

网络出版时间: 2020-6-29 11:27 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.023.html>

◇ 临床医学研究 ◇

GSE1 在肝细胞性肝癌中的表达及临床意义

刘大潮¹, 吴文涌¹, 吴正升²

摘要 目的 通过观察人 GSE1 螺旋蛋白(GSE1)在肝细胞性肝癌(HCC)及癌旁非肿瘤组织中表达的差异性,探讨其在 HCC 发生、发展过程中的作用及临床意义。方法 使用 qRT-PCR 法、Western blot 法及免疫组化法检测 GSE1 蛋白在 HCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达。所得实验结果使用 SPSS 20.0 数据分析软件分析,并探讨 GSE1 mRNA 的阳性表达水平与 HCC 的临床病理特征的关系。结果 qRT-PCR 实验显示 GSE1 mRNA 在 30 组新鲜 HCC 组织中的表达水平高于癌旁非肿瘤组织,差异有统计学意义($P < 0.0001$); Western blot 结果显示 GSE1 在 HCC 组织中高表达,在癌旁非肿瘤组织中低表达;免疫组化结果显示 71 例 HCC 组织中 GSE1 蛋白阳性表达 36 例,阴性表达 35 例,其阳性率为 50.70%;41 例癌旁非肿瘤组织中 GSE1 蛋白阳性表达 8 例,阴性表达 33 例,其阳性率为 19.51%,GSE1 在 HCC 和癌旁非肿瘤组织中的表达差异有统计学意义($P < 0.05$);GSE1 蛋白在 HCC 和癌旁非肿瘤组织中的表达与临床病理分期相关($P < 0.01$),与性别、年龄、脉管浸润以及 Edmondson 组织学分级无关。结论 GSE1 在肝细胞肝癌中的高表达并与 HCC 的发生发展密切相关。

关键词 肝细胞性肝癌; GSE1; 癌症

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)07-1103-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.023

我国罹患恶性肿瘤的患者中,肝癌的发病率排在第 3 位,病死率处于第 2 位^[1]。最新公布的数据表明,在所有恶性肿瘤疾病中,新发肝癌患者人数排名第 6^[2]。肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)作为肝癌中最常见的组织学亚型,人们对 HCC 的研究也进一步深入,信号通路在 HCC 的进程中扮演了重要的角色^[3-5]。GSE1 螺旋蛋白(Gse1 coiled-coil protein, GSE1)是一种富脯氨酸蛋白质,在研究中被发现可以促进乳腺癌细胞的增殖和转

移^[6],并且和人胃癌临床病理及预后情况密切相关^[7]。但是对于 GSE1 在 HCC 的表达情况,国内外文献目前尚未发现报道。因此该研究对 HCC 组织进行 GSE1 的检测,从蛋白及 mRNA 水平探讨 GSE1 在临床样本中的表达情况,并分析其与 HCC 临床病理特征的关系,为 HCC 患者的疾病发展机制及潜在的治疗方法提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料 收集安徽医科大学第一附属医院病理科 2012 年 1 月~2013 年 12 月 HCC 的石蜡包埋标本 71 例,同时选取癌旁的非肿瘤组织 41 例作为对照组。在上述病例中,女性患者共计 12 例,男性患者共计 59 例,患者年龄 27~78(54.06 ± 10.63)岁。癌肿直径 ≤ 5 cm 33 例; > 5 cm 38 例;脉管浸润 16 例;无脉管浸润 55 例。在本实验中,依据国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)所制定的 TNM 分期系统^[8],对患者临床标本进行病理分期;分级采用 Edmondson 分级法。依据双盲原则,邀请 2 名读片经验丰富的病理医师对结果进行评定。

新鲜标本收集于安徽医科大学第一附属医院 2019 年 5 月~9 月经手术切除的 30 对 HCC 及癌旁非肿瘤组织标本(HCC 诊断经明确病理证实)。标本离体后 0.5 h 内置入液氮速冻,续置入 -80°C 冰箱冻存。

