



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.012
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3955.shtml

· 基础研究 ·

肝细胞癌 Period1 表达与预后的关系

刘振, 杨建青, 潘光栋, 刘强, 陈辉, 肖亿

(广西柳州市人民医院肝胆外科, 广西柳州 545006)

摘要

目的: 探讨 Period1 在肝细胞癌 (HCC) 组织中的表达及意义。

方法: 用 RT-PCR 与 Western blot 法检测 30 例 HCC 组织与其癌旁肝组织及 5 例正常肝组织中 Period1 mRNA 与蛋白表达; 甲基化特异性 PCR 检测 HCC 组织与癌旁肝组织中 Period1 启动子甲基化水平; 免疫组化检测 67 例 HCC 组织及其癌旁肝组织石蜡切片中 Period1 蛋白的表达; 分析 Period1 的表达与 HCC 患者临床病理特征及预后的关系。

结果: HCC 组织 Period1 mRNA 和蛋白的表达水平均较癌旁肝组织与正常肝组织明显降低 (均 $P < 0.05$), 而两者在癌旁肝组织与正常肝组织间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$); HCC 组织 Period1 启动子甲基化水平较其癌旁肝组织明显增高 (均 $P < 0.05$)。HCC 组织石蜡切片中 Period1 阳性表达率为 47.8%, 而癌旁肝组织阳性表达率为 83.6%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Period1 表达与 HCC 分化程度、结节数目、有无静脉浸润有关 (均 $P < 0.05$); Period1 阳性表达 HCC 患者中位复时间与中位生存时间均明显短于阳性者 (均 $P < 0.05$)。

结论: Period1 在肝癌中表达下调可能与 HCC 的发生发展和侵袭转移密切相关; 启动子甲基化可能是 Period1 表达下调的重要机制。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(7):926-930]

关键词

癌, 肝细胞; Period1 基因; 预后
中图分类号: R735.7

Relationship between Period1 expression and prognosis in hepatocellular carcinoma

LIU Zhen, YANG Jianqing, PAN Guangdong, LIU Qiang, CHEN Hui, XIAO Yi

(Department of Hepatobiliary Surgery, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou, Guangxi 545006, China)

Corresponding author: LIU Zhen, Email: ggbao@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the Period1 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue and its significance.

Methods: The Period1 mRNA and protein expressions in the specimens of 30 HCC tissues along with their adjacent liver tissues and 5 normal liver tissues were detected by RT-PCR method and Western blot analysis, and the methylation level in the promoter sequences of Period1 in HCC tissues and their adjacent liver tissues was determined by methylation-specific PCR. Period1 protein expression in 67 paraffin-embedded HCC tissue and adjacent liver tissue samples were examined by immunohistochemical staining, and the relations of Period1 expression with the clinicopathologic characteristics and prognosis of the patients were analyzed.

Results: Both the Period1 mRNA and protein expressions in HCC tissue were significantly lower than those in the adjacent liver tissue or normal liver tissue (all $P < 0.05$), but there was no statistical difference between the

收稿日期: 2014-04-26; 修订日期: 2014-06-03。

作者简介: 刘振, 广西柳州市人民医院主治医师, 主要从事肝癌临床与基础方面的研究。

通信作者: 刘振, Email: ggbao@163.com

adjacent liver tissue and normal liver tissue (both $P>0.05$); the methylation level in the promoter sequences of Period1 in HCC tissue was significantly higher than that in the adjacent liver tissue ($P<0.05$); Period1 positive expression rate was 47.8% for HCC tissue and 83.6% for adjacent tissues in the paraffin-embedded samples, and the difference had statistical significance ($P<0.05$); Period1 expression was related to the degree of differentiation of HCC, tumor number, and vascular invasion (all $P<0.05$); the median time to recurrence and median survival time in HCC patients with negative Period1 expression were significantly reduced compared with those with positive Period1 expression (both $P<0.05$).

