

# HuR 和 HIF-1 $\alpha$ 在肝癌组织中的表达 及其与患者的预后的关系

雷达, 李永利, 祁军安

宝鸡市中心医院肝胆胰脾外科, 陕西 宝鸡 721008

**摘要: 目的** 探讨 RNA 结合蛋白人抗原 R(HuR)和转录因子缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )在肝癌组织中的表达及其与患者预后的关系。**方法** 收集 55 例行肝癌手术切除后保存完好的肝癌组织和癌旁组织蜡块,同时选取 20 例正常人的肝脏组织作为正常对照,采用免疫组化染色法检测不同组织中 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达阳性率,采用 Spearman 相关分析研究肝癌组织中 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的相关关系,采用 Kaplan-Meier 法生存分析肝癌组织 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达与患者预后的关系。**结果** 肝癌组织、癌旁组织和正常肝组织中 HuR 蛋白的阳性表达率分别为 67.27%、20.0%和 5.0%,3 种组织中 HuR 蛋白阳性表达率的差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );肝癌组织、癌旁组织和正常肝组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白的阳性表达率分别为 58.18%、12.73%和 10.0%,肝癌组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白阳性表达率高于癌旁组织和正常肝组织,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。经 Spearman 相关分析,肝癌组织 HuR 蛋白表达与 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达呈正相关( $r_s = 0.508, P < 0.01$ );Log-rank 检验表明,HuR 蛋白表达阳性的肝癌患者的 5 年随访中位无瘤生存期为 27 个月,显著低于 HuR 蛋白表达阴性患者的 32 个月( $\log\text{-rank} = 19.350, P < 0.01$ );HIF-1 $\alpha$  蛋白表达阳性的肝癌患者的 5 年随访中位无瘤生存期为 28 个月,显著低于 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达阴性患者的 37 个月( $\log\text{-rank} = 26.556, P < 0.01$ )。**结论** 肝癌组织中 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  表达率异常增高,两者在肝癌组织中的表达呈正相关,且与患者的无瘤生存时间密切相关。

**关键词:** 原发性肝癌; 人抗原 R; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 无瘤生存期; 预后; 相关性

**中图分类号:** R 735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)09-1160-04

## Expressions of HuR and HIF-1 $\alpha$ in hepatocellular carcinoma tissues and their association with prognosis of patients

LEI Da, LI Yong-li, QI Jun-an

Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Splenic Surgery, Baoji Central Hospital of Shanxi Province, Baoji, Shanxi 721008, China

Corresponding author: LI Yong-li, E-mail: 35174426@qq.com

**Abstract: Objective** To observe the expressions of human antigen R(HuR, a member of RNA binding protein) and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ , a transcription factor) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and their association with the prognosis of patients. **Methods** The well-preserved wax block samples of HCC tissues and para-carcinoma tissues after surgical resection from 55 cases of HCC were collected, and the liver tissues samples from 20 normal subjects were selected as controls. Immunohistochemical staining method was used to detect the positive expression rates of HuR and HIF-1 $\alpha$  proteins in different tissues. Spearman correlation analysis was used to analyze the relationship between the HuR and HIF-1 $\alpha$  proteins expressions in HCC tissues. Kaplan-Meier survival analysis was used to analyze the correlation of expressions of HuR and HIF-1 $\alpha$  proteins in HCC tissues with the patients' prognosis. **Results** There were significant differences in positive expression rates of HuR protein in carcinoma tissues, para-carcinoma tissues and normal liver tissues(67.27%, 20.00%, 5.00%;  $P < 0.01$ ). There were significant differences in positive expression rates of HIF-1 $\alpha$  protein in carcinoma tissues, para-carcinoma tissues and normal liver tissues(58.18%, 12.73%, 10.00%;  $P < 0.01$ ). Spearman correlation analysis showed that the expression of HIF-1 protein in HCC tissues was positively correlated with the expression of HuR protein in HCC tissues ( $r_s = 0.508, P < 0.01$ ). Log-rank test showed that the median tumor-free survival time in follow-up

of 5 years in HCC patients with positive HuR protein expression was significant lower than that in patients with negative HuR protein expression(27 months *vs* 32 months, Log-rank = 19.350,  $P < 0.01$ ); the median tumor-free survival time in follow-up of 5 years in HCC patients with positive HIF-1 $\alpha$  protein expression was significant lower than that in patients with negative HIF-1 $\alpha$  protein expression(28 months *vs* 37 months, log-rank = 26.556,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression rates of HuR protein and HIF-1 $\alpha$  protein in HCC tissues increase significantly, and the expressions of HuR and HIF-1 $\alpha$  proteins present positive correlation and are all closely correlated with patients' tumor-free survival time.

