

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.026

缺氧诱导因子-1 α 在肝癌组织中的动态表达特征及意义*

郭晓东 杨 美 周艳贤 余灵祥 熊 璐 李志伟[△]

(解放军第 302 医院 北京 100039)

摘要 目的:研究肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)组织中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的动态表达特征及其临床价值。**方法:**采用 WB、IHC 以及 PCR 方法测定并比较 HIF-1 α 在不同肝脏组织中的阳性情况以及表达量,分析 HIF-1 α 强阳性和临床病理的关系。**结果:**正常肝组 HIF-1 α 阴性率明显高于其他各组;HCC 坏死组 HIF-1 α 强阳性率最高。正常肝组 HIF-1 α 表达量明显低于其他各组;HCC 坏死组表达量最高且明显高于 HCC 组。中低度分化组 HIF-1 α 强阳性较高度分化组高得多;有转移组 HIF-1 α 强阳性较无转移组高得多。差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**HIF-1 α 在肝硬化以及 HCC 组织中表达量均高于正常肝组织。HIF-1 α 表达与肿瘤分化的程度以及 HCC 转移相关,但与有无癌栓及 HBsAg 表达及预后不相关,为临床治疗肝癌提供了新思路。

关键词:肝癌;HIF-1 α ;表达特征;临床意义

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)17-3300-04

Dynamic Expression Characteristics and Significance of HIF-1 α in Hepatocellular Carcinoma Tissues

GUO Xiao-dong, YANG Mei, ZHOU Yan-xian, YU Ling-xiang, XIONG Lu, LI Zhi-wei[△]

(302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

ABSTRACT Objective: To study the dynamic expression characteristics of HIF-1 α in HCC tissues and its clinical significance. **Methods:** WB, IHC and PCR methods were used to determine and compare the positive expression and expression quantity of HIF-1 α in different liver tissues. The relationship between the strong positive expression of HIF-1 α and clinical pathology was analyzed. **Results:** The negative rate of HIF-1 α in normal liver tissues was much higher than that in other groups; the strong positive rate of HIF-1 α in HCC necrosis tissues was the highest. The expression of HIF-1 α in normal liver tissues was much less than that in other groups; the HIF-1 α expression in HCC necrosis tissues was the highest and clearly higher than HCC liver tissues. The strong positive expression of HIF-1 α in group with low differentiation was higher than that in high differentiation group, and the strong positive expression in group with metastasis was higher than that in non metastasis group. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of HIF-1 α in liver cirrhosis and HCC tissues was all higher than normal liver tissues. HIF-1 α expression is associated with tumor differentiation degree and HCC metastasis, but is not related to cancer embolus, expression of HBsAg and prognosis, which provides a new idea for HCC treatment.

Key words: HCC; HIF-1 α ; Expression characteristics; Clinical significance

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

Article ID: 1673-6273(2014)17-3300-04

前言

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的癌症之一,在全球范围内肿瘤相关性死亡因素中排名第三^[1,2]。我国是肝癌高发国家,每年约有 11 万人死于肝癌,占全世界肝癌死亡人数的 45%。肝癌的预防和治疗是世界性难题,至今仍缺乏有效治疗手段。由于肿瘤侵袭、频繁的肝内扩散及肝外转移,预后不良^[3]。缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是由 α 以及 β 两个亚基组成,是介导生理以及病理低氧性反应比较关键的转录因子。HIF-1 α 为缺氧型依赖因子,当氧分压处

于正常状态时,可以抑制癌变基因 VHL 产物 p-VHL 的形成^[4],从而引导 HIF-1 α 形成泛素型多聚体,进而发生水解。LV 生长以及进展最为关键的步骤为血管生成,HIF-1 α 过表达能促进癌变细胞生长^[5,6]。我们对 HIF-1 α 在肝细胞癌中的表达及临床意义展开研究,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 标本选取

