

中药槐耳前期工作: 上皮-间质转化和肝细胞癌进展相关新型标记物-星形细胞上调基因 1 (AEG-1) 在中国两地区的研究

郑加生¹ 李聪¹ 吴霞² 杨颖卓² 郝美君¹ 生守鹏¹ 孙玉¹ 张洪海¹ 龙江¹ 胡彩霞¹

【摘要】星形细胞上调基因 (AEG-1) 涉及重要的生物过程, 包括细胞侵袭、转移和肿瘤的发生。然而其对于肝细胞癌的临床意义很大程度上还是未知的。本研究取 144 例来自北京和黑龙江地区的肝细胞癌标本, 通过免疫组化染色研究 AEG-1, 波形蛋白, 和 E-cadherin 的表达。病理研究显示 AEG-1 在肿瘤细胞的表达水平与肿瘤的 TNM 分期 ($P = 0.001$) 和 Edmonson 分级 ($P < 0.0001$) 显著相关。此外, AEG-1 基因, 波形蛋白, 和 E-cadherin (上皮间质转化 (EMT) 生物标志物) 的表达水平之间有相关性。这些结果表明, AEG-1 基因可能是人类肝癌组织中与上皮间质转化相关的标志物, 同时在肝癌的进展中也发挥着重要的作用。此外, AEG-1 基因是未来肝癌治疗的一个潜在靶点; 下一步我们将用中药槐耳清膏提取物进一步研究其抑制肝癌的分子机制。

【关键词】肝细胞癌; 星形细胞上调基因 (AEG-1); 波形蛋白; 上皮-间质转化 (EMT); 生物标记物

【作者单位】1. 首都医科大学附属北京佑安医院肿瘤肝胆介入微创治疗中心 (北京 100069)
2. 哈尔滨医科大学附属第二医院感染科 (哈尔滨 150081)

【引言】肝癌是全世界癌症死亡的一个常见原因[1]。由于世界范围内环境污染加重和人口老龄化, 肝细胞癌发病率仍保持上升趋势[2]。来自中国和美国的报告表明, 肝癌具有很高的死亡率, 这通常归因于癌症转移和诊断较晚[1-3]。然而, 肝癌的机制还不是很清楚。上皮间质转化 (EMT) 是肝癌进展的一个中心事件[4, 5]。发生 EMT 的细胞具有穿透血管, 通过肝细胞癌循环系统的能力[4, 5]。这也与早期肿瘤向浸润性癌的转化相关[4, 5]。EMT 的标志是 E-cadherin 的降低和波形蛋白的表达增加[4, 5]。

星形细胞上调基因 1 (AEG-1) 又名 MTDH 和 LYRIC, 2002 年首次被克隆并认定为人类胎儿星形胶质细胞中, 人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 和肿瘤坏死因子- α 诱导的基因[6, 7]。人类 AEG-1 基因位于染色体 8q22, 与正常对照相比, 在多种肿瘤中发现其基因组的表达加强[7-25]。它通过激活不同信号分子调节各种癌症的转化状态, 这些信号分子包括 PI3K, AP-1, 和细胞外信号调节激酶等[7-25]。在 HeLa 细胞中, 它也提高转录因子 κB 与 DNA 结合和转录活性[9-11, 24]。转录因子 κB 调节各种分子的表达, 如金属蛋白酶, 趋化因子, 细胞粘附蛋白, 这些物质会引发癌细胞的侵袭和转移[9-11, 24]。沉默恶性细胞的 AEG-1 基因可显著阻碍其的增殖、迁移和侵袭, 而上调 AEG-1 基因能抑制细胞凋亡并增加恶性细胞的侵袭能力[7-26]。使用类似的方法, 研究人员还发现, 在肝细胞癌中 microRNA-375 可以靶标 AEG-1 并抑制体内和体外肝癌细胞的生长[27]。

尽管 AEG-1 作为一种重要的癌基因与肝癌发生途径相关[22], AEG-1 还参与波形蛋白和 E-cadherin 的表达调控[26-30]。这些结果表明, AEG-1 基因可能参与了肝癌细胞的 EMT。在此, 我们研究临床上 AEG-1 的过表达是否增强肝细胞癌 EMT 并进一步影响肝癌进展。

【材料和方法】

一、样本

本研究按照伦理准则进行, 已被研究伦理委员会和作者所在大学科学委员会批准。石蜡切片 ($4 \mu M$) 由肝细胞癌组织与正常组织中采集的 158 份肝脏样本制成。详细的临床病理资料从病人的病历中获得, 所有患者均在作者的医院。患者年龄 47~78 岁, 平均年龄为 55 岁。33 例的患者为女性, 111 例为男性。临床病理特征判断主要是参考 Zhu 等[28]的研

