

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00842

## 肝细胞癌组织中 ZEB-1 的表达及意义

杨晓宇<sup>1</sup>, 范飞<sup>2</sup>, 付晓辉<sup>1</sup>, 李爱军<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院特需治疗二科, 上海 200438
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院胆道二科, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 探讨 ZEB-1 在肝细胞癌(HCC)组织中的表达及意义。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法和蛋白质印迹分析法检测 ZEB-1 在 62 例 HCC 组织、48 例相应癌旁肝硬化组织和 10 例正常肝组织中的表达, 并分析其与 HCC 临床病理特征的关系。**结果** 免疫组化结果显示 ZEB-1 在 HCC 组织及癌旁肝硬化组织中呈阳性表达, 阳性率分别为 93.5%(58/62)和 83.3(40/48)。蛋白质印迹分析显示 ZEB-1 蛋白在 HCC 组织中的表达高于相应癌旁肝硬化组织和正常肝组织 ( $P < 0.05$ )。ZEB-1 在 HCC 组织中的表达与临床分期、肿瘤分化程度、有无发生转移、有无门脉癌栓及有无术后复发等因素相关 ( $P < 0.05$ ), 与肿瘤直径、肿瘤数目、血清 AFP 水平等因素无关 ( $P > 0.05$ )。**结论** ZEB-1 的高表达与肝癌的发生、发展密切相关, 并且有可能参与 HCC 细胞的上皮间质转化而促进肝癌的侵袭和转移。

**[关键词]** 肝肿瘤; 肝细胞癌; ZEB-1; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)08-0842-04

### Expression of ZEB-1 in hepatocellular carcinoma tissues and its significance

YANG Xiao-yu<sup>1</sup>, FAN Fei<sup>2</sup>, FU Xiao-hui<sup>1</sup>, LI Ai-jun<sup>1\*</sup>

1. Department of Special Treatment II, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Biliary Tract Surgery II, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate ZEB-1 protein expression in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and the relevant significance. **Methods** Immunohistochemical method and Western blotting analysis were used to detect the ZEB-1 protein expression in 62 HCC tissues, 48 paracancerous cirrhotic tissues and 10 normal liver tissues. The relationship between ZEB-1 protein expression and clinicopathological features of HCC was evaluated. **Results** Immunohistochemical staining showed that the positive rates of ZEB-1 protein expression in HCC tissues and paracancerous cirrhotic tissues were 93.5% (58/62) and 83.3 (40/48), respectively. Western blotting analysis showed that ZEB-1 protein expression in HCC tissues was significantly higher than those in the paracancerous cirrhotic tissues and normal liver tissues ( $P < 0.05$ ). We also found that ZEB-1 expression was significantly correlated with the clinical stage, tumor differentiation degree, metastasis, portal vein tumor thrombus and postoperative recurrence ( $P < 0.05$ ), and was not correlated with the tumor diameter, number of tumors, or serum AFP levels ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** High expression of ZEB-1 is correlated with the development and progression of HCC. ZEB-1 might also participate in the epithelial-mesenchymal transition of HCC cells, subsequently contributing to the invasion and metastasis.

**[Key words]** liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; paracancerous tissue; ZEB-1; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8): 842-845]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一。高复发转移性是影响预后及其致死的最主要原因<sup>[1-4]</sup>。锌指 E-盒结合同源异形盒 1 (zinc finger E-box binding homeobox 1,

ZEB-1) 是一个非受体转录因子, 又称为 TCF8、AREB6、zfhep、zfhx1a、BZP、Nil-2-a、deltaEF1, 位于人类 10 号染色体短臂上, 编码序列全长 3 327 bp, 编码 1 108 个氨基酸, 其结构包含有 2 个锌指结构簇及 1 个

**[收稿日期]** 2012-05-24 **[接受日期]** 2012-07-11

**[基金项目]** 国家科技重大专项 (2008ZX10002-025). Supported by National Major Science and Technology Project of China (2008ZX10002-025).