**Key words:** Primary hepatocellular carcinoma; Human antigen R; Hypoxia inducible factor 1; Tumor-free survival time; Prognosis; Correlation

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是我国常见的恶性肿瘤之一,我国 PHC 患者年龄为 40~50 岁,男性较多。其病因和发病机制尚未确定,目前认为与肝硬化、病毒性肝炎以及黄曲霉素等化学致癌物质和环境因素有关。根治性手术或姑息性手术是目前治疗 PHC 的主要方式,而早期的临床诊断有利于提高 PHC 患者肿瘤病灶的完全切除率,改善预后<sup>[1]</sup>。但目前肝癌患者根治性手术术后的中位生存时间仍不足 34 个月,且术后 5 年生存率不足 34%,临床治疗存在一定的局限性<sup>[2]</sup>。

肿瘤生物学信号分子或蛋白通过影响细胞周期的调控、细胞分化以及凋亡等参与肿瘤的发生、发展。作为转录因子的缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )能够调控一系列靶基因的表达,参与细胞增殖调控以及细胞凋亡,而 RNA 结合蛋白人抗原 R(HuR)在调节细胞的生长、分化、信号转导、转录和翻译等生理生化过程中发挥重要作用<sup>[3,4]</sup>。本研究探讨 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  在 PHC 组织中的表达及与患者预后的关系,为进一步揭示 PHC 的发病机制以及术后的预后评估提供新的参考。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 55 例在本院行 PHC 手术切除后保存完好的癌组织及癌旁组织蜡块。入选标准:术后经组织病理学确诊的 PHC 患者,术前均没有接受过任何放化疗治疗,且收集患者标本时取得患者及其家属的同意。55 例 PHC 患者中男 43 例,女 12 例;年龄(48.63  $\pm$  10.82)岁,年龄  $\leq$  60 岁 37 例,年龄  $>$  60 岁 18 例;乙肝病毒感染后肝癌 45 例,合并肝硬化者 39 例;单个肿瘤病灶 43 例,多个肿瘤病灶 12 例;肿瘤直径  $\geq$  5 cm 35 例,  $<$  5 cm 20 例;肝功能 Child 分级 A 级 42 例, B 级 13 例;TNM 分期 I + II 期 38 例, III + IV 期 17 例;分化程度:高分化 41 例,中分化 9 例,低分化 5 例;胎儿甲种蛋白(AFP)  $\geq$  200 ng/ml 32 例, AFP  $<$  200 ng/ml 23 例。同时选取 20 例正常人的肝组织作为正常对照,其中男 14 例,女 6 例;年龄(49.17  $\pm$  10.15)岁,年龄  $\leq$  60 岁 16 例,年龄  $>$  60 岁

4 例。两组患者的年龄和性别比较差异无统计学意义( $P$  均  $>$  0.05)。

**1.2 HuR 蛋白和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达检测方法** 组织采用石蜡包埋,切片机切取组织,厚度 5 mm,用多聚赖氨酸处理。在脱蜡之前,将切片置于 60  $^{\circ}$ C 恒温箱中烘烤 60 min。将切片用二甲苯浸泡 10 min,更换二甲苯后再浸泡 10 min。水化后进行抗原修复,3%  $H_2O_2$  - 甲醇溶液处理切片 15 min,加入一抗 HuR 蛋白、HIF-1 $\alpha$  蛋白鼠单抗 100  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C,湿盒孵育 1 h。加入增强剂 50  $\mu$ l,室温湿盒孵育 20 min。加入 HRP 标记二抗 50  $\mu$ l,室温 37  $^{\circ}$ C,孵育 30 min。每张切片加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察。荧光显微镜 HS023-GH 购自日本 Panasonic 公司;HuR 蛋白、HIF-1 $\alpha$  蛋白抗体购自 Abcam 公司,其余配套试剂购自罗氏公司。严格按照相关说明书进行操作。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 统计软件分析数据。HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达率以百分率(%)表示,各种组织中的表达差异比较用  $\chi^2$  检验;肝癌组织中 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达率的关系用 Spearman 相关分析;用 Kaplan-Meier 法生存分析 Log-rank 检验进行不同 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达患者的无瘤生存期的差异比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PHC 组织、癌旁组织和正常肝组织中 HuR 蛋白表达比较** PHC 组织、癌旁组织和正常肝组织中 HuR 蛋白的阳性表达率分别为 67.27%、20.0% 和 5.0%,3 种组织中 HuR 蛋白阳性表达率差异有统计学意义( $\chi^2 = 36.924$ ,  $P < 0.01$ )。PHC 组织胞浆和胞核中 HuR 蛋白的表达见图 1a。