1.2 主要试剂和仪器 实时荧光定量 PCR 试剂盒及 RNA 逆转录试剂盒购自全式金生物公司;兔抗人 GSE1 抗体购自美国 proteintech 公司,工作滴度 1:200;RIPA 蛋白裂解液购自武汉 BOSTER 生物工程有限公司;聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)购自上海罗氏公司;电化学发光液(electrochemiluminescence, ECL)购自上海拜力(Pierce)生物科技有限公司;小鼠/兔聚合物法检测系统(PV-6000)及 DAB 显色试剂盒(ZLI-9018)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法

2020-04-20 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81572305)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022

²安徽医科大学病理学教研室,合肥 230032

作者简介:刘大潮,男,硕士研究生;

吴文涌,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: m13805694400@163.com

1.3.1 免疫组化方法 免疫组化使用 EnVision 法。所需临床标本在术中取下后均使用 10% 福尔马林溶液固定 24 h, 石蜡包埋机包埋组织, 切片机切片厚度为 4 μm , 石蜡切片烤片后依下列顺序过缸脱蜡: 二甲苯(10 min) 2 遍 $\rightarrow$ 无水乙醇(5 min) 2 遍 $\rightarrow$ 95% 乙醇(5 min) 1 遍 $\rightarrow$ 90% 乙醇(5 min) 1 遍 $\rightarrow$ 80% 乙醇(5 min) 1 遍 $\rightarrow$ 70% 乙醇(5 min) 1 遍 $\rightarrow$ 蒸馏水(5 min)。随后放置于加有抗原修复液(柠檬酸钠溶液)的容器内高压加热进行抗原修复 120 s, 取片静置至室温, 并滴加 3% H_2O_2 作用 10 min。滴加一抗后置入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜, 待孵育完成后滴入二抗 50 μl , 置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 30 min, 最后在避光环境下滴加 DAB 显色, 显色情况在光学显微镜下观测, 待显色完全, 流水冲洗终止显色反应, 再使用苏木素染色液对切片复染, 脱水后中性树脂封片, 在光学显微镜下观察染色情况。

1.3.2 提取 RNA 和 qRT-PCR 检测 使用 TRIzol 试剂从待检测组织中提取总 RNA, cDNA 制备工作在逆转录反应试剂盒的说明书指导下完成, qPCR 检测以上步骤所得 cDNA 为模板进行。将 GAPDH 作为内参, 同时每组设定 3 个平行副孔。引物均由上海生工生物公司合成, qRT-PCR 引物序列如下: GAPDH 上游: 5'-AGCAAGAGCACAAGAG-GAAG3', GAPDH 下游: 5'-GGTTGAGCACAGGG-TACTTT3'; GSE1 上游: 5'-ATGGTGTCTGGAGGAGT-GAGAGC-3', GSE1 下游: 5'-AGGTCGTCGGTGGTGT-GGTAG-3'。实验步骤如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性、变性, 后 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸, 重复循环 40 次, 继而进行融解曲线反应, 基因样本的扩增 Ct 值经由软件分析并导出, 记录所得实验数据。

1.3.3 蛋白提取和 Western blot 检测 收集新鲜组织并用蛋白裂解液裂解后提取蛋白, 使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 在 300 mA 恒流条件下转膜 90 min, 浆膜置于浓度为 5% 脱脂牛奶中, 室温下摇床封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内一抗孵育过夜; TBST 洗膜后加入二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内孵育 1 h, 洗膜后配置 ECL 液进行检测。

1.4 结果判定 GSE1 免疫反应阳性以细胞质中即见棕黄色颗粒状物质沉积作为判断并进行计数, 并随机选择 5 个不重复的视野对免疫组化切片进行观察, 对所挑选的每个视野范围内对细胞进行计数。依据半定量积分法对最终结果进行判断, 并由 2 名资深病理科医师完成打分, 标准如下: ① 依照反应着色强度打分。0 分: 细胞无明显的着色反应; 1 分:

浅黄色; 2 分: 棕黄色; 3 分: 棕褐色。② 依照同一视野下阳性细胞个数占观测所得细胞总数比例进行打分。0 分: 视野中未发现阳性细胞; 1 分: 阳性细胞所占比例 $\leq 10\%$; 2 分: 阳性细胞所占比例为 11% ~ 50%; 3 分: 阳性细胞所占比例 51% ~ 75%; 4 分: 阳性细胞所占比例 $> 75\%$ 。将上述各切片打分后的①②两项得分相乘, 依据相乘后所得的分数将结果划分为 4 个等级 “-”: ≤ 2 分 “+”: 3 ~ 4 分 “2+”: 6 ~ 8 分 “3+”: ≥ 9 分, 依所得分数判定 ≥ 6 分为反应阳性^[8]。

1.5 统计学处理 实验结果采用 SPSS 20.0 软件分析, 所得计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 配对设计的 t 检验用于分析组间比较; χ^2 检验用于分析所需定性资料的组间比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GSE1 在 HCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达 本实验收集 30 组新鲜 HCC 和 30 组癌旁非肿瘤组织进行 qRT-PCR 实验, 测定 GSE1 mRNA 在不同组织中的表达。结果发现 HCC 组中 GSE1 的 mRNA 表达与癌旁非肿瘤组织相比上调 ($P < 0.0001$), 见图 1。接着运用 Western blot 实验进一步检测 GSE1 在实验组和对照中的表达情况, 结果表明在 HCC 组织中 GSE1 的表达上调, 见图 2。

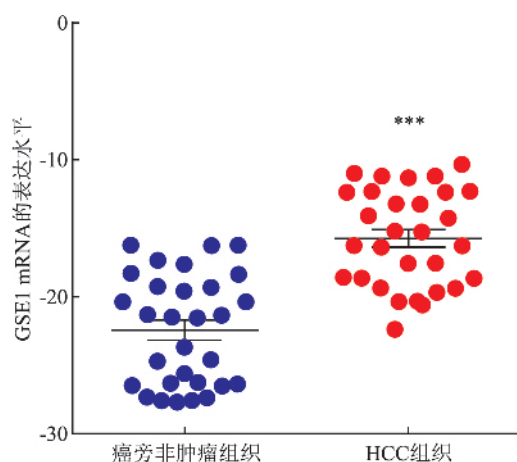


图1 GSE1 mRNA 在 HCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达
与癌旁非肿瘤组织比较: *** $P < 0.0001$

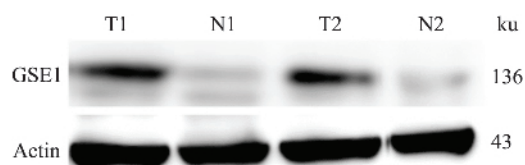


图2 GSE1 蛋白在 HCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达
T: HCC 组织; N: 癌旁非肿瘤组织

在免疫组化实验中,GSE1 的表达定位于细胞质,见图3。GSE1 蛋白在 71 例 HCC 组织中阳性率为 50.70% (36/71),41 例癌旁非肿瘤组织阳性率为 19.51% (8/41)。GSE1 蛋白在 HCC 组织与癌旁非肿瘤组织中的表达存在差异 ($P < 0.05$),见表 1。

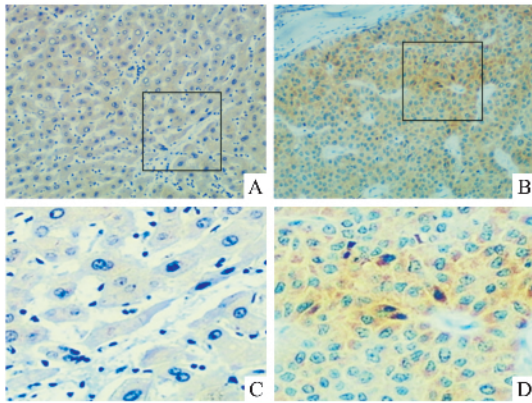


图3 GSE1 在不同肝组织中的表达

A: 癌旁非肿瘤组织 $\times 100$; B: HCC 组织 $\times 100$; C: 癌旁非肿瘤组织 $\times 200$; D: HCC 组织 $\times 200$

