

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.025.html>

## Fra-1 在肝癌中的表达及其与 sAFP、血管侵犯的关系

高小强, 葛勇胜, 许戈良, 马金良, 英卫东, 余继海, 张传海, 刘文斌

**摘要** 目的 检测 Fra-1 在肝细胞性肝癌(简称肝癌)及癌旁组织中的表达情况,探讨其与肝癌病理特征间的关系。方法 采用免疫组化法检测 Fra-1 在 60 例肝癌及癌旁组织中的表达情况;采用 Western blot、实时定量 PCR(qRT-PCR)法检测 Fra-1 在 20 对冰冻肝癌及癌旁组织中的相对表达量。结果 免疫组化示 Fra-1 在肝癌组织细胞核中阳性表达率为 57%(34/60),细胞质中未见明显表达;而 Fra-1 在癌旁组织细胞质阳性表达率为 23%(14/60),细胞核中未见明显表达。Fra-1 在肝癌组织中的表达和血清甲胎蛋白(sAFP)、肿瘤血管侵犯相关( $\chi^2=4.538, 9.086, P<0.05$ ),而与肝癌患者的肿瘤包膜、肝癌 TNM 分期、Edmondson 分级等其他临床病理特征无明显相关性;Western blot 及 qRT-PCR 检测结果示肝癌组织中 Fra-1 的相对表达量高于癌旁组织( $P<0.01$ )。结论 Fra-1 与 sAFP 及肿瘤血管侵犯相关,提示 Fra-1 可能参与调控肝癌甲胎蛋白(AFP)的生成并影响肝癌的发展;为肝癌的诊治提供一些新的思路及理论基础。

**关键词** 肝细胞癌; Fra-1; AFP; 血管侵犯

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0575-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.025

肝细胞癌(简称肝癌)是原发性肝癌的主要类型,约占 70%~85%,在全球恶性肿瘤中排名第 5 位<sup>[1]</sup>。外科手术仍然是治疗肝癌的重要手段之一,然而术后较高复发率是影响患者生存的关键<sup>[2]</sup>。目前,对肝癌发生、发展的确切机制尚未完全明了,缺乏有效的预测指标。Fra-1 作为一种转录因子,是原癌基因 *fra-1* 的表达产物;研究<sup>[3-5]</sup>证实 Fra-1 在多种恶性肿瘤中阳性表达,其参与细胞增殖、分化、迁移等生物学过程,与肿瘤的发生发展密切相关。然而, Fra-1 与肝癌的关系鲜有报道。该研究通过实

验检测肝癌组织及癌旁组织中 Fra-1 的表达情况,初步探讨肝癌组织中 Fra-1 的表达及其与相关临床病理特征之间的关系和临床意义。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集安徽医科大学附属省立医院肝脏外科 2008 年 1 月~2011 年 12 月行肝切除术并经术后病理证实为肝细胞性肝癌的 60 例石蜡标本,切片行免疫组化染色检验,其中男 54 例,女 6 例;年龄 20~74(54.6±11.3)岁;血清甲胎蛋白(serum alpha fetal protein, sAFP)≤20 ng/ml 21 例, >20 ng/ml 39 例;肿瘤包膜完整者 36 例,不完整者 24 例;肝癌 TNM 分期: I~II 期 42 例, III~IV 期 18 例;肝癌 Edmondson I~II 级 37 例, III~IV 级 23 例;血管侵犯(镜下癌栓和肉眼癌栓) 34 例,无血管侵犯者 26 例;肿瘤转移者 25 例,无肿瘤转移者 35 例。选取安徽省立医院省重点实验室冰冻储存的术后病理证实为肝细胞癌的肝癌及癌旁组织共 20 例,行 Western blot 及 qRT-PCR 检验。所选患者术前均未行化疗、放疗、介入等抗肿瘤治疗;该研究资料获得患者及家属的书面同意及安徽医科大学医学伦理学委员会批准。

