANKENHEIM Z, SCOTT P M, et al. CFTR and gastrointestinal cancers: an update[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(6): 868.
- [3] LIU H Y, WU W Y, LIU Y, et al. Predictive value of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the diagnosis of gastric cancer [J]. *Clin Invest Med*, 2014, 37(4): E226-E232.
- [4] ZHANG J T, JIANG X H, XIE C, et al. Downregulation of CFTR promotes epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis of breast cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 2961-2969.
- [5] XU J, LIN L B, YONG M, et al. Adenovirus-mediated over-expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhances invasiveness and motility of serous ovarian cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 265-272.
- [6] ZHANG J T, WANG Y, JIANG X H, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-emerging regulator of cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(10): 1737-1756.
- [7] RATJEN F, BELL S C, ROWE S M, et al. Cystic fibrosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15010.
- [8] ANDERSON K J, CORMIER R T, SCOTT P M. Role of ion channels in gastrointestinal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(38): 5732-5772.
- [9] BAREIL C, BERGOUGNOUX A. CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology [J]. *Arch Pediatr*, 2020, Suppl 1: eS8-eS12.
- [10] AMARAL M D, QUARESMA M C, PANKONIEN I. What role does CFTR play in development, differentiation, regeneration and cancer? [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3133.
- [11] SCOTT P, ANDERSON K, SINGHANIA M, et al. Cystic fibrosis, CFTR, and colorectal cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2891.
- [12] TIAN F, ZHAO J L, FAN X L, et al. Weighted gene co-expression network analysis in identification of metastasis-related genes of lung squamous cell carcinoma based on the cancer genome atlas database [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(1): 42-53.
- [13] YU J, ZHU T Y, WANG Z R, et al. A novel set of DNA

- methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(24):7296-7304.
- [14] TU Z W, CHEN Q, ZHANG J T, et al. CFTR is a potential marker for nasopharyngeal carcinoma prognosis and metastasis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47):76955-76965.
- [15] XIE C, JIANG X H, ZHANG J T, et al. CFTR suppresses tumor progression through miR-193b targeting urokinase plasminogen activator (uPA) in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(18):2282-2291, 2291, e1-e7.
- [16] SUH Y S, YU J, KIM B C, et al. Overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 in advanced gastric cancer with aggressive lymph node metastasis [J]. *Cancer Res Treat*, 2015, 47(4):718-726.
- [17] XU J, YONG M, LI J, et al. High level of CFTR expression is associated with tumor aggression and knockdown of CFTR suppresses proliferation of ovarian cancer in vitro and in vivo [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(5):2227-2234.
- [18] PENG X, WU Z, YU L, et al. Overexpression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is associated with human cervical cancer malignancy, progression and prognosis [J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 125(2):470-476.
- [19] MORIBE T, LIZUKA N, MIURA T, et al. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(2):388-397.
- [20] DING S, GONG B D, YU J, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 14 "drug-resistance" genes in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(23):3433-3440.
- [21] SUN T T, WANG Y, CHENG H, et al. Disrupted interaction between CFTR and AF-6/afadin aggravates malignant phenotypes of colon cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(3):618-628.
- [22] THAN B L, LINNEKAMP J F, STARR T K, et al. CFTR is a tumor suppressor gene in murine and human intestinal cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35(32):4179-4187.
- [23] ZHANG X F, LI J, SHEN F, et al. Significance of presence of microvascular invasion in specimens obtained after surgical treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(2):347-354.
- [24] HUANG W J, JENG Y M, LAI H S, et al. Tumor size is a major determinant of prognosis of resected stage I hepatocellular carcinoma [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2015, 400(6):725-734.

[收稿日期:2022-10-31]

[责任编辑:杨建香 英文编辑:阳雨君]