

Mortalin 在肝癌中的表达及其与血管生成和上皮间质转化的关系

陈 静 李建生 刘文斌 英卫东 许戈良 马金良 余继海 葛勇胜

摘要 目的 检测热休克蛋白 75 (Mortalin) 在肝细胞癌中的表达,探讨其与血管生成和上皮间质转化(EMT)的关系。方法 收集 100 例原发性肝癌(HCC)患者的癌组织和癌旁组织及 10 例正常肝组织,采用免疫组织化学染色、Western blot 和 qPCR 检测 Mortalin 的表达,分析 Mortalin 表达与肝癌临床病理特征之间的关系。同时分析 100 例 HCC 患者癌组织中 Mortalin、波形蛋白(Vimentin)和微血管密度(MVD)的表达情况,判断 Mortalin 的表达与 EMT、肿瘤血管生成之间的关系。结果 免疫组织化学显示 Mortalin 主要表达在细胞质中。肝癌组织中高表达 Mortalin 的比率是 77%,显著高于癌旁组织的 19%和正常组织的 10% ($\chi^2 = 67.388, 16.669; P < 0.01$)。Mortalin 的高表达与肝癌 Edmondson 分级、TNM 分期、血管侵犯和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。Western blot 和 qPCR 检测结果显示肝癌组织中 Mortalin 相对含量明显高于癌旁和正常组织 ($P < 0.05$)。免疫组织化学染色检查显示,肝癌组织中 Mortalin 的表达与 Vimentin 的表达存在正相关 ($r = 0.235, P < 0.05$),而高表达 Mortalin 的肝癌组织比

低表达的有更高的 MVD 的趋势,但差异无统计学意义 ($t = 1.630, P > 0.05$)。结论 Mortalin 不能促进肝癌血管形成,但可能通过诱导肝癌组织的 EMT 而参与肝癌的侵袭和转移。

关键词 肝肿瘤; Mortalin; 血管生成; 上皮间质转化

中图分类号 R 341; R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)06-0795-05

热休克蛋白 75(Mortalin)是在小鼠胚胎成纤维细胞中克隆出来的一种蛋白,属于热休克蛋白 70 家族成员之一^[1]。研究^[2-6]显示,Mortalin 参与细胞生长周期调控、外界应激和肿瘤发生等多种生物学过程,且在多种恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的转移关系密切。该研究选取 100 例原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者的癌组织和癌旁组织及 10 例正常肝组织,采用免疫组织化学染色技术,检测 Mortalin、波形蛋白(Vimentin)和微血管密度(microvessel density, MVD)的表达情况。同时,选取 13 例 HCC 患者冻存的癌组织和癌旁组织,行 qPCR 和 Western blot 分析,探讨 Mortalin 在 HCC 转移中的临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2007 年 6 月~2010 年 6 月在安徽医科大学附属省立医院 100 例 HCC 患者,男

2014-02-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81272398);安徽省科技攻关计划项目(编号:12010402112);安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A171)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院肝脏外科,肝胆胰外科安徽省重点实验室,合肥 230001

作者简介: 陈 静,男,硕士研究生;

李建生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: lijiansheng1953@163.com

resection of R4 alone with resection of R4 combined with R3 ramus sympathectomy in the treatment of palmar hyperhidrosis (PH). The role of the Kuntz fibers in hand sweating was further investigated. **Methods** 120 consecutive patients with severe PH were randomized into two therapeutic groups. Group A: underwent resection of R4 combined with R3 ramus sympathectomy ($n = 60$). Group B: underwent resection of R4 sympathectomy ($n = 60$). Assessment was applied to pre-operatively and 6 months postoperatively. **Results** 91 patients were followed up (51 cases in group A, 40 cases in group B) at six months postoperatively. Six months postoperatively, 1 case (1.96%) of moderate sweating hands occurred in group A, compared with 3 cases (7.5%) in group B; and there were 2 cases (3.9%) of moderate sweating hands in group A, compared with 5 cases (12.5%) in group B ($P < 0.05$). Meanwhile, 30 cases (58.82%) of compensatory sweating occurred in group A, compared with 31 cases (77.5%) in group B ($P > 0.05$). **Conclusion** The treatment of PH with thoracoscopic sympathectomy under the thoracoscopic is safe, effective with high patient satisfaction. The preventive resection of the R3 ramus based on the R4 sympathectomy improves the effect of patient's palm while not increase incidence of compensatory hyperhidrosis.