**2.2 PHC 组织、癌旁组织和正常肝组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达比较** PHC 组织、癌旁组织和正常肝组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白的阳性表达率分别为 58.18%、12.73% 和 10.0%,3 种组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白阳性表达率的差异具有统计学意义( $\chi^2 = 31.393$ ,  $P < 0.01$ )。PHC 组织胞浆和胞核中 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达见图 1b。

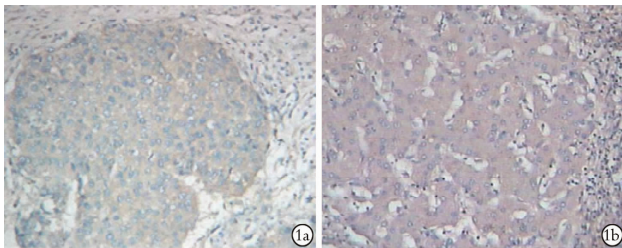
**2.3 PHC 组织 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的相关性分**

析经 Spearman 相关分析,PHC 组织 HuR 蛋白表达与 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达呈正相关( $r_s = 0.508, P < 0.01$ )。见表 1。

**2.4 PHC 组织 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达与患者预后的关系** HuR 蛋白表达阳性的 PHC 患者的 5 年随访中位无瘤生存期为 27 个月,显著低于 HuR 蛋白表达阴性的患者的 32 个月( $\log\text{-rank} = 19.350, P < 0.01$ )。见图 2a。HIF-1 $\alpha$  蛋白表达阳性的 PHC 患者的 5 年随访中位无瘤生存期为 28 个月,显著低于 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达阴性患者的 37 个月( $\log\text{-rank} = 26.556, P < 0.01$ )。见图 2b。

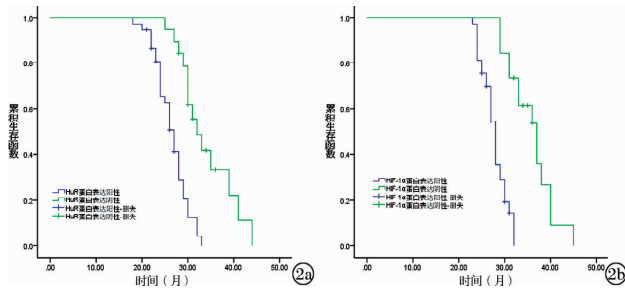
表 1 PHC 组织 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的相关性分析例(%)

HuR 蛋白表达	HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达		合计	$r_s$ 值	$P$ 值
	阳性	阴性			
阳性	28	9	37	0.508	<0.01
阴性	4	14	18		
合计	32	23	55		



注:1a:HuR 蛋白的表达;1b:HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达。

图 1 PHC 组织胞浆和胞核中 HuR、HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达(HE 染色,  $\times 200$ )



注:2a:不同 HuR 蛋白表达患者生存函数图;2b:不同 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达患者生存函数图。

图 2 不同 HuR、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的 PHC 患者生存函数图

### 3 讨论

半数以上 PHC 早期以肝区疼痛为首发症状,多为持续性钝痛、刺痛或胀痛,主要是由于肿瘤迅速生长,使肝包膜张力增加所致。位于肝右叶顶部的癌肿累及横膈,则疼痛可牵涉至右肩背部。55% 以上的 PHC 患者临床上出现典型的肝区疼痛或者反射性疼痛时,已失去手术机会,病灶的完全切除率不足

