

人肝细胞癌中 miR-23a 和 XIAP 的表达及意义

马 伟¹ 吴文涌¹ 吴正升² 汪树静² 余昌俊¹

摘要 目的 探讨 miR-23a 和 X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)在人肝细胞癌(HCC)中的表达、相互关系及临床病理意义。方法 建立组织微阵列,采用原位分子杂交方法分别检测 150 例人 HCC 和 136 例相对应的癌旁组织中 miR-23a 的变化;利用免疫组化两步法检测 XIAP 蛋白和 Ki-67 蛋白的表达水平。结果 HCC 组织和癌旁组织中 miR-23a 的高表达率分别为 48.7%(73/150)和 77.2%(105/136),两者差异有统计学意义($P=0.001$),XIAP 蛋白在 HCC 和癌旁组织中的高表达率分别为 25.3%(38/150)和 22.1%(30/136),两者差异无统计学意义;miR-23a 高表达率在患者中男性高于女性($P=0.037$)、HBsAg 阳性高于 HBsAg 阴性患者($P=0.022$)、大肝癌高于小肝癌($P=0.021$)、I~II 期高于 III~IV 期($P=0.002$);而 XIAP 蛋白高表达在患者中小肝癌高于大肝癌($P=0.001$)、I~II 期高于 III~IV 期($P=0.009$)。此外两者均与患者年龄、是否合并肝硬化、组织学分级无关。经 Pearson 相关检验,miR-23a 和 XIAP 蛋白在 HCC 中的表达呈显著负相关性($r_s=-0.308, P<0.01$)。结论 miR-23a 和 XIAP 可能参与 HCC 的发生与发展。

关键词 肝细胞癌;miR-23a;XIAP;免疫组化;原位分子杂交中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-1008-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.014

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是肝脏最常见的原发性恶性肿瘤,位居癌症致死原因的第三位^[1]。由于早期没有有效的肿瘤标志物,难以被发现,导致患者延误诊治。至今 HCC 的治疗尚无突破性进展。微小 RNA(miRNA,miR)是一大家族小分子非编码单链 RNA,大小约为 18~22 个核苷酸,可通过与其相应 mRNA 的 3'端非编码区域(3'-untranslated region,3'UTR)互补匹配,在转录后水平上抑制翻译,并且在生长发育、细胞分化、增殖、迁

移、凋亡等方面起重要作用^[1]。近年来研究^[2]显示 miRNA 在肿瘤细胞中异常表达,有些 miRNA 充当致癌基因,有的充当抑癌基因,miR-23a 作为 miRNA 其中的一种,亦参与多种肿瘤的发生与发展。X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein,XIAP)是 IAP 家族中的主要成员^[3],XIAP 通过直接抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)并可多途径调节细胞凋亡。该文主要探讨 miR-23a 和 XIAP 在 HCC 中的发生、发展中的作用及临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料 收集安徽医科大学第一附属医院病理教研室 2003 年~2007 年存档的 HCC 石蜡标本 150 例,所有患者术前未行放疗、化疗等抗肿瘤治疗。在 150 例石蜡标本中有 136 例同时包含癌旁组织。所有组织以 10% 中性福尔马林固定。依据 Edmondson-Steiner 分级系统进行病理分级。

1.2 主要试剂 XIAP 抗体(稀释度为 1:200)、Ki-67(稀释度为 1:300)购自美国圣克鲁斯公司;miR-23a 原位分子杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate,DEPC)购自美国 Sigma 公司;DAB 显色剂(ZLI-9018)购自北京中山金桥生物技术有限公司。

1.3 组织芯片制备 使用光镜定位器在 HE 染色切片上进行定位,选取代表性组织位点,每例供体标本选 3 个位点;使用组织芯片制备仪,取样针内径 1.5 mm,在相应组织蜡块上找到取样位置,通过取样、点样,每枚蜡块 7×8 点阵;以 4 μm 厚连续切片,敷贴于 10% 多聚赖氨酸预先处理的载玻片上。

1.4 方法 具体免疫组化和原位分子杂交操作步骤按试剂盒说明书进行,简要步骤如下:①免疫组化:烤片后依次通过二甲苯 I、II 及不同浓度梯度的乙醇脱蜡及水化,玻片加入柠檬酸盐缓冲液高压修复抗原,PBS 冲洗,后滴加 3% 双氧水孵育 10 min,PBS 缓冲液冲洗,加入一抗后 4℃ 冰箱过夜,复温后 PBS 冲洗,加入二抗孵育 20 min,PBS 冲洗,滴加 DAB 显色液,苏木精复染后显微镜下观察;②原位

2017-03-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81572305)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022

