

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00215

## HMGA2 在原发性肝细胞癌中表达的临床意义

### HMGA2 expression in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

刘蓓<sup>1</sup>, 王琼<sup>1</sup>, 贺玉娟<sup>1</sup>, 曾桃英<sup>1</sup>, 刘辉<sup>2\*</sup>

1. 武汉科技大学附属天佑医院病理科, 武汉 430064

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外科, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 探讨 HMGA2 在原发性肝癌中的表达及其与原发性肝癌患者临床资料间的关系。**方法** 通过 RT-PCR 检测 HMGA2 mRNA 在肝癌组织及正常肝组织中的表达, 蛋白质印迹分析、免疫组化分别检测 HMGA2 蛋白在肝癌组织及正常肝组织中的表达水平, 分析 HMGA2 蛋白的表达与肝癌患者临床资料之间的相关性。**结果** HMGA2 mRNA 在肝癌组织中的阳性表达率为 43.69%, 高于在正常肝组织中 23.30% 的阳性表达率, 其在肝癌组织中的相对表达值为  $0.71 \pm 0.03$ , 高于其在正常肝组织中  $0.28 \pm 0.04$  的相对表达值 ( $P < 0.05$ )。HMGA2 蛋白在肝癌组织中的相对表达值为  $0.56 \pm 0.04$ , 高于其在正常肝组织中  $0.19 \pm 0.03$  的相对表达值 ( $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示 HMGA2 蛋白在正常肝组织中阳性表达率为 20.39%, 明显低于其在肝癌组织中 37.86% 的阳性表达率 ( $P < 0.05$ ), HMGA2 蛋白的表达与肝癌患者性别和肿瘤大小无关 ( $P > 0.05$ ), 但与淋巴结转移数量、肝内转移以及临床分期相关 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论** HMGA2 在肝癌组织中高表达, 且其高表达与肝癌的淋巴结转移数量、肝内转移及临床分期紧密相关, 可作为肝癌转移和恶化的肿瘤标志物。

**[关键词]** HMGA2 蛋白; 肝肿瘤; 肿瘤转移; 癌基因

**[中图分类号]** R 735.7

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0215-03

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 世界每年 42.5% 的新发肝癌发生在我国, 由于缺乏早期诊断, 近 20 年来我国肝癌的病死率增加了 41.17%, 肝癌已成为我国第 2 位的肿瘤疾病<sup>[1-2]</sup>。因此, 阐明肝癌发生、发展的潜在分子生物学机制可能对肝癌早期诊断及寻求更多有效的治疗方法有帮助。高迁移率蛋白 A (high mobility group A, HMGA) 是一种广泛参与细胞各种生理活动的蛋白质, 在早期的胚胎组织中含量很丰富, 而在大部分的成体细胞中含量却相对较少, 主要由以下 4 种已知的成员组成: HMGA1a、HMGA1b、HMGA1c 和 HMGA2, 其主要生理功能包括可诱导性基因转录的调控、将反转录病毒整合到染色体上、诱导转化及促进癌细胞活化等。其中 HMGA2 则是单独由 HMGA2 基因编码的蛋白质。近来研究发现 HMGA2 在一些上皮源性恶性肿瘤中如肺癌<sup>[3]</sup>、胰腺癌<sup>[4]</sup>、白血病<sup>[5]</sup>和神经内分泌瘤<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>等肿瘤组织中表达增高, 对恶性肿瘤的生长、分化、转移起重要作用。目前关于 HMGA2 在肝癌中的表达及其与肝癌患者临床资料间的相关性研究尚未见报道, 为此我们探讨 HMGA2 在肝癌组织内的表达特征及临床意义, 为进一步研究 HMGA2 在肝癌发生发展中的作用机制提供依据并为其新的临床应用进行有益的探索。

### 1 材料和方法

1.1 临床资料 收集 2008 年 4 月至 2009 年 4 月第二军医

大学东方肝胆外科医院原发性肝癌患者手术切除标本 103 例, 所有标本均在手术切除后 30 min 内切取适当大小保存于液氮中, 患者年龄 19~72 岁, 平均 ( $54 \pm 6.2$ ) 岁, 男 64 例, 女 39 例。其中 I~II 期 50 例, III~IV 期 53 例。以同一肝癌患者肝癌组织手术切缘旁组织作为正常对照, 所有标本均经术后病理确诊。

1.2 RT-PCR 检测 取适量保存于液氮中的肝癌组织, 在液氮中研磨成粉末状后, 加入适量 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取组织总 RNA, 取 2  $\mu$ g 总 RNA 反转录后进行 HMGA2 基因 PCR 扩增, 正向引物: 5'-CAC TTC AGC CCA GGG ACA A-3', 反向引物: 5'-AAT TCG GTT TTT CTC ACC CG-3', 扩增片段大小为 651 bp; 以 GAPDH 为内参照扩增, 正向引物: 5'-AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA-3', 反向引物: 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3', 扩增片段大小为 587 bp。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳后拍照并进行灰度扫描。

