

凋亡诱导因子 AIF 在肝癌组织中的表达及临床意义*

郭晓东 杨永平 楼敏 熊璐 曲建慧 王春平 陆荫英 周霖 常秀娟
苏淑慧 冯永毅

(北京市解放军第 302 医院 北京 100039)

摘要 目的:探讨凋亡诱导因子(AIF)在肝细胞癌组织中的表达及其临床意义。**方法:**采用免疫组织化学 Envision 法检测 75 例肝细胞癌组织及其相应癌旁肝组织、30 例正常肝组织中 AIF 的表达,并分析其表达与肝细胞癌临床病理因素的相关性。**结果:**肝癌组织中 AIF 阳性表达率明显高于癌旁组织及正常肝组织,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。AIF 在肝癌组织中的表达仅与病理分级密切相关($P<0.01$),而与年龄、性别、肿瘤大小、临床分期、肿瘤数目、有无肿瘤包膜和有无淋巴结转移、有无门静脉癌栓均无关。**结论:**AIF 表达可能参与了肝癌的发生和发展过程。

关键词:肝细胞癌;凋亡诱导因子;免疫组织化学

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-502-03

Expression of Apoptosis Inducing Factor in Hepatocellular Carcinoma and Its Clinical Significance*

GUO Xiao-dong, YANG Yong-ping, LOU Min, XIONG Lu, QU Jian-hui, WANG Chun-ping, LU Yin-ying, ZHOU Lin,
CHANG Xiu-juan, SU Shu-hui, FENG Yong-yi
(302 hospital of PLA, Beijing China, 100039)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical significance of AIF in hepatocellular carcinoma tissue. **Methods:** The expression of AIF protein was detected with immunohistochemical EnVision plus non-biotin technique in 75 cases of hepatocellular carcinoma and pericarcinoma tissues, 30 cases of normal tissues. **Results:** The positive expression rates of AIF protein in hepatocellular carcinoma were significantly higher than that in pericarcinoma tissues and normal tissues ($P<0.05$). The expression of AIF were positively related to differentiation degree ($P<0.05$). **Conclusion:** Expression of AIF protein may play important roles in the carcinogenesis and development of hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular carcinoma, Apoptosis inducing factor, Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-502-03

原发性肝细胞癌(简称肝癌)恶性程度高,治疗效果欠佳,患者死亡和复发率高。目前对肝癌发病的生物学机制尚未阐明,多数认为其癌变发展过程涉及多种复杂病因和多种基因的异常激活、失活和复活^[1-3]。目前认为肿瘤的自主增殖和凋亡失调是肝癌发生发展过程中的重要机制之一。凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)是新发现的一种凋亡效应分子,与其他凋亡途径不同,AIF 依赖的细胞凋亡是非 caspases 依赖的一条凋亡途径^[4]。近年来 AIF 介导细胞凋亡的机制及其在肿瘤细胞凋亡失调中的作用越来越受到学者们的关注。本研究采用免疫组织化学 Envision 法检测例肝癌及其相应癌旁肝组织、例正常肝组织中 AIF 的表达情况,探讨其在肝癌发生发展中的作用及意义。

1 对象和方法

1.1 对象

选择 2003 年 6 月~2007 年 10 月我院手术切除的 75 例肝癌组织及对应的癌旁肝组织标本。术前均未接受任何化疗、放疗及免疫治疗。其中男 62 例,女 13 例;年龄 32~74 岁,平均 56.9±11.4 岁。病理分级按 WHO 分级: I~II 级 30 例, III~IV

级 45 例; 临床 TNM 分期: I~II 级 48 例, III~IVa 级 27 例。另取 30 例肝囊肿周边的正常肝组织为正常对照组,经病理证实为正常肝组织。所有标本均采用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,常规连续 4μm 切片。

1.2 方法

采用免疫组化 EnVision 法检测 AIF 的表达,EnVision 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司,AIF 山羊抗人多克隆抗体(工作液浓度为 1:200)均购自 Santa Cruz 公司。操作程序按说明书进行。结果判断:AIF 均定位于肿瘤细胞胞浆,呈棕黄色颗粒状为阳性。每张切片在高倍镜下随机选取 10 个视野,按阳性细胞占同类细胞总数的百分比来计算。≤5% 为阴性(-),6%~29% 为弱阳性(+),30%~60% 为表达阳性(++),61%~100% 为表达强阳性(+++)。(-)和(+)为 AIF 表达阴性,(++)和(+++)为 AIF 表达阳性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件,计数资料多个样本率的比较和两个样本率之间的比较采用卡方检验,以 $P<0.05$ 作为有统计学意义的判断水准。

