

ERβ 基因表达与肝细胞肝癌术后复发的相关性及其机制研究

吴其肯, 刘玉君, 王海江, 王利平, 梅 勇
(舟山市妇幼保健院, 浙江 舟山 316004)

摘 要: [目的] 研究雌激素受体 2 (ERβ) 与肝细胞肝癌 (HCC) 术后复发的相关性以及其潜在分子机制。[方法] 通过 qRT-PCR 技术与 Western Blot 检测 ERβ 在 HCC 术后两年内复发的 8 例患者以及 10 例未复发患者癌组织样本内的表达差异。同时, 利用三种交叉验证实验 (留一交叉验证、十折交叉验证和蒙特卡罗交叉验证) 分析 ERβ 表达对 HCC 样本的术后复发预测的分型准确性。此外, 进一步预测 ERβ 下游调控基因, 分析下游调控基因显著参与的生物学功能以及信号通路, 探究其可能的分子机制。[结果] ERβ 基因在术后复发的 HCC 样本中显著高表达, 与术后复发明显相关, 且通过交叉验证实验结果发现 ERβ 对 HCC 样本有较好的分型准确性, 三种验证方法的分型准确率分别为 75% (73%~76%)、73% (72%~73%) 与 71% (71%~72%)。最后通过对 ERβ 下游调控基因的功能富集分析发现, ERβ 显著参与到细胞增殖、RNA 转录等 HCC 术后发展相关的功能与通路中。[结论] ERβ 具有良好的 HCC 术后复发预测效能, 具有成为 HCC 术后复发分子标志物的潜力, 具有一定的研究价值。

主题词: ERβ; 肝肿瘤; 术后复发; 分子标志物

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)10-0835-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.10.B011

Study of Correlation and Mechanism Between ERβ Expression and Postoperative Recurrence of Hepatocellular Carcinoma

WU Qi-ken, LIU Yu-jun, WANG Hai-jiang, et al.

(Zhoushan Maternal and Child Care Service Centre, Zhoushan 316004, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the correlation and mechanism between estrogen receptor 2 (ERβ) expression and postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC). [Methods] The expression of ERβ between 8 patients with postoperative recurrence of HCC and 10 patients with no recurrence of HCC was detected by qRT-PCR and Western Blot. The classified power of ERβ was analyzed by three cross-validation algorithms [leave-one-out cross validation (LOOCV), 10-fold cross validation (10-fold CV) and Montecarlo cross validation (MCCV)]. Moreover, the downstream regulated genes of ERβ were predicted. Then, biological functional enrichment analysis was used to detect the functions and processes related to these regulated genes. [Results] The expression of ERβ gene was higher in patients with postoperative recurrence of HCC. ERβ had a high prediction accuracy for classified HCC [LOOCV: 75% (73%~76%), 10-fold CV: 73% (72%~73%), MCCV: 71% (71%~72%)]. At last, functional enrichment analysis showed that the regulated genes of ERβ were significantly involving in functions of cell proliferation, apoptosis, differentiation, angiogenesis and HCC progression related functions and pathways. [Conclusion] ERβ shows a good classified power for recurrence of HCC, and those may be candidate biomarkers of postoperative recurrence of HCC and worth researching.

Subject words: ERβ; liver neoplasms; postoperative recurrence; biomarker

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种发病率极高的恶性肿瘤, 其恶性程度高、预后差、死亡率高。在中国, 肝癌的发病率和死亡率均为所有癌症中第 1 位^[1]。目前常用的治疗手段为手术切除, 然而超过 60% 的患者在 5 年内复发, 生存率

不足 60%^[2-4]。因此, 在 HCC 尚未出现复发转移之前, 及早预测、诊断以及治疗就成为提高 HCC 生存率的关键因素。

研究发现肝癌根治术后复发是多中心起源或体循环中的癌细胞所致^[5]。目前肝癌复发诊断主要依赖于影像学及血清甲胎蛋白 (AFP) 的检测。同时, 寻找早期复发的检测方法成为当今世界 HCC 研究的热点^[6]。近年来随着高通量技术如基因表达谱技术

通讯作者: 刘玉君, 教授, 主任医师, 博士; 舟山市妇幼保健院外科, 浙江省舟山市定海区人民南路 30 号 (316004); E-mail: yu-junliu66@163.com

