

肝细胞癌中膜铁转运蛋白的表达及意义

王珊珊, 汪静, 张浩, 王琴, 杨凯, 管世鹤

摘要 目的 探讨膜铁转运蛋白(FPN)在肝细胞癌中的表达及其意义。方法 采用ELISA法分别检测41例健康对照组、48例慢性肝病组和80例肝癌组血清中的FPN表达,分析肝癌组FPN表达程度与肝癌患者Child-pugh分级、巴塞罗那(BCLC)肝癌分期等指标的相关性;收集46例肝组织切片,通过普鲁士蓝铁染色和免疫组化检测肝良性病变组织和肝癌组肝组织铁沉积及FPN表达。结果 血清中健康对照组与慢性肝病组FPN表达差异无统计学意义($P>0.05$),而肝癌组FPN表达明显高于健康对照组($P<0.001$)和慢性肝病组($P<0.05$),且FPN表达程度与肝癌的Child-pugh分级、BCLC肝癌分期及转移呈正相关($P<0.05$),与肿瘤大小($P>0.05$)、结节数目($P>0.05$)不相关;组织中,肝癌患者体内出现蓝色铁颗粒沉积现象且肝癌组FPN的表达明显高于肝良性病变组($P<0.05$)。结论 FPN在肝细胞癌患者体内中高表达,表明FPN可能在肝细胞癌的发生发展中起到重要作用,可作为肝细胞癌免疫治疗的一个新的靶点。

关键词 肝细胞癌;膜铁转运蛋白;铁死亡

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)05-0772-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.023

肝癌是全球病死率最高的恶性肿瘤之一,是全球癌症相关死亡的第二大原因^[1],特别是在发展中国家。在我国每年有近38万人死于肝癌,面对如此严峻的形势,肝癌的治疗备受关注。铁是人体必不可少的微量元素之一,在人体中参与腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的合成、氧的运输及DNA合成等多种代谢过程,而膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN)作为唯一已知的铁离子输出蛋白,在体内广泛分布,是参与机体铁代谢的重要调节因子。已有研究^[2-3]表明,铁代谢紊乱引起的过量铁离子与肿瘤的发生、转移及预后有关。该研究拟通

过分析FPN在肝细胞癌中表达及与患者的分期和预后的关系,阐明FPN可能在肝细胞癌的发生发展起到的作用,为肝细胞癌的免疫治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集2017年3月~2019年3月安徽医科大学第二附属医院检验科血清169例。肝癌组80例,慢性肝病组48例,健康对照组血清41例。肝癌组男58例,女22例,年龄在28~86(52.61 ± 13.61)岁;慢性肝病组男38例,女10例,年龄在27~75(47.40 ± 11.17)岁;健康对照组男25例,女16例,年龄在16~80(48.98 ± 14.30)岁。收集2017年3月~2018年8月安徽医科大学第四附属医院病理科石蜡包埋的肝组织46例、肝癌组织32例、正常肝良性病变肝组织14例。肝癌组织男28例,女4例,年龄在39~70(56.87 ± 13.39)岁。肝良性病变肝组织男6例,女8例,年龄在55~69(62.71 ± 5.99)岁。所有受检人员性别、年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义,且均未服用华法林抗凝剂、维生素K及维生素K拮抗剂等药物。

1.2 纳入标准和排除标准 纳入标准:①所有肝癌患者均符合《原发性肝癌诊疗规范(2017版)》诊断标准;②所有慢乙肝患者均符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)》诊断标准;③血清标本的选择均为受检者入院后第1次检测。排除标准:①排除其他恶性肿瘤;②排除其他肝脏病史如肝移植病史、转移性肝癌等。

1.3 主要仪器与试剂 FPN抗体购自美国Abcam公司;普鲁士蓝铁染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;免疫组化试剂购自安徽欣乐生物技术有限公司;人膜铁转运蛋白ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物技术公司。奥林巴斯CR23显微镜观察免疫组化结果,Roche601电化学发光仪检测甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP),KHB-ST-360酶标仪读取FPN吸光度值,Siemens2000全自动生化仪检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)水平,Mindray6800血

2020-02-10 接收

基金项目:安徽省科技厅重点研究与开发计划项目(编号:1804h08020236);安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2017zhyy11)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601

