

原发性胆管细胞癌中Fyn的表达及其与患者预后的关系

宋锦慧¹, 田金², 张腾龙¹, 郭成业^{1*}

¹青岛大学附属青岛市市立医院, 山东 青岛

²青岛大学附属青岛市海慈医疗集团, 山东 青岛

收稿日期: 2022年12月28日; 录用日期: 2023年1月21日; 发布日期: 2023年1月31日

摘要

目的: 研究非受体酪氨酸激酶Fyn在原发性胆管细胞癌组织中的表达情况, 分析Fyn与临床病理参数之间的关系及其和患者预后的关系。方法: 收集113例胆管细胞癌患者的临床资料和病理标本, 通过免疫组织化学染色法(免疫组化)检测患者肿瘤组织Fyn中的表达情况, 分析患者的临床病理特征, 采用卡方检验分析Fyn与临床病理参数之间的关系。Kaplan-Meier法绘制患者生存曲线, Log-rank检验和Cox比例风险模型分析患者预后及影响因素。结果: Fyn的表达水平与肿瘤直径、N分期、组织分化程度有相关性, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Fyn高表达患者的总生存期(OS)较Fyn低表达患者短($P < 0.05$)。多因素Cox比例风险模型分析显示, 高Fyn表达、高龄、组织分化程度低、淋巴结转移皆为影响OS的独立危险因素。结论: 癌组织中Fyn的表达会影响胆管癌患者预后, Fyn可能成为胆管癌患者临床诊疗过程中新的观察指标及治疗靶点。

关键词

原发性胆管细胞癌, Fyn, 临床病理学参数, 预后

Expression of Fyn in Primary Cholangiocarcinoma and Its Relationship with Prognosis of Patients

Jinhui Song¹, Jin Tian², Tenglong Zhang¹, Chengye Guo^{1*}

¹Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao Shandong

²Qingdao Haici Medical Treatment Group Affiliated to Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Dec. 28th, 2022; accepted: Jan. 21st, 2023; published: Jan. 31st, 2023

*通讯作者。

Abstract

Objective: To study the expression of non-receptor tyrosine kinase Fyn in primary cholangiocarcinoma tissues, and to analyze the relationship between Fyn and clinicopathological parameters and its relationship with patient prognosis. **Methods:** Clinical data and pathological specimens of 113 patients with cholangiocarcinoma were collected, and the expression of Fyn in tumor tissues of patients was detected by immunohistochemical staining (immunohistochemistry) to analyze the clinicopathological characteristics of patients, and the relationship between Fyn and clinicopathological parameters was analyzed by the chi-square test. The Kaplan-Meier method was used to plot the survival curves of patients, and the Log-rank test and Cox proportional risk model were used to analyze patient prognosis and influencing factors. **Results:** The expression level of Fyn correlated with tumor diameter, N stage, and tissue differentiation, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The overall survival (OS) of patients with high Fyn expression was shorter than that of patients with low Fyn expression ($P < 0.05$). Multifactorial Cox proportional risk model analysis showed that high Fyn expression, advanced age, low tissue differentiation, and lymph node metastasis were independent risk factors for OS. **Conclusion:** Fyn expression in cancer tissues affects the prognosis of cholangiocarcinoma patients, and Fyn may become a new observational index and therapeutic target in the clinical treatment of cholangiocarcinoma patients.

