

网络出版时间: 2020-4-7 16:49 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.026.html>

CYFIP1 表达与肝细胞性肝癌发生发展的相关性研究

顾 炯, 崔 笑, 侯 辉, 喻宗繁, 张 彬, 熊奇如

摘要 目的 研究细胞质 FMR1 相关蛋白 1 (CYFIP1) 在肝细胞性肝癌 (HCC) 组织中的表达及与 HCC 发生发展的相关性。方法 利用组织微阵列分析检测 80 例原发性肝细胞性肝癌的肿瘤组织与癌旁正常肝组织中 CYFIP1 的表达水平, 并分析其与临床特征的相关性; 运用 Annexin V-FITC/PI 双染标记法检测 HepG2 细胞沉默 CYFIP1 后的凋亡水平; 运用 Western blot 法检测 CYFIP1 的蛋白表达变化。结果 组织芯片染色结果提示肿瘤组织中 CYFIP1 表达量降低 ($P = 0.031$), 且与 HCC 患者的肿瘤分化程度、肿瘤直径及生存期存在相关性。采用 shRNA 沉默 CYFIP1 后, HepG2 细胞的细胞增殖水平上升 ($P = 0.019$), 且细胞凋亡水平下降 ($P = 0.021$)。结论 CYFIP1 是 HCC 的抑癌基因, 可能成为患者临床预后的监测指标。

关键词 肝细胞性肝癌; CYFIP1; 基因沉默

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0617-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.026

与其他常见肿瘤相比, 肝细胞性肝癌 (hepatocarcinoma, HCC) 恶性程度较高、易复发, 而且治疗方式有限, 患者预后较差, 生存期较短^[1]。细胞信号通路如 PI3K-AKT-mTOR、JAK-STAT、Wnt/ β -catenin

等^[2]已被证实在 HCC 的发生发展中具有重要作用, 肿瘤分子靶向治疗也成为近年来的研究热点。针对 HCC 的分子靶向药物如索拉非尼、乐伐替尼等在临床治疗中得到了越来越多的应用, 但是分子靶向治疗的效果不尽如人意, 部分药物治疗后期耐药率较高^[3]。因此, 需要对 HCC 发病的分子机制进行进一步研究, 帮助发现更有效的靶向药物或治疗方法。

细胞内 mRNA 翻译通常有 2 种途径: Cap-依赖型和非 Cap-依赖型。Cap-依赖型 mRNA 翻译异常与很多肿瘤的发生发展有关^[4]。在 Cap-依赖型 mRNA 翻译进程中, 起始阶段的调控作用尤其重要, 主要参与的调控因子有: 真核起始因子复合物 4F (eukaryotic initiation factor 4F, EIF4F) 以及 CYFIP1-EIF4E-FMR1 复合物^[5-7]。其中细胞质 FMR1 相关蛋白 1 (cytoplasmic FMR1-interacting protein 1, CYFIP1) 被证实是一些肿瘤如鼻咽癌、乳腺癌等的潜在抑制因子^[8,9], 但是 CYFIP1 在 HCC 发病中的作用目前尚不清楚。故该研究主要探讨 CYFIP1 的表达与 HCC 临床特征之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本与病例资料 组织标本取自安徽医科大学第二附属医院的标本库, 并制作成组织芯片。共纳入 4 张组织芯片, 包括 80 例 HCC 患者的肿瘤组织以及对应的癌旁正常组织。80 例患者均

2020-01-09 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1808085MH270)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院普外科, 合肥 230601

作者简介: 顾 炯, 男, 副主任医师;

熊奇如, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zdc1987@yeah.net

ance of patients. **Results** The level of IL-26 in HBV-ACLF patients was significantly higher than that in non-achf patients. The expression of IL-26 was positively correlated with creatinine (CREA) and activated partial thromboplastin time (APTT). Multivariate logistic analysis showed that total bilirubin (TBIL) and IL-26 were independent risk factors. The prognostic model AUC (0.933) established by IL-26 combined with MELD was more sensitive and accurate than single index. Serum IL-26 $> 1\ 019.68$ pg/ml had reliable prognostic accuracy in predicting 90-day mortality in patients with HBV-ACLF. **Conclusion** The level of IL-26 significantly increased in patients with HBV-ACLF, which has important clinical significance and application value in monitoring the condition and prognosis of patients with HBV-ACLF.

