

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.015

· 临床研究 ·

LYRIC 在人肝癌组织中的表达及其临床意义

李琦^{1,2}, 韩涛^{2△}, 李凯¹, 李午生¹, 赵力¹, 韩雅玲³, 谢晓冬^{2▲}, 邹华伟¹(1. 中国医科大学附属盛京医院 肿瘤科, 辽宁沈阳 110086; 2. 中国人民解放军沈阳军区总医院 肿瘤科, 辽宁 沈阳 110086; 3. 中国人民解放军沈阳军区总医院 心血管病研究所, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] **目的:**检测 LYRIC 分子在肝癌和癌旁组织中的表达,探讨 LYRIC 分子与肝癌患者临床病理特征的关系及其对预后判断的指导意义。**方法:**收集 2005 年 1 月至 2013 年 12 月沈阳军区总医院和中国医科大学附属盛京医院的 87 例肝癌患者肝癌及其癌旁组织切除标本,采用 Real-time PCR 和免疫组织化学染色等方法从基因和蛋白水平检测肝癌患者的癌组织及相应的癌旁组织中 LYRIC 分子的表达,结合患者病理指标、病理分型和预后随访资料分析 LYRIC 分子表达的临床意义。**结果:**在基因水平检测发现,LYRIC 基因在 56 例肝癌组织中表达高于癌旁组织,高表达率为 64.7% (56/87);在蛋白水平检测发现,LYRIC 蛋白在 87 例肝癌组织中均表达,且在肝癌组织中的表达显著高于癌旁组织(2.16 ± 0.87 vs 1.63 ± 0.88 , $P=0.0001$)。在肝癌组织中 LYRIC 分子的高、低表达可较好地预测肝癌患者的预后情况,LYRIC 分子高表达患者预后较差($\text{Log-rank}10.236, P=0.001$);多因素分析提示,LYRIC 高表达($\text{HR}=2.19$)、转移($\text{HR}=2.44$)及肿瘤分期($\text{HR}=2.01$)是影响肝癌总体生存期的独立危险因素,而与肿瘤直径及是否有病毒感染无关。**结论:**LYRIC 分子在肝癌组织中高表达,且其表达水平与肝癌的临床分期、转移能力和临床预后密切相关,是肝癌潜在的预后判断指标。

[关键词] LYRIC;肝癌;预后

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0565-05

LYRIC in hepatocellular carcinoma: Expression and potential prognostic significance

Li Qi¹, Han Tao^{2△}, Li Kai¹, Li Wusheng¹, Zhao Li¹, Han Yaling³, Xie Xiaodong^{2▲}, Zou Huawei¹(1. Department of Oncology, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110086, Liaoning, China; 2. Department of Oncology, General Hospital of Shenyang Military Region of PLA, Shenyang 110086, Liaoning, China; 3. Institute of Cardiovascular Disease, General Hospital of Shenyang Military Region of PLA, Shenyang 110016, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the expression profile of lysine-rich CEACAM1 coisolated (LYRIC) in hepatocellular carcinoma (HCC) and matched adjacent normal liver tissue. **Methods:** Matched biopsy specimens of the tumor proper and the corresponding adjacent normal mucosa were collected from 87 HCC patients who underwent surgical resection in China Medical University-Affiliated Shengjing Hospital and General Hospital of Shenyang Military Region. LYRIC mRNA and protein in these specimens were assessed by realtime PCR and immunohistochemical staining. The potential significance of LYRIC mRNA and protein level measurements in the prognosis of HCC were evaluated by multivariate analysis. **Results:** In 56 (64.7%) of the 87 matched specimens, LYRIC mRNA was significantly higher in HCC than in the adjacent mucosa. LYRIC protein was detected in both HCC and adjacent normal tissue in all 87 cases, but the level was

[基金项目] 科技部“十二五”重大新药创制平台子课题(No. 2012ZX09303016-002);辽宁省科技攻关计划课题(No. 2012225019)。Project supported by the Grants from the National Research Key Project of the Twelfth Five-Year Plan of the Bureau of Science and Technology (No. 2012ZX09303016-002), and the Science and Technology Key Programs of Liaoning Province (No. 2012225019)