Keywords

Primary Cholangiocarcinoma, Fyn, Clinicopathologic Parameters, Prognosis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来,原发性胆管细胞癌(简称胆管癌)总发病率在全球范围内保持递增趋势,成为全球继肝细胞癌之后,第二常见的肝胆系统恶性肿瘤[1][2]。胆管癌(cholangiocarcinoma)是胆管系统中衬覆上皮所发生的恶性肿瘤,其累及肝内、肝门周围和远端胆道。按肿瘤所发生的部位可分为肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)和肝外胆管癌(extrahepatic cholangiocarcinoma, ECC)两大类。与肝细胞癌生物学行为不同是胆管癌更容易浸润胆管壁并侵犯到周围肝组织、血管、神经、淋巴组织,所以手术切除率很低,患者总的预后较差。大多数早期胆管癌患者是没有症状的,且胆管癌病理特点是高度促结缔组织增生,细胞分布稀疏,会降低细胞学和病理学诊断方法的敏感性。故胆管癌的早期诊断仍然是一个较大的挑战,仅少数患者能够早期发现并接受根治性手术,而手术是唯一能够根治胆管癌的方法,是延长胆管癌患者生存期的最有利治疗方法[3][4][5]。但手术治疗后的长期存活率并不理想,因为约5%的胆管癌是多病灶,50%的患者有淋巴结转移,10%~20%的患者有远处转移[6]。Src家族激酶是由Src家族基因编码的非受体型蛋白酪氨酸激酶。作为Src家族的重要成员之一,酪氨酸激酶Fyn近年来受到了广泛关注,其蛋白表达水平或催化活性水平的异常升高,可参与多种肿瘤细胞的分化、增殖、迁移、血管生成[7][8]。研究发现Fyn在多种肿瘤组织中如乳腺癌[9]、颅脑肿瘤[10]、胰腺癌[11][12]、前列腺癌[13]等表达水平增高,并且Fyn表达升高可以促进肿瘤发展。但目前并没有Fyn在胆管癌表达与预后关系的相关研究,此研究可填补这一领域的空白。

2. 材料与方法

2.1. 研究对象

本研究选取 2015 年 6 月至 2017 年 6 月在青岛市市立医院东院区肝胆外科行胆管癌根治术共计 113 例胆管癌患者，纳入标准包括均为术后患者，且未行新辅助放化疗、靶向治疗、免疫治疗等，符合胆管细胞癌的诊断且具有明确的病理学诊断；患者能够完成完整的随访；排除标准：病理诊断为原发性肝细胞肝癌或者合并有其他恶性肿瘤的患者；手术前接受新辅助放化疗或相关抗肿瘤药物治疗的患者；术后 30 天内死亡的患者；随访期间失访者。随访时间截止到 2022 年 6 月。患者或其授权的家属均已签署知情同意书，本次研究获得了青岛市市立医院伦理委员会的许可。

2.2. 检测方法

1) 均采用免疫组织化学过氧化物酶连接(SP)法进行检测。

2) 胆管细胞癌中 Fyn 的表达检测方法

选择待测蜡块，制作厚度为 4 μm 的常规组织切片，68 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烤片 30 分钟。经二甲苯脱蜡操作 4 次，梯度酒精脱水操作 4 次，浸泡于蒸馏水中水洗 1 分钟。用 EDTA 修复液在高压(100 $^{\circ}\text{C}$ ，2 分钟)下修复组织抗原，取出冷却至室温。PBS 洗涤 3 次。3% H_2O_2 室温下孵育 10 分钟。PBS 洗涤 3 次。加入山羊血清，在室温下孵育 20 分钟。滴加一抗工作液(重组 Anti-Fyn 抗体[EPR19636] ab184276, 1:50, Abcam)、于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1 小时。PBS 洗涤 3 次。滴加二抗(酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物)，于室温下孵育 15 分钟。PBS 洗涤 3 次。使用 DAB 显影剂控制显微镜下的染色。用蒸馏水冲洗 1 分钟，苏木素复染，梯度酒精脱水操作 3 次干燥，二甲苯 3 次透明，中性树胶封片。

3) 结果判读

Fyn 的表达的结果判读由两位职称均为副主任医师以上的资深病理学专家采用双盲法独立评估所有的病理染色切片。当两位医师评估结果不一致时，则由第三位病理科主任医师重新进行计数并分组。在肿瘤细胞膜和细胞质上出现黄色至棕褐色颗粒，判读为阳性，首先在低倍镜下观察切片全部视野，而后随机选取 10 个中倍镜视野(200 倍)进行观察。表达水平由染色强度和分布决定。染色强度分级：无着色为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、棕褐色为 3 分；阳性细胞的分布定义为：<5%为 0 分、5%~25%为 1 分、26%~50%为 2 分、51%~75%为 3 分、>75%为 4 分，两项结果相乘得到免疫组化评分：0~1 分为阴性、2~4 分为弱阳性、5~8 分为中阳性、9~12 分为强阳性。为了确定 Fyn 表达是否与临床病理特征相关，将 Fyn 在肿瘤细胞上的表达水平是阴性与弱阳性定义为 Fyn 低表达组，表达水平是中阳性及强阳性定义为 Fyn 高表达组。