表1 GSE1 在不同肝组织中的表达

组别	例数 (n)	GSE1 表达 阳性(n)	χ^2 值	P 值
HCC 组织	71	36	10.602	0.001
癌旁非肿瘤组织	41	8		

2.2 GSE1 蛋白在 HCC 组织中的表达结果与临床病理参数之间的相关性 在 HCC 组织中,GSE1 蛋白水平的变化与 TNM 分期相关 ($P < 0.01$),与统计的其余参数均未见相关,见表 2。

3 讨论

恶性肿瘤发生的根本原因包括了原癌基因的激活和抑癌基因功能的丧失。HCC 作为肝癌中最为常见的组织学亚型,其预后不佳,经统计患者 5 年生存率不足 15%^[14],因此对可能参与到 HCC 进展过程中关键因素的研究十分重要。既往的研究中 Yao et al^[11] 发现 ASB16-AS1 可作为癌基因调节 miR-1827/FZD4/Wnt/ β -catenin 途径促进 HCC 的进程; Salah et al^[12] 则发现 MiR-34a 可作为抑癌基因并能被制成纳米制剂用于 HCC 的治疗。而对于早期 HCC 患者,经射频消融治疗的短期生存率优异^[13]。

GSE1 是一种富脯氨酸蛋白质,分子量 136 ku^[14],首次 Nagase et al^[15] 通过使用离子阱质谱法被分离和鉴定,定位于 16q24.1。Chai et al^[6] 在

表2 GSE1 在 HCC 中的表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	例数 (n)	GSE1 阳性 n(%)	χ^2 值	P 值
性别				
男	59	30(50.85)	0.003	0.957
女	12	6(50.00)		
年龄(岁)				
≤ 55	30	19(63.33)	3.315	0.069
> 55	41	17(41.46)		
肿瘤直径(cm)				
≤ 5	33	18(54.55)	0.364	0.546
> 5	38	18(47.37)		
脉管浸润				
有	16	5(31.25)	3.127	0.077
无	55	31(56.36)		
Edmondson 组织学分级				
I + II	30	16(53.33)	0.144	0.705
III + IV	41	20(48.78)		
临床分期				
I + II	29	5(17.24)	21.962	0.000
III + IV	42	31(73.81)		

GSE1 的研究中发现 GSE1 在体外可以介导乳腺癌的进展。通过实验证明了 GSE1 在乳腺癌中高表达,siRNA 对乳腺癌细胞系 GSE1 基因敲除抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。通过 qRT-PCR 对新鲜冰冻乳腺癌组织进行检测发现,miR-489-5p 在乳腺癌组织中的表达减少。此外,miR-489-5p 的高表达抑制了乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并且 miR-489-5p 的靶基因是 GSE1。同时 Ding et al^[7] 在对 GSE1 的进一步研究中,选取了 100 组人胃癌组织和正常胃组织进行免疫组化实验,结果发现相比于正常组织,胃癌组织中高表达,并对上述 100 名胃癌患者临床病理数据进行分析,发现 GSE1 的表达与淋巴结转移及临床分期相关,对患者术后 5 年随访调查发现,胃癌组织中 GSE1 高表达患者的无复发生存率及总生存率均低于低表达组,这些数据表明 GSE1 与胃癌患者的预后不良有关。

本研究检测首先使用 qRT-PCR 方法检测 GSE1 mRNA 在新鲜 HCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达情况。结果显示,GSE1 在 HCC 组织中的表达上调;接着使用 Western blot 检测 GSE1 蛋白在新鲜 HCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达情况。结果显示,GSE1 蛋白在 HCC 组织中表达水平较高;最后使用免疫组化的方法测定 GSE1 在石蜡样本中的表达,结果显示 GSE1 在 HCC 组织中表达上调且 GSE1 的高表达与 HCC 的临床分期正相关。这与 Ding et al^[7] 在胃恶性肿瘤研究结果相一致,提示了 GSE1 可能扮演着癌基因的角色。

