

文章编号:1005-6947(2008)07-0678-04

· 基础研究 ·

HLJ1 基因在肝细胞癌组织中的表达及其生物学意义

刘海军¹, 王志明¹, 陈能志²

(1. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省常德市第一人民医院 普通外科, 湖南 常德 415003)

摘要:目的 探讨 HLJ1 基因在肝细胞癌(HCC)组织中的表达及其生物学意义。方法 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 32 例 HCC 组织及其对应的癌旁肝组织(PLCT)中 HLJ1 基因的 mRNA 表达水平;分析 HLJ1 与肝硬化、HCC 的结节数目、静脉浸润、分化程度和肝外转移等临床病理特征的关系。结果 HCC 组织中 HLJ1 mRNA 的表达水平显著性低于 PLCT [(1.18 ± 0.82) vs. (1.92 ± 1.15), $P < 0.05$], 其 HLJ1 mRNA 低表达组($n = 18$)和高表达组($n = 14$)在静脉浸润($P = 0.001$)和细胞分化程度($P = 0.010$)方面差异显著,而在性别、有无肝硬化、结节数目和肿瘤直径等因素的组间差异无显著性($P > 0.05$)。结论 HLJ1 在 HCC 中表达显著性下调;HLJ1 有可能参与 HCC 的细胞分化和侵袭转移。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(7): 678-681]

关键词: 癌, 肝细胞; 基因, HLJ1; 肿瘤复发; 肿瘤转移

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

The expression and biological significance of HLJ1 in hepatocellular carcinoma tissue

LIU Haijun¹, WANG Zhiming¹, CHEN Nengzhi²

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

2. Department of General Surgery, the First People's Hospital of Changde, Changde, Hunan 415003, China)

Abstract: **Objective** To analyze the expression of HLJ1 in the tissues of hepatocellular carcinoma (HCC) and the correlation between its expression and clinical pathological characteristic. **Methods** HLJ1 mRNA expression level was determined in 32 HCC tissues and their associated noncancerous liver tissues by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The correlation of HLJ1 expression level with clinicopathologic variables was also analyzed. **Results** HLJ1 mRNA expression level was significantly lower in HCC than in associated noncancerous liver tissue [(1.18 ± 0.82) vs. (1.92 ± 1.15), $P < 0.05$]. Importantly, the HLJ1 mRNA expression level correlated with the Edmondson-Steiner grade ($P = 0.010$) and vein invasion ($P = 0.001$). **Conclusions** Our study indicates that HLJ1 mRNA expression level is significantly lower in HCC tissues than in associated noncancerous liver tissue. HLJ1 may participate in the cell proliferation and invasiveness of HCC cell.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(7): 678-681]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Genes, HLJ1; Neoplasm Recurrence; Neoplasm Metastasis

CLC number: R 735.7

Document code: A

收稿日期: 2007-11-01; 修订日期: 2008-04-01。

作者简介: 刘海军, 男, 中南大学湘雅医院硕士研究生, 主要从事肝胆疾病方面的研究。

通讯作者: 王志明 E-mail: zhiming2382@126.com

HLJ1 是一个新发现的抑癌基因,具有抑制细胞生长、增殖、侵袭、迁移,促进凋亡、参与细胞周期调控等作用,并与肿瘤的复发、转移密切相关^[1]。但目前有关 HLJ1 在 HCC 中表达情况,HLJ1 与 HCC 临床病理特征的关系等研究罕有报道。本课题据此就 HLJ1 在原发性 HCC 中的表达及其与 HCC 患者的临床病理特征的关系作一探讨,以企为早期诊断治疗肝癌,判断肝癌预后,以及实行针对患者个体生物学特点的治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源及其一般资料

组织标本取自 2005 年 3 月—2006 年 12 月本院外科手术切除的 32 例 HCC 组织和 32 例相对应的癌旁肝组织(PCLT,距肿瘤边缘 ≥ 2 cm)。标本离体后迅速取材,并注意避开坏死组织,部分置入液氮速冻后转入 -70 °C超低温冰箱存放。全部患者未接受包括肝动脉化疗栓塞术等在内的多种抗肿瘤治疗。本组男 27 例,女 5 例;年龄 27~62 岁,中位年龄 41 岁。其中合并肝硬化者 20 例(62.5%),无肝硬化者 12 例(37.5%);直径大于 5 cm 者 21 例(65.6%),小于或等于 5 cm 者共 11 例(34.4%);有静脉浸润者 16 例(50.0%),无静脉浸润者 16 例(50.0%);单结节 21 例(65.6%),多结节 11 例(34.4%)。Edmonson 分级 I~II 级 12 例(37.5%),III~IV 级 20 例(62.5%)。所有标本经病理组织学检查证实诊断。