Key words palmar hyperhidrosis; thoracoscopy; sympathectomy; compensatory hyperhidrosis; Kuntz nerve

76例,女24例;年龄21~80(56.4 ± 11.4)岁。患者术前未行化疗、介入等辅助治疗,且组织经病理学确诊。选取10例因外伤行肝部分切除患者的正常肝组织作为对照;选取13例来源于我院肝胆胰外科安徽省重点实验室标本库的冷冻肝癌患者的癌组织和相应的癌旁组织。

1.2 主要试剂和仪器 兔抗人 Mortalin 多克隆抗体和兔抗人 β -actin 抗体购于美国 Abcam 公司;鼠抗人 CD34 多克隆抗体、鼠抗人 Vimentin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的通用型二抗和 DAB 试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司;蛋白提取试剂盒购于中国 KeyGEN 公司;TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司;ECL 显影试剂盒购于美国 Pierce 公司;PVDF 膜购于美国 Millipore 公司;逆转录试剂盒购于美国 Thermo 公司;实时定量 PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司。

1.3 免疫组织化学染色检测 常规行石蜡切片,厚2 μ m。首先,每张片子行 HE 染色;然后,免疫组化染色按试剂说明书行 SP 二步法染色。光镜下计数和拍照。细胞质中出现黄色颗粒为 Mortalin 阳性表达;Vimentin 蛋白主要表达在肝癌细胞周围的间质细胞中,发生 EMT 后部分肝癌细胞胞质中出现黄色为 Vimentin 阳性表达。染色评估使用半定量计数法^[7]:光镜100倍下检查组织染色强度(0:无;1:弱;2:中;3:强),然后400倍下检查肿瘤细胞阳性染色比例(0:<5%;1:5%~25%;2:26%~50%;3:51%~75%;4:>75%)。把这两项得分相乘得出最后的评分。 ≥ 4 分为高表达;<4分为低表达。通过抗 CD34 抗体染色血管上皮细胞,低倍镜下找到血管最密集的地方,然后200倍下计数 MVD^[8]。

1.4 Western blot 检测 按照蛋白提取试剂盒的说明书,制备蛋白标本,BCA 法测蛋白浓度。取20 μ l 样品上样,使用 SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,半干式电转膜仪转移蛋白至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭,Mortalin 一抗孵育过夜, β -actin 二抗室温孵育2 h。ECL 显影和定影。Mortalin 蛋白大小为74 ku; β -actin 蛋白大小为43 ku。Mortalin 相对含量 = Mortalin 灰度值/ β -actin 灰度值。

1.5 qPCR 检测 根据 TRIzol 使用说明书,提取 RNA。采用吸光度比值 OD_{260}/OD_{280} 测 RNA 纯度和浓度。使用逆转录试剂盒合成 cDNA。Mortalin 的引物序列:正向 5'-GAGAGACAGGGGTTGATTTGAC-

3',反向 5'-GCACAGATGAGGAGAGTTTACA-3';内参(GAPDH)引物序列:正向 5'-AAGGTCATCCCTGAGCTGAAC-3',反向 5'-ACGCCTGCTTACCACCTTCT-3'。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 s;60 $^{\circ}$ C 30 s 40 个循环。Mortalin 基因扩增产物大小为 96 bp;GAPDH 基因扩增产物大小为 142 bp。基因扩增产物的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,率的比较采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法,组间均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 Mortalin 在肝癌、癌旁和正常组织中的相对表达量 qPCR 法检测结果显示,Mortalin mRNA 在肝癌、癌旁和正常组织中相对表达量为 2.18 ± 0.31 、 0.35 ± 0.14 和 0.13 ± 0.05 。肝癌组织中的 Mortalin 相对表达量明显高于癌旁和正常组织($t = 15.72, P < 0.05$; $t = 20.75, P < 0.05$)。Western blot 法分析显示,Mortalin 蛋白在肝癌、癌旁和正常组织中相对表达量为 2.58 ± 0.21 、 0.22 ± 0.09 和 0.05 ± 0.02 。肝癌组织中的 Mortalin 相对表达量明显高于癌旁和正常组织($t = 39.35, P < 0.05$; $t = 61.73, P < 0.05$)。见图1。