[作者简介] 李琦(1984 -),男,辽宁省大石桥市人,硕士生,主要从事肝癌标志物的筛查研究, E-mail: xiao.-163@163.com; 韩涛(1984 -),男,辽宁省阜新市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤信号转导研究, E-mail: than1984@aliyun.com。△共同第一作者

[通信作者] 邹华伟(Zou Huawei, corresponding author), E-mail: 13904019071@163.com; 谢晓冬(Xie Xiaodong, co-corresponding), E-mail: doctor_xxd@163.com。▲共同通信作者

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140928.1512.010.html>

significantly higher ($P < 0.001$) in HCC (2.16 ± 0.87) than in adjacent normal tissue (1.63 ± 0.88). Enhanced LYRIC expression was associated with poor prognosis (Log-rank $10.236, P = 0.001$). Metastasis (HR = 2.44), elevated LYRIC expression (HR = 2.19) in HCC and tumor stage (HR = 2.01) were independent risk factors of overall survival. In contrast, overall survival was not associated with tumor diameters and virus infection. **Conclusion:** LYRIC expression is significantly up-regulated in HCC as compared with normal liver tissue. Both LYRIC mRNA and protein levels in HCC are closely associated with the molecular subtype and staging of the tumor, prognosis, suggesting that LYRIC may serve as a potential prognostic factor of liver cancer.

[**Key words**] LYRIC; hepatocellular carcinoma (HCC); prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 565-569]

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC; 简称肝癌)是我国最常见的高发肿瘤之一,其发生发展是由体内多基因参与、多步骤协同作用的复杂过程^[1]。目前,尽管已经鉴定了一些肝癌相关抑癌基因,如 p53 和 p16 INK4a,并明确了它们在肝癌中的特异性失活,但是在肝癌发生中特异性激活的癌基因却少见报道^[2]。LYRIC 又称为转移黏附基因(metadherin, MTDH)或 astrocyte elevated gene-1(AEG-1)基因,于 2002 年在感染了人免疫缺陷病毒(HIV-1)的人原始胚胎星形细胞中被发现^[3]。近十年的研究^[4-7]证实,LYRIC 在多种实体肿瘤中呈现高表达,如乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌和胃癌等。LYRIC 高表达具有促进肿瘤细胞增殖、抗凋亡、促进血管生成、降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性等多方面的作用^[8],从而确立了 LYRIC 基因作为一个潜在靶点的可能性,降低 LYRIC 基因的表达能够降低肿瘤细胞发生转移的风险。但是作为重要的肿瘤癌基因,LYRIC 在肝癌发生发展中的作用报道甚少。本研究收集了大量肝癌临床样本,研究 LYRIC 与肝癌预后的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本及临床资料的收集

收集 2005 年 1 月至 2013 年 12 月间沈阳军区总医院和中国医科大学附属盛京医院的 87 例肝癌手术切除冰冻组织和石蜡标本(同时每例患者另取距癌组织 2~5 cm 处的癌旁组织标本作为对照)及患者的相关临床病理资料,其中男 44 例,女 43 例,患者中位年龄 52 岁(31~78 岁),术后病理诊断均为 HCC。患者随访 60 个月,中位生存时间 48 个月。同时对 87 例肝癌组织及其癌旁组织抽提 RNA,反转录成 cDNA,进行转录水平的分析。

1.2 主要抗体及试剂

兔抗人 LYRIC 多克隆抗体购自 CST 公司,TRIzol[®] reagent 购自 Invitrogen 公司,Syrb green 购自 QIAGEN 公司,甲醇、无水乙醇均购自上海试剂一厂。

荧光实时定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司。

1.3 Real-time PCR 检测肝癌及癌旁组织中 LYRIC mRNA 的表达

将肝癌及癌旁组织碾碎分别装在 1.5 ml Ep 管中,用 TRIzol[®] reagent 收集组织,依据试剂说明的步骤抽提 RNA 并做反转录,得到 cDNA 用于荧光定量 PCR 检测。引物由上海生工生物技术有限公司合成。LYRIC 上游引物序列:5'-CATCATGGCGTGAAGT-GTTT-3',下游引物序列:5'-CAAAGCAGCCAC-CAGAGATT-3'。以人 GAPDH 作为内参,引物的上游序列:5'-AATGAAGGGTCATTGATGG-3',下游序列:5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3'。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 10 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环,72 °C 终末延伸 10 min。以双 Ct 值法计算靶基因相对表达水平:LYRIC 相对表达水平 = $-\Delta(\Delta Ct)$; $\Delta Ct = Ct(LYRIC) - Ct(GAPDH)$; $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct - \Delta Ct(\text{Control})$ 。