2.3. 统计学处理

统计学分析应用 SPSS 23.0 软件进行。癌组织中 Fyn 表达与各临床病理参数的数据分析比较采用卡方检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制患者的生存曲线，log-rank 检验法分析 Fyn 表达与患者总生存期(OS)之间的关系。采用 Cox 比例风险模型来确定各变量对 OS 的影响。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. Fyn 的表达情况

Fyn 主要表达于肿瘤细胞膜及细胞质中。在胆管癌组织中，Fyn 高表达 63 例，低表达 50 例。在纳入研究的胆管癌组织中，Fyn 高表达 63 例，低表达 50 例。癌组织中 Fyn 阳性表达见图 1，癌组织与癌旁组织中 Fyn 表达差异见图 2。

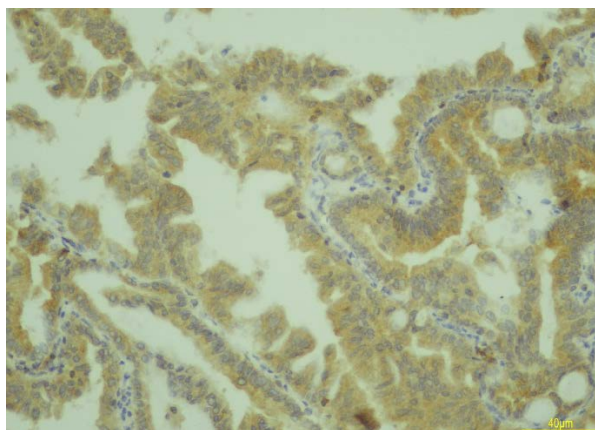


Figure 1. Fyn positive expression in cancer tissues
图 1. 癌组织中 Fyn 阳性表达

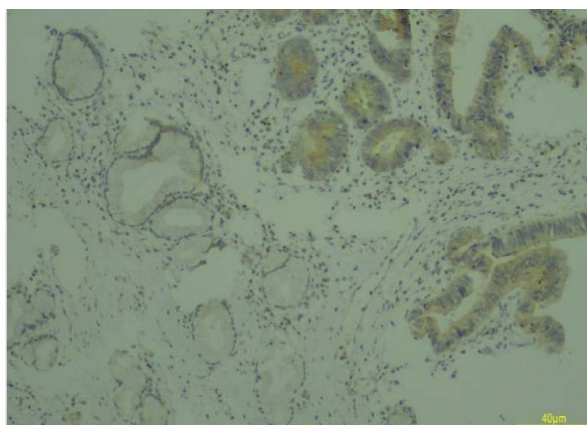


Figure 2. Difference of Fyn expression between cancer tissues and adjacent tissues
图 2. 癌组织与癌旁组织中 Fyn 的表达差异

3.2. Fyn 的表达与临床病理学参数的关系

统计学分析表明，癌组织中 Fyn 的表达水平与肿瘤直径、N 分期、组织分化程度有关，差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与性别、年龄、术前 ALT、AST 水平、病理类型等因素没有相关性，差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

Table 1. The relationship between Fyn expression and clinicopathological parameters
表 1. Fyn 的表达与临床病理参数的关系

参数	分组	Fyn 高表达	Fyn 低表达	χ^2	P
性别	男性	35	26	0.142	0.706
	女性	28	24		
年龄	≥60 岁	31	23	0.115	0.735
	<60 岁	32	27		
N 分期	N0	22	37	17.062	<0.001
	N1	41	13		

Continued

肿瘤直径	≥5 cm	31	11	8.835	0.003
	<5 cm	32	39		
术前 ALT 水平	≥40 U/L	19	17	0.189	0.663
	<40 U/L	44	33		
术前 AST 水平	≥40 U/L	25	22	0.214	0.644
	<40 U/L	38	28		
肿瘤分化程度	低分化	41	16	12.202	< 0.001
	中高分化	22	34		
病理类型	腺癌	36	28	0.015	0.903
	鳞癌	27	22		