Conclusion: Down-regulated Period1 expression may be closely related to the occurrence and development as well as invasion and metastasis of HCC, and promoter methylation is possibly an important mechanism for Period1 down-regulation. [Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(7):926-930]

KEYWORDS

Carcinoma, Hepatocellular; Period1 gene; Prognosis

CLC number: R735.7

生物钟紊乱与肿瘤发生存在密切关系^[1-2]。作为生物钟调控关键基因 Period1 在多种肿瘤中表达明显下调,并与肿瘤恶性特征及不良预后显著相关,甲基化是导致 Period1 表达下调的主要机制^[3-6],提示其可能在肿瘤发展过程中发挥着重要作用,而在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中的研究尚鲜见报道。本研究拟通过检测 HCC 组织中 Period1 mRNA、蛋白表达及启动子甲基化水平,研究其与 HCC 患者临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

67 例 HCC 及相应癌旁肝组织标本均取自我院 2009 年 4 月—2013 年 4 月间手术切除 HCC 患者,其中 30 例患者留存新鲜冷冻标本,所有患者均留存石蜡切片。5 例正常肝组织取自肝血管瘤切除标本瘤旁切缘肝组织,留存新鲜冷冻标本。全部病例术前均未接受包括肝动脉化疗栓塞等在内的治疗。所有标本均经病理检查证实。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 采用 TRIzol (Invitrogen, 美国)提取总 RNA, RT-PCR 按照试剂盒 (宝生物, 大连)说明书进行操作。PCR 反应条件: 94 °C 变性 4 min, 94 °C 30 s, 50 °C 40 s 和 72 °C 40 s, 顺序循环 35 次, 最后 72 °C 延伸 7 min。Period 1 上游引物为 5'-TTC CAG CTG AGC CTG AAT CT-3', 下游引物为 5'-CAA AAA CAC AAA TGC CAT CG-3', 产物为 250 bp, 产物经基因测序为 Period 1 基因片段。GAPDH 基因上游引物为 5'-CTG CAG CAT CTT CTC CTT CC-3', GAPDH 基因下游引物

5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3', 产物为 500 bp^[7]。基因表达值 =Period 1/GAPDH。

1.2.2 Western blot 参照文献^[8]进行, 采用 Quantity one 软件对杂交条带进行定量分析, 基因表达值 =Period 1/ β -actin。

1.2.3 甲基化特异性 PCR (MS-PCR) 组织 DNA 提取及纯化按文献进行^[8], DNA 硫化修饰处理及 PCR 步骤参照试剂盒 (宝生物, 大连)说明进行。PCR 反应条件: 94 °C 变性 2 min, 95 °C 30 s, 65 °C 40 s 和 72 °C 30 s, 顺序循环 35 次, 最后 72 °C 延伸 4 min。甲基化上游引物为 5'-ATT TAG GTT TAC GTG CGT TC-3', 下游引物为 5'-TAG TAT TAG TAT TTA GGT TTA TGT GTG TTT-3', 产物 298 bp; 非甲基化上游引物为 5'-CGA CTC AAA AAC GAA AAT CG-3', 下游引物为 5'-AAC AAC AAT CCA ACT CAA AAA CAA AAA TCA-3', 产物 318 bp。

1.2.4 免疫组织化学 采用链酶素-生物素-辣根过氧化物酶法进行免疫组织化学分析, 具体过程参照试剂盒 (博士德, 武汉)说明书进行。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 预后随访

所有患者均获随访, 自术后第 1 天开始计算术后复发转移及生存时间, 随访时间 62~1 833 d, 平均 863.6 d。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据统计, 计量资料及等级资料组间比较采用非参数秩和检验, 计数资料组间比较采用四表格资料 Fisher 确切概率法, 用 Kaplan-Meier 法计算复发率、生存率, Log-Rank 法计算组间差异, 以 $P<0.05$ 作为差异具有统计学意义界值。

2 结果

2.1 Period1 mRNA 及蛋白在不同组织中的表达水平

结果显示, HCC 组织中 Period1 mRNA 及蛋白表达水平均明显低于癌旁肝组织 (均 $P < 0.05$),

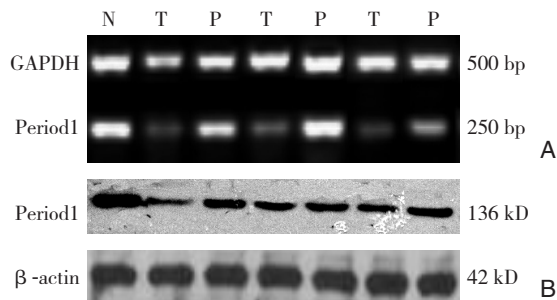


图 1 Period1 mRNA 与蛋白在 HCC 组织、癌旁肝组织及正常肝组织中的表达 A: RT-PCR; B: Western blot T: HCC 组织; P: 癌旁肝组织; N: 正常肝组织

Figure 1 Period1 mRNA and protein expression in HCC tissue, adjacent noncancerous tissue and normal liver tissue