**[作者简介]** 杨晓宇, 硕士, 住院医师. E-mail: brian1979627@hotmail.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875531, E-mail: ajli62@smmu.edu.cn

同源结构域。研究发现它在多种细胞系中可以抑制多种基因的表达<sup>[5]</sup>,在肿瘤的发生发展及肿瘤细胞的侵袭转移过程中扮演重要角色<sup>[6]</sup>。

本研究应用免疫组化技术和蛋白质印迹法检测 HCC 及癌旁组织中 ZEB-1 蛋白的表达,并探讨其与 HCC 临床病理学特征的关系。

## 1 材料和方法

1.1 临床资料 62 例 HCC 和相应 48 例癌旁肝硬化组织取自我院 2006 年 1 月至 2012 年 1 月间的手术切除标本,术后石蜡包埋,经病理证实为 HCC 以及肝硬化。62 例 HCC 患者年龄 32~65 岁,中位年龄 48 岁;10 例正常肝组织为肝血管瘤患者手术切除样本,患者年龄 43~66 岁,中位年龄 52 岁。

1.2 主要试剂 小鼠抗人 ZEB-1 单克隆抗体购自 Santa cruz 公司,SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福建迈新生物科技有限公司。

1.3 免疫组织化学检测及结果判定 所有标本均经过 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,4  $\mu$ m 厚度连续切片。将组织切片置于多聚赖氨酸包被的载玻片上,60℃ 烘烤 30 min,常规脱蜡水化,用 3%  $H_2O_2$  处理 10 min 去除内源性过氧化物酶的作用后置于微波炉中用中火进行抗原修复。山羊血清常温封闭 30 min 后滴加一抗工作液于 4℃ 孵育过夜。滴加生物素标记的二抗工作液、HRP 标记的链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液于 37℃ 各孵育 15 min, DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分化,常规脱水、透明,中性树脂封片。光镜下观察并拍照。

以细胞质或细胞核中出现清晰的黄色、棕黄色颗粒为 ZEB-1 表达阳性。染色阳性细胞数评分:0 分,阳性细胞比例为 0;1 分,阳性细胞比例为 1%~25%;2 分,阳性细胞比例为 26%~50%;3 分,阳性

细胞比例为 51%~100%。染色强度评分:0 分,阴性(细胞无着色);1 分,弱阳性(细胞中有黄色着色颗粒);2 分,中阳性(细胞中有棕色着色颗粒);3 分,强阳性(细胞中有深褐色着色颗粒)。根据染色阳性细胞数和染色强度评分判定各标本的染色结果: $\geq 3$  分,强阳性(++); $< 3$  分,弱阳性(-/+).

1.4 蛋白质印迹法检测 HCC 及相应癌旁肝硬化组织和正常肝组织中 ZEB-1 蛋白的表达 在新鲜 HCC 组织及相应癌旁肝硬化组织和正常肝组织中分别添加蛋白裂解液(150 mmol/L NaCl、0.1% SDS、1% Triton-100、5  $\mu$ g/ml 抑肽酶、20 mmol/L Tris-HCl; pH 7.4),冰上裂解 30 min 后,4℃ 12 000  $\times g$  离心 10 min,Bradford 法测定蛋白浓度。分装后储存于 -70℃ 备用。取蛋白行 10% SDS-PAGE 后电转至 PVDF 膜上,10% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后加入小鼠抗人 ZEB-1 单克隆抗体(1:500) 4℃ 孵育过夜,以 GAPDH 作为内参对照。TBST 洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后 ECL 显色。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,计数资料用百分比表示,采用  $\chi^2$  检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 免疫组化检测结果 免疫组化结果显示,ZEB-1 主要表达于细胞质和细胞核中(图 1)。62 例 HCC 组织中 ZEB-1 的阳性表达率为 93.5% (58/62),48 例癌旁肝硬化组织中的阳性表达率为 83.3% (40/48),正常肝组织中不表达或呈现低表达。

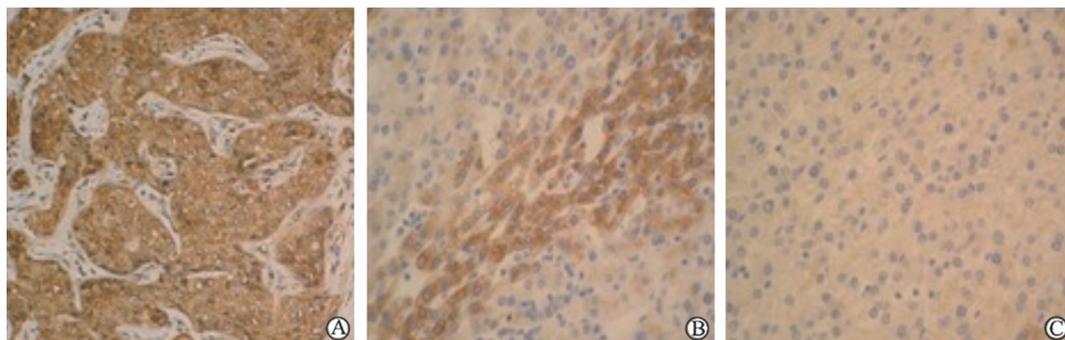


图 1 ZEB-1 表达的免疫组化检测结果(SP 法)