1.3 蛋白质印迹法检测 取适量保存于液氮中的肝癌组织, 匀浆处理后加入 200  $\mu$ l 细胞裂解液提取组织总蛋白<sup>[8]</sup>, 取 20  $\mu$ l 蛋白质样品进行 SDS-PAGE, 电泳结束后将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 加 1:1 000 稀释的抗 HMGA2 单克隆抗体 (Abcam 公司) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,

**[收稿日期]** 2009-06-01 **[接受日期]** 2009-11-02

**[基金项目]** 上海市卫生局青年科研基金(2008Y077), 国家高科技研究发展计划 (“863”计划)(2007AA022004). Supported by Fund for Youth of Health Bureau of Shanghai Municipal Government(2008Y077) and National High-tech R&D Program (“863” Program, 2007AA022004).

**[作者简介]** 刘蓓, 硕士生, 主治医师. E-mail: liubei1976@126.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-65389998, E-mail: liuhuigu@hotmail.com

1×PBS洗涤3次,加入1:2 000稀释的辣根过氧化物酶标记的抗人IgG多克隆抗体(Abcam公司)孵育20 min,然后用Pierce ECL 荧光试剂检测蛋白,以β-actin为内参照。

**1.4 免疫组化检测及阳性结果判定** 每个蜡块取4 μm厚连续切片做免疫组化染色。鼠抗人HMGA2单克隆抗体购自美国Abcam公司,PV-9000免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。检测肝癌组织中HMGA2的表达按试剂盒操作说明进行。先对组织切片进行常规脱蜡、水化,然后用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>去离子水孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶的干扰。EDTA(pH 8.0)修复液微波常规修复,待其自然冷却,1×PBS清洗后滴加100 μl鼠抗人HMGA2(1:100稀释),4℃孵育过夜,然后PBS冲洗,2 min×3次。滴加试剂盒中的试剂1,37℃孵育20 min,1×PBS冲洗,2 min×3次,然后滴加试剂盒中的试剂2,37℃孵育20~30 min,PBS冲洗,2 min×3次。最后DAB显色10 min,终止显色,苏木精复染,盐酸乙醇固定,封片并观察。以1×PBS代替一抗作阴性对照。

利用光学显微镜观察到组织标本的着色程度判定免疫组化结果。HMGA2蛋白阳性表达主要表现为细胞核内含棕黄色或者棕褐色颗粒。高倍镜下(×200)随机取8个不同的视野,计数细胞总数及核阳性细胞数,按阳性细胞所占百分比计分:阳性细胞率≤5%计0分,5%<阳性细胞率≤25%计1分,25%<阳性细胞率≤50%计2分,50%<阳性细胞率≤75%计3分,阳性细胞率>75%计4分;同时,根据染色的强弱程度计分:阴性染色计0分,弱染色计1分,中等强度染色计2分,强染色计3分;根据两者之和判定:0分为(-),1~2分为(+),3~4分为(++),5~6分为(+++),7分为(++++)。统计分析时(-)为阴性,(+)和(++)合计弱阳性表达,(+++和(++++))合计为强阳性表达。以上结果均至少由2位病理医师双盲法观察并确定。

**1.5 统计学处理** 采用SPSS 11.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验;计数资料采用 $\chi^2$ 检验、四格表概率法及计数资料的相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HMGA2 mRNA在原发性肝细胞癌组织中的表达** 为检测HMGA2在肝癌组织中的表达分布,我们首先采用RT-PCR检测HMGA2 mRNA在肝癌组织、正常肝组织中的表达。检测发现,HMGA2 mRNA在部分肝癌组织中的表达明显升高,在正常组织中不表达或者弱表达;对琼脂糖凝胶电泳图像进行灰度扫描,HMGA2在肝癌组织中的相对表达值为 $0.71 \pm 0.03$ ,在正常组织中的表达为 $0.28 \pm 0.04$ ,差异有显著统计学意义( $P < 0.05$ ,图1)。HMGA2 mRNA在肝癌组织和正常肝组织中的阳性表达率分别为43.69%(45/103)和23.30%(24/103),差异有显著统计学意义( $\chi^2 = 9.610, P < 0.05$ )。

**2.2 蛋白质印迹分析检测结果** HMGA2蛋白在正常肝癌组织中表达很低或者不表达,在部分肝癌组织中表达明显增强,在肝癌组织中的阳性表达率为37.86%(39/103),

HMGA2蛋白在肝癌组织中的相对表达为 $0.56 \pm 0.04$ ,在正常肝组织中的相对表达为 $0.19 \pm 0.03$ ,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图2)。