108 例临床标本均取自我院病理科,均经病理证实。经过甲醛固定,用石蜡进行包埋后保存。所有标本都做 2 张 5

* 基金项目:解放军第 302 医院院长创新基金(2012039)

作者简介:郭晓东, E-mail: gxd302@163.com

[△] 通讯作者:李志伟,主任医师, E-mail: laohushangshang@163.com

(收稿日期:2013-11-05 接受日期:2013-11-30)

μm 的连续切片。分别进行 HE 染色以及 IHC 染色。其中男 67 例,女 41 例;年龄在 19-70 岁之间,平均年龄为 (48.9 ± 7.3) 岁。肝细胞癌 51 例,肝硬化 33 例,正常肝 24 例。其中 HCC HBsAg 阳性者 44 例,阴性者 7 例;正常肝 HBsAg 全为阴性。根据 Sugihara 分级^[7],将 HCC 分成高度分化 16 例,中度分化 20 例,轻度分化 15 例。

1.2 试剂

HIF-1 α 鼠单抗(Abcam),羊抗鼠二抗(Jackson),IHC 试剂盒(Vector),ECL 显色试剂(Vector),PCR 试剂盒(MBI)均由上海麦生物代购。PCR 所需引物由北京旷博生物合成。

1.3 方法

1.3.1 Western-blotting 取 50 μg 总蛋白 进行凝胶电泳,将蛋白分离好后转移到 PVDF 膜,用稀释好的一抗(1:80)以及 HRP 标记的二抗(1:10000)将其封闭,用 ECL 显色液进行显色。同时设内参对照。

1.3.2 Immunohistochemistry (IHC) 把石蜡切片用二甲苯进行脱蜡,用乙醇进行梯度水化,而后用 PBS 洗 5 分钟;使用 3% H_2O_2 将其封闭 10 分钟。采用 PBS 煮沸法进行抗原修复,封闭液采用 10%的山羊血清,加入稀释好的一抗(1:500),在室温下孵育过夜。用 PBS 将其清洗 5 分钟后用 IHC 试剂盒进行染色。同时

设空白以及阳性对照。

1.3.3 RT-PCR 严格参照说明书 上游引物为 5'-GACAAGCCA-CCTGAGGAGAG-3',下游引物为 5'-GGCCTTATCAAGATGC-GAAC-3'。

1.4 评价标准

在切片中将染为淡黄色至棕黄色作为阳性标志。将阳性细胞数分为 4 类:(-) 为阳性细胞 <1%;(+) 为阳性细胞占 1%至 25%;(++)为阳性细胞占 25%至 50%;(+++)为阳性细胞 >50%^[8]。

1.5 统计学方法

SPSS13.0 软件分析,数据比较 χ^2 检验,计量数据 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α 在不同肝脏组织中的表达阳性比较

正常肝组 HIF-1 α 阴性率是 95.83%(23/24),较其他各组的 6.06%(2/33)、5.26%(2/38) 和 7.69%(1/13) 高得多。肝硬化组、HCC 坏死组中 HIF-1 α 强阳性率分别是 54.55%(18/33)、34.21%(13/33) 和 61.54%(8/13),都明显高于正常肝组的 0%(0/24),且 HCC 坏死组强阳性率最高。差异均具有统计学意义($P < 0.05$),提示 HIF-1 α 表达和 HCC 进展密切相关,见表 1。

表 1 HIF-1 α 在不同肝脏组织中的表达阳性比较(%)

Table 1 Comparison of HIF-1 α positive expression in different liver tissues(%)

Group	Cases	HIF-1 α			
		-	+	++	+++
① Normal liver	24	23(95.83)	1(4.17)	0(0)	0(0)
② Liver cirrhosis	33	2(6.06)*	5(15.15)	8(24.24)*	18(54.55)*
③ HCC	38	2(5.26)*	10(26.32)	13(34.21)*	13(34.21)*
④ HCC necrosis	13	1(7.69)*	1(7.69)	3(23.08)*	8(61.54)*
② VS ①	χ^2	45.478	1.780	6.768	19.133
	P	0.000	0.182	0.009	0.000
③ VS ①	χ^2	50.143	4.946	10.389	10.389
	P	0.001	0.026	0.001	0.001
④ VS ①	χ^2	28.745	0.205	6.027	18.844
	P	0.000	0.651	0.014	0.000

Note: Compared with normal liver group, * $P < 0.05$.