收稿日期: 2015-03-25; **修回日期:** 2015-04-21

的快速发展和广泛应用,为研究 HCC 的分子机理与分子诊断提供了新的方法与思路^[7,8]。因此,筛选寻找肿瘤预前预后的分子诊断标志物成为目前肿瘤诊断研究领域的热门方向。

雌激素受体 2 (estrogen receptor 2, ER β) 是一种受雌激素激活的细胞核转录因子, ER β 一旦与雌激素结合, 便会调控下游靶基因的表达, ER β 介导的信号通路与乳腺癌、结肠癌以及卵巢癌等多种肿瘤的发生发展相关^[9,10]。为了研究 ER β 与 HCC 预后的关系, 在本研究中, 我们分别检测 ER β 基因在 HCC 术后两年内复发的 8 例患者以及 10 例未复发患者癌组织样本内的表达。并进一步分析 ER β 可调控的下游基因所涉及的生物学功能。希望明确 ER β 与 HCC 预后的关联, 并探索其具体的分子机制。

1 资料与方法

1.1 HCC 组织样本

样本取自舟山市妇幼保健院 2010 年手术切除的 HCC 患者, 筛选术后两年内复发的 HCC 患者组织样本 8 例, 其中男性 6 例, 女性 2 例, 年龄 58~71 岁。筛选术后未复发的 HCC 患者组织样本 10 例, 其中男性 6 例, 女性 4 例, 年龄 52~73 岁。所有样本速冻于液氮, -80℃ 冰箱保存。

1.2 qRT-PCR 实验

利用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, USA) 提取细胞总 RNA, 具体步骤参考试剂盒说明。采用 SYBR Green 法检测基因的表达。ER β 基因 PCR 引物 (产物 <200bp) 由上海生工生物工程技术服务有限公司提供。采用 10 μ l ABI 体系, 包括单链 cDNA 1 μ l, SYBR Green Real-time PCR Master Mix 5 μ l, 上游引物和下游引物各 0.45 μ l (1 μ mol/L), 再加去离子水 3.1 μ l。采用 ABI Stepone qRT-PCR 仪检测。PCR 循环参数为: 95℃ (60s), 95℃ (15s), 60℃ (15s), 72℃ (35s) 共 40 个循环。以 β -actin 基因作为内参照进行 PCR, 用计算机软件 (StepOne™ Software v3.0) 分析各反应的荧光强度得出反应的循环阈值 (cycle threshold, Ct)。使用比较 Ct 值法计算目的基因的相对表达量。ER β 的上游引物: 5'-TCCATCGCCAGTTATCATCT-3', 下游引物: 5'-CTGGACCAGTAA-CAGGGCTG-3'; β -actin 的上游引物: 5'-CATGTA-CGTTGC-

TATCCAGGC-3', 下游引物: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。

1.3 Western Blot 检测

提取跨膜蛋白, 具体步骤参照试剂盒说明书 (碧云天核蛋白提取试剂盒)。BCA 法蛋白定量。SDS-PAGE 电泳后将蛋白转至 PVDF 膜。膜在 5% BSA 溶液中室温孵育 1h 以封闭膜上的非特异结合。TBS/T 洗膜 3 次, 每次 5min。封闭过的膜加入 anti-ER β 兔单抗 (CST, 货号 5513, 1:1 000 稀释), 4℃ 过夜, 抗原抗体结合。TBS/T 洗膜 3 次, 每次 5min。加入 HRP 标记的兔二抗 (CST, 货号 7074, 1:3 000 稀释) 以结合一级抗体及 HRP 标记的抗生物素抗体以结合分子量标准, 室温孵育膜 1h。TBS/T 洗膜 3 次, 每次 5min。加入化学发光底物发光, 用凝胶成像系统 (Chemiluminescence imaging system, USA) 扫描图像, Image J 分析软件将图片上每个特异条带灰度数值化, 统计 ER β 蛋白与 β -actin 的 OD 比值。