2.2 不同肝脏组织中各蛋白表达情况 在100例标本中,有77例肝癌组织和19例癌旁组织 Mortalin 蛋白呈高表达;10例正常肝组织中仅1例 Mortalin 蛋白呈高表达;肝癌组织中有52例 Vimentin 蛋白呈高表达;CD34 主要在血管上皮细胞表达。统计结果显示,肝癌组织中高表达 Mortalin 的比率为77% (77/100) 显著高于癌旁组织19% (19/100) 和正常组织10% (1/10) ($\chi^2 = 67.388, P < 0.01$; $\chi^2 = 16.669, P < 0.01$)。见图2。

2.3 肝癌组织中 Mortalin 的表达与患者临床病理特征的关系 Mortalin 的高表达与肝癌的 Edmondson 分级、TNM 分期和肿瘤转移相关,而与性别、年龄、肿瘤大小和甲胎蛋白(AFP)水平等无关。Mortalin 在低分化的肝癌(III+IV)中的表达明显高于中高分化的肝癌(I+II) ($\chi^2 = 4.272, P = 0.039$);Mortalin 在 TNM I+II 期中的表达显著低于在 III+IV 期中的表达 ($\chi^2 = 8.188, P = 0.004$)。见图3。Mortalin 在有淋巴结转移和血管侵犯中的表达显著高于无侵袭转移中的表达 ($P < 0.05$)。见表1。

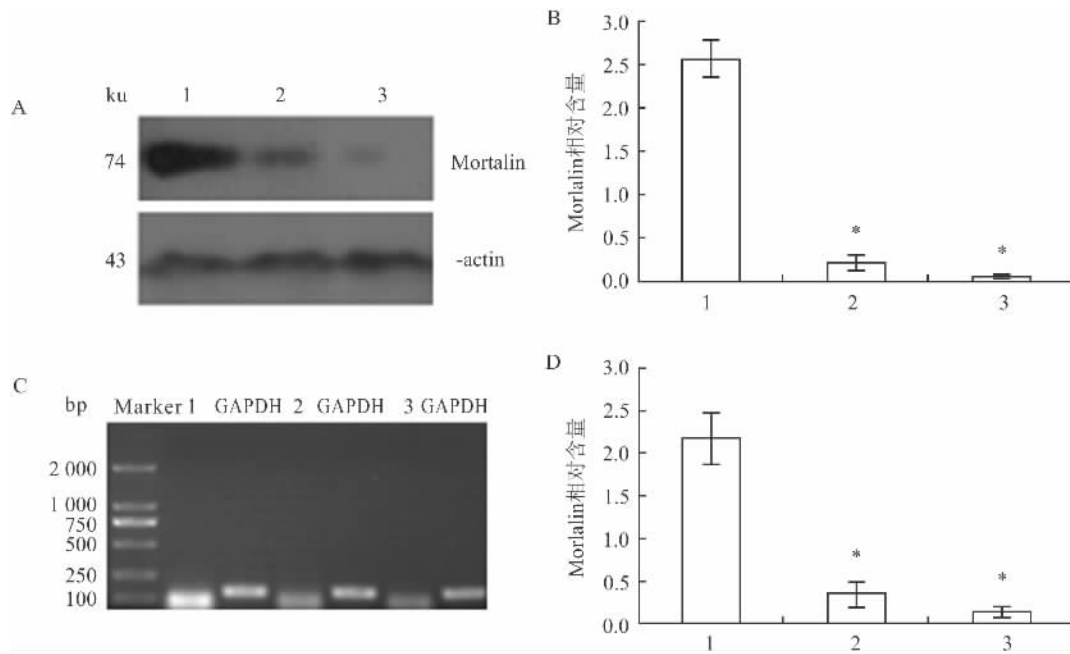


图1 癌和癌旁及正常肝组织中 Mortalin 的表达情况

1: 癌组织; 2: 癌旁组织; 3: 正常肝组织; A: Western blot 法检测 Mortalin 蛋白的表达; B: Mortalin 蛋白的相对表达量; C: qPCR 法检测 Mortalin mRNA 的表达; D: Mortalin mRNA 的相对表达量; 与癌组织比较: * $P < 0.05$

