

肝癌组织中复制蛋白 A1 的表达及其意义

王肖泽¹, 田学军¹, 蒙轩²

1. 清华大学玉泉医院普外科, 北京 100040; 2. 中国人民解放军总医院肝胆外科, 北京 100853

摘要: **目的** 研究探讨肝癌组织中复制蛋白 A1 (RPA1) 的表达变化及其临床意义。**方法** 选择 2015 年 1 月至 2018 年 5 月就诊的 82 例肝癌患者为研究对象, 采集肝癌患者的肝癌组织、癌旁正常组织, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)、蛋白质印迹法 (Western blot) 对肝癌组织、癌旁组织中的 RPA1 mRNA 及蛋白表达水平进行检测。比较肝癌组织与癌旁组织的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平。比较乙肝表面抗原阳性与阴性患者、淋巴结转移与无转移患者、不同肿瘤 TNM 分期患者、不同病理分化程度患者肝癌组织的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平, 并分析 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平与肝癌患者临床病理特征的相关性。**结果** (1) 肝癌与 RPA1: 肝癌患者肝癌组织的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。 (2) 肝癌临床病理特征与 RPA1: 淋巴结转移患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于无淋巴结转移患者 ($P < 0.01$); TNM III ~ IV 期患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于 TNM I ~ II 期患者 ($P < 0.01$); 肿瘤低分化患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于肿瘤中高分化患者 ($P < 0.01$)。相关性分析发现, RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平与肝癌患者的淋巴结转移、肿瘤分期呈正相关, 与病理分化程度呈负相关 ($P < 0.05$), 而与乙肝表面抗原阳性之间无相关性 ($P > 0.05$)。**结论** RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平在肝癌组织中普遍处于增高状态, 其表达水平与淋巴结转移、肿瘤分期、病理分化程度等临床病理特征存在紧密联系, 临床上可将 RPA1 作为肝癌早期诊断、疗效评估及预后预测的辅助标志物。

关键词: 复制蛋白 A1; 肝癌; 诊断; 淋巴结转移; 肿瘤分期; 分化程度

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)02-0229-03

RPA1 expression in hepatocellular carcinoma and its significance

WANG Xiao-ze*, TIAN Xue-jun, MENG Xuan

* Department of General Surgery, Yuquan Hospital of Tsinghua University, Beijing 100040, China

Corresponding Author: MENG Xuan, E-mail: wangxiaozg2@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the expression of replication protein A1 (RPA1) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue and its clinical significance. **Methods** Eighty-two patients with hepatocellular carcinoma from January 2015 to May 2018 were selected as study subjects, in whom liver cancer tissues and adjacent normal tissues were collected. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect RPA1 mRNA and protein expressions in hepatocellular carcinoma and para-cancerous tissues. The expression levels of RPA1 mRNA and RPA1 protein in hepatocellular carcinoma and adjacent tissues were compared. The expression levels of RPA1 mRNA and RPA1 protein in hepatocellular carcinoma tissues were compared in the patients with positive or negative hepatitis B surface antigen (HBsAg), with lymph node metastasis and non-metastasis, with different TNM stages and with different pathological differentiation. The correlation between the expressions of RPA1 mRNA and RPA1 protein and the clinicopathological features of HCC was analyzed. **Results** (1) The expression levels of RPA1 mRNA and RPA1 protein in HCC tissues were significantly higher than those in adjacent tissues ($P < 0.05$). (2) The expression levels of RPA1 mRNA and RPA1 protein in patients with lymph node metastasis and poorly differentiation and at TNM III-IV stage were respectively higher than those in patients without lymph node metastasis, with high differentiation and at TNM stage I-II ($P < 0.05$). The correlation analysis showed that the expression levels of RPA1 mRNA and RPA1 protein were positively correlated with lymph node metastasis and tumor stage and negatively correlated with the degree of pathological differentiation ($P < 0.05$), and there was no linear correlation between them and positive HBsAg ($P > 0.05$). **Conclusions** RPA1 mRNA and RPA1

protein expression levels generally increase in HCC tissues and are closely related to lymph node metastasis, tumor stage, pathological differentiation and so on. PRA1 can be used as an auxiliary marker for early diagnosis, evaluation of curative effect and prognosis of HCC.