**1.2 主要试剂** 兔抗人单克隆抗体 Fra-1(美国 Abcam 公司);免疫组化 S 试剂盒、 $\beta$ -actin(北京中杉金桥公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司);ECL 超敏发光试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司);PCR 引物(上海生工生物工程公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 免疫组化** 运用 SP 法免疫组织化学染色,乙醇脱蜡水化,柠檬酸高温修复抗原,过氧化氢室温孵育 8 min 灭活过氧化物酶,加入兔抗人 Fra-1 单克隆抗体(1:150), 37℃孵育 90 min, PBS 冲洗 3 遍;二抗 37℃孵育 30 min, PBS 冲洗 3 遍,加入 DAB 显色,自来水冲洗 10 min,苏木精复染,乙醇脱水,使用中性树胶封片。

**1.3.2 Western blot 法检测** 取肝癌及癌旁组织,

2016-12-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272398);安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号:16040804011)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院肝脏外科,肝胆胰外科安徽省重点实验室,合肥 230001

作者简介:高小强,男,硕士研究生;

葛勇胜,男,博士,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: ahslyygs@163.com

加入 RIPA ,提取总蛋白 ,BCA 法蛋白定量测定 ,等量蛋白上样 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后转蛋白至 PVDF 膜上 ,Western 洗涤液漂洗蛋白膜 5 min ,脱脂奶粉室温摇床中封闭 ,Fra-1 一抗 (1 : 1 000) 4 °C 冰箱中孵育过夜 ,TBST 洗膜 3 次 ,二抗 (1 : 2 000) 37 °C 孵育 2 h; ECL 显影、定影; 结果拍照、扫描; 同法用鼠抗人  $\beta$ -actin 作内参对照; Fra-1 条带灰度值与  $\beta$ -actin 灰度值之比用于统计学分析。

**1.3.3 qRT-PCR 法检测** 提取肝癌与癌旁组织总 RNA ,合成 cDNA; PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C、5 s 60 °C、30 s ,共 40 个循环; Fra-1 荧光定量引物序列 F: 5'-AGCTTTGAGAAGCCTTCAGC-3' ,R: 5'-CCAAATACTCTCCCATTGGC-3' ,扩增产物长度: 172 bp;  $\beta$ -actin F: 5'-GGGAAATCGTGCCTGACATTAAGG-3' ,R: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAGAGTG-3' ,扩增产物长度为: 180 bp; Fra-1 mRNA 的表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行计算。

**1.4 免疫组化结果判定** 根据细胞染色的强度分级: 无染色 0 分、浅黄色 1 分、棕黄色 2 分、棕褐色 3 分; 根据阳性细胞所占比例分级: 低倍视野下 (100 倍) 每例随机选取 5 个不重叠视野 ,高倍视野下 (200 倍) 计  $5 \times 10^2$  细胞中阳性细胞所占百分比; 阳性细胞比例  $\leq 10\%$  计 0 分 ,11% ~ 25% 计 1 分 ,26% ~ 50% 计 2 分 ,51% ~ 75% 计 3 分 ,76% ~ 100% 计 4 分。两者评分乘积  $\geq 2$  分为阳性; 免疫组化综合评分由两位对患者病历资料不知情且经验丰富的病理科医师进行。

**1.5 统计学处理** 使用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示 ,用  $t$  检验分析; 分类资料用  $\chi^2$  检验分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Fra-1 在肝癌及癌旁组织中的表达情况

Western blot 示肝癌组织中 Fra-1 的相对表达量 ( $1.39 \pm 0.37$ ) 高于癌旁组织 ( $0.76 \pm 0.28$ ) ,差异有统计学意义 ( $t = 0.061$  , $P < 0.01$ ) ,见图 1; qRT-PCR 结果示: 肝癌组织中 Fra-1 mRNA 相对表达量 ( $2.96 \pm 1.76$ ) 高于癌旁组织 ( $1.17 \pm 0.73$ ) ,差异有统计学意义 ( $t = 4.188$  , $P < 0.01$ ) 。免疫组化结果显示 ,Fra-1 在肝癌组织细胞核中的阳性表达率为 57% (34/60) ,细胞质中未见明显表达; Fra-1 在癌旁组织细胞质中的阳性表达率为 23% (14/60) ,细胞核