作者简介:王珊珊,女,硕士研究生;

管世鹤,男,教授,主任技师,博士生导师,责任作者,E-mail: shihguan@126.com

常规分析仪检测血红蛋白(hemoglobin, Hb)水平。

1.4 方法

1.4.1 普鲁士蓝铁染色检测肝癌组织铁沉积 肝组织石蜡切片经二甲苯脱蜡两次,用不同浓度梯度的乙醇(100%、95%、90%、85%)水化。Perls stain 染液染色 15~30 min,蒸馏水充分冲洗 5~10 min 后,伊红染液复染 15~30 s,蒸馏水冲洗 3~5 s。最后乙醇(90%、95%、100%)脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。普鲁士蓝铁染色结果判断:无蓝色铁颗粒沉积为阴性,有蓝色铁颗粒沉积为阳性。

1.4.2 免疫组化检测 FPN 在肝组织中的表达 将石蜡组织切片在二甲苯中脱蜡,并根据标准方案在降序乙醇系列中再水合。在 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中在 100 °C 下进行热诱导的抗原修复 20 min。酶消化的抗原修复在 0.1% 胰蛋白酶中于 37 °C 进行 25 min。然后用血清封闭切片 30 min,然后与兔抗 SLC40A1 抗体在 37 °C 温育 1~2 h。洗涤后,将切片与辣根过氧化物酶-山羊抗兔抗体在 37 °C 温育 30 min。用 DAB 缓冲底物中的 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)溶液显色过氧化物酶反应。用 DAB 显示切片并用苏木精复染,安装在中性胶中并使用明视野显微镜分析。使用鼻咽癌病理切片作为阴性对照,并用 PBS 代替一抗。为了评估 IHC 结果,使用 Image-J 软件对免疫组化结果进行分析判读。

1.4.3 ELISA 检测 FPN 在肝癌患者和正常健康对照者血清中的表达 将标准品工作液与待测样品依次加入酶标板孔中每孔 100 μ l,覆膜,37 °C 孵育 90 min;弃去液体不用洗涤,每孔直接加入生物素化抗体工作液 100 μ l,覆膜,37 °C 孵育 60 min;甩尽孔内液体,每孔加入洗涤液 350 μ l,浸泡 1~2 min 后拍干,重复洗涤 3 次;加入酶结合物工作液 100 μ l,覆膜,37 °C 孵育 30 min,同上洗涤 5 次;每孔加入底物溶液 90 μ l,覆膜,37 °C 避光孵育 15 min 后加入终止液 50 μ l,终止反应,立即使用酶标仪在波长 450 nm

波长测量各孔 OD 值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,其中正态数据采用均数和标准差表示,偏态数据采用中位数和四分位数间距表示,正态分布数据比较采用 *t* 检验,偏态分布数据采用秩和检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌患者肝组织中肝铁沉积 普鲁士蓝铁染色结果显示,肝癌组织中铁沉积明显高于肝良性病变组织(图 1),肝癌组织出现明显的蓝色铁沉积,而肝良性病变组织中无蓝色铁颗粒,以上结果提示肝癌患者较对照组织中出现铁代谢紊乱,并发生肝铁沉积现象。

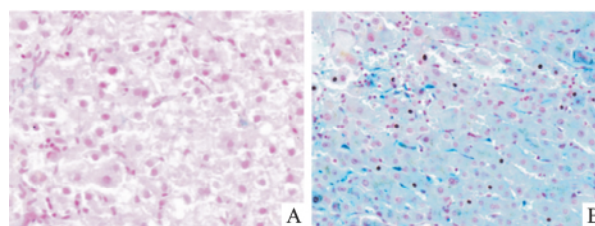


图 1 HCC 和肝良性病变组织普鲁士蓝铁染色 $\times 200$

A: 肝良性病变组织; B: 肝癌组织

2.2 FPN 在血清中的表达水平 健康对照组、慢性肝病组和肝癌组生化指标水平比较中显发现 ALT、AST、TBIL、Hb、FPN 三组均有差异(表 1),且肝癌组患者血清中 FPN 表达水平明显高于健康对照组和慢性肝病组(图 2)。再对肝癌患者进行临床特征分析,发现患者的 Child-pugh 肝功能分级($P<0.05$),BCLC 肝癌分期($P<0.05$),转移($P<0.05$)与 FPN 表达水平差异有统计学意义,与结节数目、肿瘤的大小($P>0.05$)差异无统计学意义(表 2)。