Key words acute-on-chronic liver failure; IL-26; hepatitis B; prognosis

经病理检查证实为 HCC,且在采集组织时,均未进行除手术以外的任何抗肿瘤治疗,如肝静脉插管化疗栓塞和灌注(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)等;同时收集纳入患者的临床资料以及随访数据。随访截止日期为 2019 年 4 月 1 日。本研究符合安徽医科大学第二附属医院伦理审查委员会批准。

1.1.2 试剂与仪器 超灵敏两步免疫组织化学试剂盒 PV-9001(北京中杉金桥);Rabbit anti-CYFIP1 多克隆抗体(ab156016,美国 Abcam);凋亡试剂盒 Annexin V:FITC Apoptosis Detection Kit I(556547,美国 BD)等。Western blot 显影仪(Tanon Fine-doX6,上海);精密恒温二氧化碳细胞培养箱(Thermo Fisher,美国);酶标仪(KHB ST-360,美国)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 组织芯片厚度 4 μm ,封蜡室温保存。按以下步骤行免疫组化染色:切片置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中烤片 1 h,于二甲苯中脱蜡 2 $\times$ 3 min,接着分别用无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇进行梯度脱水处理;抗原修复采用高压煮沸方式(枸橼酸钠缓冲液,3 min);用 3% H_2O_2 进行内源性过氧化物酶阻断后,1% BSA 封闭 1 h;4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育一抗(1:100)过夜;第 2 天常温孵育二抗(1:1000)1 h 后,进行 DAB 染色,显微镜下观察结果。免疫组化的结果由 2 位医师分别进行分级(1:最弱;4:最强)。

1.2.2 细胞培养 含 10% 血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基用于 HepG2 细胞。培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。每 3 d 更换培养基 1 次。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达水平 6 孔板中的细胞经处理,并提取蛋白。蛋白浓度采用 BCA 试剂盒测定。电泳凝胶为 10%~12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶。浓缩胶电泳条件为:80 V、30 min;分离胶电泳条件为:120 V、60 min;转膜条件为:200 mA 恒定电流下 1 h。5% BSA 室温封闭 1 h;4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育一抗(1:1000);室温孵育二抗(1:10000)1 h。

1.2.4 流式检测细胞凋亡 6 孔板中的细胞,离心后用 1 $\times$ 缓冲液重悬并计数,将浓度稀释为 1 $\times 10^6$ 个/ml。充分震荡后,取 100 μl 细胞悬液加入流式试管中,再用 5 μl ANNEXIN V 和 5 μl PI 进行细胞标记,室温下避光孵育 15 min,1 h 内用流式细胞仪进行凋亡检测。

1.3 统计学处理 统计学分析采用 SPSS 17.0 软件。分类变量的数据分析采用 χ^2 检验;临床指标与蛋白表达程度的相关性研究采用多因素方差分析;Log-rank test 及 Gehan-Breslow-Wilcoxon test 用于生存曲线的差异性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYFIP1 在肿瘤组织中的表达 纳入的 80 例 HCC 患者人口学特征和临床基本情况见表 1。组织芯片免疫组织化学染色情况见图 1。与癌旁组织比较,42 例患者的肿瘤组织中存在 CYFIP1 低表达,20 例患者组织中存在 CYFIP1 的高表达,另 18 例患者肿瘤组织中 CYFIP1 的表达未见差异。其中在 42 例低表达的患者中,肿瘤组织 CYFIP1 的表达量较癌旁正常组织中表达降低,差异有统计学意义($P = 0.031$)。

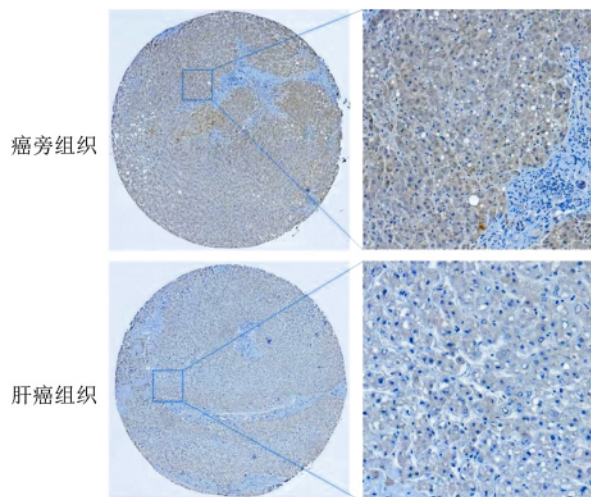


图 1 CYFIP1 组织芯片免疫组化表达情况 $\times 100$

2.2 CYFIP1 在肿瘤组织中的表达与肿瘤组织分化、肿瘤直径及患者生存期的关系 多因素分析的结果提示,CYFIP1 的表达与患者的肿瘤分级、肿瘤直径 2 项临床指标呈负相关且差异有统计学意义($P = 0.012$ 、 $P = 0.014$);但是与性别、年龄、血清 AFP、HBV-DNA、Child 分级等指标的关联无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。生存分析显示 CYFIP1 低表达的患者生存期较差,差异有统计学意义($P = 0.018$)。见图 2A。