中未见明显表达 ,见图 2。

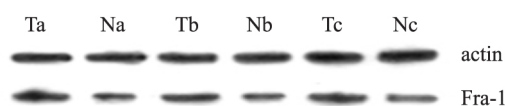


图 1 肝癌及癌旁组织中 Fra-1 蛋白的表达  
T: 肝癌组织; N: 癌旁组织; a、b、c: 3 组配对的肝癌与癌旁组织

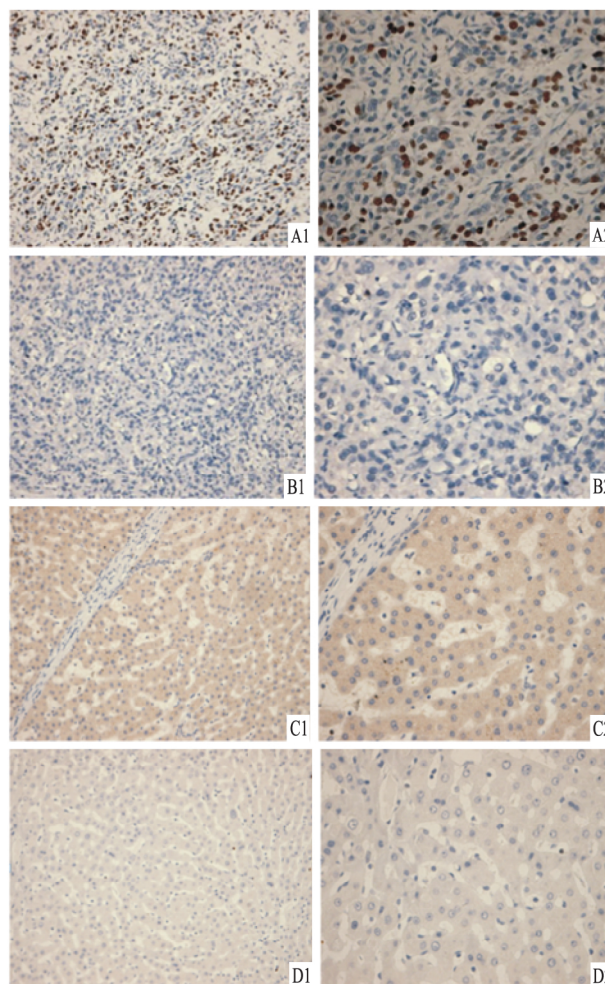


图 2 免疫组化染色检测 Fra-1 在肝癌和癌旁组织中的表达

A: 肝癌组织中 Fra-1 阳性表达; B: 肝癌组织中 Fra-1 阴性表达; C: 癌旁组织中 Fra-1 阳性表达; D: 癌旁组织中 Fra-1 阴性表达; 1:  $\times 200$ ; 2:  $\times 400$

### 2.2 Fra-1 在肝癌组织中的表达和临床病理特征间的关系

Fra-1 在肝癌组织中的表达与 sAFP 及肿瘤血管侵犯相关 ( $\chi^2 = 4.538, 9.086$  , $P < 0.05$ ) ,而与患者性别、年龄、TNM 分期、肿瘤有无包膜、肿瘤 Edmondson 分级、乙肝表面抗原 (HBsAg) 、肿瘤转移、肝硬化、肿瘤数目等临床病理特征无明显相关性 ,见表 1。

表1 Fra-1 的表达与临床病理特征之间的关系(n)