究结果。

二、免疫组化

所有病例标本用 10% 甲醛溶液固定并石蜡包埋。简单地说，具有代表性的石蜡块制成的组织切片 (4 - 5 μm)，要用先二甲苯脱蜡再通过分级酒精溶液水化。而内源性过氧化物酶用 3% 过氧化氢阻滞。波形蛋白、E-cadherin 的抗原修复是在 0.01 M 柠檬酸盐缓冲液 (pH = 6) 中进行微波修复 20 分钟。此外，AEG-1 抗原修复是在 EDTA (pH = 8, ZLI-9066 and ZLI-9067, 中山金桥, 中国) 中进行微波修复。使用的主要抗体: 兔多克隆抗 AEG-1 (稀释 1:200; Abcam, 英国), 抗 E-cadherin 单克隆抗体 (稀释 1:2500; BD Biosciences 公司, 圣迭戈, CA, USA), 和小鼠单克隆抗波形蛋白 (1:100 稀释; 圣克鲁斯生物技术, 圣克鲁斯, CA, USA)。切片与初级抗体在 4° C 隔夜孵育, 结合的初级抗体应用免疫组织化学 PV-9000 通用型二步法检测。反应产物用苏木精复染。

三、免疫反应的评价

组织免疫反应分别由两位病理学专家独立评估, 这两位病理学家对临床数据和其他免疫组化结果不知晓。对各个蛋白质的细胞膜和核染色分别进行评估 [10 - 13]。AEG-1 基因, 波形蛋白, 和 E-cadherin 主要表达于细胞膜。AEG-1 基因, 波形蛋白, 和 E-cadherin 染色强度和分布在免疫反应得分的基础上进行评价 [26 - 30]。

四、数据分析

统计分析采用 Windows 系统 SPSS 15.0 (SPSS 公司, 芝加哥, IL, USA) 进行。蛋白质的表达水平与临床病理参数的相关性采用 Spearman 相关和对这些数据的卡方检验分析。显著性水平被定义为 P < 0.05。

表 1 基因的表达水平与肝细胞癌的主要临床特征之间的关系

	例数	AEG-1			波形蛋白			E-cadherin		
		H	L	P 值	H	L	P 值	L	H	P 值
年龄				0.2			0.8			0.9
≤52	22	22	0		18	4		20	2	
>52	67	62	5		55	12		63	4	
性别				0.7			0.8			0.9
男	67	64	3		56	11		62	5	
女	22	20	2		17	15		21	1	
HBsAg				0.2			0.4			0.5
阳性	80	75	5		65	15		74	6	
阴性	8	8	0		7	1		8	0	
BCLC 分期				0.2			0.6			0.4
B/C	80	75	5		65	15		74	6	
0/A	7	7	0		6	1		7	0	
Edmonson 分级				<0.0001			0.0003			<0.0001
I/II	47	46	1		44	3		41	6	
III/I	42	38	4		29	13		42	0	
TNM 分期				0.001			0.004			<0.0001
II/III	75	72	3		65	10		69	6	
I	14	12	2		8	6		14	0	

H: 高表达; L: 低表达

【结果】

一、肝细胞癌的临床病理特点

这项研究有 144 例肝细胞癌患者（选自北京和黑龙江地区），年龄在 31~78 岁，平均手术年龄为 52 岁。男性 111 例（77%），女性 33 例（23%）。在诊断时，这项研究中包括 89 例肝细胞癌。

二、肝细胞癌及配对正常组织中 AEG-1、波形蛋白和 E-cadherin 的表达

AEG-1 和波形蛋白主要在肝细胞癌组织细胞膜中检测到表达。从正常组织到癌组织免疫活性的评价逐渐升高。在九例肿瘤组织和一例正常组织中观察到波形蛋白阳性表达。在 6 例肿瘤和 13 例正常组织中观察到 E-cadherin 阳性表达。在七例肿瘤和一例正常组织中观察到 AEG-1 阳性表达。总体而言，在肝细胞癌和正常组织之间，波形蛋白、E-cadherin 和 AEG-1 的表达有显著差异（ $P < 0.05$ ）。