30%<sup>[5]</sup>。肝癌可沿肝内胆管系统发展,沿着肝十二指肠韧带纵径上下蔓延或向肠壁深层浸润,除经淋巴管、血流转移和局部侵犯外,还可向腹腔内种植或沿缝线、切口面扩散转移。基础研究表明,通过特异性地拮抗相关肿瘤分子信号通路以及肿瘤分化相关蛋白,可以有效地降低患者术后的复发率和肝脏以及颅内转移率,并改善肝癌细胞的分化以及淋巴结转移等临床预后指标<sup>[6-7]</sup>。近年来,在肿瘤分子免疫学发现的过程中发现,通过特异性降低靶蛋白如肿瘤相关蛋白以及转移相关翻译蛋白的表达,可以抑制肿瘤细胞增殖活性,进而有利于延长患者术后生存时间,并提高 5% 左右的术后 5 年生存率<sup>[8-9]</sup>。

转录因子 HIF-1 $\alpha$  通过影响原癌基因、编码细胞周期调节因子、细胞因子和生长因子等的表达,并通过促进基因产物如 HIF-1、环氧化酶(COX)-2、血管内皮生长因子(VEGF)、炎性因子白介素(IL)-8、IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF)等的上调,促进肿瘤细胞的早期发生发展<sup>[10-11]</sup>。相关研究表明,在卵巢癌、乳腺癌以及肺癌病灶组织中的 HIF-1 $\alpha$  以及 RNA 结合蛋白 HuR 显著异常表达,且与患者的临床预后指标如淋巴结转移以及肿瘤临床病理分期有关<sup>[12-13]</sup>。但对在肝癌组织中的分析研究缺乏。本研究探讨了 HIF-1 $\alpha$  以及 HuR 与 PHC 患者无瘤生存率的差异,对于揭示 HIF-1 $\alpha$  以及 HuR 与 PHC 患者的临床预后的关系具有重要参考价值。

本研究显示,PHC 病灶组织中的 HIF-1 $\alpha$  以及 HuR 蛋白表达阳性率均较高,明显高于癌旁及正常肝组织。组织中的 HIF-1 $\alpha$  以及 HuR 主要定位于肝脏病灶组织细胞异型性较为明显的区域,特别是细胞间质中的 HIF-1 $\alpha$  以及 HuR 表达可进一步升高,细胞质内的 HIF-1 $\alpha$  以及 HuR 表达阳性率可进一步下降。HIF-1 $\alpha$  和 HuR 在细胞质中的表达下降以及在细胞间质中的表达增高,均可促进早期肝癌细胞的增殖活性,促进肝癌的发生发展。

HuR 蛋白的表达及功能异常可能会引起多种基因产物的异常表达,从而导致组织细胞信号转导障碍及生物功能紊乱,最终引起细胞的恶变和肿瘤的发展,而在此过程中 HIF-1 $\alpha$  可能通过上调肿瘤细胞的缺氧状态、促进新生血管的形成以及影响肿瘤微环境,与 HuR 蛋白具有一定的协同作用<sup>[14-15]</sup>。本组结果显示,经 Spearman 相关分析,肝癌组织 HuR 蛋白表达与 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达呈正相关。HuR、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达阳性的肝癌患者的 5 年随访中位无瘤生存期明显低于 HIF-1 $\alpha$ 、HuR 阴性表达者,提示 HIF-1 $\alpha$  及 HuR 蛋白阳性表达的患者,可能通过影响淋巴结转

移、肿瘤细胞的分化等影响 PHC 患者的预后。本研究的不足之处在于未能分析 HIF-1 $\alpha$  以及 HuR 蛋白与 PHC 患者临床病理特征间的关系,具有一定的局限性。

综上所述,肝癌组织中 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  表达率异常增高,且与患者的无瘤生存时间密切相关。术后结合免疫组化分析病灶组织中的 HuR 和 HIF-1 $\alpha$  表达情况,可为评估患者的术后无瘤生存时间以及临床预后提供参考。

#### 参考文献

[1] 姚杨,苏杰,徐锐,等.水通道蛋白 1 与血管内皮生长因子在乙肝相关性肝癌中的表达及其意义[J].实用医学杂志,2015,31(19):3189-3192.

[2] 邓龙飞,丁晨虹,谢渭芬,等.PEP-1 介导的重组肝细胞核因子 4 $\alpha$  蛋白转导对肝癌细胞的抑制作用[J].第二军医大学学报,2015,36(9):929-935.

