肝细胞癌患者外周血 HSF1 基因表达的检测及应用价值 *

卢 鹏[1] 冯 薇[2] 李 霄[1] 杨 平[1] 寇明文[1] 胡延忠[3] 宋振顺[4△]

(1 第四军医大学附属西京医院肝胆胰脾外科 陕西 西安 710032；2 第四军医大学附属口腔医院特诊科 陕西 西安 710032；3 河南大学医学院免疫学教研室 河南 开封 475001；4 同济大学附属上海市第十人民医院肝胆胰脾外科 上海 200072)

摘要 目的：建立检测 HSF1 mRNA 的 real-time PCR 的方法，了解肝细胞癌患者外周血中 HSF1 的表达水平及其与各临床病理特征之间的关系。方法：利用 real-time PCR 的方法检测 20 例肝细胞癌患者及 20 例正常人群外周血中 HSF1 mRNA 的表达量。结果：肝细胞癌患者外周血中的 HSF1 mRNA 表达量显著高于正常人群（P<0.05）；肝细胞癌患者外周血中 HSF1 mRNA 的表达水平在不同性别、肿瘤大小、门静脉侵犯情况、HbsAg 水平及 AFP 水平的患者中的差异无统计学意义（P>0.05）；在不同病理分化程度、TNM 分期的患者中的差异有统计学意义（P<0.05）。结论：real-time PCR 技术可以成功检测外周血中 HSF1 mRNA 的表达量，HSF1 可能与肝细胞癌的发生发展密切相关。

关键词：肝细胞癌；外周血；热休克转录因子 1；实时定量 PCR；诊断

中图分类号：R735.7 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273（2012）14-2716-04

Development and Application of Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Detection of Human Hepatocellular Carcinoma Related Novel Gene HSF1 Expression*

LU Peng[1], FENG Wei[2], LI Xiao[1], YANG Ping[1], KOU Ming-wen[1], HU Yan-zhong[3], SONG Zhen-shun[4△]

(1 Department of Hepatobiliary and Pancreatosplentic Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China; 2 School of Stomatology Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China; 3 Department of Immunology, Henan University, Kaifeng, 475001, China；4 Department of Hepatobiliary and Pancreatosplentic Surgery, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai, 200072, China)

ABSTRACT Objective: To establish a quantitative real-time PCR method for detection of HSF1 gene expression level in human hepatocellular carcinoma and to investigate the relationship between HSF1 mRNA expression level and the clinicopathological characters. Methods: Real-time PCR was employed to determine the expression level of HSF1 mRNA in peripheral blood of 20 specimens of human hepatocellular carcinoma patients and normal human. Results: Comparing with normal human, HSF1 present higher expressions in human hepatocellular carcinoma patients (P<0.05). There is no statistical differences of HSF1 mRNA expression level between the group with different sexes, tumour diameters, portal involvement levels, HBsAg levels and AFP levels (P>0.05). There is statistical differences of HSF1 mRNA expression level between the group with different differentiations and TNM stages (P>0.05). Conclusion: The established quantitative real-time PCR method can successfully detect the expression level of HSF1 mRNA, which may be closely related to the occurrence and development of human hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Serum; HSF1; Real-time PCR; Diagnosis

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

Article ID:1673-6273(2012)14-2716-04

前言

研究发现肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）的发病率有不断升高的趋势，全球每年大约有 60 万人死于 HCC，其死亡率列肿瘤死亡率的第三位[1]。在我国，HCC 的年发病数已超过 36 万，而死亡数也已超过 35 万，是仅次于肺癌的第二大肿瘤死因。然而如何对其进行早期诊断仍然困扰着所有的肝胆外科医生，这也是 HCC 患者存活率低的主要原因[2,3]。

热休克转录因子 1（HSF1）是广泛存在于真核生物细胞内的一种起主导作用的转录因子，通过调节热休克反应一方面恢复正常的蛋白折叠环境，另一方面还可以使细胞在应激状态下改变信号传导通路来调节代谢从而增强细胞的生存能力[4]。近年来发现 HSF1 蛋白的异常表达可能与恶性肿瘤的侵袭、转移有关[5]。我们的前期实验证实 HSF1 在肝细胞癌组织中的表达水平增高。但其在肝细胞癌患者外周血中的表达水平状况尚无文献报道。本研究利用实时定量 PCR（real-time PCR）技术检测