1.2 实验方法

1.2.1 组织总 RNA 提取 取 HCC 组织和 PCLT 各 100 mg/mL,分别置于消毒研钵中,加入液氮后研磨粉碎。粉碎后加入 1 mL trizol,室温放置,解冻后继续研磨成浆。采用两步法提取组织总 RNA。提取的组织总 RNA 行琼脂糖凝胶电泳并测定 OD 值,分析提取 RNA 的纯度和浓度。

1.2.2 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR) RT-PCR 试剂盒 DR019A 购自大连宝生物公司。结合 GeneBank(基因库)序列,利用 Primer5 引物软件设计引物。HLJ1 引物:正向为 5'-ATATTGTGAAAC-CCGGAATG-3',反向为 5'-TTTGCCTATTTATTTGAC-CC-3',产物长度 325 bp。GAPDH 引物:正向为 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3',反向为 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3',产物长度 500bp。提取的组织总 RNA 逆转录为 cDNA。按照试剂盒

说明书,PCR 采用 50 μ L 反应体系。PCR 反应条件:94 °C 变性 4 min 后,94 °C 30 s,54 °C 40 s 和 72 °C 40 s;顺序循环 35 次;最后 72 °C 延伸 7 min。2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶自动成像系统上摄像并分析各条带吸光度值(基因表达值 = HLJ1/GAPDH)。

1.2.3 临床病理特征的确定 每例标本均需记录详细的临床病理特征,包括性别、有无肝硬化、结节数目、肿瘤直径;HCC 有无静脉浸润及细胞分化程度。HCC 细胞分化根据 Edmonson-Steiner 分级而定:I~II 级癌细胞在形态上较接近正常肝细胞,分化较高;III~IV 级癌细胞胞核大而深染,胞浆少,分化低。镜下见血管内有癌细胞浸润伴血管内皮染色不连续或见管腔内有癌栓存在,即为静脉浸润。肿瘤直径为肿瘤组织的最大径。

1.2.4 实验设计与分组 检测 HCC 组($n = 32$)和 PCLT 组($n = 32$)中 HLJ1 mRNA 的表达,根据 RT-PCR 结果,以 32 例 HCC 中 HLJ1 mRNA 表达量的均数(X_1)与 32 例 PCLT 中 HLJ1 mRNA 表达量的均数(X_2)的比值($X_1/X_2 = 0.61$)为界,分为 HLJ1 低表达组($n = 18$)和高表达组($n = 14$)。每组再根据性别、有无肝硬化、结节数目、肿瘤直径、HCC 组织有无静脉浸润、细胞分化程度等临床病理特征分组,比较 HLJ1 表达水平与 HCC 临床病理特征间的关系。

1.3 统计学处理

全部数据采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学分析。计量资料的均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料比较采用非配对 t 检验。计数资料的组间比较采用 Fisher's 确切概率法。 $P \leq 0.05$ 作为差异具有显著性。

2 结果

2.1 HLJ1 在组织中的 mRNA 表达水平

HCC 组织中 HLJ1 mRNA 的表达水平为 1.18 ± 0.82 ,显著低于 PLCT 组织中 HLJ1 mRNA 表达水平 1.92 ± 1.15 (图 1-2)。

2.2 HLJ1 mRNA 表达与 HCC 临床病理特征的关系

HLJ1 低表达组的肿瘤细胞分化程度明显低于高表达组($P < 0.001$),而有静脉浸润的显著高于高表达组($P < 0.001$)。而在性别、有无肝硬化、结节数目和肿瘤直径等因素的组间差异无显著性(图 3)(表 1)。

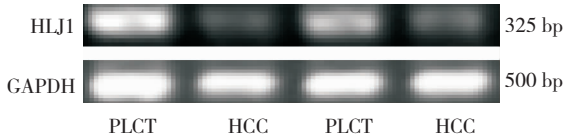


图1 HLJ1 RT-PCR 结果琼脂糖凝胶电泳图

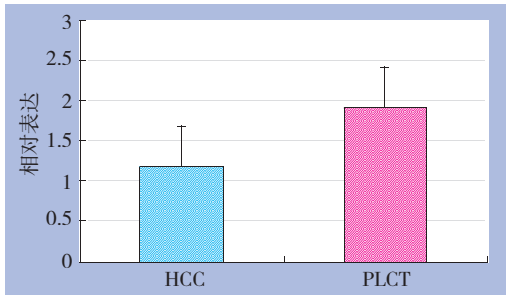


图2 HLJ1 RT-PCR 统计分析直方图

表1 HLJ1 表达与 HCC 临床病理特征的关系(例数)