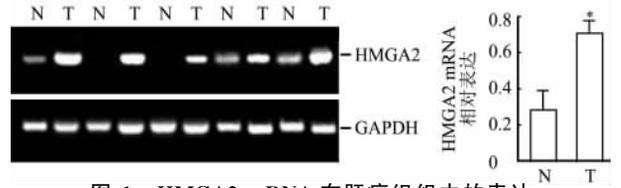


图1 HMGA2 mRNA在肝癌组织中的表达

N:正常肝组织,T:肝癌组织。\* $P < 0.05$ 与正常肝组织比较; $n = 103, \bar{x} \pm s$

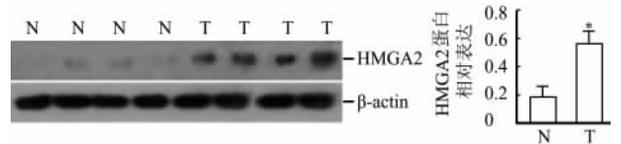


图2 HMGA2蛋白在肝癌组织中的表达

N:正常肝组织,T:肝癌组织。\* $P < 0.05$ 与正常肝组织比较; $n = 103, \bar{x} \pm s$

**2.3 免疫组织化学检测结果** 免疫组化分析发现,HMGA2蛋白为核表达蛋白,在正常肝组织中表达阳性率为20.39%(21/103),其阳性表达见图3B,而在肝癌组织中的表达阳性率为37.86%(39/103),其阳性表达见图3C、3D。HMGA2蛋白在肝癌组织中阳性率明显高于其在正常肝组织中的阳性率,两者差异有统计学意义( $P = 0.0058$ )。

**2.4 HMGA2蛋白表达与肝癌患者临床资料的相关性分析** 将HMGA2蛋白与肝癌肿瘤大小、患者性别、淋巴结转移以及临床分期进行相关性分析,发现HMGA2蛋白的表达与肝癌患者性别和肿瘤大小无关( $P > 0.05$ ),与淋巴结转移数量、肝内转移以及临床分期相关( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),见表1。

## 3 讨论

HMG蛋白是由HMGA基因编码的一类与染色体结合的非组蛋白家族,因其在聚丙烯酰胺中电泳迁移率快而得名<sup>[9]</sup>。其中HMGA2是HMGA家族成员之一,由109个氨基酸组成,由位于12q13-15的HMGA2基因编码。HMGA2蛋白含3个AT-沟结合域,一旦与染色体DNA小沟内AT丰富的短序列结合,立即启动转录因子,并与转录因子协同作用调节靶基因的转录<sup>[10]</sup>。正常情况下,HMGA表达水平在胚胎时期是最高的,而在高度分化或非分裂的成熟细胞和组织中多表达减少或检测不出<sup>[10]</sup>。越来越多的证据<sup>[11-13]</sup>显示HMGA2的过表达与恶性肿瘤的发病机制相关,其在肿瘤组织中可能是通过发挥转录因子的功能,参与调节恶性肿瘤的发生发展。

本研究中我们通过RT-PCR和蛋白质印迹法检测HMGA2在肝癌及癌旁正常肝组织中的表达发现,HMGA2在癌旁正常肝组织中不表达或者低表达,其相对表达量(mRNA: $0.28 \pm 0.04$ ;蛋白质: $0.19 \pm 0.03$ )与其在肝癌组织中的表达量相比,后者中的表达量明显增高(mRNA: $0.71 \pm$

0.03;蛋白质:0.56±0.04),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。同时 HMGA2 在肝癌组织中的阳性表达率明显高于其在正

常肝组织中的阳性表达率,差异也有统计学意义( $P<0.05$ ),提示 HMGA2 的表达可能与肝癌的发生有一定关系。

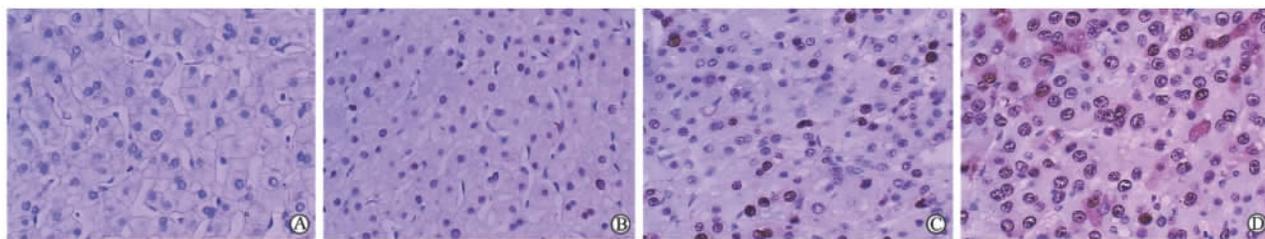


图3 免疫组化检测 HMGA2 蛋白在肝癌组织中的表达

A: HMGA2 蛋白在正常肝组织中不表达;B: HMGA2 蛋白在正常肝组织中低表达; C: HMGA2 蛋白在肝癌组织中低表达; D: HMGA2 蛋白在肝癌组织中高表达. Original magnification: ×200