1.4 免疫组织化学染色法检测 LYRIC 蛋白的表达

所有标本均行 4 mm 连续切片,石蜡包埋,应用 cyclin G1 多抗进行免疫组化 SP 法染色。具体操作步骤:石蜡切片脱蜡至水,3% 过氧化氢室温孵育 10 min,以清除内源性过氧化物酶的活性;抗原微波热修复 3 min,抗原修复液为 pH 6.0 柠檬酸缓冲液;3.5%~10% 正常山羊血清封闭非特异性位点,室温孵育 10 min;倾去血清,滴加 cyclin G1 一抗工作液,37 °C 孵育过夜;滴加生物素标记的二抗工作液,湿盒中孵育 20 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液,湿盒中孵育 20 min。上述步骤之间均用 0.01 mmol/L PBS(pH = 7.4)冲洗。DAB 染色,自来水冲洗、苏木精复染细胞核、封片。结果判定:细胞质或细胞膜呈清晰黄褐色颗粒为阳性表达,高倍镜($\times 400$)下随机观察 5 个视野,根据阳性细胞百分率和染色强度进行半定量分析,染色强度:无染色 0 分,染色弱但强于阴性对照计 1 分,染色清晰记 2 分;阳性细胞数 < 10% 计 0 分,10%~25% 计 1

分,26%~50%计2分,>50%计3分。两项指标积分之和0~1分为阴性病例(-), ≥ 2 分为阳性病例(+), ≥ 4 分为强阳性病例(++)。由两位病理科医师双盲法计数,差异超过10%需重新计数。

1.5 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件,计量资料的均数比较采用 t 检验,计数资料的生存分析采用Kaplan-Meier法,生存率的比较采用Log-rank检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。采用Cox逐步回归模型分析HCC患者预后的独立危险因素,单因素分析中对总体生存有意义的变量随后会纳入多因素分析并绘制森林图。

2 结果

2.1 LYRIC蛋白在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织

本实验首先在组织学水平上检测了87例肝癌及其癌旁组织中LYRIC蛋白的表达情况,免疫组化染色如图1所示,87例肝癌组织LYRIC染色均呈阳性着色,且LYRIC阳性表达弥漫性分布于胞质;经过病理学评分,量化其表达情况,结果显示,LYRIC染色评分在肝癌组织中的表达(2.16 ± 0.87)显著高于癌旁组织($1.63 \pm 0.88, P = 0.0001$)。

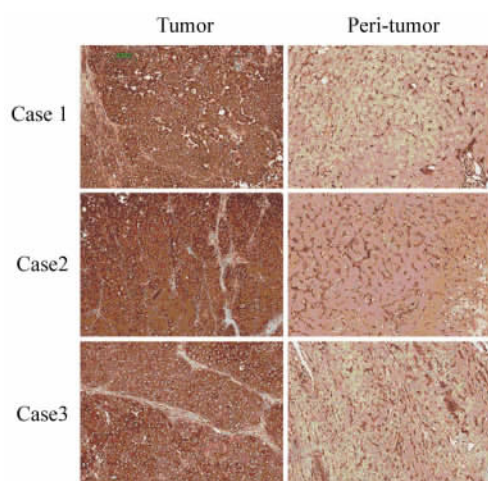


图1 肝癌及其癌旁组织中LYRIC蛋白的免疫组织化学染色结果(SP法)($\times 100$)

Fig.1 Immunohistochemical staining results of LYRIC protein expression in HCC and corresponding peri-tumor tissues (SP)($\times 100$)

2.2 LYRIC mRNA在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织

在基因水平上,收集了上述87例手术切除的肝

癌组织及其癌旁组织实验结果(图2)显示,LYRIC mRNA在56例肝癌中的表达高于癌旁组织中的表达,高表达率为64.4%(56/87)。实验提示LYRIC基因在大多数肝癌组织中表达高于癌旁组织,LYRIC基因有可能在肝癌的发生发展过程中发挥了重要作用。

