

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00103

肝癌患者血清高迁移率族蛋白 B1 的表达及与 p53 和临床病理的相关性

陈科济[△], 范飞[△], 朱斌, 马优钢, 张永杰*

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** 探讨肝癌血清高迁移率族蛋白 B1(HMGB-1)的表达及与 p53 的相关性和临床病理特征的关系。**方法** 酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)检测 20 例肝细胞癌、20 例肝内胆管细胞癌患者和 20 例健康志愿者血清 HMGB-1 和 p53 表达。**结果** 血清 HMGB-1 在肝细胞癌组[(83.8±17.4) ng/ml]和胆管细胞癌组[(95.9±21.4) ng/ml]的表达均高于健康对照组[(8.4±2.6) ng/ml], 差异均有统计学意义($P<0.05$); 血清 p53 在肝细胞癌组[(251.0±45.6) pg/ml]和胆管细胞癌组[(267.8±47.4) pg/ml]的表达均高于健康对照组[(160.0±28.4) pg/ml], 差异均有统计学意义($P<0.05$)。HMGB-1 和 p53 的表达在肝细胞癌组和肝内胆管细胞癌组血清中均呈正相关($r=0.6603, P<0.05$; $r=0.6142, P<0.05$); 血清 HMGB-1 和 p53 水平与患者年龄、性别、肿瘤大小和肿瘤数目无相关性($P>0.05$), 与肿瘤 TNM 分期、分化程度、淋巴转移情况相关($P<0.05$)。**结论** 肝癌血清 HMGB-1 的表达与 p53 具有相关性, 二者共同影响肝癌临床病理。

[关键词] 肝肿瘤; HMGB-1 蛋白质; 肿瘤抑制蛋白 p53; 临床病理学; 酶联免疫吸附测定

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0103-03

Serum HMGB-1 level and its correlation with p53 and clinical pathology in patients with liver cancer

CHEN Ke-ji[△], FAN Fei[△], ZHU Bin, MA You-gang, ZHANG Yong-jie*

Department of Biliary Surgery II, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To investigate the serum level of high mobility group box-1(HMGB-1) in patients with liver cancer and its correlation with p53 and clinical pathological features of liver cancer. **Methods** Serum levels of HMGB-1 and p53 were determined by ELISA in 20 patients with hepatocellular carcinoma, 20 with cholangiocellular carcinoma and 20 healthy volunteers. **Results** Serum HMGB-1 levels in hepatocellular carcinoma patients [(83.8±17.4) ng/ml] and cholangiocellular carcinoma patients [(95.9±21.4) ng/ml] were significantly higher than that in the healthy volunteers [(8.4±2.6) ng/ml, $P<0.05$]. Serum p53 levels in hepatocellular carcinoma patients [(251.0±45.6) pg/ml] and cholangiocellular carcinoma patients [(267.8±47.4) pg/ml] were also significantly higher than that in the healthy volunteers [(160.0±28.4) pg/ml, $P<0.05$]. Serum HMGB-1 level was positively correlated with the serum p53 level in the hepatocellular carcinoma patients ($r=0.6603, P<0.05$) and cholangiocellular carcinoma patients ($r=0.6142, P<0.05$). Serum HMGB-1 and p53 levels were not correlated with the age, gender, tumor size, or number of tumors ($P>0.05$), but were correlated with the TNM stage, differentiation degree and metastasis status ($P<0.05$). **Conclusion** Serum HMGB-1 level is positively correlated with p53, and both HMGB-1 and P53 influence the pathogenesis of liver cancer.

[Key words] liver neoplasms; HMGB-1 protein; tumor suppressor protein p53; clinical pathology; enzyme-linked immunosorbent assay

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1):103-105]

肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 据 2002 年调查显示: 全世界肝癌发病率位居恶性肿瘤的第 6 位, 死亡率位居第 3 位^[1]。肝癌在我国恶性肿瘤病死率中居第 2 位, 为 26.26/10 万, 仅次于肺癌, 高于世界平均水平(23.48/10 万)^[2]。因此, 肝癌发病机制的研究一直是一个热点。近年来的研究显示

高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1, HMGB-1) 在乳腺癌、肺癌、胃癌、膀胱癌等多种肿瘤中有高表达, HMGB-1 被认为与肿瘤和生物形成有关^[3]; p53 的异常表达被认为是多种肿瘤的发病机制^[4]。但目前关于 HMGB-1 和 p53 蛋白表达在肝癌中相关性的研究比较少见。本研究通过酶联

[收稿日期] 2011-08-05

[接受日期] 2011-12-07

[作者简介] 陈科济, 硕士, 主治医师。E-mail: keji_ch@163.com; 范飞, 硕士, 主治医师。E-mail: doctorff@sohu.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875273, E-mail: yjoy005@sina.com

免疫吸附剂测定法(ELISA)检测肝细胞癌患者、肝内胆管细胞癌患者和健康志愿者血清 HMGB-1 和 p53 的表达,寻找它们之间的联系,为研究肝癌的发病机制和开辟新的治疗途径提供一些线索。