Key words: Replication protein A1; Hepatocellular carcinoma; Diagnosis; Lymph node metastasis; Tumor stage; Differentiation degree

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81502376)

肝癌是一种常见的恶性肿瘤,具有较高的发病率、死亡率,临床上需对肝癌予以积极治疗^[1-3]。目前,临床上关于肝癌的发病机制尚未完全明确,推测可能与多种蛋白、基因有关。复制蛋白 A1(RPA1)是一种真核细胞单链 DNA 结合蛋白,在肿瘤组织中呈高表达,推测其可能参与到肿瘤的发生及发展过程中^[4],本研究旨在探讨肝癌组织中 RPA1 的表达水平及其临床意义,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 1 月至 2018 年 5 月就诊的 82 例肝癌患者为研究对象,其中男性 47 例,女性 35 例,年龄 39 ~ 77 (58.09 ± 17.81) 岁;乙肝表面抗原阳性 45 例,阴性 37 例;31 例患者发生淋巴结转移,其余 51 例未发生淋巴结转移;肿瘤分期为 I ~ II 期 53 例,III ~ IV 期 29 例;病理分化程度为低分化 34 例,中高分化 48 例。本研究获伦理学委员会批准,且患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 法检测 RPA1 mRNA 对患者进行肝区穿刺,采集肝癌组织、癌旁正常组织,利用总 RNA 提取试剂盒完成总 RNA 提取,并用紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。应用 Primer 5.0 软件设计引物,由上海生工生物有限公司合成 cDNA。引物序列如下。RPA1:上游 5'-AAG TGG AGA CCT ACA ACG AC-3';下游 5'-ACA ACC ACC TGA GCG TAT-3';扩增产物为 312 bp。β-actin:上游 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3';下游 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3';扩增产物为 285 bp。以 cDNA 为模板,RPA1、β-actin 两种引物分别进行 PCR 反应;经凝胶成像仪成像,用 Image J 图像分析软件进行半定量分析。

1.2.2 Western blot 法检测 RPA1 蛋白 对患者进行肝区穿刺,取肝癌组织提取总蛋白,按照 BCA 试剂盒(碧云天生物技术研究提供)说明测定蛋白的含量,通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将蛋白转膜,封闭,一抗孵育;最后进行显色,取出条带晾干,照相。将胶片进行扫描或拍照,Image J 图像处理系统分析

目的条带的灰度值。

1.3 观察指标 (1)比较肝癌组织与癌旁组织的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平。(2)比较不同临床病理特征患者(乙肝表面抗原阳性与阴性、淋巴结转移与无淋巴结转移、TNM I ~ II 期与 TNM III ~ IV 期、低分化与中高分化)肝癌组织的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌患者肝癌组织与癌旁组织的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 肝癌患者肝癌组织的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 乙肝表面抗原阳性与阴性肝癌患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 乙肝表面抗原阳性患者与乙肝表面抗原阴性患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 淋巴结转移与无转移肝癌患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 淋巴结转移患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于无淋巴结转移患者 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 不同肿瘤分期肝癌患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 TNM III ~ IV 期患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于 TNM I ~ II 期患者 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 不同病理分化程度肝癌患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 肿瘤低分化患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于肿瘤中高分化患者 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 1 肝癌患者肝癌组织与癌旁组织 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

检测位置	例数	RPA1 mRNA 灰度比值	RPA1 蛋白灰度比值
癌旁组织	82	0.437 ± 0.141	0.721 ± 0.127
肝癌组织	82	0.623 ± 0.159	0.874 ± 0.153
<i>t</i> 值		7.926	6.968
<i>P</i> 值		0.000	0.000

表 2 乙肝表面抗原阳性与阴性肝癌患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	RPA1 mRNA 灰度比值	RPA1 蛋白灰度比值
乙肝表面抗原阴性	37	0.619 ± 0.108	0.867 ± 0.119
乙肝表面抗原阳性	45	0.627 ± 0.104	0.881 ± 0.123
t 值		0.341	0.520
P 值		0.734	0.604

表 3 淋巴结转移与无转移肝癌患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	RPA1 mRNA 灰度比值	RPA1 蛋白灰度比值
无淋巴结转移	51	0.598 ± 0.040	0.853 ± 0.042
淋巴结转移	31	0.651 ± 0.054	0.904 ± 0.051
t 值		5.086	4.913
P 值		0.000	0.000

表 4 不同肿瘤分期肝癌患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	RPA1 mRNA 灰度比值	RPA1 蛋白灰度比值
TNM I ~ II 期	53	0.592 ± 0.042	0.858 ± 0.036
TNM III ~ IV 期	29	0.656 ± 0.063	0.897 ± 0.042
t 值		5.502	4.419
P 值		0.000	0.000

表 5 不同病理分化程度肝癌患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	RPA1 mRNA 灰度比值	RPA1 蛋白灰度比值
低分化	34	0.645 ± 0.046	0.902 ± 0.058
中高分化	48	0.601 ± 0.039	0.847 ± 0.043
t 值		4.670	4.933
P 值		0.000	0.000