2.3 沉默 CYFIP1 对 HepG2 细胞增殖的影响 在

表1 CYFIP1 表达情况与 HCC 患者临床特征的相关性分析

临床特征	n	低表达组 (n=42)	高表达组 (n=20)	χ^2/F 值	P 值
性别				0.021	0.512
男	58	31	13		
女	22	11	7		
年龄(岁)				44.414	0.617
<52	42	23	11		
≥52	38	19	9		
AFP(μg/L)				2.371	0.728
阳性(>20)	45	22	12		
阴性(<20)	35	20	8		
HBV-DNA				0.028	0.926
阳性	49	25	9		
阴性	31	17	11		
Child-Pugh 分级				0.042	0.461
A	71	38	17		
B	9	4	3		
分化				11.332	0.012
低分化	30	12	5		
中分化	38	22	11		
高分化	12	8	4		
肿瘤直径(cm)				14.662	0.014
≤5	36	12	12		
>5	44	30	8		

人肝癌细胞系 HepG2 中采用 siRNA 沉默 CYFIP1 后,Western blot 验证 siRNA 沉默有效。与阴性对照组(negative control,NC)比较,siRNA 沉默 CYFIP1 后,MTT 结果提示其细胞增殖速度提高($P=0.019$)。见图 2B。流式细胞凋亡检测结果提示,沉默 CYFIP1 后细胞中晚期凋亡比例降低($P=0.021$)。见图 2C。

3 讨论

HCC 是中国常见的恶性肿瘤之一,由于 HCC 的治疗难度较大,术后复发率较高,因此针对 HCC 的分子生物学机制研究一直是该领域的热点。CYFIP1 作为新发现的肿瘤抑制基因,在乳腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌等肿瘤中具有一定的肿瘤抑制作用^[6-7,9],并且与肿瘤的转移有关^[8],但是 CYFIP1 在肝癌中的作用目前相关报道有限,因此本研究首次探讨了 CYFIP1 的表达与 HCC 临床特征的相关性。

本研究结果表明,CYFIP1 是 HCC 的一个抑癌基因,其在 HCC 患者组织中的表达低于癌旁正常组织。更重要的是,CYFIP1 的表达与 HCC 患者的肿瘤生存期、肿瘤大小以及肿瘤分化程度具有相关性。这些结果提示,CYFIP1 的表达可能与 HCC 的发生

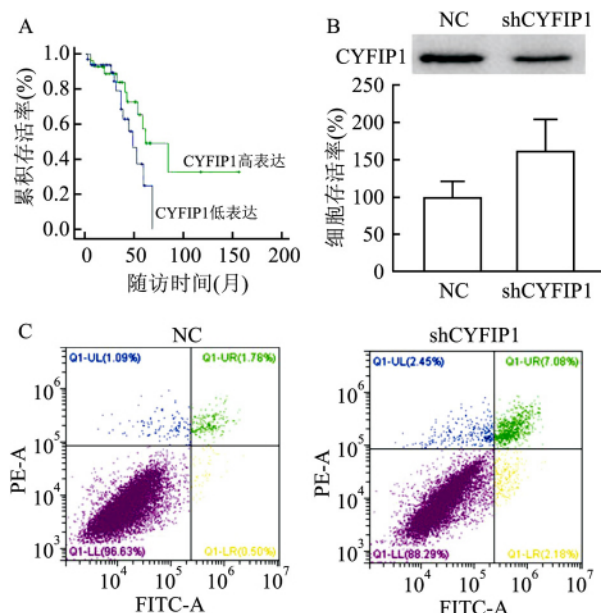


图2 CYFIP1 表达对 HCC 的发生发展的影响

A: CYFIP1 表达与 HCC 患者的生存分析; B: 沉默 CYFIP1 对 HepG2 细胞增殖的影响; C: 沉默 CYFIP1 的表达对 HepG2 细胞凋亡的影响