2 结果

* 基金项目:全军十一五基金项目(424134H)

作者简介:郭晓东(1981-)主治医师;研究方向:肝病诊断与治疗;联系方式:13911161582

(收稿日期:2010-11-08 接受日期:2010-11-30)

2.1 AIF 在肝癌、癌旁组织及正常肝组织中的表达

75 例肝癌组织、癌旁组织及 30 例正常肝组织中 AIF 阳性表达率分别为 70.7%(53/75),6.7%(5/75),3.3%(1/30), 肝癌组织中 AIF 阳性表达率明显高于癌旁组织及正常肝组织,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 肝癌组织中 AIF 表达与临床病理学特征的相关性

AIF 在肝癌组织中的表达仅与病理分级密切相关($P<0.01$),而与年龄、性别、肿瘤大小、临床分期、肿瘤数目、有无肿瘤包膜和有无淋巴结转移、有无门静脉癌栓均无关(表 1)。

表 1 肝癌组织中 AIF 表达与临床病理学特征的关系 [n(%)]
Table 1 The correlation between clinicopathological features and the expression of AIF in HCC tissues [n(%)]

临床病理学特征 clinicopathological features	n	AIF 阳性表达 the positive expression of AIF
年龄 age		
<60	45	32(71.1)
≥ 60	30	21(70.0)
性别 gender		
男	62	44(71.0)
女	13	9(69.2)
肿瘤大小 tumor size		
<5 cm	26	18(69.2)
≥ 5 cm	49	35(71.4)
肿瘤数目 tumor number		
单发	60	42(70.0)
多发	15	11(73.3)
TNM 分期 TNM stage		
I ~ II	48	34(70.8)
III ~ IVa	27	19(70.4)
病理分级 pathological grade		
I ~ II	30	12(40.0)
III ~ IV	45	41(91.1) a
门静脉癌栓 portal vein tumor thrombus		
有 exist	37	27(73.0)
无 none	38	26(68.4)
肿瘤包膜 the capsule of tumor		
有 exist	39	28(71.8)
无 none	36	25(69.4)
淋巴结转移 lymphatic metastasis		
有 exist	34	25(73.5)
无 none	41	28(68.3)

a $P<0.01$

3 讨论

细胞凋亡在维持生物体正常发育及维持正常细胞更新和异常细胞清除之间平衡中起着重要作用,它是一系列酶参与的生化反应,受许多凋亡相关因子的影响,涉及不同基因的表达及调控、信号转导系统的正负调节。一旦凋亡调控机制发生紊乱,不断再生细胞的稳态被打破,应该凋亡的异常细胞不断得以存活,细胞恶变的潜能增高,最终可能转化为肿瘤^[5-7]。

凋亡诱导因子 (AIF) 是一类具有凋亡诱导活性的黄素蛋白,正常生理状态下,AIF 存在于线粒体内外膜间隙,受到凋亡信号刺激时,AIF 从线粒体释放到细胞浆,在细胞核中与染色体结合,引起染色体凝集和 DNA 呈大片段断裂,从而导致细胞凋亡^[8-11]。AIF 同时具有氧化还原酶活性,与其凋亡诱导活性作用是脱偶联的。目前认为 AIF 的氧化酶活性可能是通过一个氧化还原循环或与其他氧化还原剂偶联的通路传递电子,而消除自由基或清除过氧化物的毒性。

国内外已经有一些研究报道发现 AIF 在不少肿瘤组织中均有表达,Daugas 等^[12]研究结果显示 65 个不同起源的肿瘤细胞系中 AIF 蛋白呈阳性表达;Jeong 等^[13]发现 80.5% 结肠癌中有 AIF 表达且着色程度较正常粘膜强;Lee 等^[14]研究中 60 例胃腺癌组织中有 42 例(70%)有 AIF 阳性表达;王昌正^[15]等发现在胃癌细胞和胃癌组织中均有 AIF 阳性高表达。推测 AIF 可能对人类的肿瘤细胞普遍起到一定的作用。本研究结果显示肝癌组织中 AIF 阳性表达率明显高于癌旁组织及正常肝组织,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。表明 AIF 的表达参与了肝癌的发病过程中,同时本研究结果还发现,AIF 在肝癌组织中的表达仅与病理分级密切相关($P<0.01$),而与年龄、性别、肿瘤大小、临床分期、肿瘤数目、有无肿瘤包膜和有无淋巴结转移、有无门静脉癌栓等其他临床病理学特征均无关。提示 AIF 可能在肝癌的发生发展过程中起普遍作用,尚不能将 AIF 作为判断肝癌恶性生物学行为的一个有效指标。推测 AIF 可能对肿瘤细胞产生一种选择性作用机制,那些恶性程度更高肿瘤细胞可抵抗 AIF 凋亡作用而得以存活;同时 AIF 可作为一种电子传递酶在电子传递中起到重要的作用,为肿瘤细胞生长活动提供能量,并发挥消除自由基或清除过氧化物的氧化酶活性作用,使肿瘤细胞可以继续增殖,从而促进肿瘤的生长发展。