2.3 FPN 在肝组织中的表达 免疫结果显示,肝良性病变组织中细胞膜和细胞质中无明显的棕黄色

表 1 健康对照组、慢性肝病组和肝癌组生化指标水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

项目	健康对照组($n=41$)	慢性肝病组($n=48$)	肝癌组($n=80$)	χ^2/Z 值	P 值
ALT(U/L)	23.00(18.00, 28.50)	46.00(31.00, 77.00) #	42.50(24.25, 81.75) #	32.46	<0.05
AST(U/L)	30.00(24.00, 34.00)	33.00(26.00, 42.00)	56.50(31.00, 137.00) **	27.67	<0.05
TBIL(μ mol/L)	10.80(6.80, 15.25)	15.40(11.20, 20.10) #	19.30(14.18, 30.33) **	32.52	<0.05
Hb(g/L)	142.00(133.50, 156.50)	144.00(133.00, 152.00)	137.00(107.00, 142.00) **	24.64	<0.05
AFP(ng/ml)	-	2.40(1.85, 4.18)	22.08(2.44, 549.80) *	-4.23	<0.05
HBV-DNA(IU/ml)	-	1 520(500, 1 520)	500(500, 49 400)	-0.96	0.34
FPN(ng/ml)	0.55(0.26, 0.99)	0.76(0.39, 1.29)	1.01(0.70, 2.04) **	14.00	<0.05

与健康对照组比较: # $P<0.05$; 与慢性肝病组比较: * $P<0.05$

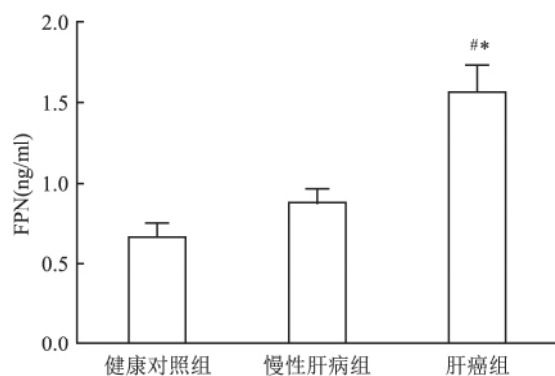


图2 血清中 FPN 表达

与健康对照组比较: $^{##}P < 0.05$; 与慢性肝病组比较: $^{*}P < 0.05$ 表2 FPN 与肝癌患者临床特征的相关性 [$M(P_{25} P_{75})$]

	<i>n</i>	FPN(ng/ml)	χ^2/Z 值	<i>P</i> 值
Child-Pugh 分级				
A	47	1.78(0.71 2.15)	10.72	<0.05
B	20	0.70(0.36 1.02)		
C	13	0.35(0.16 0.35)		
BCLC 分期				
0 + A	14	1.14(0.74 1.14)	16.32	<0.05
B	40	1.92(0.93 4.03)		
C + D	26	0.99(0.99 1.70)		
肿瘤大小(cm)				
<5	56	0.77(0.74 2.23)	-0.03	0.92
≥5	24	0.85(0.36 1.74)		
结节数目				
无 + 单发	30	1.25(0.74 2.23)	-1.74	0.09
多发	50	0.85(0.36 1.74)		
转移				
有	55	1.41(0.41 3.42)	-2.76	<0.05
无	25	0.79(0.43 1.51)		

染色,而肝癌组织细胞膜和细胞质中有明显的棕黑色染色(图3),肝癌患者肝组织中 FPN% Area 中 FPN(9.718 ± 8.005)明显高于肝良性病变患者肝组织中 FPN% Area(2.669 ± 2.231),差异有统计学意义($t = 2.361$, $P < 0.05$)。