2.2 HIF-1 α 在不同肝脏组织中的表达量比较

正常肝组 HIF-1 α 表达量为 (14826.2 ± 10011.1) ,明显少于

肝硬化组 (62864.1 ± 10031.1) 、HCC 组 (53783.1 ± 11011.2) 以及 HCC 坏死组 (68553.2 ± 10133.1) 。其中 HCC 坏死组表达量最

表 2 HIF-1 α 在不同肝脏组织中的表达量比较(例, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of HIF-1 α expression quantity in different liver tissues (cases, $\bar{x} \pm s$)

Group	Cases	HIF-1 α expression quantity	Compared with normal liver		Compared with HCC necrosis	
			t	P	t	P
① Normal liver	24	14826.2 $\pm$ 10011.1#			15.519	0.000
② Liver cirrhosis	33	62864.1 $\pm$ 10031.1*	17.866	0.000	1.641	0.110
③ HCC	38	53783.1 $\pm$ 11011.2*#	14.044	0.000	4.002	0.000
④ HCC necrosis	13	68553.2 $\pm$ 10133.1*	15.519	0.000		

Note: Compared with normal liver group, * $P < 0.05$; compared with HCC necrosis group, # $P < 0.05$.

高,且明显高于 HCC 组。差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 HCC 组织 HIF-1 α 的表达与临床病理的关系

中低度分化组 HIF-1 α 强阳性为 54.29%(19/35),明显高于

比高度分化组 6.25%(1/16)。有转移组 HIF-1 α 强阳性为 78.57%(11/14),明显比无转移组的 24.32%(9/37)高得多。差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 HCC 组织 HIF-1 α 的表达与临床病理的关系

Table 3 Relationship between HIF-1 α expression in HCC tissues and clinical pathology

Pathological characteristics	Cases	HIF-1 α strong positive expression	χ^2	P
Differentiation degree				
High	16	1(6.25)	10.629	0.001
Medium and low	35	19(54.29)*		
Lymphatic metastasis				
Yes	14	11(78.57)	12.539	0.000
No	37	9(24.32)*		
HBsAg				
Positive	44	19(43.18)	2.115	0.146
Negative	7	1(14.29)		
Survival time				
1-3 years	16	9(56.25)	3.772	0.052
3-5 years	21	8(38.10)		
>5 years	14	3(21.43)		
Cancer embolus				
Yes	20	7(35.00)	0.245	0.620
No	31	13(41.94)		

Note: Compared among groups, * $P<0.05$.

3 讨论

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,有逐年增高的趋势,其中肝细胞肝癌占原发性肝癌的 90%以上。肝癌危害严重,其发生率和死亡率分别占全球恶性肿瘤的第 5 位和第 3 位,占我国恶性肿瘤的第 3 位和第 2 位。我国每年约 11 万人死于肝癌,占全世界肝癌死亡人数的 45%^[9,10]。肝癌的预防和治疗是全世界面临的重要难题和重大研究课题。目前肝癌的治疗主要采取以手术、放疗、化疗和免疫治疗为主的综合治疗,然而晚期病患由于癌变细胞扩散常常导致治愈率非常低,目前肝癌总体治疗效果仍不满意,仍是最难治的恶性肿瘤之一。

