

肝细胞癌组织中 HIF-1 α 表达及其与预后的相关性研究

Relationship Between HIF-1 α Expression and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma
GUAN Tie-jun, WANG Bin, CHEN Feng, et al.

关铁军, 王斌, 陈峰, 华南, 王晓明, 刘峰, 周平, 闫光志, 吕华,
杨玉波, 王帅, 郝延勇
(吉林省肿瘤医院, 吉林 长春 130012)

摘要: [目的] 研究血管缺氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor-1 α , HIF-1 α) 在肝细胞癌组织中表达及其在判断预后中的价值。[方法] 对随访的 60 例原发性肝癌患者的临床资料进行回顾性分析, 通过免疫组化方法检测 HIF-1 α 在癌组织中的表达情况。[结果] HIF-1 α 阳性表达率为 53.3%。HIF-1 α 与细胞分化程度具有相关性。HIF-1 α 高表达组和低表达组患者的 1、3、5 年无瘤生存率分别为 57.1%, 14.3%, 0 和 84.9%, 50.7%, 23.3%。高表达患者无瘤生存期明显低于低表达患者 ($P=0.004$)。[结论] HIF-1 α 高表达肝细胞癌生存期低, HIF-1 α 是肝细胞癌切除术后预后判定的预测因子。

关键词: 乏氧诱导因子-1 α ; 肝细胞癌; 免疫组化

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)04-0304-04

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 在全球肿瘤发病率中位居第 5 位, 其死亡率位居第 3 位。我国每年约有 25 万多人罹患肝癌。手术切除仍是目前 HCC 最主要的治疗手段^[1]。影响 HCC 手术效果的主要原因是 HCC 复发和转移^[2]。在 HCC 的复发和转移过程中, 血管滋养和再生具有非常重要的作用。研究发现, 乏氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor-1 α , HIF-1 α) 在多种肿瘤中过度表达^[3], 其在肿瘤血管生成和能量代谢中具有重要的调控作用, 在肿瘤浸润、生长、进展及转移中起关键作用^[4]。HIF-1 α 在肿瘤中的过表达也与一些恶性肿瘤的耐药及预后不良呈密切相关^[5]。本研究通过免疫组化方法检测 HIF-1 α 在 HCC 癌组织中的表达, 并分析其与预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般材料

选取吉林省肿瘤医院 2004 年 1 月至 2007 年 8

月行根治性切除 60 例 HCC 标本, 其中男性 45 例, 女性 15 例, 年龄 44~79 岁, 中位年龄 63.0 岁。乙型肝炎和丙型肝炎分别为 40 例和 12 例, 1 例同时患乙型肝炎和丙型肝炎, 其余为非乙、非丙型肝炎患者。

1.2 免疫组织化学方法

实验步骤: 标本用 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 切成 5 μ m 厚薄片, 用二甲苯脱蜡, 经梯度乙醇、形成水化物, 免疫组化方法用 Vedastain ABC 过氧化酶试剂盒完成。标本薄片用 0.01M 硝酸钠缓冲溶液 (pH6.0) 95 $^{\circ}$ C 处理 40min 以获取抗原, 然后在室温含 0.3% 过氧化氢的甲烷中孵化 20min 以封闭内源性过氧化物酶, 内源性生物素封闭后, 标本薄片用正常蛋白封闭血浆溶液孵化, 室温 20min, 以封闭非特异性染色, 然后用抗 HIF-1 α (鼠单克隆 IgG- α , 稀释度 1:50, littleton, co) 和抗-thrombospondin-1 (鼠单克隆抗体 IgG- α , 稀释度 1:50, Fremont, CA) 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。用 PBS 缓冲液冲洗 3 次 5min 后, 标本薄片用含有生物素结合的二抗马抗鼠抗体室温孵化 20min, 最后用含有过氧化物酶结合的链霉抗生物素蛋白室温孵化 20 min。然后, 用 3,3'-四氯化二氨基联苯胺

收稿日期: 2012-10-28; 修回日期: 2013-01-05

基金项目: 吉林省自然科学基金资助项目 (201215217)

通讯作者: 杨玉波, E-mail: yuboyangen@yahoo.com.cn

苏木精完成过氧化物酶反应。最后,标本涂片法用 Meyer's 苏木素计数染色。阴性对照组标本用兔 IgG 或 Tris 缓冲盐溶液取代一抗处理,其余步骤相同^[6]。HCC 标本边缘部分正常肝组织用同样方法处理。