3.3. Fyn 与患者预后的关系

Fyn 高表达组中, 在随访过程中, 有 11 例删失数据, 其中 3 例患者退出研究, 6 例患者失访, 2 例患者因研究时限已到而停止观察。Fyn 高表达者 OS 平均值为 32.950 个月, 中位生存时间为 33 个月。Fyn 低表达组中, 有 10 例删失数据, 其中 6 例失访患者, 1 例患者退出研究, 3 例患者因研究时限已到而停止观察。Fyn 低表达者患者 OS 平均值为 39.796 个月, 中位生存时间为 36 个月。统计学分析表明, Fyn 低表达患者 OS 高于 Fyn 高表达患者, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果显示, Fyn 低表达患者预后较高表达患者好。见图 3、表 2。

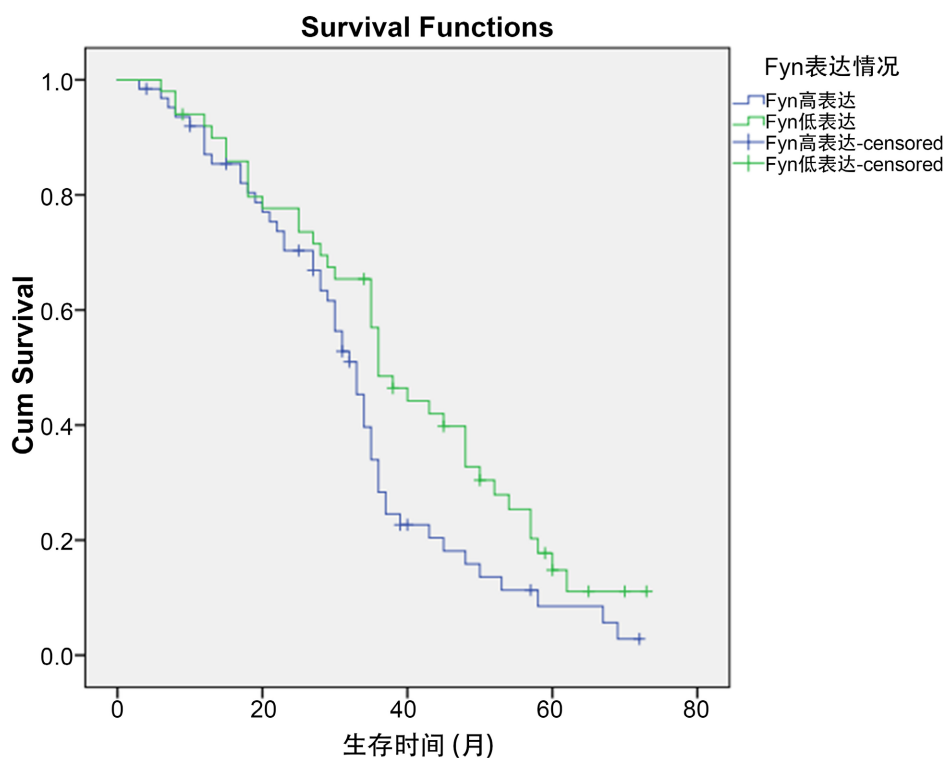


Figure 3. Effect of Fyn expression on OS of patients

图 3. Fyn 表达情况对患者 OS 的影响

Table 2. Effect of Fyn expression on survival time of patients with cholangiocarcinoma
表 2. Fyn 表达情况对胆管癌患者生存时间的影响

Fyn 表达	平均生存时间	中位生存时间	χ^2	P
Fyn 高表达	32.950	33.000	4.521	0.033
Fyn 低表达	39.796	36.000		

Log-rank 检验提示 Fyn 的表达水平与患者预后相关, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

在完成随访的 102 名患者中, 采用 Cox 比例风险模型确定 Fyn 与 OS 的相关性。单变量 Cox 回归分析显示, Fyn、年龄、N 分期、组织分化程度是影响 OS 的重要预后因素。多变量 Cox 回归分析显示, 这些因素仍然是独立的预后因素。见表 3。

Table 3. Univariate and multivariate Cox regression analysis of OS in patients with cholangiocarcinoma
表 3. 胆管癌患者 OS 的单因素及多因素 Cox 回归分析