综上所述,AIF 在肝癌中的表达上调提示 AIF 可能参与了肝癌的发生和发展,深入研究其在肝癌发病演变过程中的分子机制,将有助于研发以 AIF 为靶点的药物治疗提供坚实的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Kittaka N, Takemasa I, Takeda Y, et al. Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data[J]. Eur J Cancer, 2008,44:885-897
- [2] Block TM, Marrero T, Gish RG, et al. The degree of readiness of selected biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma; notes from a recent workshop[J]. Cancer Biomark, 2008,4:19-33
- [3] Ralnanathan A, Wang C, Schreiber SL. Perturbational profiling of a cell line model of tumorigenesis by using metabolic measurements[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(17):5992-5997

- [4] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat shock protein70 antagonizes apoptosis inducing factor [J]. Nat cell Biol, 2001,3 (9): 839-843
- [5] Wa M, Xia L, Li X, et al. AMID, an apoptosis-inducing factor homologue mitochondrion associated protein induces caspase-independent apoptosis[J]. Biol Chem, 2002, 277(28):25617-25623
- [6] Nicholas J, Santos AS, Eric D, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death[J]. Nature, 2001, 410(6828):549-554
- [7] 张闻多, 丁文惠. 细胞凋亡与凋亡诱导因子. 中国病理生理杂志, 2006, 22(9):1858-1862
Zhang Wen-duo, Ding Wen-hui. Apoptosis and apoptosis-inducing factor. Chinese Journal of Pathophysiology, 2006, 22(9):1858-1862
- [8] Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis[J]. J Exp Med, 2000, 192(4):571-579
- [9] Celine C, Isabelle C, Eric D, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria [J]. Biochimie, 2002, 84(2-3):215-222
- [10] Ohiro Y, Garkavtsev L, Kobayashi S, et al. A novel p53-inducible apoptogenic gene, PRG3, encodes a homologue of the apoptosis-inducing factor(AIF)[J]. FEBS Lett, 2002, 524(123):163-171
- [11] Wang X, Yang C, Chai J, et al. Mechanisms of AIF mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2002, 298(5598):1587-1591
- [12] E daugas, D Nochy, L Ravagnan, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. FEBS Lett, 2000,476(3):118-123
- [13] Jeong, E.G, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of apoptosis-inducing factor (AIF) in colorectal carcinomas [J]. APMIS, 2006,114(12):867-873
- [14] Lee JW, Eun GJ, Young HS, et al. Immunohistochemical analysis of apoptosis-inducing factor (AIF) expression in gastric carcinomas [J]. Pathol Res and Pract, 2006, 202:497-501
- [15] 王昌正, 吴本俨, 朱铭, 等. 凋亡诱导因子(AIF)在胃癌细胞和组织中的表达和意义[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(7):1184-1186
Wang Chang-zheng, Li Ying-nan, Wu Ben-yan, et al. The expression and significance of AIF in gastric cancer tissues and cell lines [J]. Modern Oncology, 2008, 16(7):1184-1186

封面说明

共同的画卷

封面设计说明

自1997年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕,2010年,可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊2011年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展:①封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时DNA测序技术的研制成功为契机(图中,偏下),这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。②封面图案以2010年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿),最强壮晶胚的筛选技术,人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上,右,中,左),这些不仅为不孕不育患者带来了福音,同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长、繁殖的人造生命细胞Synthia的问世(六边形图,右),由干细胞培育出的肺脏(六边形图,左)等最新研究成果。④封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机,关于艾滋病的研究取得了很多成就,但我们还没有攻克艾滋病,特别是Superbug耐药性超级细菌的出现,让无数人感到前所未有的恐慌(六边形,中)。⑤生命科学的一切研究成果,只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花,因此图片采用波浪形设计,如河流奔涌向前,如画卷色彩缤纷,如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过,未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展,需要有准备的大脑,也需要灵光突闪的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域,我们如图中的小孩一样,睁大纯真的眼睛,好奇的观察、了解;我们也需要运用一系列的技术手段,面对未知的一个个"黑箱"问题,需要细心大胆的研究、推断;同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机,应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信,《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台,不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷,让我们与你们共同分享灵感与喜悦,成功与辉煌!