临床因素	n	Fra-1		$\chi^2$ 值	P 值
		阴性	阳性		
性别					
男	54	25	29	0.113	0.339
女	6	1	5		
年龄(岁)					
≤50	19	6	13	1.564	0.211
>50	41	20	21		
AFP(ng/ml)					
≤20	21	13	8	4.538	0.033
>20	39	13	26		
HBsAg					
阳性	50	22	28	0.000	1.000
阴性	10	4	6		
肿瘤数目(个)					
1	47	21	26	0.016	0.689
≥2	13	5	8		
肿瘤直径(cm)					
≤5	27	14	13	1.451	0.228
>5	33	12	21		
肿瘤包膜					
完整	36	15	21	0.102	0.750
不完整或无	24	11	13		
血管侵犯					
阳性	34	9	25	9.086	0.003
阴性	26	17	9		
肿瘤转移					
阳性	25	9	16	0.939	0.333
阴性	35	17	18		
TNM 分期					
I ~ II	42	19	23	0.207	0.649
III ~ IV	18	7	11		
Edmondson 分级					
I ~ II	37	18	19	1.111	0.292
III ~ IV	23	8	15		

### 3 讨论

AP-1 是由 Jun 和 Fos 构成的二聚体, Jun 家族由 c-Jun、JunB 和 JunD 3 个成员组成, Fos 家族由 c-Fos、FosB、Fra-1 及 Fra-2 4 个成员组成, AP-1 作为转录因子, 通过调控下游基因的转录, 引发一系列基因的表达。Fra-1 是位于染色体 11q13 原癌基因 Fra-1 的表达产物, 由 271 个氨基酸构成, 与 Jun 家族表达产物构成异源二聚体 AP-1<sup>[6]</sup>, 在胚胎发育及骨形成过程中发挥重要作用。研究<sup>[3-5]</sup>证实 Fra-1 在多种恶性肿瘤中高表达, 与肿瘤细胞的增殖、分化、迁移、EMT 转化等生物学特征相关。

研究<sup>[7]</sup>显示 Fra-1 可上调乳腺癌细胞表面黏附分子的表达, 增强癌细胞与血管内皮的黏附, 促进癌细胞的血管侵犯及转移。研究<sup>[8]</sup>显示 Fra-1 可促进

乳腺癌细胞中 MMP-1 的表达, 增加乳腺癌细胞的血管侵犯性及转移性。上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 使正常上皮细胞转变为具有较高增殖性、迁移、抗凋亡等能力的间充质细胞表型; 研究<sup>[9]</sup>显示 EMT 与肿瘤的发生发展密切相关。Bakiri et al<sup>[10]</sup>研究证实: Fra-1 通过调节 Zeb1/2 和 TGF $\beta$  的表达, 促进乳腺上皮细胞进行 EMT 转化, 促进乳腺癌细胞的血管侵犯及癌症的发展进程。研究<sup>[11]</sup>显示沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 1 通过调节 Fra-1 的表达, 促进结肠癌细胞的 EMT 转变, 抑制癌细胞凋亡, 促进其迁移、侵袭, 影响结肠癌预后。Zhang et al<sup>[12]</sup>研究证实: AP-1 作为一种转录因子, 可以通过与甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP) 编码基因的启动子相结合而促进 AFP 的表达。

本研究通过免疫组化染色、qRT-PCR、Western blot 法检测肝癌及癌旁组织中 Fra-1 的表达情况, 结果显示 Fra-1 在肝癌组织中主要在细胞核中表达, 且其在肝癌组织中的相对表达量高于癌旁组织。Fra-1 的表达与肝癌患者 sAFP 及血管侵犯相关, 而与患者年龄、性别、有无包膜、TNM 分期、Edmondson 分级等无相关性。Fra-1 作为一种重要的转录因子, 参与组成 AP-1 二聚体, 推测 Fra-1 可与其下游基因启动子结合, 调控其下游相关基因转录, 上调肝癌细胞表面黏附分子、MMP-1 等与肿瘤侵袭相关蛋白的表达, 并促进肝癌细胞的 EMT 转变, 增加癌细胞的移动性、侵袭性, 促进血管侵犯的发生。Fra-1 在肝癌组织中的过度表达也可能通过促进 AP-1 异源二聚体的形成, 结合下游 AFP 编码基因启动子, 促进 AFP 编码基因的转录, 上调其表达, 导致 sAFP 水平升高。本研究仅初步证实 Fra-1 参与了肝癌的恶性进程, 但其具体的作用靶点、调控机制、信号通路等相关问题尚需进一步探究, 将来有可能作为一种新的肝癌治疗靶点, 为肝癌的诊治提供新的方向与理论依据。

