

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.25.031

DEC1-mRNA 在肝癌患者血清中的表达和手术预后的关系 *

李志伟 郭晓东 赵 新 余灵祥 张培瑞[△]

(解放军第 302 医院 北京 100039)

摘要 目的:研究 DEC1 在肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)患者血清中的表达水平及其临床意义。**方法:**收集 60 例 HCC 患者,30 例正常人,30 例慢性肝炎患者,30 例慢性肝硬化患者血清标本。采用实时荧光定量 RT-PCR(RT-PCR)检测血清 DEC1 的表达情况。分析血清 DEC1 的表达水平与 AFP 相关性。探讨血清 DEC1 的表达水平与 HCC 手术预后的关系。**结果:**肝癌患者血清 DEC1 明显高于正常人、慢性肝炎和慢性肝硬化患者($P<0.05$)。皮尔森相关分析结果显示 HCC 患者血清 DEC1 的表达与血清 AFP 水平是呈正相关的。Kaplan-Meier 结果显示血清 DEC1 低表达组术后的复发转移率显著低于高表达组,其术后生存率也显著高于高表达组($P<0.01$)。**结论:**DEC1 在肝癌者血清中高表达,不仅可能成为 HCC 诊断的标记物,且其血清表达水平也有助于 HCC 临床预后的评估。

关键词:肝细胞癌;血清;DEC1;预后

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)25-4924-03

The Correlation between DEC1 in Serum and the Prognosis of Postoperative Patients with Hepatocellular Carcinoma*

LI Zhi-wei, GUO Xiao-dong, ZHAO Xin, YU Ling-xiang, ZHANG Pei-rui[△]

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

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of DEC1 in serum of patients with the hepatocellular carcinoma (HCC), as well as their clinical significances. **Methods:** The blood samples were collected from 60 patients with HCC, 30 patients with chronic hepatitis, 30 patients with chronic hepatic cirrhosis and 30 normal subjects. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression levels of DEC1 in the serum. Pearson's correlation analysis was used to estimate the relationship between DEC1 and AFP. The correlations of DEC1 expression to the prognosis were analyzed. **Results:** The expression of DEC1 level in the serum of patients with HCC was significantly higher than those of the benign diseases and the healthy controls($P<0.05$). Pearson's correlation analysis showed that DEC1 expression level in serum had a close correlation with AFP ($P<0.05$). The survival time of HCC patients with a lower DEC1 expression level was longer than those with a higher level, and the recurrent/metastatic of HCC patients with a lower DEC1 expression level was also lower than those with higher expression ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression of DEC1 in serum may serve as a promising and prognostic biomarker for HCC.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Serum; DEC1; Prognosis

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

Article ID:1673-6273(2014)25-4924-03

前言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是常见的恶性肿瘤之一。目前在内地人口中,肝癌的发病率已超过胃癌而位居消化道恶性肿瘤死亡率之首,其发病人数占全球总人数的 55%,死亡人数可达 45%,也就是说,每一分钟就有一人死于肝癌^[1,2]。由于肝细胞肝癌发病隐匿、进展快,患者确诊时常为中晚期,失去了治疗的最佳时机,从而导致预后较差^[3,4]。因此,肝细胞肝癌的早期诊断对患者的治疗至关重要。

分化型胚胎软骨发育基因 1(differentiated embry-onchondrocyte expressed gene 1,DEC1)为碱性螺旋-环-螺旋

(bHLH)结构的转录因子^[5]。研究显示,DEC 1 通过调控肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡,从而在恶性肿瘤的发生发展中发挥重要的作用^[5-7]。DEC1 在胃癌、肺癌等多种恶性肿瘤组织中呈高表达,但在 HCC 患者血清中的表达情况尚不清楚。本文通过检测肝癌患者血清 DEC1 的表达水平,探讨 DEC1 在 HCC 发展中的相关机制,为 DEC1 在 HCC 的诊断和治疗中的应用提供理论和实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集我院 2010 年 4 月~2012 年 6 月接受手术治疗的 60

* 基金项目:北京首都市民健康项目培育基金资助(z131100004013041)

作者简介:李志伟(1967-),主任医师,医学硕士,主要研究方向:肝胆肿瘤治疗与研究

△ 通讯作者:张培瑞,副主任医师,E-mail:laohushanshang@163.com

(收稿日期:2014-02-22 接受日期:2014-03-19)