临床病理特征	HLJ1 低表达组	HLJ1 高表达组	P 值
性别			
男	15	12	$P=1.000$
女	3	2	
肝硬化程度			
伴有	12	8	$P=0.718$
不伴有	6	6	
肿瘤直径(cm)			
>5	11	10	$P=0.712$
≤5	7	4	
结节数目(个)			
单结节	10	11	$P=0.226$
多结节	8	3	
静脉浸润			
有	14	2	$P=0.001$
无	4	12	
细胞分化(级)			
I - II	3	9	$P=0.010$
III - IV	15	5	

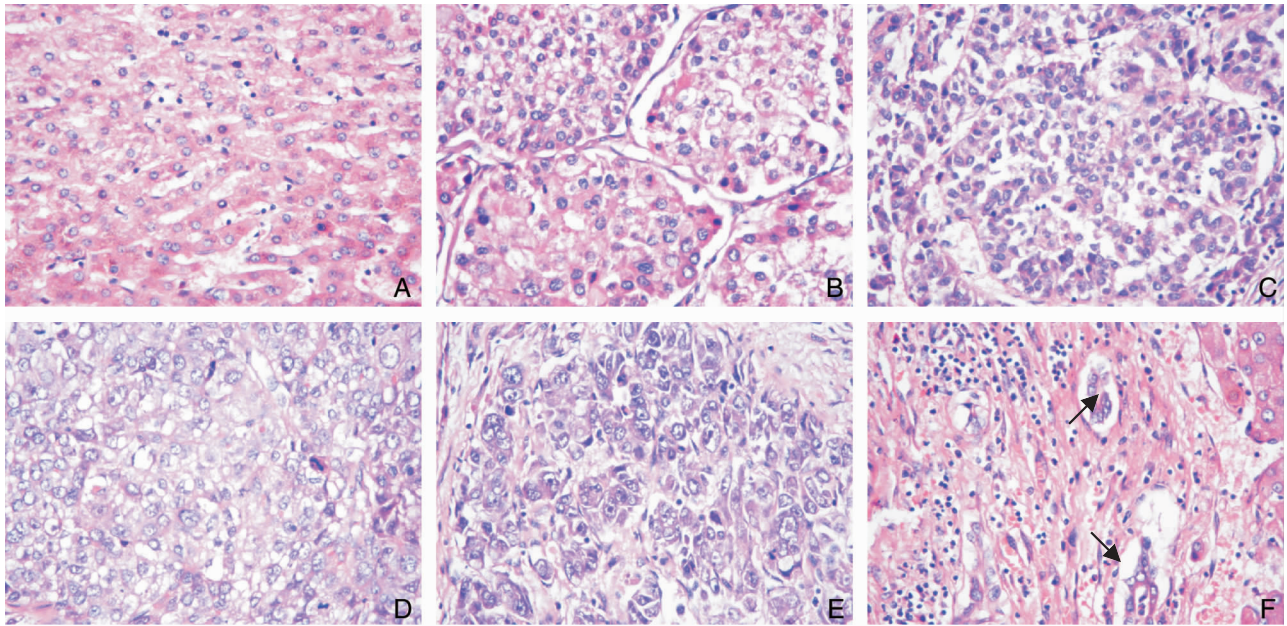


图3 肝癌细胞分化程度和静脉浸润的 HE 染色图($\times 400$) A: 正常肝组织; B: Edmonson-Steiner 分级 I 级; C: Edmonson-Steiner 分级 II 级; D: Edmonson-Steiner 分级 III 级; E: Edmonson-Steiner 分级 IV 级; F: 镜下静脉浸润

3 讨论

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是广泛存在于生物界中具有高度保守性质的蛋白质, HSP 家族在细胞生长、发育、分化、基因转录等功能方面发挥重要作用^[2]。近年发现 HSP 与肿瘤发生发展、生物学行为及其预后有着较密切的关

系^[3-4]。HLJ1 是 Dnaj 类 HSP40 家族成员之一,定位于人类染色体 1P31.1。HLJ1 蛋白由 337 个氨基酸残基构成,分子质量约 40 kD,属于 HSP40 家族^[5]。

研究证实,HLJ1 参与了 STAT1 和 p21^{WAF1} 信号通路,能上调 STAT1 及 p21^{WAF1} 的表达,同时下调 Cyclin D1 的表达,p21^{WAF1} 的表达上调和 Cyclin D1

的表达下调能减缓细胞分裂和肿瘤细胞的生长^[6]。此外,HLJ1 能上调钙黏蛋白 E 的表达并能抑制 CD44 的表达,从而降低肿瘤细胞的侵袭力^[7]。Chen 等用基因芯片技术检测了一个肺癌侵袭性细胞系模型,发现 HLJ1 与肿瘤侵袭转移相关。进一步研究证实,HLJ1 是一个转移抑制因子,其表达水平与肺癌细胞的侵袭能力呈负相关;过表达 HLJ1 能抑制肺癌细胞的侵袭力^[8]。