### 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin 2011 61(2): 69-90.
- [2] Fan S T, Mau Lo C, Poon R T, et al. Continuous improvement of survival outcomes of resection of hepatocellular carcinoma: a 20-year experience[J]. Ann Surg 2011 253(4): 745-58.
- [3] Zhong G, Chen X, Fang X, et al. Fra-1 is upregulated in lung

- cancer tissues and inhibits the apoptosis of lung cancer cells by the p53 signaling pathway [J]. *Oncol Rep* 2016 35(1):447-53.
- [4] Iskit S, Schlicker A, Wessels L, et al. Fra-1 is a key driver of colon cancer metastasis and a Fra-1 classifier predicts disease-free survival [J]. *Oncotarget* 2015 6(41):43146-61.
- [5] Oliveira-Ferrer L, Kürschner M, Labitzky V, et al. Prognostic impact of transcription factor Fra-1 in ER-positive breast cancer: contribution to a metastatic phenotype through modulation of tumor cell adhesive properties [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015 141(10):1715-26.
- [6] El-Serag H B, Rudolph K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology* 2007, 132(7):2557-76.
- [7] Oliveira-Ferrer L, Kürschner M, Labitzky V, et al. Prognostic impact of transcription factor Fra-1 in ER-positive breast cancer: contribution to a metastatic phenotype through modulation of tumor cell adhesive properties [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015 141(10):1715-26.
- [8] Henckels E, Prywes R. Fra-1 regulation of Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) in metastatic variants of MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *F1000Res* 2013 2:229.
- [9] Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance [J]. *Cancer Sci* 2010 101(2):293-9.
- [10] Bakiri L, Macho-Maschler S, Cusic I, et al. Fra-1/AP-1 induces EMT in mammary epithelial cells by modulating Zeb1/2 and TGF $\beta$  expression [J]. *Cell Death Differ* 2015 22(2):336-50.
- [11] Cheng F, Su L, Yao C, et al. SIRT1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer by regulating Fra-1 expression [J]. *Cancer Lett* 2016 375(2):274-83.
- [12] Zhang X K, Dong J M, Chiu J F. Regulation of alpha-fetoprotein gene expression by antagonism between AP-1 and the glucocorticoid receptor at their overlapping binding site [J]. *J Biol Chem* 1991 266(13):8248-54.

## The expression of Fra-1 in hepatocellular carcinoma and its relationship with sAFP and vascular invasion

Gao Xiaoqiang, Ge Yongsheng, Xu Geliang, et al

(Dept of Hepatic Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Anhui Province Key Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To detect the expression of Fra-1 in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and their corresponding peritumorous tissues, as well as its clinical significance. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of Fra-1 in 60 cases of HCC tissues and their corresponding peritumorous tissues. Western blot and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) were used to assess the relative expression levels of Fra-1 in 20 pairs of frozen HCC tissues and their corresponding peritumorous tissues. **Results** Immunohistochemical staining showed that the positive expression rate of Fra-1 in the nucleus of the 60 HCC tissues was 57%, which appeared almost 0 in the cytoplasm. The positive expression rate of Fra-1 in the cytoplasm of the peritumorous tissues was 23%, which appeared almost 0 in the nucleus. The expression of Fra-1 in tumor cells was related to sAFP (serum alpha fetal protein) and vascular invasion ( $\chi^2 = 4.538$ ,  $P = 0.086$ ,  $P < 0.05$ ), while not to the other clinical pathological features such as tumor capsule, TNM stage and Edmondson classification. The results of Western blot and qRT-PCR showed that the expression level of Fra-1 in HCC tissues was higher than their corresponding adjacent tissues ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Fra-1 is related to sAFP and vascular invasion, which shows that Fra-1 may be involved in the formation of AFP and affect the development of HCC. It may provide some new insight and theoretical basis for the diagnosis and treatment of HCC.

**Key words** hepatocellular carcinoma; Fra-1; AFP; vascular invasion