1.4 生物信息学分析

使用 R 语言 CMA 包^[11] 分别进行留一交叉验证、十折交叉验证以及蒙特卡罗交叉验证计算 ER β 基因表达结果的样本分型准确性, 验证实验重复 1 000 次, 得到平均的分型准确率。ER β 下游靶基因预测来使用 TRANSFAC 数据库^[12]。共得到 30 个 ER β 调控的靶基因。然后使用 DAVID 数据库^[13] 分析靶基因所富集到的 GO 功能与生物学通路。设定阈值为 FDR < 0.05。采用 R 软件对结果进行数据分析, 组间采用 One-way ANOVA 分析, 以 P < 0.05 为差异显著性标准。

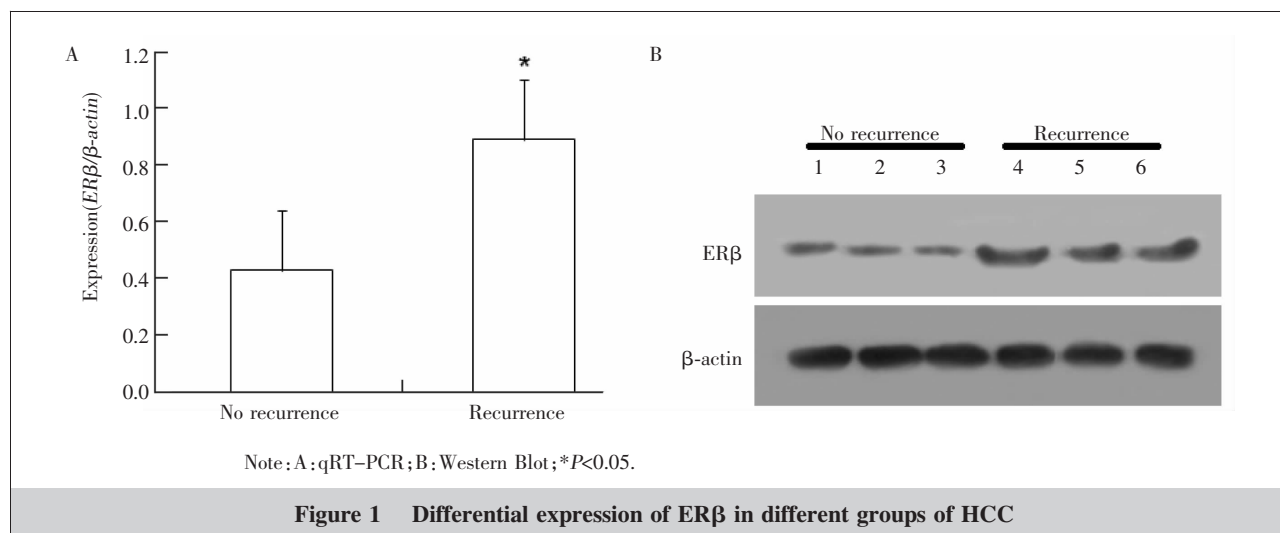
2 结果

2.1 ER β 在 HCC 组织中的表达

首先, 我们通过 qRT-PCR 实验检测 ER β 基因在术后复发与未复发两组样本中的表达, 结果显示, ER β 基因在 HCC 术后复发样本中显著高表达 (P = 0.031)。同时, 通过 Western Blot 实验也显示 ER β 蛋白表达也在术后复发的样本中有明显的增高 (Figure 1)。

2.2 ER β 基因的分型准确性

为了进一步确认 ER β 基因与 HCC 术后复发的相关性, 我们分别使用留一交叉验证、十折交叉验证以及蒙特卡罗交叉验证计算 ER β 基因的表达对 18



个样本的分型准确性，且所有验证都进行 1 000 次随机重复。结果三种验证方法的分型准确率分别为 75%(73%~76%)、73%(72%~73%) 和 71%(71%~72%) (Table 1)。该结果说明，针对 *ERβ* 表达的检测，可以很好地对 HCC 术后复发进行预测。