* 基金项目：国家自然科学基金（30971508）

作者简介：卢鹏（1982），男，医学硕士、主治医师，主要研究方向：肝癌的基础与临床研究，E-mail：lupengfmmu@hotmail.com

△通讯作者：宋振顺，男，医学博士，教授，主任医师，主要研究方向：肝癌的基础与临床研究、干细胞移植，E-mail：songzs@fmmu.edu.cn

（收稿日期：2012-02-26 接受日期：2012-03-20）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

外周血中 HSF1 mRNA 表达水平，为进一步研究 HSF1 基因在肝细胞癌发生、发展中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病例来源

选取 2010 年 7 月至 2010 年 12 月第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科收治的 20 例肝细胞癌患者为研究对象，经手术或 B 超引导下穿刺取细胞学诊断，均明确病理类型。患者中男性 12 例，女性 8 例，中位年龄为 50 岁（38-74 岁）。术后病理：低分化 5 例，中高分化 15 例。TNM 分期（2002 版 UICC）：I 期 2 例，II 期 9 例，III 期 6 例，IV 期 3 例。20 例正常体检人员作为阴性对照，其中男女各 10 人，中位年龄 48 岁（40-67 岁）。

1.2 试剂及设备

RNAprep pure 血液总 RNA 提取试剂盒（TIANGEN 公司），反转录反应试剂盒、SYBR Green 荧光定量试剂盒（TAKARA 公司），HSF1、GAPDH 引物（上海生工生物技术有限公司），IQ5TM 荧光定量聚合酶链反应（PCR）仪（Bio-Rad 公司），高速冷冻离心机 Sigma3-18K（Sartorius 公司），紫外分光光度计 Ultrospec（GE Healthcare 公司）。

1.3 实验方法

1.3.1 外周血总 RNA 的提取 清晨空腹经外周静脉抽取实验组及对照组患者外周血各 1.5ml，常温存放于抗凝管中（保存时间少于 2h）。按照 RNAprep pure 血液总 RNA 提取试剂盒说明书严格操作，获取 RNA 溶液 40μl，上述操作于冰浴中进行。紫外线分光光度计测定 OD260 和 OD280，并计算 OD260/OD280 值（控制在 1.8-2.0 范围内）。

1.3.2 cDNA 的合成 反转录反应：1μg 样本总 RNA，1μl miScript Reverse Transcriptase Mix，4μl 5*miScript RT Buffer，DEPC 水，体系为 20μl。反应条件：37℃孵育 60min，95℃孵育 5min。反转录产物置于冰上备用。

1.3.3 标准曲线的绘制 任意取一肝细胞癌患者外周血的 cDNA 作为标准品，按 1:10 倍比稀释得到不同浓度的标准模板，进行 real-time PCR 反应，以拷贝数的自然对数作为横坐标，以 Ct 值作为纵坐标，绘制 HSF1 基因 real-time PCR 反应的标准曲线。同法绘制 GAPDH 基因 real-time PCR 反应的标准曲线。

1.3.4 Real-time PCR 反应 反应体系的制备：10μl SYBR Green PCR MasterMix，2μl miScript universal primer，2μl specific primer，1μl cDNA 以及 5μl DEPC 水，总反应体系 20μl。反应条件：95℃ 15 min 后连续 45 个循环，每个循环内 94℃ 15 s、55℃ 30s、70℃ 30s。每次试验均设置阴性对照，以 H_2O 代替 cDNA。

1.3.5 数据处理及结果分析 反应结束后分析 PCR 反应曲线，得到 Ct 值。Real-time 反应中基因表达的相对定量统计学分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行[6]。

1.4 统计方法

各项数据以均数± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，实验数据应用 SPSS17.0 统计软件进行处理，各组数据间差异分析采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 real-time PCR 反应的可重复性、有效性和可靠性

本实验将随机选取的一个样本做 3 个复孔的荧光定量 PCR，从扩增曲线可见三个复孔的荧光值曲线拟合良好，Ct 值接近，说明反应体系稳定，可重复性好。实验中 HSF1 和 GAPDH 标准曲线的扩增效率分别为 97%和 103%，斜率分别为 -3.20 和 -3.26，相关系数分别为 0.99933 和 0.99987，说明实验结果是有效和可靠的。