本研究结果显示,HCC 组织中 HLJ1 mRNA 表达水平显著下调($P < 0.05$)。Tsai 等^[1]运用 RT-PCR 法检测 HLJ1 在 71 例非小细胞肺癌患者的癌与癌旁组织中的表达,发现 HLJ1 在癌组织中的表达低于癌旁组织。本研究结果与之一致。研究证实,在 HLJ1 基因里有一个能驱动其转录活性的区域,序列分析显示此区缺失 TATA 盒,存在 1 个 CCAAT 盒,并有 4 个转录因子 YY1 (Yin-Yang-1, 又称 NF-E1) 的结合位点;这也许对调控 HLJ1 的表达是重要的,因转录因子 YY1 能增强 HLJ1 启动子活性,过表达 YY1 能增加 HLJ1 的表达^[9]。HLJ1 基因在肝癌组织中表达下调,亦可能是通过转录因子 YY1 的转录调控所致。此观点尚待于研究证实。

HCC 的侵袭转移是一个多因素和多步骤的过程。HCC 本身的各种生物学特性,比如细胞分化程度和静脉浸润等也决定了侵袭转移潜能的不同^[10]。笔者分析 HLJ1 mRNA 表达水平与 HCC 临床病理特征之间的关系的结果显示 HLJ1 mRNA 在分化程度高的 HCC 中表达要高于分化低者($P = 0.010$),在无静脉浸润的 HCC 中表达高于有静脉浸润者($P = 0.001$)。肿瘤细胞的分化程度是判断 HCC 恶性程度的标准;分化程度越高,肿瘤细胞的形态和功能越接近正常组织,其恶性表现也越低,表现为肿瘤的侵袭力和转移潜能显著降低。HCC 的静脉浸润与 HCC 的血行转移密切相关,也是 HCC 恶性程度高,侵袭转移能力强的表现^[10]。这些结果提示,HLJ1 基因可能参与了肝癌的发生发展过程,并可能在肝癌细胞分化、侵袭转移中发挥重要作用。Tsai 等^[1]研究证实,低侵袭性肺腺癌中的 HLJ1 的 mRNA 表达水平高于高侵袭性者。实时定量 PCR 测定发现,低侵袭性肺腺癌中的 HLJ1 的 mRNA 表达水平是高侵袭性肺腺癌中的 8 倍。生存分析和 Log-rank 检验发

现,HLJ1 高表达患者有着更长的生存期和更长的无瘤生存期;回归分析发现,HLJ1 的低表达是患者总体生存率和无瘤生存时间的一个危险因素;多变量 COX 比例风险回归模型分析显示,患者的无瘤生存期也仅仅与 HLJ1 的表达水平相关。

本研究结果提示,HLJ1 下调参与了 HCC 的发生发展过程,并可能在 HCC 的细胞分化和侵袭转移中发挥重要作用。HLJ1 有可能成为 HCC 治疗中重要的基因靶点。本研究结论为早期诊断治疗肝癌,判断肝癌预后,实行针对患者个体生物学特点的治疗提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Tsai MF, Wang CC, Chang GC, *et al.* A new tumor suppressor dnaJ-like heat shock protein, HLJ1, and survival of patients with non-small-cell lung carcinoma [J]. *National Cancer Ins*, 2006, 98 (12): 825 - 838.
- [2] Lee GJ, Vierling E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122 (1): 189 - 198.
- [3] Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, *et al.* p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160 (1): 255 - 263.
- [4] Lu AL, Xu CS. Effects of heat shock on change of HSC70/HSP68 acid and alkaline phosphatases before and after rat partial hepatectomy [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6 (5): 730 - 733.
- [5] Hoe KL, Won M, Chung KS, *et al.* Isolation of a new member of DnaJ-like heat shock protein 40 (Hsp40) from human liver [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1383 (1): 4 - 8.
- [6] Yang ZY, Perkins ND, Ohno T, *et al.* The p21 cyclin dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo [J]. *Nat Med*, 1995, 1 (10): 1052 - 1056.
- [7] Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, *et al.* The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis [J]. *Lung Cancer*, 2002, 36 (2): 115 - 124.
- [8] Chen JW, Konan P, Hong TM, *et al.* Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model [J]. *Cancer research*, 2001, 61 (12): 5223 - 5230.
- [9] Wang CC, Tsai MF. The transcriptional factor YY1 upregulates the novel invasion suppressor HLJ1 expression and inhibits cancer cell invasion [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (25): 4081 - 4093.
- [10] Poon RT, Fan ST, Ng IO, *et al.* Different risk factors and prognosis for early and the late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2000, 89 (3): 500 - 507.