Fig 1 Immunohistochemical staining of ZEB-1 protein expression (SP method)

A: Hepatocellular carcinoma tissues; B: Paracancerous cirrhotic tissues; C: Normal liver tissues. Original magnification:  $\times 200$

2.2 蛋白质印迹分析结果 蛋白质印迹分析结果显示,HCC组织中 ZEB-1 的表达高于相应癌旁肝硬化组织及正常肝组织 ( $P<0.05$ ,图 2)。

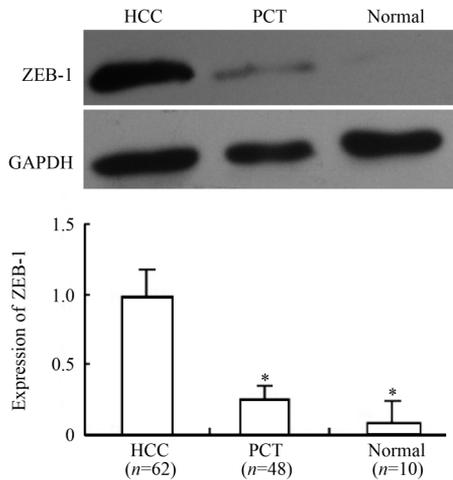


图 2 蛋白质印迹分析检测 ZEB-1 蛋白的表达  
Fig 2 Western blotting analysis of ZEB-1 protein expression

HCC: Hepatocellular carcinoma; PCT: Paracancerous cirrhotic tissues. \*  $P<0.05$  vs HCC group;  $\bar{x}\pm s$

2.3 HCC 组织中 ZEB-1 表达与临床病理特征的关系 ZEB-1 表达与临床病理特征之间的相关性分析显示,ZEB-1 在 HCC 组织中的表达与临床分期、肿瘤分化程度、有无发生转移、有无门脉癌栓和有无术后复发有关 ( $P<0.05$ ),与肿瘤直径、肿瘤数目、血清 AFP 水平等因素无关 ( $P>0.05$ ,表 1)。

### 3 讨论

HCC 发病率居恶性肿瘤第 5 位,病死率高居第 3 位,仅次于肺癌和结肠癌;手术切除是目前临床最常用的治疗手段<sup>[7-10]</sup>。侵袭性和转移性是恶性肿瘤最重要的生物学特征,也是肿瘤患者致死的最主要原因。研究发现上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)在肿瘤细胞侵袭转移过程中具有重要作用<sup>[11]</sup>。

最近的研究发现转录因子 ZEB-1 是诱导 EMT 的因子之一<sup>[12-13]</sup>。转录因子通常位于信号转导中蛋白激酶的下游,ZEB-1 能够与上皮标志物 E-cadherin 编码基因的启动子上的 E2 盒结合,抑制 E-cadherin 的转录,诱导肿瘤细胞发生 EMT,增强细胞的侵袭转移能力<sup>[14-15]</sup>。ZEB-1 与 SIP1 结构相似,能够通过结合 TGF- $\beta$  信号通路中的 R-Smads 并且在 TGF- $\beta$  信号刺激下,与 R-Smads-Smad4 复合体直接

结合,从而调节 SMA、p21、p15 等多个直接或间接与 EMT 过程相关的基因转录<sup>[14]</sup>。

表 1 HCC 组织中 ZEB-1 的表达与临床病理学特征的关系

Tab 1 Correlation of HCC clinicopathological features with ZEB-1 expression in HCC tissue

Characteristics	N	Expression of ZEB-1		
		Positive n(%)	$\chi^2$	P
TNM stage			6.462 7	<0.05
I - II	30	26(86.7)		
III	32	32(100)		
Extrahepatic metastasis			3.128 7	<0.05
Absent	24	24(100)		
Present	38	34(89.5)		
Portal vein tumor thrombus			2.237 6	<0.05
Absent	34	34(100)		
Present	28	24(85.7)		
Recurrence			2.736 8	<0.05
Yes	40	40(100)		
No	22	18(81.8)		
Tumor number n			0.334	>0.05
1	50	46(92.0)		
>1	12	12(100)		
Tumor size d/cm			0.138	>0.05
$\geq 5$	36	34(94.4)		
<5	26	24(92.3)		
Serum AFP $\rho_B$ /(ng · ml <sup>-1</sup> )			1.517	>0.05
$\geq 400$	46	46(100)		
<400	16	12(75.0)		
Differentiation			4.143 2	<0.05
I - II	38	38(100)		
III - IV	24	20(83.3)		