免疫染色评价:由不知患者临床病理相关资料的两名研究者独立进行免疫组化染色评价。一旦出现分歧,两者共同评估解决分歧,达成一致意见^[6]。

HIF-1 α 的免疫反应位于细胞核和细胞浆。胞核清晰染色为 HIF-1 α 表达:0 分,无核染色,无表达;1 分,<1%核染和/或中度细胞浆染色;2 分,>1%核染色,为强染色,高表达。

1.3 随访与数据分析

本组病例每 3 个月采取电话随访或者患者返院复查时采用登记方法随访。随访时间截至 2012 年 8 月。数据分析应用 SPSS 20.0 统计软件,阳性率比较采用 χ^2 检验。生存率分析采用 Kaplan-Meier 方法和 Log-Rank 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α 表达情况

在正常肝细胞中,没有核染色或只有胞浆模糊染色。而在肝癌细胞中,HIF-1 α 表达见 Figure 1,其中 28 例为 0 分,25 例为 1 分,7 例为 2 分。HIF-1 α 阳性率为 53.3%(32/60),其中高表达率为 11.7%(7/60)。

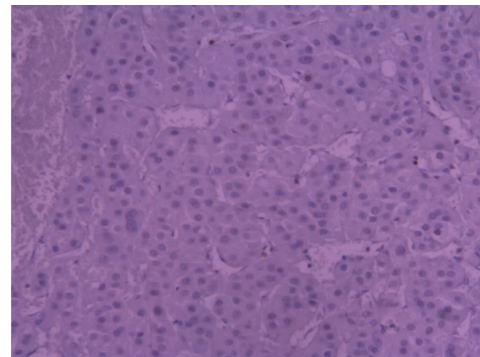
2.2 HIF-1 α 表达与临床病理特征的关系

HIF-1 α 与性别、年龄、病毒感染种类、肝硬化、肿瘤直径、肿瘤包膜形成、肿瘤包膜侵犯、间隔形成、肝内转移、静脉癌栓、是否行 TAE 治疗无相关性($P>0.05$),而与病理组织学分级有相关性($P=0.028$),低分化肝癌 HIF-1 α 表达明显高于中分化和高分化肝癌(Table 1)。

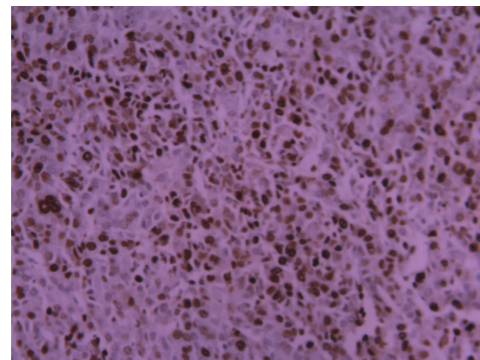
2.3 HIF-1 α 表达与预后的关系

60 例患者总无瘤生存时间为 33.2 ± 2.5 个月,总中位生存时间为 28.4 个月。HIF-1 α 低表达组总生存时间为 35.3 ± 2.6 个月,总中位生存时间为 36.0 个月,明显高于 HIF-1 α 高表达组的总生存时间(17.9 ± 5.2 个月)和中位生存时间(15.0 个月)(Table 2)。

HIF-1 α 高表达组的 1、3、5 年生存率分别为 57.1%、14.3%和 0,均低于低表达组生存率的 84.9%、50.7%和 23.3%($P=0.014$)(Figure 2)。



A: HIF-1 α negative expression



B: HIF-1 α expression(++)

Figure 1 Expression of HIF-1 α in HCC tissue

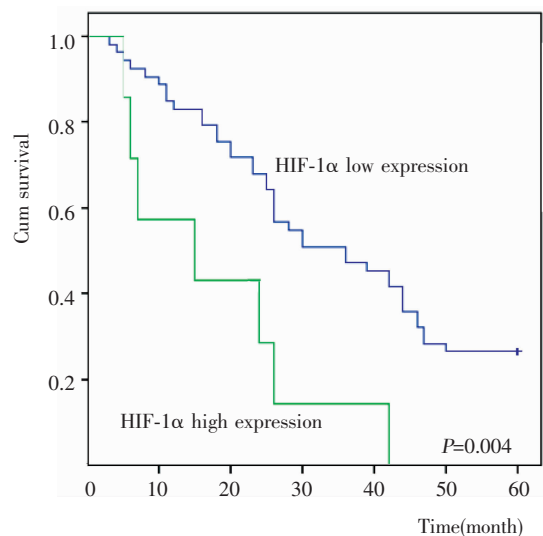


Figure 2 Survival curve of HCC with different HIF-1 α expression

3 讨论

血管乏氧诱导因子(HIF)在肿瘤的形成中具有

重要作用,调节与肿瘤生长、浸润和转移相关的多个基因^[7],其对氧浓度极其敏感。HIF-1 α 和HIF-1 β (也称ARNT,the aryl hydrocarbon receptornuclear translocator 芳香烃受体核转运蛋白)是HIF的亚单