2.3 *ERβ* 下游调控基因以及相关功能的分析

为进一步考察 *ERβ* 在 HCC 术后复发过程中的分子机制，本研究利用 TRANSFAC 数据库预测 *ERβ* 下游的调控基因，结果得到 30 个 *ERβ* 靶向调控基因。其中包括大量的与肿瘤相关的经典基因，例如 *EGFR*、*SMARCA2* 以及 *STAT5A* 等^[14]。同时，为了进一步分析这些靶向调控基因所涉及的生物学功能与通路。我们利用 DAVID 数据库对这 30 个基因进行功能富集分析，结果显示，这些基因大量地富集到“细胞增殖”、“RNA 转录调节”、“肿瘤通路”以及“细胞发育”等相关的生物学功能 (Table 2)。

Table 1 The classification power of *ERβ*

Methods	Parameters	Mean of power	Std
LOOCV	Accuracy	0.750	0.016
	Misclassification	0.081	0.012
	Sensitivity	0.723	0.011
	Specificity	0.798	0.008
10-fold CV	Accuracy	0.730	0.012
	Misclassification	0.135	0.013
	Sensitivity	0.811	0.012
	Specificity	0.745	0.021
MCCV	Accuracy	0.710	0.011
	Misclassification	0.121	0.025
	Sensitivity	0.779	0.021
	Specificity	0.805	0.011

3 讨论

在应用现代科技不断改善肝脏外科技术来完成多类型高难度的肝癌切除术和肝移植术并取得巨大

Table 2 Results of gene enrichment analysis using *ERβ* regulated genes (FDR<0.05)

Database	Function	Gene number	<i>P</i>	FDR
KEGG pathway	Pathways in cancer	7	6.58×10^{-4}	0.034906
GO function	Positive regulation of developmental process	9	4.55×10^{-8}	4.96×10^{-5}
	Regulation of response to external stimulus	7	5.79×10^{-7}	6.31×10^{-4}
	Regulation of cell proliferation	11	1.43×10^{-6}	0.001558
	Positive regulation of transcription, DNA-dependent	9	2.77×10^{-6}	0.003016
	Positive regulation of RNA metabolic process	9	2.95×10^{-6}	0.003209
	Response to organic substance	10	6.49×10^{-6}	0.007059
	Positive regulation of transcription	9	9.55×10^{-6}	0.010362
	Positive regulation of gene expression	9	1.19×10^{-5}	0.01286
	Response to lipopolysaccharide	5	1.54×10^{-5}	0.016678
	Response to cytokine stimulus	5	1.71×10^{-5}	0.01845
	Response to molecule of bacterial origin	5	2.39×10^{-5}	0.025733
	Response to steroid hormone stimulus	6	3.42×10^{-5}	0.036663

进步的今天,肝癌的复发转移仍是影响肝癌患者长期治疗效果的难点,寻找肝癌复发诊断的特异性标志物成为当务之急^[6]。目前,已有诸多的 HCC 术后复发相关的标志物被发现,如血清甲胎蛋白 (AFP)、血清可溶性细胞间黏附分子 1 (sICAM21) 以及血清基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 等^[15-17]。但这些潜在的肝癌预后判断标志物多来源于科研机构的独立研究报告,缺乏多中心和规模化验证资料,还有很多临床前工作需要开展。

ER β 是肿瘤发展过程中非常关键的转录因子,其作为转录因子参与多种组织的生长发育过程,ER β 最主要的是参与了雌激素受体信号通路,该信号通路与多种肿瘤的发生发展相关^[18]。在本研究中,我们检测 ER β 基因以及蛋白在不同预后的 HCC 组织中的表达情况,结果发现,ER β 基因在预后差的 HCC 组织样本中明显的表达增高。证明其与 HCC 的预后明显相关,然后通过交叉验证发现 ER β 的表达对 HCC 术后复发的预测准确性与稳定性较好。明显预示该基因具有成为 HCC 预后分子标志物的潜力。此外,通过进一步分析 ER β 基因下游调控基因参与的生物学功能与通路也侧面反映出 ER β 在 HCC 的术后复发过程中起重要作用。这些基因大量地富集到“细胞增殖”、“RNA 转录调节”、以及“细胞发育”等相关的生物学功能。而这些功能都与 HCC 的发展转移高度相关^[19,20]。同时,我们发现这些基因也富集到了“肿瘤通路”。顾名思义,大量的 ER β 下游基因都参与到了肿瘤发生发展的过程^[15]。以上结果都显示 ER β 基因与 HCC 术后复发显著相关,具有成为 HCC 预后分子标志物潜力,且具有一定的研究价值。