例 HCC 患者血清样本。HCC 的诊断标准如下:①影像学标准:两种影像学检查均显示有 >2 cm 的肝癌特征性占位性病变。②影像学结合 AFP 标准:一种影像学检查显示有 >2 cm 的肝癌特征性占位性病变,同时伴有 AFP $\geq 400 \mu\text{g/L}$ 。③对影像学不能确定诊断的 $\leq 2 \text{ cm}$ 的肝内结节,尽可能通过肝穿刺活组织检查以证实为肝癌。其中男性 48 例,女性 12 例,平均年龄(51.7 ± 7.4)岁。所有患者均经过术后组织病理学证实。另取在我院接受住院治疗的 30 例慢性乙型肝炎患者为慢性肝炎组;30 例慢性肝硬化患者为肝硬化组;选健康体检者 30 名为对照组。本研究所有患者均自愿加入并签署知情同意书。

1.2 样本采集

所有实验对象均在凌晨空腹情况下采集静脉血 5 mL,将采集的静脉血置于室温下 1 h。4℃、1500 rpm 条件下离心 15 min,取上清(血清)置于新 1.5 mL 微量离心管。放入 -80℃ 冰箱待实验。

1.3 主要试剂及仪器

Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司);逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(Takara 公司);SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TakaRa 公司);DEC1 及 β -actin 引物序列由上海阅微基因技术有限公司合成;DEC1 基因引物:上游 5'-TGTGGGAGAG-AAAGACAAGGAGA-3',下游 5'-TTTCCTCCATTGTAGC-AGACTCC-3';扩增片段为 201bp;紫外分光光度计(VARIAN 公司);ABI PRISM 7900 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司)。

1.4 实验方法

RT-PCR 检测血清中 DEC1 的表达水平:①血清总 RNA 的提取:每 1 mL 血清加入 1 mL 的 Trizol 试剂充分混匀,提取血清中的总 RNA。异丙醇沉淀浓缩 RNA。使用 NanoDrop ND-1000 测定 RNA 浓度和纯度,变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。将提取出的 RNA 样品保存于 -80℃ 冰箱以备下一步实验使用。②cDNA 合成:按照 RevertAid First strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明进行操作。构建 10 μL 反应体系:10 $\times$ RT buffer 1 μL ,dNTPs 混合物 1 μL ,RNase Inhibitor 0.25 μL ,AMV Reverse Transcriptase 0.5 μL ,Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μL ,MgCl₂ 2 μL 。在 Gene Amp PCR System 9700 仪器上进行 RT 反应。40℃ 反转录 50 min,95℃ 5 min 灭活反转录酶。③Real-time PCR 反应:以 β -actin 为内参基因,建立 20 μL 反应体系:5 $\times$ PCR buffer 5 μL ,TaKaRa Ex Taq HS 酶 0.125 μL ,DEC1 上、下游引物各 1 μL , β -actin 上、下游引物各 1 μL ,RNase free H₂O 9.875 μL 。反应条件如下:94℃,2 min;94℃,30 s;56℃,30 s;72℃,1 min,共 30 个 PCR 循环。通过 cDNA 浓度梯度的 log 值对 ΔCT 值作图,如果所得直线斜率绝对值接近于 0,说明目标基因和内标基因的扩增效率相同。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法(CT 值定义为每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数)对 DEC1 表达的相对强度进行分析。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,采用 χ^2 检验分析各组数据的组间差异情况,Kaplan-Meire 法计算复发转移率与术后生存率,皮尔森相关分析评估血清 DEC1 的表达水平与 AFP 的相关

性,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 患者与肝良性疾病、正常人血清 DEC1 表达情况

通过 RT-PCR 检测各组血清 DEC1 表达的 CT 值。以 U6 为内参基因,经 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算,HCC 患者血清 DEC1 表达相对值为(0.87 ± 0.15);较正常人、慢性肝炎患者和慢性肝硬化患者血清 DEC1 表达相对值(0.17 ± 0.04 , 0.19 ± 0.04 和 0.21 ± 0.06)明显上调($P < 0.01$)。而正常人、慢性肝炎患者和慢性肝硬化患者血清 DEC1 的表达比较则无显著差异($P > 0.05$)(图 1)。