A: RT-PCR; B: Western blot T: HCC tissue; P: Adjacent noncancerous tissue; N: Normal liver tissue

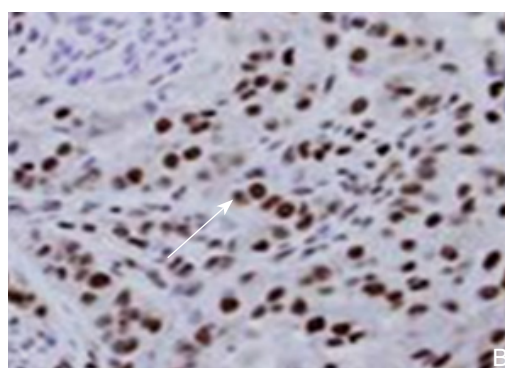
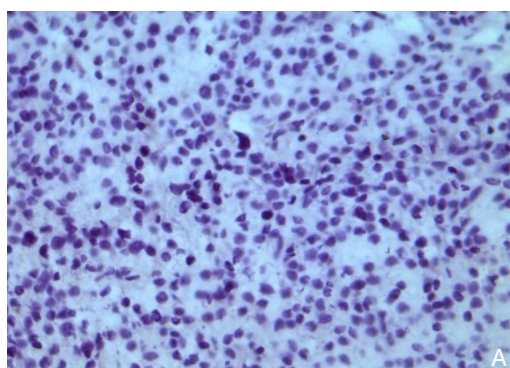


图 2 免疫组化检测 Period1 蛋白表达 (×400) A: 肝癌组织; B: 癌旁肝组织

Figure 2 Immunohistochemical staining for Period1 protein expression (×400) A: HCC tissue; B: Adjacent liver tissue

表 2 HCC 组织与癌旁肝组织 Period1 蛋白表达阳性率比较

Table 2 Comparison of positive Period1 protein expression rates between HCC tissue and adjacent noncancerous tissue

组别	阳性	阴性	合计	阳性率 (%)	P
HCC 组织	32	35	67	47.8	0.000
癌旁肝组织	56	11	67	83.6	

2.2 HCC 组织与癌旁肝组织 Period1 启动子甲基化水平

MS-PCR 结果显示, Period1 启动子在 HCC 组织中的甲基化水平明显高于癌旁肝组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3) (表 3)。

正常肝组织 mRNA 及蛋白表达水平与癌旁肝组织差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 1) (表 1)。Period1 蛋白主要表达于细胞核, 少量表达于细胞浆, 在 HCC 组织中阳性表达率低于癌旁肝组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2) (表 2)。

表 1 HCC 组织、癌旁肝组织及正常肝组织 Period1 mRNA 及蛋白中位数水平比较

Table 1 Comparison of median levels of Period1 mRNA and protein among HCC tissue, adjacent liver tissue and normal liver tissue

组别	mRNA	蛋白
HCC 组织	0.67 ^{1), 2)}	0.59 ^{1), 2)}
癌旁肝组织	1.32	1.35
正常肝组织	1.42	1.27

注: 1) 与正常肝组织比较, $P < 0.05$; 2) 与癌旁肝组织比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. normal liver tissue; 2) $P < 0.05$ vs. adjacent liver tissue

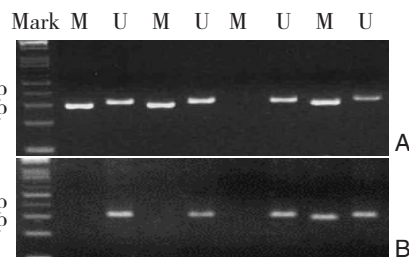


图 3 MS-PCR 检测 Period1 启动子甲基化水平 A: HCC 组织; B: 癌旁肝组织 Marker: 分子量标准; M: 甲基化; U: 非甲基化

Figure 3 MS-PCR determination for Period1 promoter methylation A: HCC tissue; B: Adjacent liver tissue Marker: Molecular weight markers; M: Methylated; U: Unmethylated

表 3 HCC 及癌旁肝组织中 Period1 启动子甲基化水平比较 (n=30)

组别	完全甲基化	部分甲基化	非甲基化	P
HCC 组织	1	25	4	0.000
癌旁肝组织	0	11	19	

2.3 Period1 蛋白表达与 HCC 临床病理特征的关系

30 例新鲜冷冻标本 HCC 患者按不同的临床病理特征进行分组比较其与 HCC 组织 Period1 蛋白表达相关性, 结果显示 Period1 蛋白表达与 HCC 的分化程度、结节数目、有无静脉浸润有关 (均 $P < 0.05$), 而与性别、年龄、肝硬化程度、肿瘤直径以及有无包膜无关 (均 $P > 0.05$) (表 4)。