²安徽医科大学病理学教研室,合肥 230032

作者简介:马 伟,男,硕士研究生;

吴文涌,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

13805694400@126.com

杂交:烤片后将切片依次放入二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、70%酒精、DEPC水中,PBS冲洗后加入3%双氧水室温放置,然后用DEPC水冲洗,再加入3%柠檬酸胃蛋白酶消化,4%多聚甲醛固定,滴加预杂交液恒温4h,滴加miR-23a探针液40℃恒温箱16~20h,不同浓度柠檬酸钠缓冲液冲洗后滴加封闭液,然后滴加生物素化鼠地高辛及生物素过氧化物酶后,使用DAB显色、苏木精复染后观察。免疫组化及原位杂交均以已知阳性组织切片作为阳性对照,免疫组化以PBS代替一抗作阴性对照,原位杂交以预杂交液代替杂交液作为阴性对照。

1.5 原位杂交和免疫组化检测结果判定 miR-23a和XIAP染色结果判断归类为两级,分别为低表达组和高表达组,均以细胞质出现黄色或棕黄色颗粒为阳性染色。miR-23a结果判定在高倍显微镜下观察($\times 200$ 倍),每张切片随机计数3个,采用定性法:阳性细胞数 $<10\%$ 为低表达组,阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为高表达组;XIAP以每张切片随机计数3个低倍视野($\times 200$ 倍)的阳性细胞比例计算其平均百分比例, $\geq 25\%$ 定为XIAP高表达组,其余为XIAP低表达组;Ki-67结果判定为在高倍显微镜下观察($\times 200$ 倍),每张切片随机计数3个,阳性细胞数 $\geq 50\%$ 为阳性, $<50\%$ 为阴性^[4]。

1.6 统计学处理 采用SPSS 19.0软件进行分析。样本率之间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用Pearson相关检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-23a和XIAP蛋白在人HCC和癌旁组织中的表达情况 miR-23a和XIAP蛋白在HCC中的表达定位于HCC细胞质中(图1、2)。原位杂交结果表明150例HCC组织中miR-23a高表达率为48.7%(73/150),136例癌旁组织中miR-23a高表达率为77.2%(105/136),两者差异有统计学意义($P=0.001$);免疫组化结果表明XIAP蛋白在HCC和癌旁组织中的高表达率分别为25.3%(38/150)和22.1%(30/136),两者差异无统计学意义。见表1。

2.2 miR-23a和XIAP蛋白表达与HCC临床病理特征的关系 为了探究miR-23a和XIAP蛋白与HCC临床病理的关系,将HCC中miR-23a和XIAP蛋白高表达依据临床病理参数的不同进行分组,结果表明,miR-23a高表达率在患者中男性高于女性($P=0.037$)、HBsAg阳性高于HBsAg阴性患者($P=$

0.022)、大肝癌高于小肝癌($P=0.021$)、I~II期高于III~IV期($P=0.002$);而XIAP蛋白高表达在患者中小肝癌高于大肝癌($P=0.001$)、I~II期高于III~IV期($P=0.009$)。此外两者均与患者年龄、是否合并肝硬化、组织学分级及Ki-67增殖指数无关。见表2。

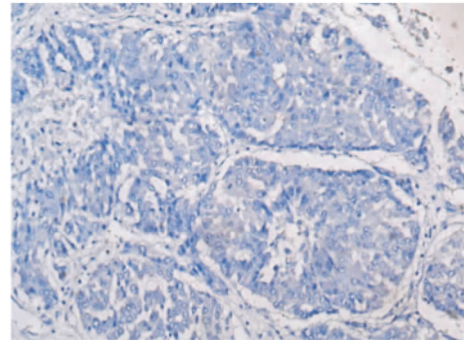


图1 HCC组织中miR-23a低表达 SP $\times 200$

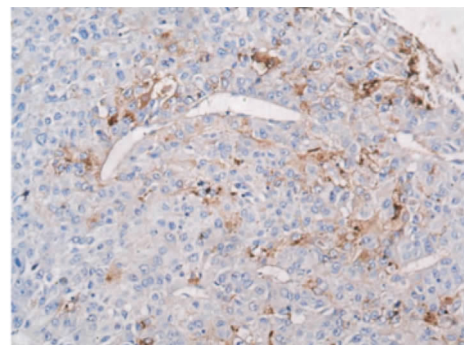


图2 HCC组织中XIAP蛋白高表达 SP $\times 200$

2.3 HCC中miR-23a和XIAP蛋白表达的相关性

为验证miR-23a和XIAP蛋白两者之间的关系,采用Pearson相关分析显示,miR-23a和XIAP蛋白在HCC中的表达呈显著负相关性($r_s = -0.308$, $P < 0.01$)。