HCC: Hepatocellular carcinoma; AFP: Alpha fetal protein

有研究表明多种肿瘤细胞系中上调 ZEB-1 的表达能够明显促进肿瘤细胞的侵袭转移,阻断其表达则可以起到抑制肿瘤细胞侵袭转移的作用<sup>[16-17]</sup>。这种调控肿瘤细胞侵袭转移的分子机制是否具有普遍性尚不清楚。本研究免疫组化染色发现 ZEB-1 在 HCC 组织及癌旁肝硬化组织中均呈阳性表达,阳性表达率分别为 93.5%(58/62)和 83.3(40/48),在正常肝组织中呈现低表达或阴性表达,并且表达位置主要集中在细胞质或细胞核中。蛋白质印迹分析结果显示,HCC 组织中 ZEB-1 的表达高于相应癌旁肝硬化组织及正常肝组织 ( $P<0.05$ )。通过比较 ZEB-1 表达与 HCC 临床病理学特征之间的关系,发现 ZEB-1 在 HCC 组织中的表达与 HCC 临床分期、肿瘤分化程度、有无发生转移、有无门脉癌栓和有无术后复发有关 ( $P<0.05$ ),而与肿瘤直径、肿瘤数

目、血清 AFP 水平等因素无关( $P>0.05$ )。以上结果都证明了 ZEB-1 在 HCC 的发生发展中起到重要作用,而且可能通过诱导肝癌细胞发生 EMT 过程从而促进肿瘤细胞侵袭转移,最终促进转移的发生。

ZEB 家族广泛参与调控肿瘤细胞的细胞周期、细胞凋亡、侵袭转移以及新生血管生成等多个过程,并且也是诱导 EMT 过程的重要转录因子<sup>[18-19]</sup>。随着对 ZEB 家族研究的不断深入,以 ZEB 家族为靶点的研究将对研究肝癌细胞侵袭转移的机制提供新的方向,但是其中具体的分子机制还有待进一步的研究证实。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55: 74-108.
- [2] Sheman M. Screening for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2007, 37(Suppl 2): S152-S165.
- [3] Pawlik T M, Esnaola N F, Vauthey J N. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: similar long-term results despite geographic variations[J]. *Liver Transpl*, 2004, 10: S74-S80.
- [4] El-Serag H B, Marrero J A, Rudolph L, Reddy K R. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1752-1763.
- [5] Spoelstra N S, Manning N G, Higashi Y, Darling D, Singh M, Shroyer K R, et al. The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 3893-3902.
- [6] Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, et al. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 537-544.
- [7] Ulmer S C. Hepatocellular carcinoma. A concise guide to its status and management[J]. *Postgrad Med*, 2000, 107: 117-124.
- [8] Clark H P, Carson W F, Kavanagh P V, Ho C P, Shen P, Zago-  
ria R J. Staging and current treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Radiographics*, 2005, 25: S3-S23.
- [9] Llovet J M, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2003, 362: 1907-1917.
- [10] Liu C L, Fan S T. Nonresectional therapies for hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Surg*, 1997, 173: 358-365.
- [11] Yang J, Weinberg R A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. *Dev Cell*, 2008, 14: 818-829.
- [12] Drake J M, Strohschein G, Bair T B, Moreland J G, Henry M D. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20: 2207-2217.
- [13] Takeyama Y, Sato M, Horio M, Hase T, Yoshida K, Yokoyama T, et al. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2010, 296: 216-224.
- [14] Liu Y, El-Naggar S, Darling D S, Higashi Y, Dean D C. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence[J]. *Development*, 2008, 135: 579-588.
- [15] Vandewalle C, Van Roy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 773-787.
- [16] Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2005, 24: 2375-2385.
- [17] Xu Z, Shen M X, Ma D Z, Wang L Y, Zha X L. TGF-beta1-promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells[J]. *Cell Res*, 2003, 13: 343-350.
- [18] Singh M, Spoelstra N S, Jean A, Howe E, Torkko K C, Clark H R, et al. ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease[J]. *Mod Pathol*, 2008, 21: 912-923.
- [19] Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S, Burk U, Niedermann G, Firat E, et al. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells[J]. *EMBO J*, 2011, 30: 770-782.

[本文编辑] 商素芳, 孙岩