位,是在体内氧平衡过程中起至关作用的异二聚物和转录因子。含氧正常情况下,HIF-1 α 在蛋白—蛋白酶体途径下被迅速分解和灭活。乏氧情况下,HIF-1 α 较稳定,可作为一种转录调节因子激活一些

基因如VEGF、红细胞生成素和糖分解酶等^[6]。

有研究表明,恶性肿瘤由于生长快于血管,造成供血、供氧不足,使肿瘤细胞常处于一种缺氧的环境中^[8]。肝癌生长较快,导致肿瘤边缘组织中存在持续的低氧微环境,肝细胞癌边缘组织中新血管密度低于肝癌组织,HIF-1 α mRNA 和/或蛋白在肝癌组织、癌边缘组织中表达均明显高于非癌组织,HIF-1 α 蛋白在非癌组织的实质细胞中不表达,在癌边缘组织及癌组织细胞的包浆内则明显表达,且癌边缘组织的表达强度及阳性率显著高于癌组织^[9]。我们的研究中也发现,HIF-1 α 表达只存在于肝癌组织中,在正常肝组织中无表达。研究表明 HIF-1 α 对新生组织及新陈代谢活跃区域造成的乏氧反应敏感,因此呈现高表达。

研究表明 HIF-1 α 在结直肠癌、卵巢癌等实体瘤中高表达,并且导致其高度恶性的生物学表现^[3,10,11]。其发生机制可能与 HIF-1 α 作为肿瘤细胞上皮间质转化的关键因子,使肿瘤细胞获得了恶性表型相关^[12]。我们的研究结果提示HIF-1 α 与细胞分化程度具有相关性($P=0.028$),低分化HCC 中 HIF-1 α 表达高,预后差,与文献报道的结论一致。

当肿瘤生长时,组织出现乏氧状态,导致细胞核内转录因子 NF- κ B 增加,促使 HIF-1 α 在细胞内高表达;乏氧又使类泛素化(SUMO)特异的稳定蛋白酶(SEN1)表达上调,使 HIF-1 α 降解能力下降,胞内 HIF-1 α 含量增加^[13-19]。SEN1 在 HIF-1 α 的

Table 1 Relationship of HIF-1 α expression and clinicopathological features in HCC

Features	HIF-1 α intensity			χ^2	P value
	0	1	2		
Median age(range)	63(49~76)	65(44~79)	59(48~72)		
Gender					
Male	21	19	5	0.054	0.816
Female	7	6	2		
Hepatitis					
HBV	5	7	0	0.074	0.807
HCV	17	18	5		
Non-HBV/HCV	6	1	2		
Cirrhosis					
Yes	19	14	4	0.069	0.793
No	9	11	3		
Tumor size					
<3cm	10	15	2	0.864	0.353
$\geq$ 3cm	18	10	5		
Capsule formation					
Yes	18	21	5	0.001	0.977
No	12	4	2		
Capsule invasion					
Yes	11	7	3	0.341	0.560
No	7	14	2		
Septum formation					
Yes	13	16	4	0.027	0.869
No	15	9	3		
Intrahaptic metastasis					
Yes	11	7	4	1.431	0.232
No	17	18	3		
Portal vein tumor thrombus					
Yes	9	9	3	0.215	0.643
No	19	16	4		
Mistological grade					
Well	4	3	0	4.855	0.028
Median	12	12	1		
Poor	12	10	6		
TEA					
Yes	10	7	5	0.935	0.728
No	8	18	8		

Table 2 Comparison of disease-free survival in different HIF-1 α expression

HIF-1 α	N	DFS(month)	95%CI	Median DFS	95%CI
1	25	35.3 $\pm$ 2.6	30.1~40.4	36.0	21.8~50.3
2	7	17.9 $\pm$ 5.2	7.74~28.0	15.0	0~35.5
Total	32	33.2 $\pm$ 2.5	28.4~38.2	28.0	19.7~36.4