2.4 Period1 蛋白表达与 HCC 患者预后的关系

预后随访结果显示, 67 例 HCC 患者肝癌组织 Period 1 蛋白表达阳性者中位复发时间为 530 d, 中位生存时间为 1 130 d; Period 1 蛋白表达阴性者, 中位复发时间为 325 d, 中位生存时间为 653 d。Period 1 蛋白表达阴性患者术后复发转移天数及生存天数均短于阳性表达患者 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

表 4 Period1 蛋白中位表达水平与 HCC 患者临床病理特征的关系

指标	n	Period1 蛋白表达	P
性别			1.000
男	25	0.94	
女	5	0.89	
年龄 (岁)			0.856
≤ 60	16	0.92	
> 60	14	0.94	
肝硬化			1.000
有	24	1.02	
无	6	0.89	
肿瘤直径 (cm)			0.256
≤ 5	11	0.95	
> 5	19	0.74	
肿瘤结节数目 (个)			0.042
≥ 2	13	0.62	
1	17	1.04	
包膜			0.455
无	15	0.72	
有	15	0.96	
肿瘤细胞分化程度			0.034
I~II	11	1.02	
III~IV	19	0.68	
血管浸润			0.049
无	16	1.09	
有	14	0.68	

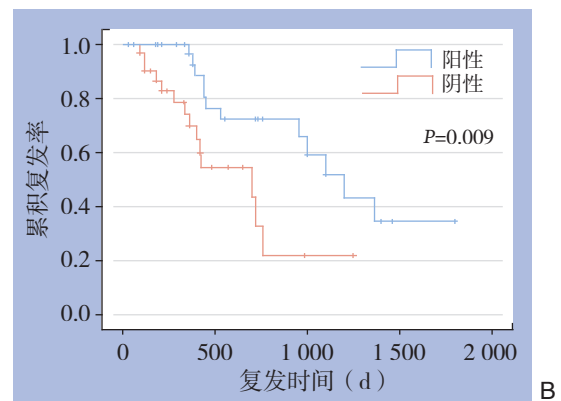
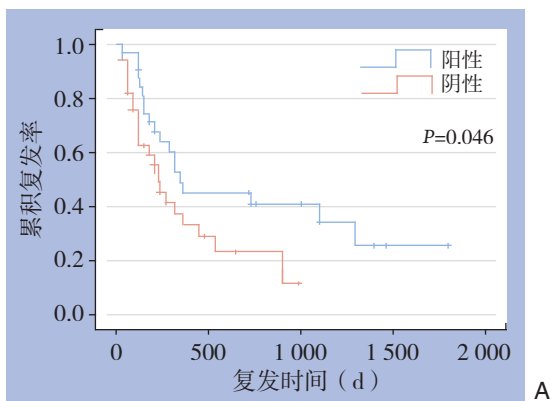


图 4 Period1 蛋白阳性表达与阴性表达 HCC 患者复发及生存情况比较 A: 复发曲线; B: 生存曲线

Figure 4 Comparison of the recurrence and survival between HCC patients with positive and negative Period1 expression A: Metastasis curves; B: Survival curves

3 讨论

细胞周期调控失常和基因组 DNA 稳定性丧失是肿瘤发生发展的中心环节。通过调控 cyclin B1、cdc2、Bub1、p53CDC、cyclin A2、chk2 等基因的表达及活性, 生物钟调节核心基因 Period1 广泛参与了细胞的周期调控、DNA 损伤修复、细胞凋

亡和肿瘤细胞增殖等过程^[10-12], 与阿霉素、卡铂等化疗药物敏感性密切相关^[13-15], 并在结肠癌、乳腺癌、胶质瘤、胰腺癌等多种肿瘤^[16-20]中表达明显下调, 充分证明 Period1 在肿瘤发生发展过程中的发挥着重要抑癌基因作用, 而其在 HCC 中尚未见深入研究。