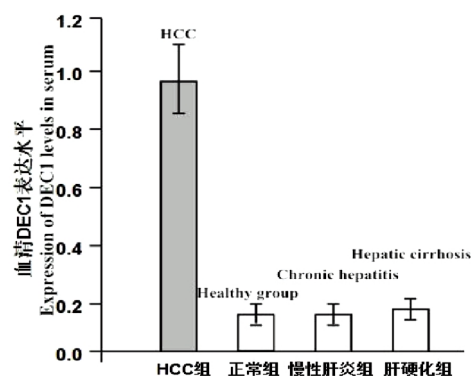


图1 各组血清 DEC1 水平表达情况

Fig.1 Expression of serum DEC1 in four groups

2.2 血清 DEC1 的表达与 AFP 的相关性分析

皮尔森相关分析结果显示 HCC 患者血清中 DEC1 的表达与 AFP 的相关系数 $r=0.76$,是呈明显正相关的($P < 0.05$)。

2.3 血清 DEC1 的表达与 HCC 手术预后的关系

将 60 例 HCC 患者血清 DEC1 表达量的平均值 0.87 作为划分标准,分为 DEC1 高表达组和低表达组,其中高表达组 37 组例,低表达组 23 例。术后 1 年,高表达组患者复发率为 81.1%,低表达组患者复发率为 47.8%;高表达组患者生存率为 62.2%,低表达组患者生存率为 82.6%。两组比较,高表达组患者的复发率明显高于低表达组,而血清 DEC1 低表达组的生存率明显高于高表达组($P < 0.05$)。

3 讨论

HCC 是临床上最常见的恶性肿瘤之一,发病率在世界范围内正处于逐年增长的趋势。其发病隐匿、预后差、死亡率高,严重危害人类的健康和生命^[89]。研究表明,HCC 的发生与病毒性肝炎和肝硬化等慢性肝病密切相关^[10]。然而,HCC 的具体发病原因和机制尚未完全明确。随着近年来对恶性肿瘤发生相关分子生物学的研究不断深入,大量与 HCC 发生相关的基因和信号通路被发现,为我们研究 HCC 的发病机制、早期诊断 HCC 和治疗 HCC 提供了大量科学的理论和实验依据。

DEC1 是近年来发现的一个肿瘤相关基因,其定位于人类染色体 3p25.3-26 上,是 bHLH 蛋白家族的成员之一,是一类具有碱性螺旋-环-螺旋结构域的转录因子^[11-13]。DEC1 可以通过其中的酪氨酸和丝氨酸/苏氨酸基因序列的磷酸化位点被蛋白激酶和肌酸激酶 H 等激活而发挥重要的病理和生理调节作

用^[14,15]。研究显示,DEC1 广泛表达于大多数正常组织,如肌肉、肝、心和胎盘,在软骨形成、神经发生、免疫应答等方面发挥重要的调控作用^[16,17]。最近的研究还发现 DEC1 在很多肿瘤如白血病、结肠癌、肺腺癌、胃癌、肝癌等中存在高表达,并可调控肿瘤生长、凋亡相关因子的表达,与肿瘤的发生、发展密切相关^[18,19]。

大量研究证实,恶性肿瘤患者血清中肿瘤相关基因的表达强度会出现异常变化,而且这种改变与肿瘤的发生、发展、复发、转移以及预后密切相关^[20]。因此本次研究我们采用 Real-time PCR 技术分析 HCC 患者与肝良性病、正常人血清 DEC1 表达情况。结果显示:HCC 患者血清 DEC1 表达相对值为 0.87 ± 0.15 ;较正常人、慢性肝炎患者和慢性肝硬化患者血清 DEC1 表达相对值 (0.17 ± 0.04 , 0.19 ± 0.04 和 0.21 ± 0.06) 明显上调 ($P < 0.01$)。而正常人、慢性肝炎患者和慢性肝硬化患者血清 DEC1 的表达比较则无显著差异 ($P > 0.05$)。提示血清 DEC1 具有作为诊断 HCC 的血清学肿瘤标志物的潜能。然而,血清 DEC1 与 HCC 临床病理参数之间的关系尚待进一步研究论证。

Shi 等^[21]研究发现,DEC1 核表达强度的改变与 HCC 的低度组织分化及恶性程度的发展有关。且 DEC1 可以通过参与调节细胞增殖/凋亡和肿瘤形成过程中的基因表达(如 P53、ROS、STATs、TGF- β 等),从而在 HCC 的发生发展中发挥重要作用。而 AFP 也是目前公认的与 HCC 组织分化及恶性程度密切相关的标志物。进一步通过皮尔森相关分析血清 DEC1 与目前公认的 HCC 血清标志物 AFP 之间的关系。结果也提示血清 DEC1 的表达与 AFP 存在明显的正相关。

此外,我们通过对病例进行随访分析,发现术后 1 年,高表达组患者复发率为 81.1%,低表达组患者复发率为 47.8%;高表达组患者生存率为 62.2%,低表达组患者生存率为 82.6%。两组比较,高表达组患者的复发率明显高于低表达组,而血清 DEC1 低表达组的生存率明显高于高表达组 ($P < 0.05$)。这进一步提示是 DEC1 不仅能够有效诊断 HCC,而且能够是评估预后 HCC 有价值的标志物。