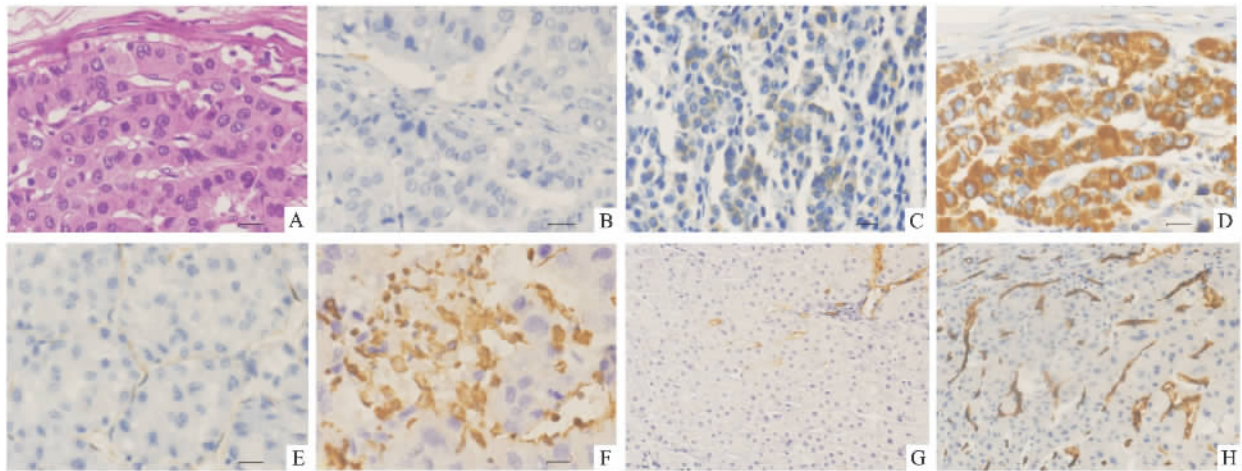


图2 癌组织 HE 染色和免疫组织化学染色

A: 癌组织 HE 染色 $\times 400$; B: 癌组织中 Mortalin 呈阴性表达 $\times 400$; C: 癌组织中 Mortalin 呈低表达 $\times 400$; D: 癌组织中 Mortalin 呈高表达 $\times 400$; E: 癌组织中 Vimentin 呈低表达 $\times 400$; F: 癌组织中 Vimentin 呈高表达 $\times 400$; G: 癌组织中 MVD 呈低表达 $\times 200$; H: 癌组织中 MVD 呈高表达 $\times 200$

2.4 肝癌组织中 Mortalin、Vimentin 和 MVD 的表达 免疫组织化学染色检查显示,肝癌组织中高表达 Vimentin 的比率为 52% (52/100)。相关性分析显示,肝癌组织中 Mortalin 的表达与 Vimentin 的表达存在正相关 ($r = 0.235$, $P = 0.018$)。通过使用 CD34 抗体染色血管发现,高表达 Mortalin 的肝癌组织有更高的 MVD 的趋势,但差异无统计学意义 (39.4 ± 42.5 vs 29.7 ± 16.9 , $t = 1.630$, $P =$

0.106)。

3 讨论

肝癌是我国较常见的恶性肿瘤之一,肝癌根治术后患者 5 年生存率为 35%,10 年生存率仅为 7.2%。肿瘤侵袭和转移是影响其生存率的主要因素^[9]。在肿瘤侵袭和转移的过程中,血管形成和 EMT 扮演着重要的作用。肝癌是富血管性肿瘤,且