3 讨论

肝癌是一种由多种因素导致的肝脏恶性病变,患者肝功能出现严重障碍,其肝细胞生长不再受到正常机体生理机制的调节,会持续性的对机体内正常组织和器官予以破坏,导致患者身体机能迅速衰弱,致死率较高^[5-8]。临床上主张对肝癌实施早期诊断和治疗,而由于肝癌早期阶段缺乏典型临床症状,大多数患者在确诊时已经处于中晚期阶段,易出现肝内转移而致死亡^[9-11],故临床上需对肝癌予以深入研究。现阶段,对于肝癌的发病机制尚未完全明确,推测肝癌的发生与多种蛋白和基因有关。RPA1 是一种真核细胞单链 DNA 结合蛋白,在 DNA 代谢中发挥作用,可对 DNA 复制、重组以及损伤修复过程起到调节作用。RPA1 是 RPA 的一种亚型,其含有 4 个 DNA 结合结构域,其 DNA 结合结构 A 域、DNA 结合结构 B 域的 DNA 结合活性相对更强。有研究指出,RPA 在恶性肿瘤组织中的表达出现上调,推测其可能参与到恶性肿瘤的发生及发展过程中^[12-13]。

目前,国内关于肿瘤与 RPA1 的研究报道较少见,而肝癌与 RPA1 的研究报道更是极其少见,本研

究对 82 例肝癌患者进行研究后发现,肝癌患者肝癌组织的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于癌旁组织;淋巴结转移患者的 RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平均高于无淋巴结转移患者,TNM III ~ IV 期患者表达水平高于 TNM I ~ II 期患者,肿瘤低分化患者表达水平高于肿瘤中高分化患者。以上研究结果证实,RPA1 在肝癌患者肿瘤组织中呈高水平表达,推测 RPA1 可能参与到肝癌的发生、发展过程中,可将 RPA1 作为肝癌临床诊治的参考标志物。

综上所述,RPA1 mRNA、RPA1 蛋白表达水平在肝癌患者肝癌组织中普遍处于增高状态,与肝癌患者的淋巴结转移、肿瘤分期有关,与病理分化程度无关,故临床上可将 RPA1 作为肝癌早期诊断、疗效评估及预后预测的辅助标志物。

参考文献

- [1] 胡兰英,张素芬,李巍. 肿瘤标志物联合检测在肝癌诊断中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(17):2587-2589.
- [2] 丁才智,任力,李剑峰,等. 肝癌患者血清中肿瘤标志物含量检测及其与肝癌组织中凋亡分子、免疫分子的关系[J]. 海南医学院学报,2015,21(5):607-610.
- [3] 王述莲,呼建民,何光伦,等. 血清肿瘤标志物联合血常规指标检测在原发性肝癌诊断中的应用研究[J]. 标记免疫分析与临床,2017,24(1):4-7.
- [4] 羊文芳,郑文雯,苏显都,等. 肿瘤标志物在肝癌患者血清中的表达及其诊断价值[J]. 解放军医学院学报,2016,37(9):976-979,1000.
- [5] 张光林,王旭东,占红,等. 肝癌组织 RPA1 的表达变化及意义[J]. 山东医药,2015,55(9):34-36.
- [6] 张光林,占红,王旭东,等. RPA1 在肝癌组织中的表达及临床意义的研究[J]. 临床和实验医学杂志,2015,14(4):270-274.
- [7] 龚由之,曾智,江应安. CYP39A1 基因在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2016,25(8):865-867.
- [8] 夏芊,陈永亮,张荣强,等. Survivin 及 Anx-A1 在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. 现代生物医学进展,2016,16(26):5055.
- [9] 黄东风,黄介飞,黄晓平,等. TRAI mRNA 在肝硬化及肝癌组织中表达的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2014,23(2):166-169.
- [10] 周正君,王晓怡,陈二宝,等. 原发性肝细胞肝癌中核不均一核糖核蛋白 A1 的定位及临床意义[J]. 中国临床医学,2016,23(6):720-724.
- [11] 柯瑞盛,李佳妍,蔡秋程,等. 核不均一核糖核蛋白 A1 的表达与肝癌肝移植患者肿瘤发生与转移的关系[J]. 中华肝胆外科杂志,2017,23(10):663-668.
- [12] 廖倩,杨筱筠,仇小强. 肝癌组织长链非编码 RNA RP13-143G15.3 表达临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志,2017,24(12):829-834.
- [13] 瞿兵. CYP27A1 基因表达与肝癌临床表型和预后的相关性[J]. 内科急危重症杂志,2017,23(2):124-126.