表1 HMGA2 蛋白与肝癌患者临床资料的相关性分析

	HMGA2 蛋白表达		$\chi^2$	P
	阴性	阳性		
患者例数	56	47		
性别				
男	35	29	0.007	0.934
女	21	18		
肿瘤大小				
<5 cm	27	28	1.325	0.250
≥5 cm	29	19		
淋巴结转移数量				
<2	31	15	11.70	0.017
≥2	25	32		
肝内转移				
有	23	34	10.11	0.002
无	33	13		
临床分期				
I~II	35	15	9.570	0.002
III~IV	21	32		

进一步免疫组化检测发现, HMGA2 蛋白主要在细胞核中表达, 在肝癌组织中的阳性表达率(37.86%)明显高于在正常肝组织中阳性表达率(20.39%), 两组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。分析 HMGA2 表达与肝癌患者临床资料的关系, 发现其与淋巴结转移数量和肝内转移相关( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 提示 HMGA2 的表达与肝癌的进展可能有一定关系。同时发现 HMGA2 在 III~IV 期肝癌患者中的阳性表达率明显高于其在 I~II 期肝癌患者中的阳性表达率( $P<0.01$ ), 进一步提示 HMGA2 的表达可能与肝癌的发生、发展密切相关。

综上所述, HMGA2 基因及蛋白在肝癌组织中表达明显增加, 且与淋巴结转移、肝内转移及肝癌的临床分期密切相关, 说明 HMGA2 在肝癌的进展中起重要作用, 提示 HMGA2 有可能作为肝癌肿瘤标志物用于肝癌的监测甚至作为肝癌治疗的靶分子, 用于肝癌的生物治疗。

[参考文献]

[1] Kudo M. Hepatocellular carcinoma 2009 and beyond: from the surveillance to molecular targeted therapy[J]. *Oncology*, 2008, 75(Suppl 1):1-12.  
 [2] Caldwell S, Park S H. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor bi-

ology[J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44(Suppl 19):96-101.  
 [3] Di Cello F, Hillion J, Hristov A, Wood L J, Mukherjee M, Schuldenfrei A, et al. HMGA2 participates in transformation in human lung cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6:743-750.  
 [4] Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, Matsumoto N, Masaki T, Mori T, et al. An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue[J]. *Br J Cancer*, 2003, 89:2104-2109.  
 [5] Meyer B, Krisponeit D, Junghans C, Murua Escobar H, Bullerdiek J. Quantitative expression analysis in peripheral blood of patients with chronic myeloid leukaemia: correlation between HMGA2 expression and white blood cell count[J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48:2008-2013.  
 [6] Rahman M M, Qian Z R, Wang E L, Sultana R, Kudo E, Nakasono M, et al. Frequent overexpression of HMGA1 and 2 in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours and its relationship to let-7 downregulation[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100:501-510.  
 [7] Jones A M, Mitter R, Poulson R, Gillett C, Hanby A M, Tomlinson I P, et al. mRNA expression profiling of phyllodes tumours of the breast: identification of genes important in the development of borderline and malignant phyllodes tumours [J]. *J Pathol*, 2008, 216:408-417.  
 [8] Rho Y S, Lim Y C, Park I S, Kim J H, Ahn H Y, Cho S J, et al. High mobility group HMGI(Y) protein expression in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127:76-81.  
 [9] Cleyne I, Van de Ven W J. The HMGA proteins: a myriad of functions[J]. *Int J Oncol*, 2008, 32:289-305.  
 [10] Rawlinson N J, West W W, Nelson M, Bridge J A. Aggressive angiomyxoma with t(12;21) and HMGA2 rearrangement: report of a case and review of the literature[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008, 181:119-124.  
 [11] Hristov A C, Cope L, Reyes M D, Singh M, Iacobuzio-Donahue C, Maitra A, et al. HMGA2 protein expression correlates with lymph node metastasis and increased tumor grade in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22:43-49.  
 [12] Venkatesan N, Kandalam M, Pasricha G, Sumantran V, Manfioletti G, Ono S J, et al. Expression of high mobility group A2 protein in retinoblastoma and its association with clinicopathologic features[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 31:209-214.  
 [13] Watanabe S, Ueda Y, Akaboshi S, Hino Y, Sekita Y, Nakao M. HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174:854-868.