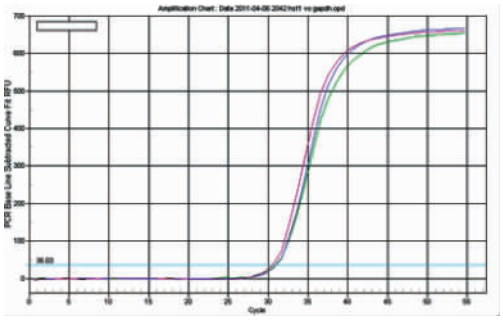

图 1 HSF1 实时定量 PCR 反应扩增曲线

Fig.1 Real time quantitative PCR amplification chart result of HSF1

2.2 溶解曲线分析

溶解曲线分析结果显示 HSF1 基因 real-time PCR 反应扩增产物溶解曲线峰值在 84.5℃，溶解温度均一，峰的形状较为锐利；GAPDH 基因 real-time PCR 反应扩增产物溶解曲线峰值在 86.5℃，溶解温度均一，峰的形状较为锐利。

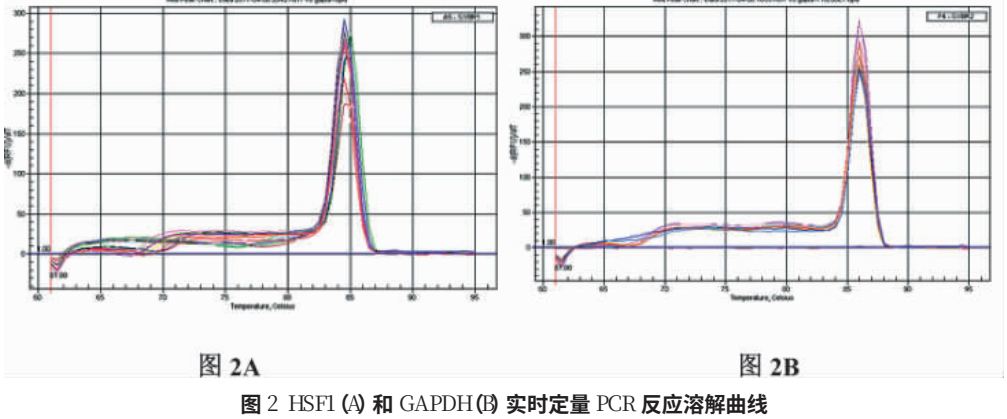

图 2 HSF1（A）和 GAPDH（B）实时定量 PCR 反应溶解曲线

Fig.2 Real time quantitative PCR melt peak chart result of HSF1 (A)and GAPDH (B)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 HSF1 mRNA 在肝细胞癌患者及正常人群外周血中的表达

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 HSF1 mRNA 的表达水平，HSF1 mRNA 在肝细胞癌中的表达量为（2.379± 0.417），在正常人群中的表达量为（1.177± 0.529），两者差异有统计学意义（P<0.05）。

2.4 肝细胞癌患者外周血中 HSF1 mRNA 的表达与临床病理特征的关系

表 1 受检者外周血中 HSF1 mRNA 表达量水平

Table 1 The expression levels of HSF1 mRNA in patients

Group	n	$\bar{x}\pm s$	t	P
HCC group	20	2.397± 0.422	10.976	<0.05
Control group	20	1.191± 2.252		

肝细胞癌患者外周血中 HSF1 mRNA 的表达水平在不同性别、肿瘤大小、门静脉侵犯情况、HbsAg 水平及 AFP 水平的患者中的差异无统计学意义（P>0.05）；在不同病理分化程度、TNM 分期的患者中的差异有统计学意义（P<0.05），肿瘤分化程度越低，HSF1 mRNA 的表达水平越高，临床分期越晚，HSF1 mRNA 的表达水平越高。

表 2 肝细胞癌患者外周血中 HSF1 mRNA 表达水平与临床病理特征之间的关系

Table2 Relationship between HSF1 expression level and clinical pathologic features of patients with HCC