三、肝细胞癌 AEG-1、波形蛋白和 E-cadherin 的表达

我们分析了波形蛋白、E-cadherin 和 AEG-1 基因在 89 例肝细胞癌的表达水平。基因的表达水平和患者的主要临床特征之间的详细关系见表 1。

四、E-cadherin、波形蛋白和 AEG-1 的表达之间的关系

我们采用 Spearman 等级相关分析了 E-cadherin 蛋白、波形蛋白和 AEG-1 之间的关系。结果表明，AEG-1 基因、波形蛋白和 E-cadherin 的表达具有相关性（表 2，3，和 4）。

表 2 波形蛋白和 AEG-1 在肝细胞癌中表达之间的关系

		AEG-1		P 值
		H	L	
波形蛋白	H	72	1	<0.0001
	L	12	4	

H: 高表达; L: 低表达

表 3 波形蛋白和 E-钙粘蛋白肝细胞癌中的表达之间的关系

		E-cadherin		P 值
		L	H	
波形蛋白	H	67	6	<0.0001
	L	16	0	

H: 高表达; L: 低表达

表 4 E-cadherin 和 AEG-1 在肝细胞癌组织中表达的关系

		E-cadherin		P 值
		L	H	
AEG-1	H	78	6	<0.0001
	L	5	0	

H: 高表达; L: 低表达

【讨论】

本研究用免疫组化法量化原发性肝细胞癌患者中 AEG-1、波形蛋白和 E-cadherin 异常表达的上调水平。EMT 已被证实在肝细胞癌的转移过程发生 [4, 5]。本研究分析了这些分子标志物的表达水平与临床病理特征的关系。此前没有北京和黑龙江地区关于肝细胞癌中 AEG-1 表达的报导。在这里，我们研究了其在人肝细胞癌中的表达水平以及表达水平与临床病理特征的相关关系。在我们的研究中，肝细胞癌中 AEG-1 的表达高于正常肝组织。同样，波形蛋白也在肝癌细胞膜过度表达。

肿瘤进展是原发性肝细胞癌患者预后的关键 [1]。晚期患者比早期患者的死亡率高 [2, 3]。以前的研究已经表明，EMT 与肝癌的转移是密切相关的 [4]。根据我们的研究和其他研

究人员的研究结果, AEG-1 路径可能参与了肝癌细胞的 EMT 过程, 导致癌细胞转移[4, 5, 26 - 30]。在一些癌细胞系, 一种涉及 AEG-1 - 波形蛋白相互作用的机制已提出[26 - 30]。最近, 波形蛋白也已经见于乳腺癌细胞系的报道, 这是由于一种涉及激活 AEG-1 的机制 [23, 29]。总之, 这些结果表明, AEG-1 结合于波形蛋白基因的上游, 造成它的表达。波形蛋白诱导 E-cadherin 的表达减少, 使肿瘤细胞突破局部浸润的屏障并转移。另有研究也说明, AEG-1 在人类肝癌细胞的癌变和起到了重要作用[22, 27, 28]。

总之, 我们的研究表明, AEG-1 基因在肝细胞肝癌的过度表达, AEG-1 通路通过 EMT 在肿瘤的发生发展过程中起到重要作用。然而, 我们的论文有一些局限, 需要进一步的多中心研究与合作 (目前, 此类研究不仅在上海, 武汉, 和西安进行)。在未来, 我们还将进行体外测试这一途径并结合其他生物标志物来预测肝细胞癌患者转移风险 [31, 32]。接下来, 我们还将使用中药 (如槐耳颗粒) [33]来抑制肝癌转移和 EMT, 可能是通过拮抗 AGE-1 路径发挥作用。

【鸣谢】

本文由中国“十二五”国家科技支撑计划支持 (第 2012bai15b08)。

【利益冲突】 无

参考文献

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:10-29.
2. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47(Suppl):S2-6.
3. Padhya KT, Marrero JA, Singal AG. Recent advances in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29:285-92.
4. van Zijl F, Zulehner G, Petz M, Schneller D, Kornauth C, Hau M, et al. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol.* 2009;5:1169-79.
5. Lee TK, Poon RT, Yuen AP, et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5369-76.
6. Su ZZ, Kang DC, Chen Y, et al. Identification and cloning of human astrocyte genes displaying elevated expression after infection with HIV-1 or exposure to HIV-1 envelope glycoprotein by rapid subtraction hybridization, RasH. *Oncogene.* 2002;21:3592-602.
7. Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, et al. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1. *Gene.* 2005;353:8-15.
8. Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell.* 2004;5:365-74.
9. Meng X, Zhu D, Yang S, et al. Cytoplasmic metadherin (MTDH) provides survival advantage under conditions of stress by acting as RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 2012;287:4485-91.
10. Thirkettle HJ, Mills IG, Whitaker HC, et al. Nuclear LYRIC/AEG-1 interacts with PLZF and relieves PLZF-mediated repression. *Oncogene.* 2009;28:3663-70.
11. Yoo BK, Emdad L, Sarkar D, et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): a multifunctional regulator of normal and abnormal physiology. *Pharmacol Ther.* 2011;130:1-8.
12. Emdad L, Lee SG, Fisher PB, et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:21300-5.