总之,随着对血清源性 DEC1 的生成机制和生物学功能与疾病之间的关系的逐步阐明,以及在基础实验及临床研究在深度及广度上的日益加大,可以相信血清 DEC1 将在 HCC 诊断和治疗领域展示出广阔的临床应用前景。

参考文献(References)

- [1] 叶胜龙,陈荣新.《肝细胞癌临床指南更新》解读[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(4): 251-253
Ye Sheng-long, Chen Rong-xin. Comments on management of hepatocellular carcinoma: an update[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2011, 19(4): 251-253
- [2] 郭晓东,张璇,刘树红,等. miRNA-125 在肝癌中表达变化的研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(7): 1253-1255
Guo Xiao-dong, Zhang Xuan, Liu Shu-hong, et al. Expression of miRNA-125 in Hepatocellular Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(7): 1253-1255
- [3] Guo X, Sun T, Yang M, et al. Prognostic value of combined aquaporin 3 and aquaporin 5 overexpression in hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 206525
- [4] 刘君,肖庚富. 中国人群 XPD-751 位点基因多态性与肝细胞癌易感性的 Meta 分析[J]. 医学分子生物学杂志, 2012, 9(4): 277-280
Liu Jun, Xiao Geng-fu. A Meta-analysis of the Relationship between XPD-751 Polymorphism and Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma in Chinese Population[J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2012, 9(4): 277-280
- [5] 单国平,戎亚雄,刘建跃,等. 胃癌组织中 DEC1 的表达及其临床意义[J]. 中国临床医学, 2011, 18(6): 755-756
Shan Guo-ping, Wu Ya-xiong, Liu Jian-yue, et al. Expression and Clinical Significance of DEC1 in Gastric Carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2011, 18(6): 755-756
- [6] 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
- [7] Martiñez-Llordella M, Esensten JH, Bailey-Bucktrout SL, et al. CD28-inducible transcription factor DEC1 is required for efficient autoreactive CD4⁺ T cell response [J]. J Exp Med, 2013, 210 (8): 1603-1619
- [8] Guo X, Yang M, Gu H, et al. Decreased expression of SOX6 confers a poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Epidemiol, 2013, 37(5): 732-736
- [9] 郭晓东,杨美,皋月娟,等. 肝癌患者血清乙肝病毒特异性 miRNAs 水平指标检测与术后肿瘤复发的相关性研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(9): 1742-1744, 1724
Guo Xiao-dong, Yang Mei, Gao Yue-juan, et al. The Relationship between Expression of Serum Hepatitis B Virus (HBV)-specific miRNAs and the Recurrence after Surgical Resection for Patients with Hepatocellular Carcinoma[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(9): 1742-1744, 1724
- [10] Wu Y, Sato F, Bhawal UK, et al. Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel-induced apoptotic pathway of MCF-7 human breast cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2011, 27(4): 491-495
- [11] 马育华,郑燕,郑雁飞,等. EGFR 与 DEC1 蛋白共表达促进肺腺癌肿瘤细胞淋巴转移 [J]. 山东大学学报(医学版), 2012, 50(3): 24-28
Ma Yu-hua, Zheng Yan, Jia Yan-fei, et al. GFR and DEC1 protein co-expression promotes lymph node metastasis in lung adenocarcinoma[J]. Journal of Shandong University (Health Science), 2012, 50(3): 24-28
- [12] Zhu Y, Xu L, Zhang J, et al. Sunitinib induces cellular senescence via p53/Dec1 activation in renal cell carcinoma cells [J]. Cancer Sci, 2013, 104(8): 1052-1061
- [13] Liu Y, Miao Y, Wang J, et al. DEC1 is positively associated with the malignant phenotype of invasive breast cancers and negatively correlated with the expression of claudin-1[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(4): 855-860
- [14] Xu Q, Ma P, Hu C, et al. Overexpression of the DEC1 protein induces senescence in vitro and is related to better survival in esophageal squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41862