Clinical pathologic features		n	$\bar{x}\pm s$	t	P
Sex	Male	12	2.391± 0.388	-0.08	>0.05
	Famale	8	2.406± 0.496		
Tumour diameter	>5cm	9	2.458± 0.489	-0.58	>0.05
	≤ 5cm	11	2.347± 0.374		
Portal involvement	Yes	3	2.329± 0.423	0.297	>0.05
	No	17	2.409± 0.503		
Differentiation	High, middle	15	2.258± 0.324	-0.307	<0.05
	Low	5	2.814± 0.433		
TNM stage	Ⅰ+Ⅱ	11	2.210± 0.308	-2.467	<0.05
	Ⅲ+Ⅳ	9	2.625± 0.444		
HbsAg	Positive	13	2.360± 0.388	-0.526	>0.05
	Negative	7	2.466± 0.504		
AFP	Positive	11	2.252± 0.310	-1.794	>0.05
	Negative	9	2.574± 0.488		

3 讨论

在人体内，HSF 为一 82KD 的转录因子，定位于 9 号染色体 q11-12，含有两个开放读码框架，分别为 489 和 529 个氨基酸。人 HSF 家族包括三个成员：HSF1、HSF2 和 HSF4。其中 HSF1 是最具有代表性的 HSF。HSF1 在人体中最主要的作用是通过特异性结合热休克元件（HSE），从而启动下游 HSPs 的转录[7,8]。大量研究报道 HSPs 的表达与肿瘤的发生、发展与预后差有关[9-11]。

近来的国内外研究表明，在前列腺癌[12]、乳腺癌[13]、胃肠道癌[14]等多种恶性肿瘤中，HSF1 均有较高水平的表达。Hoang[12]等首先报道了人前列腺癌的发生与 HSF1 相关，他们采用代表性差异分析法研究非转移型前列腺癌细胞系和转移型前列腺癌细胞系，发现 HSF1 呈过表达，同样的现象也在前列腺癌组织标本中被发现。Nakamura 等[15]在人黑色素瘤的研究中也得到了上述结论，并且通过小干扰 RNA 沉默掉 HSF1 基因后，使肿瘤细胞的侵袭增殖能力出现显著下降。另外在子宫颈癌的研究中发现，沉默掉 HSF1 基因后明显增强了子宫颈癌细胞对化疗的敏感性[16]。这些都说明，HSF1 不仅与肿瘤的发生发展关系密切，而且很可能在肿瘤的侵袭转移中发挥了关键作用[17,18]。我们的科研团队在前期研究中发现在人肝细胞癌组织中 HSF1 蛋白的表达显著高于正常肝脏组织，HSF1 蛋白的高表达与肝细胞癌的侵袭转移相关。

Real-time PCR 技术实现了 PCR 反应从定性到定量的飞跃，是目前分子生物学研究的重要工具，它具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快和全封闭的特点。SYBR

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

green 荧光 real-time PCR 是简便、低成本的荧光方法，它的原理是利用 taq 酶对荧光双标记探针的切口平移效应，连续不断地检测反应体系中荧光信号的变化，当信号增强到某一阈值时，此时 Ct 值就被记录下来，该参数和 PCR 体系中起始 DNA 量的对数值之间有严格的线性关系，利用阳性梯度标准品的 Ct 值就可以准确确定出起始 DNA 的数量[19]。

目前临床上用于筛查、诊断、随访肝细胞癌的血清学标志物仍比较局限，最常用的 AFP 依旧有着敏感性较低、特异性不强的缺点[20,21]，因此寻找新的肝细胞癌血清学诊断标志物迫在眉睫[22]。

我们此次的实验结果显示，HSF1 mRNA 在肝细胞癌患者外周血中的表达水平明显高于正常人群。临床病理因素分析表明，不同性别、肿瘤大小、门静脉侵犯情况、HbsAg 水平及 AFP 水平的肝细胞癌患者血清中的 HSF1 mRNA 差异无统计学意义（$P>0.05$），分化越差的肝细胞癌患者外周血中 HSF1 mRNA 的表达水平越高，临床分期越晚的肝细胞癌患者外周血中 HSF1 mRNA 的表达水平越高。说明外周血中 HSF1 基因的表达与肿瘤的恶性程度、侵袭转移等预后不良因素有关。

应用 real-time PCR 技术检测患者外周血中 HSF1 基因的表达水平方法简便、重复性好、特异性和扩增效率高，我们的初步实验结果理想，为肝细胞癌的诊断、预后及靶向治疗提供了一个潜在的新途径。下一步我们要进行大样本量、更为深入的研究，并将其敏感性与 AFP 进行对比，以期早日提供更有意义的临床实验结果。