参数	单因素 COX 回归分析		多因素 COX 回归分析	
	HR (95% CI)	P	RR (95% CI)	P
Fyn	0.643 (0.423~0.977)	0.038	0.559 (0.362~0.864)	0.009
性别	0.847 (0.561~1.279)	0.429	0.705 (0.441~1.129)	0.146
年龄	0.572 (0.373~0.878)	0.011	0.537 (0.337~0.856)	0.009
N 分期	2.130 (1.386~3.274)	0.001	2.025 (1.262~3.248)	0.003
组织分化程度	0.495 (0.343~0.715)	<0.001	0.514 (0.355~0.744)	<0.001
病理类型	1.036 (0.625~1.718)	0.890	1.138 (0.634~2.042)	0.665
肿瘤直径	0.885 (0.587~1.335)	0.560	0.977 (0.628~1.518)	0.917
术前 ALT 水平	1.058 (0.692~1.617)	0.796	1.192 (0.760~1.868)	0.444
术前 AST 水平	0.904 (0.573~1.426)	0.664	0.892 (0.543~1.467)	0.653

4. 讨论

胆管癌是一类具有高度分子多样性和基因异质性的肿瘤。特别是在早期阶段, 肿瘤的隐匿性、无症状性、高侵袭性、瘤内和瘤间异质性以及化疗耐药性, 严重的影响了化学治疗的疗效, 导致预后不佳。胆管癌不同的类型都有不同的流行病学、生物学、预后和临床管理策略, 这些异质性同样导致靶向治疗的效果差异巨大。故更深入地了解胆管癌各类型的驱动基因突变对精准治疗意义重大。本研究结果证明 Fyn 在胆管细胞癌中过表达, 并与胆管癌的大小与淋巴结转移和组织分化程度相关, 这些结果揭示了 Fyn 在胆管细胞癌中的促癌作用。

Fyn 是 Src 家族酪氨酸激酶成员之一, 在细胞质多聚核糖体上合成, N 端豆蔻酰化, 然后迅速转移到脂膜上并进行棕榈酰化修饰。Fyn 具有广泛的生物学功能, 包括通过 T 细胞受体的信号传递、血小板活化、脑功能的调节(轴突导向、突触功能、神经元分化、中枢神经系统髓鞘形成)以及细胞生长、存活、粘附介导、运动性的信号传递。Fyn 可作为治疗中枢神经系统损伤和某些神经退行性疾病潜在靶点, 如阿尔茨海默病。更多的研究表明 Fyn 的上调和转录水平改变与一些恶性肿瘤有关, Fyn 过表达会影响细胞生长和增殖, 导致形态转化和有丝分裂信号的改变。在外周免疫系统中, Fyn 在 T 细胞和 B 细胞受体信号传导的调节和功能以及自然杀伤细胞的分化中发挥着重要作用, 这表明 Fyn 可通过影响人体免疫系统进而影响肿瘤的发生发展。有研究表明 Fyn 在胰腺癌淋巴转移起重要作用[14], 这和我们的实验结果相

吻合。在前列腺癌组织中 Fyn 的表达能够预测淋巴结转移[8], Fyn 会增强神经内分泌表型并增加前列腺癌内脏转移几率[15]。在结直肠癌中, 细胞肌蛋白诱导 Fyn 加速结直肠癌转移[16]。邵等人证明了 Fyn 可抑制 AMPK/mTOR 信号通路, 促进胆管癌细胞迁移和侵袭, 结果证实, Fyn 阻断是抗胆管癌治疗的一个潜在靶点[17]。

目前的实验中仍然存在局限性。首先虽然长期随访可以增加结果的说服力, 但需要对大量患者进行额外的前瞻性研究来证明当前的结论。第二, 通过免疫组化法检测出的 Fyn 表达只针对原始肿瘤组织, 并不能反映其在肿瘤微环境相互作用的完整信息。Fyn 表达与其他临床病理特征相关性的机制仍然不明确, 这会是以后研究的重要方向。我们的研究清楚地证明了 Fyn 在预测胆管癌患者生存率中的预后价值。不同研究中差异的原因尚不清楚, 将来可能仍需要更大的队列来确定 Fyn 在疾病过程中的积极或消极作用。