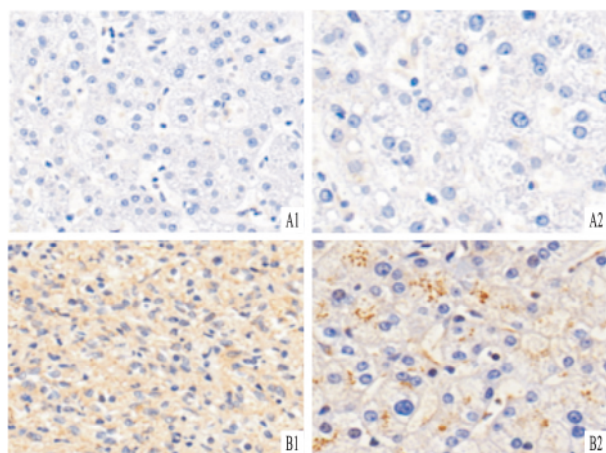


图3 肝组织免疫组化染色

A: 肝良性病变组织; B: 肝癌组织; 1: $\times 200$; 2: $\times 400$

3 讨论

我国是肝癌大国,每年新发病例和死亡病例都占到全球的 50% 以上。据统计,我国的肝癌患者,以巴塞罗那分期 B 和 C 期为主,占到所有肝癌患者的 80% 以上,C 期在我国肝癌患者中占到 50% 以上,大多数肝癌患者发现时即为晚期,而早期肝癌的诊出率不足 30%,晚期肝癌的五年生存率不足 20%,而及时进行治疗后,早期肝癌的 5 年生存率已超过 70%^[4]。因此,寻找有效的靶基因对肝癌的早期诊断早期治疗是尤为重要的。

人 FPN 基因位于 2 号染色体上,其 mRNA 编码的 FPN 有 571 个氨基酸,分子量约 62 000,在体内广泛分布,在脾脏、肝脏、十二指肠、心脏等细胞中均有表达。肝脏中,FPN 主要表达在枯否细胞的细胞质,肝细胞的窦周边缘^[5]。FPN 是机体铁代谢的重要调节因子,将细胞内游离铁转运至胞外,其变化会使肿瘤细胞更具侵袭性。因此,FPN 异常引起的铁代谢失衡通常会引起肿瘤侵袭和转移。Geng et al^[6]提出,敲低 FPN 可加速诱导神经母细胞瘤发生铁死亡。Shan et al^[7]发现,抑制 FPN 表达可刺激三阴性乳腺癌细胞的增殖、EMT 和迁移。Wang et al^[8]发现 FPN 与肝癌预后有一定的相关性。薛冬等^[9]发现 FPN 在前列腺癌细胞株和患者癌组织中均低表达,可能与其参与铁调节相关,由此可见,FPN 可能在肿瘤的发生发展中起到重要作用。

本研究首先通过普鲁士蓝铁染色发现肝癌患者肝组织中已出现铁沉积,表明肝癌患者体内已出现铁紊乱现象,再通过免疫组化与 ELISA 分析出肝癌患者体内肝组织和血清中 FPN 的表达均高于对照组($P < 0.05$),进一步分析患者的临床特征也得出 FPN 的表达程度与患者的 Child-pugh 肝功能分级、BCLC 肝癌分期、转移呈正相关。这与 Wang et al^[8]研究得出的肝癌患者组织中 FPN 低表达相矛盾,一方面可能由于肝脏发生铁过载现象,机体反馈性的上调铁调素的分泌水平,而 FPN 是已知的哺乳动物唯一的铁输出蛋白,需铁调素结合,发挥作用,减少铁的吸收,细胞内释放铁离子至血液减少,改善体内的铁过载现象;另一方面,FPN 在肝脏的亚细胞定位主要集中在枯否细胞胞质中,肿瘤细胞侵犯肝脏细胞时致使枯否细胞发挥吞噬和清除功能,FPN 从胞质释放进入血清^[10-11],导致 FPN 在肝癌患者体内高表达。