参考文献（References）

[1] Venook AP, Papandreou C, Furuse J, et al. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: A global and regional perspective [J]. Oncologist, 2010, 15(suppl 4):5-13

[2] Han KH, Kudo M, Ye SL, et al. Asian consensus workshop report: expert consensus guideline for the management of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma in Asia [J]. Oncology,2011,81Suppl 1: 158-164

[3] Salhab M, Canelo R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. J Cancer Res Ther, 2011,7(4):463-475

[4] Chengkai Dai, Luke Whitesell, Arlin B. Rogers, et al. Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modi?er of Carcinogenesis [J]. Cell, 2007, 130:1005-1018

[5] Whitesell L, Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(4):469-478

[6] Purcell MK, Getchell RG, McClure CA, et al. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of aquatic animal pathogens in a diagnostic laboratory setting[J]. J Aquat Anim Health, 2011, 23(3):148-161

[7] Yu Y, Liu M, Zhang L, et al. Heat shock transcription factor 1 inhibits H(2)O (2)-induced cardiomyocyte death through suppression of high-mobility group box[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1-2):263-269

[8] Meng L, Gabai VL, Sherman MY. Heat-shock transcription factor HSF1 has a critical role in human epidermal growth factor receptor-2-induced cellular transformation and tumorigenesis[J]. Oncogene, 2010, 29 (37):5204-5213

[9] Zhou J, Fang L, Yao WX, et al. Effect of quercetin on heat shock protein expression in HepG2 cells determined by SILAC[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2011, 33(10):737-741

[10] Xiang Y, Koomen JM. Evaluation of direct infusion-multiple reaction monitoring mass spectrometry for quantification of heat shock proteins[J]. Anal Chem,2012,84(4):1981-1986

[11] Guttmann DM, Koumenis C. The heat shock proteins as targets for radiosensitization and chemosensitization in cancer [J]. Cancer Biol Ther,2011,12(12) [Epub ahead of print]

[12] Hoang AT, Huang JP, Rudra-Ganguly N, et al. A novel association between the human heat shock transcription factor1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma[J]. Am J Pathol, 2000, 156(3):857-864

[13] Calderwood SK. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment[J]. Int J Hyperthermia, 2010,26(7):681-685

[14] Li T, Chen CL, Wang JD, et al. Expression of heat-shock transcription factor 1 and X-linked inhibitor of apoptosis protein-associated factor-1 in gastrointestinal cancer [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008, 28(3):487-490

[15] Yoshitaka Nakamura, Mitsuaki Fujimoto, Naoki Hayashida, et al. Silencing HSF1 by short hairpin RNA decreases cell proliferation and enhances sensitivity to hyperthermia in human melanoma cell lines [J]. J Dermatol Sci, 2010, 60(3): 187-192

[16] Rossi A, Ciafrè S, Balsamo M,et al. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(15):7678-7685

[17] Aldana-Masangkay GI, Sakamoto KM. The role of HDAC6 in cancer [J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:875824

[18] Khaleque MA, Bharti A, Gong J, et al. Heat shock factor 1 represses estrogen-dependent transcription through association with MTA1[J]. Oncogene, 2008, 20:27(13):1886-1893

[19] Farah AM, Mustafa MI, How SH, et al. Development of multiplex real-time PCR for the rapid detection of five bacterial causes of community acquired pneumonia[J]. Trop Biomed, 2011, 28(3):545-556

[20] Lao Ming, Zhu Bo, Huang Lingsha, et al. Diagnostic value of three kinds of tumor markers in primary hepatic carcinoma [J]. Chinese Journal of Digestion, 2005, 25: 109-110

[21] Ma Jingxiang, Gong Qilin, Lin Meiqing, et al. Combined five tumor markers in detecting primary hepatic carcinoma [J]. Chinese Journal of Surgery, 2000, 38: 14-16

[22] Voiculescu M, Winkler RE, Moscovici M, et al. Chemotherapies and targeted therapies in advanced hepatocellular carcinoma: from laboratory to clinic[J]. J Gastrointestin Liver Dis, 2008, 17(3): 315-322

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net