稳定中起到关键作用,SENP1 在缺氧状态中,维持 HIF-1 α 的稳定并通过下游靶基因转录产生 VEGF,介导新生血管形成,导致肿瘤血管大量生长^[13-19]。我们的研究结果显示,HIF-1 α 的阳性表达率为 53.3%。HIF-1 α 高表达者总无瘤生存期(17.9 $\pm$ 5.2 个月)低于低表达者的总无瘤生存期(35.3 $\pm$ 2.6 个月)($P<0.05$)。HIF-1 α 高表达患者的生存率也明显低于低表达患者的生存率($P=0.004$)。结果表明,HIF-1 α 表达影响 HCC 的生长速度,进而影响 HCC 患者的生存期。

综上所述,HCC 组织中可见 HIF-1 α 表达,高表达 HIF-1 α 预示 HCC 分化差,增长速度快,进展迅速,生存期短,预后差,提示 HIF-1 α 是 HCC 患者的预后因子。

参考文献:

- [1] Wu MC. Reducing liver cancer recurrence rate[J]. Chinese Journal of Practical Surgery, 2012, 32(10):793-795. [吴孟超. 关于降低肝癌术后复发率之我见[J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32(10):793-795.]
- [2] Yang Y, Nagano H, Ota H, et al. Patterns and clinicopathologic features of extrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. Surgery, 2007, 141(2):196-202.
- [3] Murphy BJ. Regulation of malignant progression by the hypoxia-sensitive transcription factors HIF-1 α and MTF-1[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2004, 139(3):495-507.
- [4] Chen JA, Shi M, Li JQ, et al. Angiogenesis: multiple masks in hepatocellular carcinoma and liver regeneration[J]. Hepatol Int, 2010, 4(3): 537-547.
- [5] Tang CM, Yu J. Hypoxia-inducible factor-1 as a therapeutic target in cancer[J]. Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(3): 401-405.
- [6] Wada H, Nagano H, Yamamoto H, et al. Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1 α [J]. Liver Int, 2006, 26(4):414-423.
- [7] Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells[J]. Cell Mol Med, 2013, 17(1):30-54.
- [8] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.
- [9] Liu Y, Li XH, Yang DH, et al. Expression of SENP-1 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2012, 33(4):465-470. [刘延, 李湘斌, 杨定华, 等. SENP-1 和 HIF-1 α 在肝细胞肝癌中的表达及临床意义[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2012, 33(4):465-470.]
- [10] Fu L, Chen L, Yang J, et al. HIF-1 α -induced histone demethylase JMJD2B contributes to the malignant phenotype of colorectal cancer cells via an epigenetic mechanism[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(9):1664-1673.
- [11] Iida T, Yasuda M, Miyazawa M, et al. Hypoxic status in ovarian serous and mucinous tumors: relationship between histological characteristics and HIF-1 α /GLUT-1 expression[J]. Arch Gynecol Obstet, 2008, 277(6):539-546.
- [12] Shin HW, Cho K, Kim DW, et al. Hypoxia-inducible factor 1 mediates nasal polypogenesis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Respir Crit Care Med, 2012, 185(9):944-954.
- [13] Kumar S, Mehta K. Tissue transglutaminase constitutively activates HIF-1 α promoter and nuclear factor- κ B via a non-canonical pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(11):e49321.
- [14] Qiao Q, Jiang YJ, Li G. Effect and mechanism of NF- κ B on regulation of HIF-1 α -VEGF pathway in human non-Hodgkin lymphoma[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2012, 19(11):827-831. [乔俏, 姜元军, 李光. NF- κ Bp65 对人非霍奇金淋巴瘤细胞 HIF-1 α -VEGF 途径调节及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(11):827-831.]
- [15] Daly C, Eichten A, Castanaro C, et al. Angiopoietin-2 functions as a tie agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition[J]. Cancer Res, 2013, 73(1): 108-118.
- [16] Oommen S, Gupta SK, Vlahakis NE. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin α 9 β 1[J]. Biol Chem, 2011, 286(2):1083-1092.
- [17] Reitmeir R, Kilic E, Reinboth BS, et al. Related citations vascular endothelial growth factor induces contralesional corticobulbar plasticity and functional neurological recovery in the ischemic brain[J]. Acta Neuropathol, 2012, 123(2): 273-284.
- [18] Ulrich HD. SUMO teams up with ubiquitin to manage hypoxia[J]. Cell, 2007, 131(3):446-447.
- [19] Xu Y, Zuo Y, Zhang H, et al. Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis[J]. Biol Chem, 2010, 285(47): 36682-36688.