参考文献

- [1] 高 婷,李 超,梁 铨,等. 中国癌症流行的国际比较 [J]. 中国肿瘤,2016,25(6):409-14.
- [2] Ferlay J,Colombet M,Soerjomataram I,et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. Int J Cancer,2019,144(8):1941-53.
- [3] Xia H,Dai X,Yu H,et al. EGFR-PI3K-PDK1 pathway regulates YAP signaling in hepatocellular carcinoma: The mechanism and its implications in targeted therapy [J]. Cell Death Dis,2018,9(3):269.
- [4] Della Corte C M,Viscardi G,Papaccio F,et al. Implication of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol,2017,23(24):4330-40.
- [5] 马 旻,崔东倩,韩陈陈,等. IGF-1 通过激活 EGR1 诱导肝细胞癌的迁移和侵袭 [J]. 安徽医科大学学报,2019,54(11):1750-5.
- [6] Chai P,Tian J,Zhao D,et al. GSE1 negative regulation by miR-489-5p promotes breast cancer cell proliferation and invasion [J]. Biochem Biophys Res Commun,2016,471(1):123-8.
- [7] Ding K,Tan S,Huang X,et al. GSE1 predicts poor survival outcome in gastric cancer patients by SLC7A5 enhancement of tumor growth and metastasis [J]. J Biol Chem,2018,293(11):3949-64.
- [8] Edge S B,Compton C C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM [J]. Ann Surg Oncol,2010,17(6):1471-4.
- [9] 王 巍,吴文涌,吴正升,等. CMIP 与 MDM2 在肝细胞性肝癌中的表达及其临床意义 [J]. 安徽医科大学学报,2018,53(2):292-6.
- [10] El-Serag H B. Hepatocellular carcinoma [J]. N Engl J Med,2011,365(12):1118-27.
- [11] Yao X,You G,Zhou C,et al. LncRNA ASB16-AS1 promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma through regulating miR-1827/FZD4 axis and activating Wnt/ β -catenin pathway [J]. Cancer Manag Res,2019,11:9371-8.
- [12] Salah Z,Abd E A E,Youssef H F,et al. Effect of tumor suppressor MiR-34a loaded on ZSM-5 nanozeolite in hepatocellular carcinoma: *in vitro* and *in vivo* approach [J]. Curr Gene Ther,2019,19(5):342-54.
- [13] Yamagiwa K,Shiraki K,Yamakado K,et al. Survival rates according to the Cancer of the Liver Italian Program scores of 345 hepatocellular carcinoma patients after multimodality treatments during a 10-year period in a retrospective study [J]. J Gastroen Hepatol,2008,23(3):482-90.
- [14] Hakimi M A,Dong Y, Lane W S,et al. A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes [J]. J Biol Chem,2003,278(9):7234-9.
- [15] Nagase T,Seki N,Ishikawa K,et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. V. The coding sequences of 40 new genes(KIAA0161-KIAA0200) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 (supplement) [J]. DNA Res,1996,3(1):43-53.

Expression and clinical significance of GSE1 in hepatocellular carcinoma

Liu Dachao¹, Wu Wenyong¹, Wu Zhengsheng²(¹Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;²Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the difference of human GSE1 coiled-coil protein(GSE1) expression in hepatocellular carcinoma(HCC) and adjacent non-tumor tissues, and then explore the clinical role and clinicopathological significance of GSE1 in the development and progression of HCC. **Methods** qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of GSE1 protein in HCC and adjacent non-tumor tissues. The results were analyzed by SPSS 20.0 software. The relationship between GSE1 mRNA expression and the clinicopathological characteristics of HCC was discussed. **Results** The results of qRT-PCR showed that the expression level of GSE1 mRNA in 30 groups of fresh HCC was higher than that in adjacent non-tumor tissues, and the difference was statistically significant($P < 0.0001$). The results of Western blot showed that GSE1 was highly expressed in HCC tissues, but low expressed in adjacent non-tumor tissues. The results of immunohistochemistry showed that the positive rate of GSE1 protein was 50.70%(36/71) in HCC tissues and 19.51%(8/41) in 41 adjacent non-tumor tissues. There was a significant difference in the expression of GSE1 between HCC and adjacent non-tumor tissues($P < 0.05$). The expression of GSE1 protein in HCC and adjacent non-tumor tissues was correlated with clinical pathological stage($P < 0.01$), but not with gender, age, vascular invasion and Edmondson histological grade. **Conclusion** GSE1 is highly expressed in HCC, and it may be closely related to the development of HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; GSE1; cancer