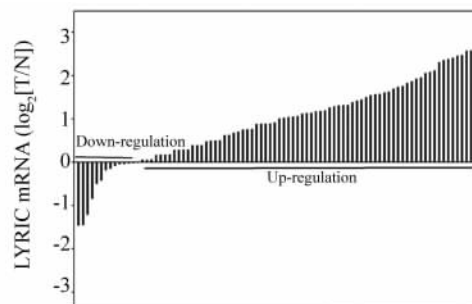


图2 Real-time PCR检测肝癌及其癌旁组织中LYRIC mRNA的相对表达

Fig.2 Relative LYRIC mRNA expression detected by real-time PCR in HCC and corresponding peri-tumor tissues

2.3 LYRIC的表达与肝癌临床病理特征的相关性

整理入组的87例肝癌患者相关临床病理资料,结合LYRIC免疫组织化学染色和评分情况进行统计学分析,以肝癌组织中LYRIC表达评分的中位数为界值,高于此界值定义为LYRIC高表达组,低于此界值定义为LYRIC低表达组。LYRIC高、低表达组的病人临床特征见表1。肝癌转移患者主要集中在LYRIC高表达组,其转移患者占转移患者总数的88%(22/25),而在LYRIC低表达组其转移患者占转移总数的12%(3/25),LYRIC高低表达两组间差异有统计学意义($\chi^2 = 20.8829, P = 0.001$)。此外,LYRIC表达与肝癌患者临床分期密切相关,在LYRIC高表达组中Ⅲa~Ⅲb期患者较集中,约占总体的58.5%(31/53),而在LYRIC低表达组中I期及II期患者约占64.0%(22/34),LYRIC高低表达两组间差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.459, P = 0.034$)。LYRIC表达与肝癌患者年龄、性别、HBV、HCV及肿瘤直径尚无关联。

2.4 LYRIC的表达与肝癌预后的相关性

87例乳腺癌患者进行预后随访,整理预后信息,结合LYRIC免疫组织化学染色和评分情况进行生存分析。SPSS18.0软件统计分析结果(图3)显示,在肝癌组织中LYRIC的高、低表达可较好地预测肝癌患者的预后情况,LYRIC高表达患者预后较差(中位总体生存期为47个月),而LYRIC低表达患者预后较好(中位总体生存期为59个月),LYRIC

低表达者与高表达者相比,其总体生存期差异有统计学意义($\chi^2 = 10.236, P = 0.001$)。

表 1 人肝癌组织中 LYRIC 表达与临床病理特征的关系[n(%)]

Tab.1 Relationship between LYRIC expression and clinical characteristics of HCC [n(%)]

Characteristic		High Expression of LYRIC(N = 43)	Low expression of LYRIC(N = 44)	P
Age(t/a)		50(31-67)	54(33-78)	0.843
Sex	Female	23(53.5)	20(46.5)	0.454
	Male	20(45.5)	24(54.5)	
Clinical Stage	I ~ II	12(35.3)	22(64.0)	0.035
	III a ~ III b	31(58.5)	22(41.5)	
Metastasis	Yes	22(88.0)	3(12.0)	0.001
	No	21(33.9)	41(66.1)	
HBV	Positive	37(50.7)	36(49.3)	0.592
	Negative	6(42.9)	8(57.1)	
HCV	Positive	2(66.7)	1(33.3)	0.543
	Negative	41(48.8)	43(51.2)	
Tumor diameters	>5	10(52.6)	9(47.4)	0.752
	<5	33(48.5 %)	35(51.5)	

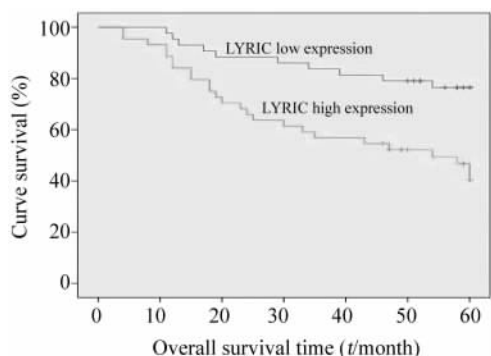


图 3 Log-rank 分析肝癌组织中 LYRIC 蛋白表达与患者总体生存期的关系

Fig.3 The relationship of the LYRIC protein expression in HCC tissues with overall survival time of patients by Log-rank statistical analysis