在恶性肿瘤病理中,肿瘤发展过程中的关键步骤之一是细胞对低氧的适应和血管生成。HIF-1 是一种广泛存在于哺乳动物和人体内的转录因子,是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚单位组成的异源二聚体核转录因子,属于 bHLH-PAS 家族成员^[11,12]。其中 HIF-1 α 是主要的氧调节亚基和功能亚基,可调节多种靶基因的表达式,在肿瘤的低氧反应过程中,HIF-1 α 对维持肿瘤细胞的能量代谢、刺激新生血管生成、促进肿瘤细胞增殖和转移起重要作用。以往研究表明,HIF-1 α 在肺癌、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌等肿瘤中呈现不同程度的表达,部分过表达占 90%以上,而在相应正常组织及一些良性病变中并无表达,提示 HIF-1 α 的表达与肿瘤的良恶性有明显关系^[13,14]。而 HCC 最主要的特点为癌变细胞的生长很难调控,细胞数量不断增多从而导致其耗氧量上升,极易使癌变组织形成缺氧性微环境。

HIF-1 α 属于缺氧型依赖因子,缺氧性微环境极易提升其表达量^[15,16]。探讨 HIF-1 α 在 HCC 组织中的表达及其临床意义,可为 HCC 临床治疗提供新的线索。

实验结果显示,正常肝组 HIF-1 α 阴性率明显高于其他各组,其中 HCC 坏死组 HIF-1 α 强阳性率最高;正常肝组 HIF-1 α 表达量明显低于其他各组,且 HCC 坏死组 HIF-1 α 表达量最高,结果与先前报道相符^[17]。HIF-1 α 在大多正常肝中没有检测到,可能是因为 HIF-1 α 属于缺氧型依赖因子,其氧分压处于正常时非常不稳定,容易被降解。HIF-1 α 在肝硬化以及 HCC 组织内普遍表达,可能和以下因素相关:①肝脏组织出现缺血以及缺氧状态使得 HIF-1 α 的表达上升;②某些病理组织的结构出现异常且其血动力学出现紊乱使得细胞处于缺氧性微环境;③癌变基因的失活(例如 p53)或者激活(例如 Ser)等,都有可能使 HIF-1 α 表达量上升。研究结果还显示 HIF-1 α 表达和肿瘤分化的程度以及 HCC 转移相关,但是和有无癌栓和 HBsAg 表达以及预后不相关,结果与郭晓东^[18,19]等人的报道基本一致。原因可能是当肿瘤长到足够大时,需要长入新生血管,其中血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)为其生成的主要因素,而 VEGF 又是 HIF-1 α 主要的靶基因。HIF-1 α 能够上调 VEGF 表达,从而促使血管生成,进而诱发 HCC 转移^[20]。但是研究结果显示病患生存期与 HIF-1 α 无关,提示病患预后是由多种因素影响的,HIF-1 α 表达高低不能成为判断病患预后的指标。

综上所述,HIF-1 α 在肝硬化以及 HCC 组织中表达量均高

于正常肝,其表与和肿瘤分化程度以及 HCC 转移相关,但与有无癌栓及 HBsAg 表达以及预后不相关,为临床治疗 HCC 提供了新思路。

参考文献(References)