3 讨论

随着研究的深入,越来越多的研究^[1]表明约30%的人类基因是miRNA的作用靶点,许多miRNA在HCC中表达失调。本研究结果表明miR-23a在HCC中呈低表达状态,而在癌旁组织中呈高表达,说明miR-23a可能在HCC中起到抑癌的作用。然而之前的研究表明其在胃癌^[5]、肝癌^[6]、结肠癌^[7]等肿瘤中呈高表达状态,可能起到促进肿瘤生长的作用,He et al^[8]研究发现,在骨肉瘤细胞中miR-23a通过结合RUNX2和CXCL12的3'UTR来

表 1 miR-23a 和 XIAP 在 HCC 组织和癌旁组织中的表达

项目	n	miR-23a			XIAP		
		高表达 [n(%)]	χ^2 值	P 值	高表达 [n(%)]	χ^2 值	P 值
癌旁组织	136	105 (77.2)	24.720	0.001	30 (22.1)	0.422	0.516
肝癌组织	150	73 (48.7)			38 (25.3)		

表 2 miR-23a 和 XIAP 与 HCC 癌患者临床病理参数之间的关系

临床病理参数	n	miR-23a			XIAP		
		高表达 [n(%)]	χ^2 值	P 值	高表达 [n(%)]	χ^2 值	P 值
年龄(岁)							
≤55	92	45 (48.9)	0.006	0.939	19(20.7)	2.756	0.097
>55	58	28(48.3)			19(32.8)		
性别							
男	126	66 (52.4)	4.349	0.037	30(23.8)	0.967	0.326
女	24	7(29.2)			8(33.3)		
肝硬化							
有	136	63 (46.3)	3.202	0.074	37(27.2)	2.701	0.100
无	14	10(71.4)			1(7.1)		
HBsAg							
阳性	120	64 (53.3)	5.230	0.022	30(25.0)	0.035	0.851
阴性	30	9(30.0)			8(26.7)		
肿瘤大小(cm)							
<5	44	15 (34.1)	5.295	0.021	25(56.8)	32.630	0.001
≥5	106	58(54.7)			13(12.3)		
组织学分级							
I	5	2(40.0)	0.408	0.815	1(20.0)	3.333	0.189
II	140	68(48.6)			34(24.3)		
III	5	3(60.0)			3(60.0)		
TNM 分期							
I ~ II	115	64(55.7)	9.627	0.002	35(30.4)	6.781	0.009
III ~ IV	35	9(25.7)			3(8.6)		
Ki-67							
<50%	60	29(48.3)	0.011	0.917	17(28.3)	0.278	0.598
≥50%	78	37(47.4)			19(24.4)		

调节 mRNA 和蛋白的表达 ,从而达到抑制肿瘤细胞生长 ,Koller et al^[9]证实了 miR-23a 在肾母细胞中处于低表达 ,且证明了 HOXB4 是其靶基因。本研究推测 miR23-a 在不同肿瘤细胞中表达不同的原因可能是 miR-23a 在各个肿瘤中的病理生理机制不同 ,以及所选肿瘤细胞系和肿瘤细胞培养环境不同引起的差异。Huang et al^[10]研究发现 ,在 HCC 细胞系中 ,雌激素可通过活化 miR-23a 和 p53 来诱导肝癌细胞凋亡阐明 miR-23a 表达在性别上的差异 ,这也同时说明 miR-23a 在 HCC 中可能起到抑癌的作用 ,而本研究结果显示 miR-23a 在男性患者中高表达率高于女性患者 ,这可能与本试验研究样本较小、单一中心取样有关。Li et al^[11]研究发现乙肝及 HCC 合并乙肝患者的血清中 miR-23a 表达升高 ,本实验显示 HCC 合并 HBsAg 阳性患者中 miR-23a 高表达率高于 HBsAg 阴性患者 ,这可能是因为 miR-23a 参与

慢性炎症的发生和发展有关。

研究^[4]显示 XIAP 在人类许多的肿瘤中呈高表达状态 ,可能起到促癌的作用 ,然而本研究的免疫组化试验结果显示 XIAP 在人 HCC 和癌旁组织中表达差异无统计学意义 ,这和 Sakemi et al^[12]研究结果是一致的 ,导致这种结果的原因可能是肿瘤本身因素或者试验环境造成的。Huang et al^[13]研究发现在异体移植的肿瘤模型上 ,XIAP 的缺失可抑制肿瘤生长 ,然而 XIAP 基因敲除的老鼠表现出正常的生长发育 ,并没有表现出明显的凋亡现象 ,说明具有抗凋亡功能的 XIAP 并非肿瘤生长所必须的。XIAP 功能及意义需待进一步研究。Siegel et al^[14]研究动物模型发现 ,XIAP 是 miR-23a 的靶基因 ,且在缺血的老鼠脑细胞中 ,miR-23a 通过结合 XIAP 的 3'UTR 来抑制后者的表达。Huang et al^[10]通过细胞转染发现 miR-23a 的降低可促进 XIAP 的表达 ,本研究也显示