13. Lee HJ, Jung DB, Kim SH, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor alpha and astrocyte-elevated gene-1 mediates cryptotanshinone exerted antitumor activity in hypoxic PC-3 cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:1–13.
14. Noch E, Bookland M, Khalili K. Astrocyte-elevated gene-1 (AEG-1) induction by hypoxia and glucose deprivation in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2011;11:32–9.
15. Li C, Song H, Geng J, et al. Significance of AEG-1 expression in correlation with VEGF, microvessel density and clinicopathological characteristics in triple-negative breast cancer. *J Surg Oncol*. 2011;103:184–92.
16. Li C, Song H, Geng J, et al. AEG-1 overexpression: a novel indicator for peritoneal dissemination and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancers. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21:602–8.
17. Li C, Song H, Geng J, et al. Elevated expression of AEG-1 is correlated with cisplatin-based chemoresistance and shortened outcome in patients with stages III–IV serous ovarian carcinoma. *Histopathology*. 2012;60:953–63.
18. Song H, Li C, Geng J, et al. Prognostic significance of expression in colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2010;25:1201–9.
19. Erdem H, Yildirim U, Uzunlar AK, et al. Relationship among expression of basic-fibroblast growth factor, MTDH/astrocyte elevated gene-1, adenomatous polyposis coli, matrix metalloproteinase 9, and COX-2 markers with prognostic factors in prostate carcinomas. *Niger J Clin Pract*. 2013;16:418–23.
20. Huang W, Yang L, Liang S, et al. AEG-1 is a target of perifosine and is over-expressed in gastric dysplasia and cancers. *Dig Dis Sci*. 2013;58:2873–80.
21. Noch EK, Khalili K. The role of AEG-1/MTDH/LYRIC in the pathogenesis of central nervous system disease. *Adv Cancer Res*. 2013;120:159–92.
22. Srivastava J, Siddiq A, Emdad L, et al. Astrocyte elevated gene-1 promotes hepatocarcinogenesis: novel insights from a mouse model. *Hepatology*. 2012;56:1782–91.
23. Wan L, Kang Y. Pleiotropic roles of AEG-1/MTDH/LYRIC in breast cancer. *Adv Cancer Res*. 2013;120:113–34.
24. Emdad L, Das SK, Dasgupta S, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC: signaling pathways, downstream genes, interacting proteins, and regulation of tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 2013;120:75–111.
25. Sarkar D. AEG-1/MTDH/LYRIC in liver cancer. *Adv Cancer Res*. 2013;120:193–221.
26. Liu K, Guo L, Miao L, et al. Ursolic acid inhibits epithelial–mesenchymal transition by suppressing the expression of astrocyte-elevated gene-1 in human nonsmall cell lung cancer A549 cells. *Anticancer Drugs*. 2013;24(5):494–503.
27. He XX, Chang Y, Meng FY, et al. MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2012;31:3357–69.
28. Zhu K, Dai Z, Pan Q, et al. Metadherin promotes hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial–mesenchymal transition. *Clin Cancer Res*. 2011;17:7294–302.
29. Li X, Kong X, Huo Q, et al. Metadherin enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Sci*. 2011;102:1151–7.
30. Wei J, Li Z, Chen W, et al. AEG-1 participates in TGF-beta1-induced EMT through p38 MAPK activation. *Cell Biol Int*. 2013;37:1016–21.
31. Kohles N, Nagel D, Jüngst D, Stieber P, Holdenrieder S. Predictive value of immunogenic cell

death biomarkers HMGB1, sRAGE, and DNase in liver cancer patients receiving transarterial chemoembolization therapy. *Tumour Biol.* 2012;33:2401–9.

32. Yao N, Yao D, Wang L, et al. Inhibition of autocrine IGF-II on effect of human HepG2 cell proliferation and angiogenesis factor expression. *Tumor Biol.* 2012;33:1767–76.

33. Sun Y, Sun T, Li C, et al. A polysaccharide from the fungi of Huaier exhibits anti-tumor potential and immunomodulatory effects. *Carbohydr Polym.* 2013;92:577–82.