- [1] Ma W, Shi X, Lu S, et al. Hypoxia-induced overexpression of DEC1 is regulated by HIF-1 α in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(6):2957-2962
- [2] Cui SY, Huang JY, Chen YT, et al. The role of Aurora A in hypoxia-inducible factor 1 α -promoting malignant phenotypes of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(17): 2849-2866
- [3] 郭晓东, 熊璐, 张红萍, 等. miRNA-181 在肝癌中表达变化的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(05):869-871
Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zhang Hong-ping, et al. Expression of miRNA-181 in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(05):869-871
- [4] Guan Tie-jun, Wang Bin, Chen Feng, et al. Relationship Between HIF-1 α Expression and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma [J]. *China Cancer*, 2013, 22(4):304-307
- [5] Tong Y, Li QG, Xing TY, et al. HIF1 regulates WSB-1 expression to promote hypoxia-induced chemoresistance in hepatocellular carcinoma cells [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(16):2530-2535
- [6] Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zou L, et al. L1 cell adhesion molecule overexpression in hepatocellular carcinoma associates with advanced tumor progression and poor patient survival [J]. *Diagn Pathol*, 2012, 13, 7:96
- [7] Dong Zhi-zhen, Yao Deng-fu, Li Shan-shan, et al. Expression characteristics of hypoxia inducible factor-1 α and its clinical values in hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2010, 18(7): 506-510
- [8] Ni Jia-yan, Wu Yu-dan, Huang Kang-hua, et al. Effects of HIF-1 α siRNA interference on expressions of HIF-1 α and VEGF in rat CBRH-7919 hepatoma cells [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2012, 19(22):1704-1708
- [9] Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zou L, et al. Upregulation of Bone morphogenetic Protein 4 is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma [J]. *Pathology & Oncology Research*, 2012, 18(3): 635-640
- [10] 郭晓东, 杨敏亮, 周艳贤, 等. miR-221 在肝癌干细胞亚群中的差异表达[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(03):465-467+563
Guo Xiao-dong, Yang Min-liang, Zhou Yan-xian, et al. Differential Expression of miR-221 in Subpopulations of Cancer Stem Cells Derived from Hepatocellular Carcinoma[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(03):465-467+563
- [11] Wang Wei, Xu Ge-liang, Jia Wei-dong, et al. Expression and correlation of HIF-1 α , VEGF and MVD in the canceration of mouse liver [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2009, 26(3):391
- [12] Xu Lin-feng, Ni Jia-ting, Chen Yao-ting, et al. Effects of HIF-1 α silencing on expression of p27 and Ki67 in rat hepatoma cell line CBRH-7919 [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2012, 28(10): 1825-1829
- [13] Wang Zhi-na, Zhang Chun-qing, Wang Qi-zhi, et al. The clinical significance and the expression of Vasohibin1 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013, 22(7): 628-631
- [14] Hsu CC, Wang CH, Wu HCC, et al. Mitochondrial dysfunction represses HIF-1 α protein synthesis through AMPK activation in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(10): 4743-4751
- [15] Wu Yu-dan, Ni Jia-ting, Chen Yao-ting, et al. Effects of HIF-1 α silencing on proliferation of rat hepatoma cells[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2013, 29(7): 1207-1212
- [16] Xia Rong-long, Xu Zong-quan, Zhang Rui-qin, et al. Effects of HIF-1 α expression regulated by Tet-on gene expression system on hepatoma cell proliferation and cell cycle in vitro[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2010, 25(10):834-837
- [17] Jia Zhong-zhi, Huang Yuan-quan, Feng Yao-liang, et al. Correlations between serum hypoxia inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and computed tomography perfusion imaging at pre-and post-TACE in patients with primary hepatic carcinoma [J]. *National Medical Journal of China*, 2013, 93(19): 1472-1475
- [18] 郭晓东, 孟繁平, 熊璐, 等. HIF-1 α 的表达在肝移植后肝癌复发与转移中的意义[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(5):876-879
Guo Xiao-dong, Meng Fan-ping, Xiong Lu, et al. Clinical significance of HIF-1 α expression in recurrence and metastasis of patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(5):876-879
- [19] Ni Qi, Zeng Si-en, Tan Ning, et al. The Role of Hypoxia Inducible Factor-1 in the Evolution from Hepatitis to Hepatocellular Carcinoma [J]. *Medical Recapitulate*, 2009, 15(5):641-644
- [20] Chen Yuan-yuan, Liang Zhong-xiao, Pan Jin-fei, et al. Expression and significance of HIF-1 α and VEGF in hepatocellular carcinoma tissues[J]. *Shan Dong Medical Journal*, 2010, 50(47): 57-58