

EZH2 和 FHIT 在肝癌中的表达及其临床意义

车爱文¹, 陈淑苹¹, 康凯夫²

(1. 深圳市龙岗区妇幼保健院, 广东 深圳 518100;

2. 佛山市顺德区第一人民医院, 广东 佛山 528000)

摘要: [目的] 探讨果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2 (EZH2) 和脆性组氨酸三联体 (FHIT) 蛋白在原发性肝细胞性肝癌 (HCC) 组织中的表达, 及其在肝癌发生发展过程中的作用和临床病理学意义。[方法] 应用免疫组化 S-P 法检测 50 例原发性肝细胞性肝癌、30 例肝硬化、10 例正常肝组织中 EZH2、FHIT 蛋白的表达。[结果] FHIT 蛋白在 HCC 中的表达明显低于肝硬化和正常肝组织, 阳性表达率分别是 40.00% (20/50)、80.00% (24/30)、80.00% (8/10), 三者之间具有明显的差异性 ($\chi^2=15.74, P<0.05$); HCC、肝硬化和正常肝组织中 EZH2 蛋白阳性表达率分别是 88.00% (44/50)、46.67% (14/30)、30.00% (3/10), 三者之间的差异有统计学意义 ($\chi^2=20.63, P<0.05$), 且 EZH2 蛋白在 HCC 组织中的表达明显高于肝硬化和正常肝组织中的表达 ($\chi^2_1=16.07, \chi^2_2=14.07, P$ 均 <0.05)。[结论] EZH2 蛋白在肝癌中的表达增加与 FHIT 蛋白相关, 提示肝癌中 EZH2 蛋白与 FHIT 蛋白可能相互协调, 促进肝癌的发生发展。

关键词: 果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2; 脆性组氨酸三联体基因; 肝肿瘤; 免疫组化
中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2013) 07-0514-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.07.B003

Expressions of EZH2 and FHIT Protein in Primary Human Hepatocellular Carcinoma and Their Clinical Significance

CHE Ai-wen¹, CHEN Shu-ping¹, KANG Kai-fu²

(1. The Mental & Children Health Care Hospital of Longgang, Shenzhen 518100, China;

2. The First People's Hospital of Shunde, Foshan 528000, China)

Abstract: [Purpose] To explore the expressions of EZH2 and FHIT protein in primary human hepatocellular carcinoma (HCC) and their clinicopathological significance. [Methods] The expressions of EZH2 and FHIT protein in 50 cases with HCC, 30 cases with liver cirrhosis and 10 cases with normal liver tissues were assessed by immunohistochemical S-P method. [Results] The expression of FHIT protein in cancer tissues was lower than that in cirrhosis tissues and normal tissues, and the positive rates were 40.00% (20/50), 80.00% (24/30), 80.00% (8/10) respectively, with significant difference ($\chi^2=15.74, P<0.05$); The positive rates of EZH2 protein in cancer tissues, cirrhosis tissues, normal tissues were 88.00% (44/50), 46.67% (14/30), 30.00% (3/10) respectively, also with significant difference ($\chi^2=20.63, P<0.05$). The expression of EZH2 protein in cancer tissues was higher than that in cirrhosis tissues and normal tissues ($\chi^2_1=16.07, \chi^2_2=14.07, P$ 均 <0.05). [Conclusion] The increased expression of EZH2 protein is closely associated with FHIT protein in HCC; EZH2 and FHIT protein may have mutual coordination to promote HCC development.