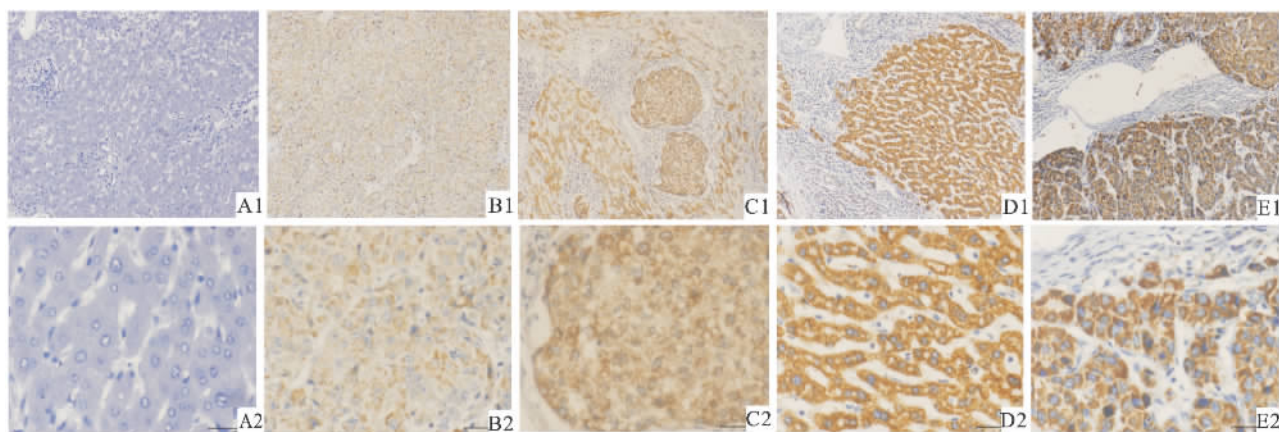


图3 Mortalin 蛋白在正常肝组织和不同临床分期的癌组织中的表达

A: 正常肝组织; B: 肝癌 I 期; C: 肝癌 II 期; D: 肝癌 III 期; E: 肝癌 IV 期; 1: $\times 100$; 2: $\times 400$

表1 癌组织中 Mortalin 的表达与临床病理因素之间的关系

项目	例数	Mortalin 表达		χ^2 值	P 值
		低	高		
年龄 (岁)					
≤55	28	3	25	2.421	0.210
>55	72	20	52		
性别					
男	76	19	57	0.322	0.570
女	24	4	20		
肿瘤大小 (cm)					
≤5	38	5	33	3.352	0.067
>5	62	18	44		
肿瘤结节					
单个	68	18	50	0.898	0.343
多个	32	5	27		
肿瘤包膜					
完整	70	13	57	2.584	0.108
不完整	30	10	20		
AFP (ng/ml)					
≤400	31	7	24	0.004	0.947
>400	69	16	53		
ICGR15 (%)					
≤10	79	17	62	1.697	0.193
>10	21	6	15		
HBsAg					
阳性	84	20	64	0.014	0.907
阴性	16	3	13		
肝硬化					
有	87	21	66	0.004	0.951
无	11	2	9		
Child-Pugh 分级					
A	79	15	64	3.420	0.064
B	21	8	13		
Edmondson 分级					
I ~ II	67	20	47	4.272	0.039
III ~ IV	33	3	30		
TNM 分期					
I ~ II	64	21	43	8.188	0.004
III ~ IV	36	2	34		
血管侵犯					
无	61	19	42	4.742	0.029
有	39	4	35		
淋巴结转移					
有	27	10	17	4.115	0.043
无	73	13	60		

微血管生长增加,肿瘤细胞得以不断的增殖和转移,通过抗 CD34 抗体使血管上皮着色,计算 MVD^[10];在 EMT 过程中,上皮细胞极性的丧失和间质特征的获得为主要特点。上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达降低,使得细胞之间的连接减弱而间质细胞标志物 Vimentin 的表达升高,导致肿瘤细胞更容易发生转移^[11-12]。

Xie et al^[13]发现,在髓细胞性白血病中高表达的 Mortalin 被看作是一个潜在的治疗靶点。Dundas et al^[14]研究结直肠癌发现 Mortalin 的高表达与患者预后不良关系密切。Yi et al^[15]发现肝癌术后早期复发较无复发患者 Mortalin 的表达是增高的。由临床病理资料分析得出,肝癌中 Mortalin 的高表达与肿瘤的 TNM 分期及静脉浸润密切相关,但是 Mortalin 是否参与肝癌及其 EMT 的发生、发展,国内外鲜有报道。