- of life[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012,35(11):1257-1266
- [7] Barbara G, Cremon C, De Giorgio R, et al. Mechanisms underlying visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2011,13(4):308-315
- [8] Koloski NA, Jones M, Kalantar J, et al. The brain-gut pathway in functional gastrointestinal disorders is bidirectional: a 12-year prospective population-based study[J]. Gut, 2012,61(91):1284-1290
- [9] 陈长香,李建民,王静. 22 省(市)老年人睡眠障碍现状调查[J]. 中国健康心理学杂志,2007,15(2):188-189
- Chen Chang-xiang, Li Jian-min, Wang Jing. 22 provinces (municipalities) sleep disorders in the elderly survey[J]. China Journal of Health Psychology, 2007,15(2):188-189
- [10] 陈长香,岳静玲,李建民,等. 离退休老年人睡眠状况及其影响因素的研究[J]. 中国老年学杂志,2006,26(4):536-537
- Chen Chang-xiang, Yue Jing-ling, Li Jian-min, et al. Study of retired old people sleep status and its influencing factors[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2006,26(4):536-537
- [11] 陈惠新,熊理守,许岸高,等. 社区人群中胃食管反流病的危险因素及其对生活质量的影响[J]. 中华内科杂志,2006,45(3):202-205
- Chen Hui-xin, Xiong Li-shou, Xu An-gao, et al. The community crowd of gastroesophageal reflux disease risk factors and their impact on quality of life [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2006,45(3):202-205
- [12] Lindam A, Jansson C, Nordenstedt H, et al. A population-based study of gastroesophageal reflux disease and sleep problems in elderly twins [J]. PLoS One, 2012,7(10):e486-491
- [13] Zhang J, Lam SP, Li SX, et al. The longitudinal course and impact of non-restorative sleep: a five-year community-based follow-up study [J]. Sleep Med, 2012, 13(6):570-576
- [14] Lazebnik LB, Masharova AA, Vasnev OS, et al. Gastroesophageal reflux disease in the elderly patients: epidemiology, clinical features, therapy [J]. Eksp Klin Gastroenterol, 2010,(12):10-16
- [15] Douglas A, Drossman MD. The functional gastrointestinal disorders [J]. Degnon Associates, 2006,8(6): 32-35
- [16] Kahrilas P J, Jonsson A, Denison H, et al. Concomitant symptoms itemized in the reflux disease questionnaire are associated with attenuated heartburn response to acid suppression [J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107(9): 1354-1360
- [17] Elliot Regenbogen, Alex Helkin, Rachel Georgopoulos, et al. Esophageal Reflux Disease Proton Pump Inhibitor Therapy Impact on Sleep Disturbance: A Systematic Review[J]. Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2012, 146(4): 524-532
- [18] 朱传会,李学良,林琳. 胃食管反流病与功能性肠道疾病的重叠及其相关因素[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(22): 2303-2307
- Zhu Chuan-Hui, Li Xue-liang, Li Lin. Gastroesophageal reflux disease and functional bowel disease overlap and its related factors[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(22): 2303-2307
- [19] 姚欣,杨云生,王永华,等. 功能性胃肠病与胃食管反流病重叠发病的研究[J]. 中国实用内科杂志, 2008, 36(5): 360-362
- Yao Xin, Yang Yun-Sheng, Wang Yong-hua, et al. Functional gastrointestinal disease and gastroesophageal reflux disease overlapping research of the disease[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2008, 36(5): 360-362
- [20] Zimmerman J, Hershcovici. T Non-esophageal symptoms cannot differentiate between erosive reflux esophagitis and non-erosive reflux disease in a referred population [J]. Scand J Gastroenterol, 2011, 46(7-8):797-802

(上接第 4926 页)

- [15] Qian Y, Jung YS, Chen X. Differentiated embryo-chondrocyte expressed gene 1 regulates p53-dependent cell survival versus cell death through macrophage inhibitory cytokine-1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(28): 11300-11305
- [16] Park YK, Park H. Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) represses PPAR γ 2 gene through interacting with CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β)[J]. Mol Cells, 2012, 33(6): 575-581
- [17] Qzaki N, Noshiro M, Kawamoto T, et al. Regulation of basic helix-loop-helix transcription factors Dec1 and Dec2 by ROR α and their roles in adipogenesis[J]. Genes Cells, 2012, 17(2): 109-121
- [18] Bode B, Shahmoradi A, Taneja R, et al. Genetic interaction of Per1 and Dec1/2 in the regulation of circadian locomotor activity[J]. J Biol Rhythms, 2011, 26(6): 530-540
- [19] Zheng Y, Shi X, Wang M, et al. The increased expression of DEC1 gene is related to HIF-1 α protein in gastric cancer cell lines [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(4): 4229-4236
- [20] Peng Y, Liu W, Xiong J, et al. Down regulation of differentiated embryonic chondrocytes 1 (DEC1) is involved in 8-methoxypsoralen-induced apoptosis in HepG2 cells [J]. Toxicology, 2012, 301(1-3): 58-65
- [21] Shi XH, Zheng Y, Sun Q, et al. DEC1 nuclear expression: a marker of differentiation grade in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(15): 2037-2043