2.5 Cox 风险模型分析肝癌患者预后的风险因子

Cox 比例风险模型分析结果(图 4)显示,肝癌组织中 LYRIC 高表达者相对 LYRIC 低表达者对于总体生存期的相对危险度 $HR = 2.19$,95% 可信区间为 $1.24 \sim 3.95, P = 0.038$;而肝癌转移患者较未转移患者对总体生存期的相对危险度最高, $HR = 2.44$,95% 可信区间为 $1.42 \sim 4.54, P = 0.001$;肝癌临床分期 III 期患者较临床分期 I 期和 II 期患者对总体生存期的相对危险度 $HR = 2.01$,95% 可信区间为 $0.73 \sim 4.71, P = 0.049$ 。结果说明,LYRIC 表达、肝癌转移和临床分期

是影响患者总生存期的独立风险因素。

3 讨论

HCC 居恶性肿瘤发病率第四位,在我国 HCC 居恶性肿瘤病死率的第二位^[9]。据 WHO 2004 年公布的数据显示,近几年全世界每年新发生 50 ~ 60 万例肝癌,其中 40% 左右发生在我国^[10]。肝癌的发生发展也是体内多基因参与、多步骤协同作用的复杂过程。至今,已有多种基因被发现可以导致肝癌的不良预后,在肝癌发生发展过程中发挥了癌基因的重要作用^[11]。肝癌的预后判断和诊治过程则越来越依赖于对这些癌基因表达情况的分析,因此,寻找重要的肝癌癌基因和预后判断标志物就显得非常重要。新近研究^[12]提示,某些癌基因的表达不仅能够判定肝癌的预后,而且对指导肝癌治疗具有重要意义。LYRIC 基因是一种保守蛋白,仅存在于大多数脊椎生物中,广泛表达于胞质,在细胞核、内质网、核边缘、核仁中也有些许存在^[13]。研究^[14]发现,LYRIC 基因介导了多种肿瘤细胞发生体内转移;与肿瘤细胞的增殖、恶性转化、复发转移密切相关;广泛参与了乳腺癌、肺癌、胃癌的进展过程,并调控 PI3-K/Akt 相关信号转导通路在癌症复发转移过程中发挥作用。本实验研究纳入的临床样本中,LYRIC 蛋白在 64.7% 的 HCC 组织中呈现高表达,且其在 HCC 中的表达水平显著高于癌旁组织(2.16 ± 0.87 vs $1.63 \pm 0.88, P = 0.0001$),提示 LYRIC 蛋白

高表达是肝癌的重要恶性表型特征之一。

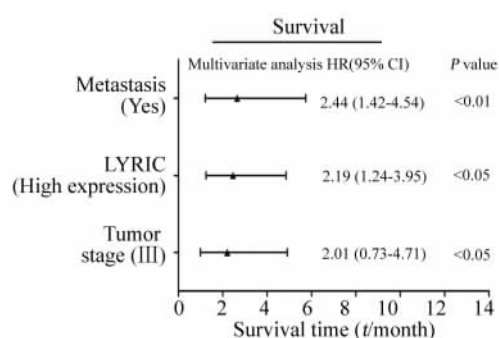


图4 影响肝癌患者总体生存期危险因素的多因素分析

Fig. 4 Multivariate analysis of HRs for overall survival time of HCC patients

为探讨 LYRIC 蛋白在肝癌预后评估中的作用,本实验进一步分析了 LYRIC 蛋白表达与肝癌临床病理参数之间的关系。研究表明,约 51.2% (22/43) 的 LYRIC 高表达患者发生了肝癌的转移,占转移患者总数的 88%,而在 LYRIC 低表达组仅有约 6.8% (3/44) 的患者发生了转移,占转移总数的 12%,LYRIC 高低表达两组间转移的发生具有显著的统计学意义($\chi^2 = 20.8829, P = 0.001$)。此外,实验还发现,LYRIC 表达与肝癌患者临床分期密切相关,在 LYRIC 高表达组 58.5% 患者肿瘤临床分期集中于 IIIa ~ IIIb 期,呈现较晚的分期;而在 LYRIC 低表达组 64.0% 患者临床分期集中于 I 期及 II 期,提示 LYRIC 蛋白表达与 HCC 临床分期密切相关。而统计分析显示,LYRIC 表达与肝癌患者年龄、性别、HBV、HCV 及肿瘤直径尚无关联。