Subject words: enhancer of *zeste* homolog 2 (EZH2); fragile histidine triade (FHIT); liver neoplasms; immunohistochemistry

原发性肝细胞性肝癌 (HCC) 危害性高, 治愈率低, 是严重威胁人类生命健康和生活质量的重要消化系统恶性肿瘤之一。肝癌的发生、发展涉及到一系列基因的改变。

果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2 (enhancer of *zeste* homolog 2, EZH2) 是多聚梳 (polycomb group, PcG) 基因家族的重要成员之一, 在胚胎发育、肿瘤发生和转移以及干细胞的维持中有着重要的作用^[1]。本实验利用免疫组化的方法来检测 EZH2 和 FHIT 蛋白在肝癌中的表达情况, 并探讨其临床意义及分析两者之间的关系。

通讯作者: 车爱文, 主治医师, 硕士; 深圳市龙岗区妇幼保健院病理科, 广东省深圳市龙岗区中心城 11 区 (518100); E-mail: aiwenche1125@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2012-12-24; 修回日期: 2013-01-19

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集顺德区第一人民医院 2000 年 1 月至 2006 年 12 月手术切除 50 例原发性肝细胞性肝癌(HCC)、30 例肝硬化及正常 10 例肝组织存档的蜡块标本。所有组织切片经 HE 染色后,均经病理学检查确诊,按 Edmondson 分级标准 I 级 13 例、II 级 15 例、III 级 8 例、IV 级 14 例。其中男性 45 例,女性 5 例,年龄 28~77 岁,平均年龄 56.8 岁。30 例肝硬化手术切除或活检标本,其中男性 25 例,女性 5 例,年龄 28~69 岁,平均年龄 50.3 岁,中位年龄 48.5 岁。标本用 40g/L 甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片。用意外死亡(生前体检)经 HE 染色切片诊断证实无病变的成人肝脏标本作正常对照。兔多抗 EZH2 购自武汉博士德生物工程有限公司,兔多抗 FHIT 购自北京中杉金桥公司。

1.2 免疫组织化学染色

免疫组化染色采用 S-P 法,实验步骤按说明书进行。以试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。用双盲法对染色结果进行评估,EZH2 蛋白表达于细胞核,呈棕黄色颗粒,FHIT 蛋白阳性反应物呈黄色或棕黄色,位于胞浆中。每例随机观察 5 个高倍视野($\times 400$),每高倍视野计数 100 个瘤细胞。采用半定量积分法,将染色强度分为 3 级:无着色 1 分,浅着色 2 分,棕黄色 3 分;按阳性瘤细胞的百分比分 3 级: $\leq 25\%$ 为 I 级记 1 分,26%~75% 为 II 级记 2 分, $\geq 76\%$ 为 III

级记 3 分。每张切片最后的得分为两次评分的乘积(1~9 分)。 ≥ 3 分为阳性, < 3 分为阴性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS15.0 统计软件对相关的资料数据进行统计学处理。各组间样本率差异的比较采用 χ^2 检验,等级资料的比较采用秩和检验,两资料之间的相关采用 Spearman 等级相关,以 $P < 0.05$ 确定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EZH2 与 FHIT 蛋白在肝组织各种病变中的表达情况

EZH2 在 HCC、肝硬化和正常肝组织之间的表达差异有统计学意义($\chi^2=20.63, P=0.002$),且 EZH2 蛋白在 HCC 组织中的表达明显高于在肝硬化和正常肝组织中的表达($\chi^2_1=16.07, \chi^2_2=14.07, P$ 均 < 0.05)。FHIT 蛋白阳性表达在 HCC、肝硬化和正常肝组织之间具有明显的差异性($\chi^2=15.74, P=0.0018$),且 FHIT 蛋白在 HCC 中的表达明显低于在肝硬化和正常肝组织中的表达($\chi^2_1=12.52, \chi^2_2=5.42, P$ 均 < 0.05) (Table 1, Figure 1, 2)。

2.2 FHIT 和 EZH2 蛋白表达水平与临床病理特征关系

FHIT 蛋白在 HCC 中的表达与病理学分级($\chi^2=15.97, P=0.0019$)有关,病理学分级越高,FHIT 蛋白

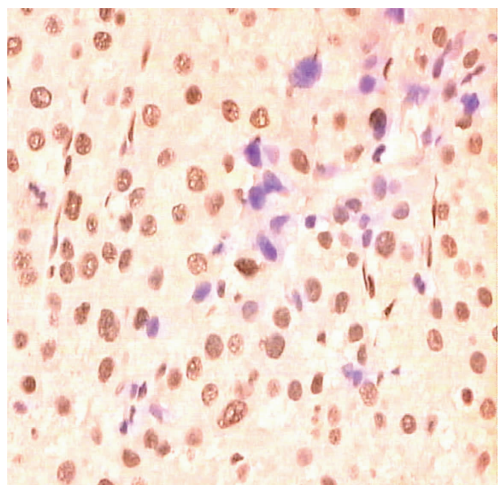


Figure 1 The expression of EZH2 protein in HCC($\times 200$)