当然,本研究只是基于本院收集的少量样本得到的结果,ER β 真正临床诊断价值的确认,还需要更多样本量并多中心规模化的验证。同时,这也是我们下一步工作的主要方向。此外,我们将进一步筛选其他 HCC 相关的基因或者分子,并与 ER β 基因联合形成一个 HCC 预后诊断的分子标志物组合,以致力于显著增加 HCC 预后预测的普适性以及准确率,为最终将成果转化向临床应用作铺垫。

参考文献:

[1] Poon D, Anderson BO, Chen LT, et al. Management of hepatocellular carcinoma in Asia: consensus statement

from the Asian Oncology Summit [J]. Lancet Oncol, 2009, 10(11): 1111-1118.

- [2] Cristea CG, Gheonea IA, Săndulescu LD, et al. Considerations regarding current diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. J Med Life, 2015, 8(2): 120-128.
- [3] Kinoshita A, Onoda H, Fushiya N, et al. Staging systems for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives[J]. World J Hepatol, 2015, 7(3): 406-424.
- [4] Tejeda-Maldonado J, García-Juárez I, Aguirre-Valadez J, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: an update[J]. World J Hepatol, 2015, 7(3): 362-376.
- [5] Masato S, Hiroaki N, Shoji N, et al. Intrahepatic recurrences of hepatocellular carcinoma after hepatectomy: analysis based on tumor hemodynamics[J]. Arch Surg, 2002, 137(1): 94-99.
- [6] Kimhofer T, Fye H, Taylor-Robinson S, et al. Proteomic and metabolomic biomarkers for hepatocellular carcinoma: a comprehensive review[J]. Br J Cancer, 2015, 112(7): 1141-1156.
- [7] Muthana SM, Gildersleeve JC. Glycan microarrays: powerful tools for biomarker discovery[J]. Cancer Biomark, 2014, 14(1): 29-41.
- [8] Lapaire O, Grill S, Lalevee S, et al. Microarray screening for novel preeclampsia biomarker candidates[J]. Fetal Diagn Ther, 2012, 31(3): 147-153.
- [9] Caiazza F, Ryan EJ, Doherty G, et al. Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis [J]. Front Oncol, 2015, 5: 19.
- [10] Wimberly H, Han G, Pinnaduwa D, et al. ER β splice variant expression in four large cohorts of human breast cancer patient tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 146(3): 657-667.
- [11] Slawski M, Daumer M, Boulesteix AL. CMA: a comprehensive Bioconductor package for supervised classification with high dimensional data[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9(2): 439-443.
- [12] Gama-Castro S, Jiménez-Jacinto V, Peralta-Gil M, et al. RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of Escherichia coli K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(Database issue): 120-124.
- [13] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources[J]. Nature Protoc, 2009, 4(1): 44-57.
- [14] Futreal PA, Coin L, Marshall M, et al. A census of human cancer genes[J]. Nature Reviews, 2004, 4(3): 177-183.
- [15] Matsumura M, Niwa Y, Kato N, et al. Detection of alpha-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1994, 20(6): 1418-1425.
- [16] Mei MH, Xu J, Zeng SE, et al. Expressions of serum and histronic intercellular adhesion molecule 1 and its mRNA in hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2001, 18(3): 261-264. [梅铭惠, 徐静, 曾思恩, 等. 肝细胞肝癌患者血清和组织间粘附分子 21 及其 mRNA 的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(3): 261-264.]
- [17] Daniele A, Divella R, Quaranta M, et al. Clinical and prognostic role of circulating MMP-2 and its inhibitor TIMP-2 in HCC patients prior to and after trans-hepatic arterial chemo-embolization[J]. Clin Biochem, 2014, 47(3): 184-190.
- [18] Chen AA, Wang J. Estrogen signaling pathway in cancer [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2012, 28(3): 570-575. [陈安安, 汪炬. 肿瘤中雌激素信号转导通路的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(3): 570-575.]
- [19] Saraswat VA, Pandey G, Shetty S. Treatment algorithms for managing hepatocellular carcinoma [J]. J Clin Exp Hepatol, 2014, 4(S3): 80-89.
- [20] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144 (5): 646-674.