同时,本实验还通过 Log-rank 法分析了 LYRIC 蛋白表达与 HCC 患者生存期之间的关系,发现 LYRIC 高表达患者的中位总体生存期为 47 个月,LYRIC 蛋白低表达患者的中位总体生存期为 59 个月,LYRIC 蛋白低表达组患者较高表达组患者中位总体生存期延长了 12 个月,两者具有统计学差异($\chi^2 = 10.236, P = 0.001$),提示 LYRIC 蛋白检测有助于 HCC 患者预后的判断。进而还将单因素分析中对总体生存期有意义变量采用 Cox 逐步回归模型纳入多因素分析,结果提示,LYRIC 蛋白表达是 HCC 患者独立的预后危险因素(HR = 2.19),这一发现为 LYRIC 成为肝癌的预后预测和评价指标提供了临床数据的支持。

综上所述,本实验首次从基因及组织学水平检测了肝癌组织中 LYRIC 的表达情况,发现 LYRIC 蛋

白在 HCC 中高表达,且其表达水平与肝癌患者的转移、临床分期等临床病理特征密切相关。而进一步的分析提示,LYRIC 蛋白表达是 HCC 患者预后判断的独立危险因素。本研究的结果为 HCC 患者的预后判断及靶向治疗提供了重要的实验依据和潜在的研究价值。

[参考文献]

- [1] Wong TC, Poon RT. Hepatobiliary malignancies: Lessons from Asia [J]. Dig Dis 2013; 31(1): 130-137.
- [2] Banin Hirata BK, Oda JM, Losi Guembarovski R, et al. Molecular markers for breast cancer: Prediction on tumor behavior [J]. Dis Markers, 2014, 2014(ID513158, 12 pages).
- [3] Su ZZ, Kang DC, Chen Y, et al. Identification and cloning of human astrocyte genes displaying elevated expression after infection with HIV-1 or exposure to HIV-1 envelope glycoprotein by rapid subtraction hybridization, RaSH [J]. Oncogene, 2002, 21(22): 3592-3602.
- [4] Wan L, Kang Y. Pleiotropic roles of AEG-1/MTDH/LYRIC in breast cancer [J]. Adv Cancer Res, 2013, 120(1): 113-134.
- [5] Meng X, Brachova P, Yang S, et al. Knockdown of MTDH sensitizes endometrial cancer cells to cell death induction by death receptor ligand TRAIL and HDAC inhibitor LBH589 co-treatment [J]. PLoS ONE, 2011, 6(6): e20920.
- [6] Gnosa S, Shen YM, Wang CJ, et al. Expression of AEG-1 mRNA and protein in colorectal cancer patients and colon cancer cell lines [J]. J Transl Med, 2012, 10(1): 109-112.
- [7] Huang W, Yang L, Liang S, et al. AEG-1 is a target of perifosine and is over-expressed in gastric dysplasia and cancers [J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(10): 2873-2880.
- [8] Hu G, Wei Y, Kang Y. The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(18): 5615-5620.
- [9] Abdurakhmanov DT. Antiviral therapy and risk for hepatocellular carcinoma in chronic viral hepatitis [J]. Ter Arkh, 2013, 85(10): 94-97.
- [10] Altekruse SF, Henley SJ, Cucinelli JE, et al. Changing hepatocellular carcinoma incidence and liver cancer mortality rates in the united states [J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(4): 524-553.
- [11] Hudler P, Kocevar N, Komel R. Proteomic approaches in biomarker discovery: New perspectives in cancer diagnostics [J]. Sci World J, 2014, 2014(ID260348, 18pages).
- [12] Gerber MA. Recent studies on the developing human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Surv, 1986, 5(4): 741-763.
- [13] Lee SG, Kang DC, DeSalle R, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC, the beginning: Initial cloning, structure, expression profile, and regulation of expression [J]. Adv Cancer Res, 2013, 120(1): 1-38.
- [14] Sarkar D, Fisher PB. AEG-1/MTDH/LYRIC: Clinical significance [J]. Adv Cancer Res, 2013, 120(1): 39-74.

[收稿日期] 2014-05-30

[修回日期] 2014-07-25

[本文编辑] 阮芳铭