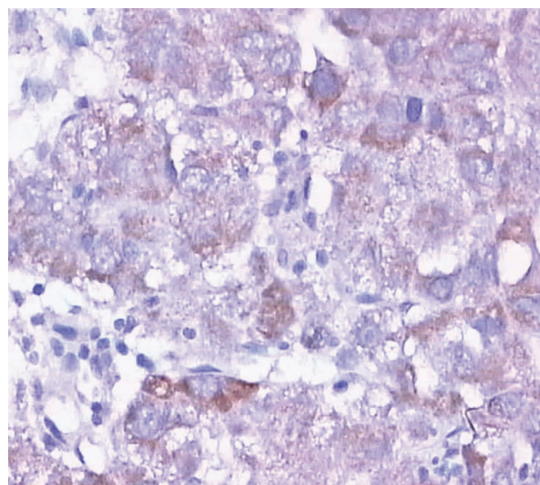


Figure 2 The expression of FHIT protein in HCC($\times 200$)

Table 1 The expressions of FHIT,EZH2 protein in 3 liver tissues

Groups	n	FHIT				EZH2			
		Positive	Negative	χ^2	P	Positive	Negative	χ^2	P
Normal tissues	10	8	2	15.74	0.0018	3	7	20.63	0.002
Cirrhosis tissues	30	24	6			14	16		
HCC tissues	50	20	30			44	6		

丢失率越高。FHIT 蛋白表达与年龄、性别、肿瘤大小、转移及 HBsAg 均无关。EZH2 蛋白表达与年龄、性别、肿瘤大小、组织学分级、HBsAg 及转移均无关(Table 2)。

2.3 FHIT 和 EZH2 蛋白表达水平之间的相关关系

44 例 EZH2 阳性病例中 FHIT 阳性 14 例，两者表达呈不一致性($\chi^2=5.18,P=0.043$)。

3 讨论

EZH2 是果蝇 *zeste* 基因增强子的人类同源基因,是 PcG 基因家族的重要成员之一。PcG 和 *trithorax group(trxG)* 都是进化过程中保守的染色质修饰基因,通过 PcG 和 *trxG* 蛋白的相互拮抗作用^[2],能够维持同源异型基因(homeotic gene)的沉默和活化表达状态。EZH2 蛋白在胚胎早期发育时普遍存在,对细胞增殖是必需的,其高表达导致细胞进入 S 期。除了维持胚胎正常发育作用之外,EZH2 蛋白在衰老细胞中低表达,P53 下调 EZH2 蛋白的表达而发挥其细胞复制性衰老的作用。EZH2 蛋白还能增强原代细胞的生长能力,在多种原发肿瘤表达,如胃癌^[3]、前列腺癌^[4]、宫颈癌^[5]等。本研究中肝癌组织中 EZH2 蛋白的表达水平高于肝硬化和正常肝组织,其表达水平在正常肝组织中最低,提示在肝癌进展过程中 EZH2 蛋白的表达异常是早期分子事件,可以推测,EZH2 蛋白参与肝癌发生发展的机制之一,可能与其促增殖能力有关,这与其他恶性肿瘤中的研究结果一致。危丹明等^[6]研究发现 *EZH2* mRNA 在肝癌组织中的表达率为 61.9%,明显高于癌旁组织和正常肝组织。在 *EZH2* 表达与临床病理因素关

Table 2 The expressions of FHIT,EZH2 protein and pathological characteristics of HCC