为研究 Mortalin 的表达和肿瘤转移之间的关系,首先通过免疫组织化学染色研究 10 例正常组织及 100 例肝癌和癌旁组织发现较其他组织,肝癌组织中 Mortalin 显著高表达,且 Mortalin 的表达水平与肿瘤 Edmondson 分级、TNM 分期和肿瘤转移关系紧密。然后对 100 例肝癌组织进行 Mortalin、Vimentin 和 MVD 相关性分析,发现肝癌组织中 Mortalin 的表达与 Vimentin 的表达有相关性,而高表达 Mortalin 的肝癌组织有更高的 MVD 的趋势,由此说明 Mortalin 不能促进肝癌血管形成,而在肝癌 EMT 的过程中起到促进作用和对肝癌的侵袭和转移有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Wadhwa R, Kaul S C, Ikawa Y, et al. Identification of a novel

- member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(9): 6615–21.
- [2] Wadhwa R, Takano S, Robert M, et al. Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(45): 29586–91.
- [3] Kaula S C, Reddel R R, Sugiharac T, et al. Inactivation of p53 and life span extension of human diploid fibroblasts by mot-2 [J]. *FEBS Lett*, 2000, 474(2–3): 159–64.
- [4] Liu Y, Liu W, Song X D, et al. Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, 268(1–2): 45–51.
- [5] Ma Z, Izumi H, Kanai M, et al. Mortalin controls centrosome duplication *via* modulating centrosomal localization of p53 [J]. *Oncogene*, 2006, 25(39): 5377–90.
- [6] Lu W J, Lee N P, Kaul S C, et al. Mortalin-p53 interaction in cancer cells is stress dependent and constitutes a selective target for cancer therapy [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(6): 1046–56.
- [7] Chen M H, Yip G W, Tse G M, et al. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(10): 1183–91.
- [8] Weidner N, Semple J P, Welch W R, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1–8.
- [9] 陈静, 李建生, 许戈良, 等. 蛋白质组学与肝细胞癌转移复发预测的研究进展 [J]. *国际外科学杂志*, 2013, 40(5): 322–7.
- [10] Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry [J]. *Liver*, 1998, 18(1): 14–9.
- [11] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442–54.
- [12] Christiansen J J, Rajasekaran A K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8319–26.
- [13] Xie H, Hu Z, Chyna B, et al. Human mortalin (HSPA9): a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on 5q31 [J]. *Leukemia*, 2000, 14(12): 2128–34.
- [14] Dundas S R, Lawrie L C, Rooney P H, et al. Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival [J]. *J Pathol*, 2005, 205(1): 74–81.
- [15] Yi X, Luk J M, Lee N P, et al. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(2): 315–25.

Expression of Mortalin in hepatocellular carcinoma and its relationship with angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition

Chen Jing, Li Jiansheng, Liu Wenbin, et al

(Dept of Hepatic Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To detect the expression of Heat shock protein 75 (Mortalin) in hepatocellular carcinoma (HCC) and explore its relationship with angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** A hundred cases of HCC tumor and paracarcinomatous tissues, and ten cases of normal liver tissues were collected. The expression of Mortalin and relationship between Mortalin and clinicopathological characteristics of HCC were detected and analyzed using immunohistochemistry, Western blot and qPCR. The expressions of Mortalin, Vimentin and microvessel density (MVD) in 100 HCC tumor tissues were detected by immunohistochemistry, and then the relationship was judged between the expression of Mortalin, EMT and angiogenesis. **Results** Immunohistochemistry showed that Mortalin mainly expressed in the cytoplasm. The high expression rate of Mortalin in HCC tumor tissues was 77%, which was remarkably higher than that in paracarcinomatous tissues (19%) and normal liver tissues (10%) ($\chi^2 = 67.388, 16.669; P < 0.01$). The high expression of Mortalin in HCC was correlated with Edmondson grade, TNM stage, vascular invasion and lymph node metastasis ($P < 0.05$). Western blot and qPCR analysis showed that relative content of Mortalin in HCC was significantly higher than that in paracarcinomatous and normal tissues ($P < 0.05$). A significant positive correlation was found between the expression of Mortalin and Vimentin ($r = 0.235, P < 0.05$), but the high expression of Mortalin group had a tendency to higher MVD than that in low expression of Mortalin group ($t = 1.630, P > 0.05$). **Conclusion** The high expression of Mortalin can not promote angiogenesis, but may accelerate invasion and metastasis of HCC through inducing EMT.

Key words liver neoplasms; Mortalin; angiogenesis; EMT