发展具有重要关联,是潜在的治疗靶点或临床监测指标。同时,进一步的细胞实验结果证实,HCC 细胞敲低 CYFIP1 后,其细胞凋亡水平下降,增殖能力提升,这些结果进一步证实了 CYFIP1 是 HCC 的潜在抑癌基因。

CYFIP1 作为 Scar/WAVE 复合物的组成部分,调节细胞骨架蛋白的形成。Scar/WAVE 复合物通过其 VCA 结构域来接受上游信号蛋白的调控^[14]。也有研究^[7,14]表明,下调肿瘤细胞中的 CYFIP1 可以引起 WAVE3 的稳定失调,从而诱导细胞侵袭能力的增加。CYFIP1 还可能与脆性 X 智力低下相关蛋白结合,进一步调节 mTOR 功能相关的生物学功能,如细胞增殖和凋亡等^[11]。除此之外,CYFIP1 也可与 EIF4E 结合,进一步抑制 EIF4G 复合物的形成,从而抑制 CAP 依赖型的 mRNA 翻译,并且 MNK 也调节着 CYFIP1/FMRP 复合物^[12]。本研究首次发现 CYFIP1 在 HCC 中的表达程度及其与 HCC 患者预后的相关性,提示 CYFIP1 可能是 HCC 的潜在预后指标,具有潜在的临床应用价值。

参考文献

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018,68

- (6): 394–424.
- [2] Forner A, Llovet J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2012, 379(9822): 1245–55.
 - [3] Niu L, Liu L, Yang S, et al. New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1868(2): 564–70.
 - [4] Shi X, Chen X, Li W C, et al. Low expression of Cyfip1 may be a potential biomarker in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Neoplasma*, 2018, 65(2): 292–5.
 - [5] Dziunycz P J, Neu J, Lefort K, et al. CYFIP1 is directly controlled by NOTCH1 and down-regulated in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0173000.
 - [6] Silva J M, Ezhkova E, Silva J, et al. Cyfip1 is a putative invasion suppressor in epithelial cancers [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1047–61.
 - [7] Teng Y, Qin H, Bahassan A, et al. The WASF3-NCKAP1-CYFIP1 complex is essential for breast cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(17): 5133–42.
 - [8] Cowell J K, Teng Y, Bendzun N G, et al. Suppression of breast cancer metastasis using stapled peptides targeting the WASF regulatory complex [J]. *Cancer Growth Metastasis*, 2017, doi: 10.1177/1179064417713197.
 - [9] Chen X, Qin L, Li P, et al. Cyfip1 is downregulated in acute lymphoblastic leukemia and may be a potential biomarker in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 9285–8.
 - [10] Teng Y, Bahassan A, Dong D, et al. Targeting the WASF3-CYFIP1 complex using stapled peptides suppresses cancer cell invasion [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(4): 965–73.
 - [11] Abekhoukh S, Sahin H B, Grossi M, et al. New insights into the regulatory function of CYFIP1 in the context of WAVE- and FM-RP-containing complexes [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(4): 463–74.
 - [12] Bramham C R, Jensen K B, Proud C G. Tuning specific translation in cancer metastasis and synaptic memory: control at the MNK-eIF4E axis [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(10): 847–58.

Correlation between the expression of CYFIP1 and the occurrence and development of hepatocellular carcinoma

Gu Jiong, Cui Xiao, Hou Hui, et al

(Dept of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To study the expression of CYFIP1 gene in HCC tissue and its biological mechanism in the development of hepatocarcinoma (HCC). **Methods** The expression of CYFIP1 in 80 pairs HCC tissues was evaluated by staining of tissue microarray slides (TMA), and its clinical relevance was evaluated. The apoptosis assay was conducted with Annexin V-FITC/PI staining. The expression of CYFIP1 in HepG2 cells was performed with Western blot. **Results** The expression of CYFIP1 in HCC tissues was lower than that in adjacent normal liver tissues ($P=0.031$), which was clinically relevant with tumor grades, tumor size and prognosis of HCC patients. Knock down of CYFIP1 by shRNA in HepG2 cells increased the proliferation ($P=0.019$) and decreased the apoptosis ($P=0.021$) of HepG2 cells. **Conclusion** CYFIP1 is a suppressor gene in HCC, which may be a potential prognostic marker in HCC.

Key words hepatocarcinoma; CYFIP1; gene silencing