综上所述,我们认为 FPN 在肝细胞癌的发生发

展中起到重要作用,可作为肝细胞癌免疫治疗的一个新的靶点。其机制可能是 FPN 作为铁输出的重要调节因子,其 mRNA 可被高水平的细胞内铁促进^[11]。在肝细胞发生肿瘤时,细胞内铁含量增高,铁依赖的 FPN 表达增加,会将细胞内铁转移到细胞外,延缓细胞内铁超载,因此细胞内铁浓度升高会引发 FPN 补偿性的负反馈调节,有利于肝细胞内铁含量的稳定,从而保护组织免受铁超载的伤害^[5],而铁超载会使细胞内活性氧增加,可致肿瘤细胞发生铁死亡,然而铁死亡^[12]作为一种新型的细胞死亡方式在肝细胞癌中起着重要作用^[13-14],FPN 升高使得肝癌细胞逃避铁死亡。但是 FPN 参与肝癌细胞铁死亡的分子机制仍有待于研究。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–32.
- [2] Thévenod F. Iron and its role in cancer defense: a double-edged sword [J]. *Metal Ions Life Sci*, 2018, 18: 437–67.
- [3] Kazan H H, Urfali-Mamatoglu C, Gunduz U. Iron metabolism and drug resistance in cancer [J]. *Biometals*, 2017, 30(5): 629–41.
- [4] Zeng H, Chen W, Zheng R, et al. Changing cancer survival in China during 2003–15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): e555–67.
- [5] 李静, 钱忠明, 常彦忠, 等. 膜铁转运蛋白 Ferroportin 1 的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2004, 35(4): 349–51.
- [6] Geng N, Shi B J, Li S L, et al. Knockdown of ferroportin accelerates erastin-induced ferroptosis in neuroblastoma cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(12): 3826–36.
- [7] Shan Z, Wei Z, Shaikh Z A. Suppression of ferroportin expression by cadmium stimulates proliferation, EMT, and migration in triple-negative breast cancer cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 356: 36–43.
- [8] Wang Q, Zhou J, Zhong D, et al. Ferroportin in the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *European J Med Res*, 2013, 18: 59.
- [9] 薛冬, 何小舟, 周萃星, 等. 膜铁转运蛋白在前列腺癌中的表达及意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(1): 207–8.
- [10] 王静文, 许吕宏, 姚茜, 等. 铁调素及膜铁转运蛋白在铁过载小鼠模型中表达变化的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(3): 936–40.
- [11] 刘玉洁, 耿惠. 铁调素受体-膜铁转运蛋白的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2016, 45(8): 1110–3.
- [12] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–72.
- [13] Sun X, Niu X, Chen R, et al. Metallothionein-4G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis [J]. *Hepatology*, 2016, 64(2): 488–500.
- [14] Yuan H, Li X, Zhang X, et al. C1SD1 inhibits ferroptosis by protection against mitochondrial lipid peroxidation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 838–44.

The expression and significance of FPN in hepatocellular carcinoma

Wang Shanshan, Wang Jing, Zhang Hao, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the expression and significance of ferroportin (FPN) in hepatocellular carcinoma. **Methods** The expression of FPN in serum of 41 healthy controls, 48 chronic liver disease patients and 80 hepatocellular carcinoma patients was detected by ELISA, and the correlation between the degree of FPN in hepatocellular carcinoma group and Child-pugh classification, Barcelona (BCLC) staging of hepatocellular carcinoma was analyzed. 46 cases of liver tissue were collected, and the iron deposition and FPN expression of liver tissue were detected by Prussian blue iron staining and immunohistochemistry. **Results** In serum, there was no significant difference between healthy control group and chronic liver disease group ($P > 0.05$), but the expression of FPN in hepatocellular carcinoma group was significantly higher than that in healthy control group ($P < 0.001$) and chronic liver disease group ($P < 0.05$). The degree of FPN was positively correlated with the grade of Child-pugh, staging of BCLC ($P < 0.05$) and metastasis, but not with tumor size ($P > 0.05$) and number of nodules ($P > 0.05$). The deposition of blue iron particles was found in patients with hepatocellular carcinoma, and the expression of FPN in liver cancer tissue group was significantly higher than that in benign liver disease tissue group ($P < 0.05$). **Conclusion** FPN is highly expressed in patients with hepatocellular carcinoma, indicating that FPN may play an important role in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma, and it can be used as a new target for immunotherapy of hepatocellular carcinoma.

Key words hepatocellular carcinoma; ferroportin; ferroptosis