两者呈显著负相关性,提示 miR-23a 可能负向调控 XIAP 蛋白的表达。

参考文献

- [1] Morishita A, Iwama H, Fujihara S, et al. MicroRNA profiles in various hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1687-92.
- [2] Yao D, Jiang Y, Gao S, et al. Deconvoluting the complexity of microRNAs in autophagy to improve potential cancer therapy [J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(5): 541-53.
- [3] Silke J, Vucic D. IAP family of cell death and signaling regulators [J]. *Methods Enzymol*, 2014, 545: 35-65.
- [4] Wu W Y, Kim H, Zhang C L, et al. Clinical significance of autophagic protein LC3 levels and its correlation with XIAP expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(8): 108.
- [5] Zhu L H, Liu T, Tang H, et al. MicroRNA-23a promotes the growth of gastric adenocarcinoma cell line MGC803 and downregulates interleukin-6 receptor [J]. *FEBS J*, 2010, 277(18): 3726-34.
- [6] Bao L, Zhao J, Dai X, et al. Correlation between miR-23a and onset of hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2014, 38(3): 318-30.
- [7] Yong F L, Wang C W, Roslani A C, et al. The involvement of miR-23a/APAF1 regulation axis in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 11713-29.
- [8] He Y, Meng C, Shao Z, et al. MiR-23a functions as a tumor suppressor in osteosarcoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(5): 1485-96.
- [9] Koller K, Das S, Leuschner I, et al. Identification of the transcription factor HOXB4 as a novel target of miR-23a [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(8): 709-15.
- [10] Huang F Y, Wong D K, Seto W K, et al. Estradiol induces apoptosis via activation of miRNA-23a and p53: implication for gender difference in liver cancer development [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34941-52.
- [11] Li L M, Hu Z B, Zhou Z X, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9798-807.
- [12] Sakemi R, Yano H, Ogasawara S, et al. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and XIAP-associated factor-1 expressions and their relationship to apoptosis in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous liver tissues [J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(1): 65-70.
- [13] Huang X, Wu Z, Mei Y, et al. XIAP inhibits autophagy via XIAP-Mdm2-p53 signalling [J]. *EMBO J*, 2013, 32(16): 2204-16.
- [14] Siegel C, Li J, Liu F, et al. miR-23a regulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) contributes to sex differences in the response to cerebral ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(28): 11662-7.

Expression of miR-23a and XIAP in hepatocellular carcinoma and their significance

Ma Wei¹, Wu Wenyong¹, Wu Zhengsheng² et al

(¹Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression and correlation of miR-23a and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in hepatocellular carcinoma (HCC) and their clinicopathological significance. **Methods** The expressions of miR-23a in 150 HCC and 136 adjacent tissues were detected by in situ hybridization. The expressions of XIAP and Ki-67 protein were detected by immunohistochemistry two-step method. **Results** The high expression rates of miR-23a were 48.7% (73/150) and 77.2% (105/136) in HCC tissues and adjacent non-cancerous tissues respectively, there was significant difference between the two groups ($P=0.001$). The high expression rates of XIAP were 25.3% (38/150) and 22.1% (30/136) in HCC tissues and adjacent non-cancerous tissues respectively, there was no significant difference between the two groups. The expression rate of miR-23a was higher in male than in female ($P=0.037$), HBsAg positive was higher than that of HBsAg negative patients ($P=0.022$), large hepatocellular carcinoma was higher than that of small hepatocellular carcinoma ($P=0.021$), and stage I ~ II was higher than that of stage III ~ IV ($P=0.002$). While the high expression of XIAP protein in patients with small hepatocellular carcinoma was higher than that of large hepatocellular carcinoma ($P=0.001$), the I ~ II stage was higher than III ~ IV stage ($P=0.009$). In addition, both of them had no correlation with age, liver cirrhosis and histological grading. The expression of miR-23a and XIAP protein in hepatocellular carcinoma was negatively correlated by Pearson's correlation ($r_s = -0.308$, $P < 0.01$). **Conclusion** miR-23a and XIAP may be involved in the development and progression of HCC.

Key words HCC; miR-23a; XIAP; immunohistochemistry; in situ hybridization