Characteristic features	FHIT			EZH2		
	Positive rate (%)	χ^2	P	Positive rate (%)	χ^2	P
Age(years)						
≥45	18(43.90)	0.26	>0.05	36(87.80)	0.05	>0.05
<45	2(22.22)			8(88.89)		
Gender						
Male	18(39.13)	2.61	>0.05	41(93.18)	0.69	>0.05
Female	2(50.00)			3(75.00)		
Tumor diameter(cm)						
≤5	10(17.72)	0.88	>0.05	19(70.18)	0.21	>0.05
>5	10(34.49)			25(86.21)		
Histological grade						
I	9(79.23)	15.97	<0.05	13(100.00)	2.76	>0.05
II	5(33.33)			12(80.00)		
III	2(25.00)			7(87.50)		
IV	4(28.77)			12(85.71)		
HBsAg						
Positive	17(42.50)	0.53	>0.05	37(92.50)	3.84	>0.05
Negative	3(30.00)			7(70.00)		
Metastasis						
Yes	8(29.73)	2.63	>0.05	24(87.89)	0.04	>0.05
No	12(52.17)			20(86.96)		

系的分析中,*EZH2* mRNA 在肝癌组织中的阳性表达率与病理分级有关,低分化的肝癌 *EZH2* 表达率明显高于高分化的肝癌,*EZH2* 的阳性表达与肝癌的恶性度有关,可能促使肝癌的肿瘤生成及进展。而本研究则与病理学分级无关,这点可能需要大量的样本来检测。*EZH2* mRNA 与肿瘤大小、HBV 感染、AFP 水平、是否伴有静脉癌栓和(或)肝内外转移以及是否伴有肝硬化无明显相关,这些结果都与本研究一样。而 Sudo 等^[7]则发现门静脉癌栓形成在高表达组明显高于低表达组,EZH2 与肝癌预后无显著相关性。这可能与病例病因不同有关,本研究中,病例所感染的肝炎病毒均为 HBV,Sudo 研究中 HCV、HBV 感染率分别为 66.17%和 21.11%,而乙肝病毒与丙肝病毒致癌机制不同^[8]。此外,也可能是标本抽样的影响,或 EZH2 在肝癌中确实与是否伴有静脉

癌栓和(或)肝内外转移无明显差别。对 EZH2 的检测可能有助于判断肝癌的恶性程度,并且可以作为肝癌潜在的一个治疗靶点。

FHIT 基因是新近发现的一个候选抑癌基因,定位于人类 3 号染色体短臂 14.2 区域上,占据 1.1Mb 大小的位置,属于组氨酸三联体 (histidine triad, HIT) 基因家族,是 Ohta 等^[9]1996 年利用外显子捕获法和差异分析探针确定并克隆出的,是第一个将肿瘤与染色体的易位点联系在一起的水平上的证据。其抑癌作用有可能通过与微管的相互作用而发挥它的肿瘤抑制活性,也可能通过诱导凋亡和参与细胞周期捕获实现。在病理情况下, FHIT 抑癌基因的异常表达及细胞异常增殖在肿瘤发生过程中起着很重要的作用^[10,11]。本研究结果显示 FHIT 在癌旁组织与正常肝组织中的表达明显高于肝癌组织,而且在分析 FHIT 与肝癌的临床病理特征关系时发现 FHIT 蛋白在肝癌中的表达与病理学分级有关,病理学分级越高, FHIT 蛋白丢失率越高,这提示着 FHIT 基因的失活在肝癌的发生发展过程中起着重要的作用。说明随着肝癌的组织学分化程度降低, FHIT 蛋白的阴性表达率却逐渐升高,预后就越差, FHIT 蛋白的表达与肝癌的预后密切相关。FHIT 蛋白表达与年龄、性别、肿瘤大小、转移及 HBsAg 均无关。