本研究发现 Period1 在 HCC 组织的 mRNA 及

蛋白表达水平明显下降,其表达水平与 HCC 的分化程度、结节数目、有无静脉浸润有关,提示 Period1 低表达可能与 HCC 增殖、侵袭转移等恶性生物学行为密切相关;Period1 低表达肝癌组织启动子甲基化水平明显增高,说明启动子甲基化可能是 Period1 在肝癌组织表达下调的重要机制;Period1 蛋白低表达与 HCC 术后低中位复发转移天数及生存天数密切相关,说明 Period1 可能是 HCC 不良预后的一个重要分子生物学标志。

因此,Period1 可能在 HCC 发生发展过程中发挥着重要抑癌基因作用,其表达下调可能是 HCC 发生发展过程中的重要分子生物学事件。对 Period1 的进一步研究对于完善 HCC 发生发展机制,评估患者预后,提高 HCC 治疗敏感性,改善 HCC 远期治疗效果具有重要意义。恢复 HCC 中包括 Period1 在内的生物钟基因的表达节律有可能成为一种全新的治疗方法。

参考文献

- [1] Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(1):9-18.
- [2] Zienolddiny S, Haugen A, Lie JA, et al. Analysis of polymorphisms in the circadian-related genes and breast cancer risk in Norwegian nurses working night shifts[J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(4):R53.
- [3] Zhao N, Yang K, Yang G, et al. Aberrant expression of clock gene period1 and its correlations with the growth, proliferation and metastasis of buccal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e55894. doi: 10.1371/journal.pone.0055894.
- [4] Oshima T, Takenoshita S, Akaike M, et al. Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(5):1439-1446.
- [5] Hsu MC, Huang CC, Choo KB, et al. Uncoupling of promoter methylation and expression of Period1 in cervical cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1):257-262.
- [6] Yang MY, Yang WC, Lin PM, et al. Altered expression of circadian clock genes in human chronic myeloid leukemia[J]. *J Biol Rhythms*, 2011, 26(2):136-148.
- [7] Chen ST, Choo KB, Hou MF, et al. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(7):1241-1246.
- [8] Yeh KT, Yang MY, Liu TC, et al. Abnormal expression of period 1 (PER1) in endometrial carcinoma[J]. *J Pathol*, 2005, 206(1):111-120.
- [9] Xu CX, Krager SL, Liao DF, et al. Disruption of CLOCK-BMAL1 transcriptional activity is responsible for aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of Period1 gene[J]. *Toxicol Sci*, 2010, 115(1):98-108.
- [10] Gery S, Komatsu N, Baldjyan L, et al. The circadian gene per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells[J]. *Mol Cell*, 2006, 22(3):375-382.
- [11] Chen-Goodspeed M, Lee CC. Tumor suppression and circadian function[J]. *J Biol Rhythms*, 2007, 22(4):291-298.
- [12] 刘振,杨建青,潘光栋. Period1 基因功能与肿瘤抑制[J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18(5):508-510.
- [13] Sato F, Wu Y, Bhawal UK, et al. Period1 (PER1) has anti-apoptotic effects, and PER3 has pro-apoptotic effects during cisplatin (CDDP) treatment in human gingival cancer CA9-22 cells[J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(11):1747-1758.
- [14] Kang TH, Sancar A. Circadian regulation of DNA excision repair: implications for chrono-chemotherapy[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(11):1665-1667.
- [15] 段志青,朱小云,张宇,等. 节律基因 mPer1 对化疗药物阿霉素敏感性的影响[J]. *四川大学学报:医学版*, 2008, 39(6):925-928.
- [16] Xia HC, Niu ZF, Ma H, et al. Deregulated expression of the Per1 and Per2 in human gliomas[J]. *Can J Neurol Sci*, 2010, 37(3):365-370.
- [17] Winter SL, Bosnyan-Collins L, Pinnaduwa D, et al. Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors[J]. *Neoplasia*, 2007, 9(10):797-800.
- [18] Suzuki T, Sato F, Kondo J, et al. Period is involved in the proliferation of human pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells by TNF-alpha[J]. *Biomed Res*, 2008, 29(2):99-103.
- [19] Tokunaga H, Takebayashi Y, Utsunomiya H, et al. Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008, 87(10):1060-1070.
- [20] Mostafaie N, Kállay E, Sauerzapf E, et al. Correlated downregulation of estrogen receptor beta and the circadian clock gene Per1 in human colorectal cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2009, 48(7):642-647.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式:刘振,杨建青,潘光栋,等. 肝细胞癌 Period1 表达与预后的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(7):926-930. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.012
 Cite this article as: LIU Z, YANG JQ, PAN GD, et al. Relationship between Period1 expression and prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(7):926-930. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.012