目前仍缺乏对胆管癌早期诊断的敏感方法, 大量研究表明 Fyn 不仅是评估预后的有价值的标志物, 而且是一个很有前景的治疗靶点, 但目前还没有针对 Fyn 的分子靶向药物获得批准并应用于临床。针对 Src 家族激酶(Src-familykinase, SFK)的分子靶向药物虽可应用于临床, 但这种非特异性靶向治疗是否会损害更多特异性抑制剂可能带来的临床益处, 仍有争议。随着对 Fyn 研究的深入, 探讨 Fyn 在临床工作中的应用前景及相关分子靶向药物研发, 可为临床医学提供新的治疗思路 and 方向。明确 Fyn 在胆管癌患者癌组织或癌旁组织中的表达及其与患者预后之间的相关性, 将对胆管癌患者的预后评估及治疗方向提供新的思路。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Saha, S.K., Zhu, A.X., Fuchs, C.S. and Brooks, G.A. (2016) Forty-Year Trends in Cholangiocarcinoma Incidence in the U.S.: Intrahepatic Disease on the Rise. *The Oncologist*, **21**, 594-599. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0446>
- [3] Luo, X., Yuan, L., Wang, Y., *et al.* (2014) Survival Outcomes and Prognostic Factors of Surgical Therapy for All Potentially Resectable Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Large Single-Center Cohort Study. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, **18**, 562-572. <https://doi.org/10.1007/s11605-013-2447-3>
- [4] Wang, Y., Yang, H., Shen, C. and Luo, J. (2015) Cholangiocarcinoma: Prognostic Factors after Surgical Resection in China. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**, 5506-5512.
- [5] Jarnagin, W.R., Fong, Y., DeMatteo, R.P., *et al.* (2001) Staging, Resectability, and Outcome in 225 Patients with Hilar Cholangiocarcinoma. *Annals of Surgery*, **234**, 507-517. <https://doi.org/10.1097/0000658-200110000-00010>
- [6] 胆管癌诊断与治疗——外科专家共识[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(1): 12-16.
- [7] Granot-Attas, S. and Elson, A. (2004) Protein Tyrosine Phosphatase Epsilon Activates Yes and Fyn in Neu-Induced Mammary Tumor Cells. *Experimental Cell Research*, **294**, 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.11.003>
- [8] Saito, Y.D., Jensen, A.R., Salgia, R. and Posadas, E.M. (2010) Fyn: A Novel Molecular Target in Cancer. *Cancer*, **116**, 1629-1637. <https://doi.org/10.1002/cncr.24879>
- [9] Xie, Y.G., Yu, Y., Hou, L.K., *et al.* (2016) FYN Promotes Breast Cancer Progression through Epithelial-Mesenchymal Transition. *Oncology Reports*, **36**, 1000-1006. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4894>
- [10] Schenone, S., Brullo, C., Musumeci, F., *et al.* (2011) Fyn Kinase in Brain Diseases and Cancer: The Search for Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, **18**, 2921-2942. <https://doi.org/10.2174/092986711796150531>
- [11] Chen, Z.Y., Cai, L., Zhu, J., *et al.* (2011) Fyn Requires HnRNPA2B1 and Sam68 to Synergistically Regulate Apoptosis in Pancreatic Cancer. *Carcinogenesis*, **32**, 1419-1426. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr088>
- [12] Chen, Z.Y., Cai, L., Bie, P., *et al.* (2010) Roles of Fyn in Pancreatic Cancer Metastasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **25**, 293-301. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06021.x>
- [13] Jensen, A.R., David, S.Y., Liao, C., *et al.* (2011) Fyn Is Downstream of the HGF/MET Signaling Axis and Affects

- Cellular Shape and Tropism in PC3 Cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **17**, 3112-3122. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1264>
- [14] Posadas, E.M., Al-Ahmadie, H., Robinson, V.L., *et al.* (2009) FYN Is Overexpressed in Human Prostate Cancer. *BJU International*, **103**, 171-177. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.08009.x>
- [15] Gururajan, M., Cavassani, K.A., Sievert, M., *et al.* (2015) SRC Family Kinase FYN Promotes the Neuroendocrine Phenotype and Visceral Metastasis in Advanced Prostate Cancer. *Oncotarget*, **6**, 44072-44083. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6398>
- [16] Wang, Q., Qian, J., Wang, F. and Ma, Z. (2012) Cellular Prion Protein Accelerates Colorectal Cancer Metastasis via the Fyn-SP1-SATB1 Axis. *Oncology Reports*, **28**, 2029-2034. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2025>
- [17] Lyu, S.C., Han, D.D., Li, X.L., *et al.* (2018) Fyn Knockdown Inhibits Migration and Invasion in Cholangiocarcinoma through the Activated AMPK/mTOR Signaling Pathway. *Oncology Letters*, **15**, 2085-2090. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7542>