人体细胞的正常增殖与分化依赖于细胞周期中各种调节因子的平衡调控,某些调控因子发生功能和结构改变,可导致细胞周期调节紊乱,从而引起细胞增殖和分化调节异常,有助于肿瘤的发生。在对 FHIT 和 EZH2 两者之间的关系进行分析时发现,两者关系密切,即 EZH2 在肝癌中明显高于癌旁组织及正常组织,而 FHIT 则在癌旁组织与正常肝组织中的表达高于肝癌组织,其结果与国内外文献报道较一致,这一现象表明在肝癌及其癌前发生阶段同时存在着 FHIT 表达的缺失和 EZH2 的异常高表达,提示 FHIT 功能的丧失和 EZH2 功能的激活将促使正常肝细胞向肿瘤细胞转化,其两者的作用机制尚需进一步研究。EZH2 和 FHIT 表达水平可能是反映肝癌发生、进展、生物学行为和预后的重要生物学标志物,联合检测 FHIT 和 EZH2 在原发性肝细胞性肝癌表达将有助于早期发现、诊断原发性肝细胞性肝癌,为肝癌的治疗提供良好的前景。

综上所述, FHIT、EZH2 基因及其蛋白的异常表达参与了肝癌细胞凋亡的调控,因此,联合检测

FHIT、EZH2 在肝癌中的表达情况,对了解肝癌的潜在的恶性生物学行为及评价预后有重要的临床参考价值, FHIT 基因也可能成为临床基因治疗的重要指标之一。随着对 FHIT 的生理功能及其突变而导致的细胞生物学行为的改变机制日益深入的了解,我们将设计出更加先进的药物和更加有效的治疗方法,不仅可以治疗 FHIT 表达异常的肿瘤,还有望将 FHIT 表达异常的癌前病变扼杀在萌芽阶段,从而能够在临床上预防肿瘤的发生、发展。

参考文献:

- [1] Feng Y, Song LB, Guo BH, et al. Expression and significance of Bmi-1 in breast cancer [J]. Chinese Journal of Cancer, 2007, 26 (2): 154-157. [冯艳, 宋立兵, 郭宝红, 等. Bmi-1 在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 癌症, 2007, 26 (2): 154-157.]
- [2] Pasini D, Braeken AP, Helin K. Polycomb group proteins in cell cycle progression and cancer[J]. Cell Cycle, 2004, 3(4): 396-400.
- [3] Choi JH, Song YS, Yoon JS, et al. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer[J]. APMIS, 2010, 118 (3): 196-202.
- [4] van Leenders GJ, Dukers D, Hessels D, et al. Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features[J]. Eur Urol, 2007, 52(2): 455-463.
- [5] Fang J, Xue Y, Zhou DX, et al. Expression of EZH2 gene in cervical cancer and its significance[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2011, 32 (6): 758-760. [方静, 薛艳, 周党侠, 等. EZH2 基因在宫颈癌中的表达及其意义[J]. 西安交通大学学报(医学), 2011, 32(6): 758-760.]
- [6] Wei DM, Feng ZB, Lu HX, et al. Expression and implication of EZH2 gene in hepatocellular carcinoma[J]. Guangdong Medical Journal, 2010, 31(12): 1529-1530. [危丹明, 冯震博, 陆海霞, 等. EZH2 mRNA 在肝细胞癌中的表达及其意义[J]. 广东医学, 2010, 31(12): 1529-1530.]
- [7] Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K, et al. Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 2005, 92(9): 1754-1758.
- [8] Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis[J]. J Viral Hepatitis, 2004, 11(5): 383-393.
- [9] Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t (3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. Cell, 1996, 84 (4): 587-597.
- [10] Wang W, Yin HM. Expression and significance of FHIT, Survivin and Bcl-2 in cervical carcinoma [J]. Shandong Medical Journal, 2011, 51 (30): 42-43. [王伟, 殷红梅. 宫颈癌组织中 FHIT、Survivin 和 Bcl-2 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51 (30): 42-43.]
- [11] Hu HM, Zhang GM. Expression of FHIT, WWOX protein in endometrial carcinoma and its clinical significance [J]. Journal of Qiqihar Medical College, 2010, 31(17): 2693-2694. [胡慧敏, 张广美. FHIT、WWOX 蛋白在子宫内膜癌中的表达及临床意义[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(17): 2693-2694.]