[3] 张勇,孟凡迪,张靖垚,等.靶向下调 Cep55 表达水平对肝癌细胞增殖能力的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2016,37(1):45-48.

[4] 颜伟,刘安文,蔡婧,等.泛素特异性蛋白酶 18 在肝癌细胞中的表达及其对生物学活性的影响研究[J].中国全科医学,2015,18(33):4077-4083.

[5] Ramirez-Tagle R, Escobar CA, Romero V, et al. Chalcone-induced apoptosis through caspase-dependent intrinsic pathways in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2):260.

[6] 肖金成,李靖,黎海亮,等.重组人血管内皮抑素介入栓塞治疗对肝癌患者血清血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶含量的影响及其临床价值[J].中国现代医学杂志,2015,25(31):70-73.

[7] He X, Qu F, Zhou F, et al. High leukocyte mtDNA content contributes to poor prognosis through ROS-mediated immunosuppression in hepatocellular carcinoma patients [J]. Oncotarget, 2016, 7(16):22834-22845.

[8] 陈军泽,覃贵慧,骆敏,等.MMP-8 在不同转移潜能人肝癌细胞株的差异化表达及其对肝癌细胞迁移侵袭的影响[J].中国药理学通报,2015,31(7):1035-1036.

[9] Sai W, Wang L, Zheng W, et al. Abnormal expression of golgi protein 73 in clinical values and their role in HBV-related hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis [J]. Hepat Mon, 2015, 15(12):e32918.

[10] 解英俊,鄂长勇,盛基尧,等.沉默 Cdc42 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J].中华外科杂志,2015,53(12):957-962.

[11] 张文广,李传飞,刘敏,等.AQP9 过表达抑制肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠皮下移植瘤的生长及其作用机制的研究[J].肿瘤,2015,35(7):723-731.

[12] Kalaiselvan A, Anand T, Gokulakrishnan K, et al. Modulatory role of shorea robusta bark on glucose-metabolizing enzymes in diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11(Supple 3):S496-S500.

[13] Zhao J, Wu J, Cai H, et al. E3 ubiquitin ligase shiah-1 is down-regulated and fails to target natural HBx truncates for degradation in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer, 2016, 7(4):418-426.

[14] 王海燕,谢丛华.血管内皮细胞钙黏蛋白和血管内皮生长因子在肝癌中的表达及其对血管内皮细胞的影响[J].中华实验外科杂志,2015,32(12):3028-3031.

[15] 李红玲,李世波,智日增.原发性肝癌患者人高迁移率族蛋白 1 及肿瘤坏死因子样凋亡诱导因子的表达[J].中华实验外科杂志,2015,32(7):1712.

收稿日期:2016-04-10 修回日期:2016-06-09 编辑:王国品

(上接第 1159 页)

[7] Tong WW, Tong GH, Chen XX, et al. HIF2 $\alpha$  is associated with poor prognosis and affects the expression levels of survivin and cyclin D1 in gastric carcinoma [J]. Int J Oncol, 2015, 46(1):33-42.

[8] Weng Y, Fei B, Chi AL, et al. Inhibition of gastric cancer cell growth in vivo by overexpression of adeno-associated virus-mediated survivin mutant C84A [J]. Oncol Res, 2013, 20(9):411-417.

[9] Cao W, Fan R, Wang L, et al. Expression and regulatory function of miRNA-34a in targeting survivin in gastric cancer cells [J]. Tumour Biol, 2013, 34(2):963-971.

[10] Li SX, Chai L, Cai ZG, et al. Expression of survivin and caspase 3 in oral squamous cell carcinoma and peritumoral tissue [J]. Asian Pac J

Cancer Prev, 2012, 13(10):5027-5031.

[11] Liarmakopoulos E, Theodoropoulos G, Vaiopoulou A, et al. Effects of stromal cell-derived factor-1 and survivin gene polymorphisms on gastric cancer risk [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(3):887-892.

[12] Sun XP, Dong X, Lin L, et al. Up-regulation of survivin by AKT and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  contributes to cisplatin resistance in gastric cancer [J]. FEBS J, 2014, 281(1):115-128.

[13] Krieg A, Baseras B, Tomczak M, et al. Role of survivin as prognostic and clinicopathological marker in gastric cancer: a meta-analysis [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(9):5501-5511.

收稿日期:2016-06-20 修回日期:2016-07-18 编辑:王国品