1 资料和方法

1.1 病例及样本收集 选取第二军医大学东方肝胆外科医院 2009 年 3 月至 2011 年 2 月间初诊的肝癌患者 40 例,均经组织病理学明确诊断,其中肝细胞癌患者 20 例、肝内胆管细胞癌患者 20 例,患者皆为初次入院,未经治疗,经入院体检未见其他异常表现。健康志愿者 20 例均为我院体检中心健康体检人群,体检各项检查结果均未见明显异常,无吸烟、喝酒等不良嗜好。60 例实验对象年龄为 45~75 岁,平均(57.6±7.3)岁,其中男 32 例、女 28 例。本实验经第二军医大学东方肝胆外科医院医学伦理委员会批准,患者和志愿者在实验前均签署知情同意书。

1.2 主要试剂及仪器 HMGB-1 ELISA 试剂盒购自深圳华拓生物科技有限公司;人 p53 蛋白 ELISA 试剂盒购自上海研域化学试剂有限公司;其他试剂均为国产分析纯。96 孔微孔反应板 2 块购自德国 Greiner 公司;实验室用高速离心机购自德国 Sigma 实验室离心机公司;实验室用 Model-550 型酶标仪购自美国 BioRad 公司。

1.3 血清制备 所有入选的肝癌患者在未经手术的情况下空腹 12 h,取前臂静脉血 10 ml,健康志愿者空腹 12 h 取血。上述血液样品分别 3 000×g 离心 10 min,取上层血清,分别稀释 10 倍制成待测样品备用。

1.4 血清 HMGB-1 蛋白浓度测定 ELISA 法检测 3 个组别血清 HMGB-1 浓度,测定过程严格按照试剂盒说明书进行,过程如下:标准品浓度为 200 ng/ml,做 2 倍比系列稀释,得到标准品浓度依次为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 ng/ml。设置空白孔,加待测样品 100 μl,加终止液 100 μl,不再滴加其他试剂。分别取 7 种标准品和待测样品 100 μl 滴加于反应板微孔底部,轻轻摇晃使之混匀,加盖后于 37℃ 温育 2 h。弃去液体,在反应板孔底部加入 100 μl 生物素标记抗体工作液,加盖后于 37℃ 温育 1 h。弃去液体,洗板 5 次,甩干后向反应板孔底部加入辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 100 μl,加盖后于 37℃ 温育 1 h。弃去液体,洗板 5 次,甩干后向反应板孔底部加入 TMB 溶液 100 μl,加盖后于 37℃ 温育 30 min,每孔加入终止液 50 μl 终止反应。用酶标仪测 450 nm 处各孔吸光度(D)值,利用标准品所测定的 D 值绘制标准曲线,计算待测样品血清 HMGB-1 蛋白浓度。

1.5 血清 p53 蛋白浓度测定 采用 ELISA 法测定,具体操作方法参考 HMGB-1 蛋白浓度的测定。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用 *t* 检验,组间相关性采用 Pearson 相关性分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 ELISA 法测定血清 HMGB-1 蛋白浓度 肝细胞癌组

[83.8±17.4) ng/ml]和肝内胆管细胞癌组[(95.9±21.4) ng/ml]血清 HMGB-1 表达均高于健康对照组[(8.4±2.6) ng/ml],差异均有统计学意义($P<0.05$);血清 HMGB-1 表达在肝细胞癌组和胆管细胞癌组差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 ELISA 法测定血清 p53 蛋白浓度 方差分析结果显示:肝细胞癌组[(251.0±45.6) pg/ml]和肝内胆管细胞癌组[(267.8±47.4) pg/ml]血清 p53 蛋白表达均高于健康对照组[(160.0±28.4) pg/ml],差异有统计学意义($P<0.05$);血清 p53 表达在肝细胞癌组 p53 和胆管细胞癌组差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 血清 HMGB-1 与 p53 蛋白表达的相关性 用 Pearson 相关性分析法分别对肝细胞癌组和胆管细胞癌组血清 HMGB-1 和 p53 的表达水平做相关性分析,结果表明:血清 HMGB-1 和 p53 表达在肝细胞癌组和肝内胆管细胞癌组均呈正相关($r=0.6603$, $P<0.05$; $r=0.6142$, $P<0.05$)。

2.4 肝癌组(肝细胞癌组+胆管细胞癌组)血清 HMGB-1 和 p53 水平与临床病理学参数关系 40 例肝癌组血清 HMGB-1 和 p53 表达水平与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤数目间未见相关性,差异均无统计学意义($P>0.05$);血清 HMGB-1 和 p53 表达水平与肝癌 TNM 分期、分化程度、淋巴转移情况相关,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

3 讨论

HMGB-1 是一种含有 215 个氨基酸残基的核蛋白,相对分子质量约为 25 000,因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移速度快而得名。Kostova 等^[5]报道 HMGB-1 蛋白在乳腺癌、膀胱癌、睾丸癌中有高表达。Akaike 等^[6]证实 HMGB-1 在胃癌组织中阳性率高,表明 HMGB-1 表达与胃癌临床病理有密切联系,可作为早期胃癌的筛查性指标。Liu 等^[7]研究发现非小细胞肺癌癌细胞中 HMGB-1 高表达,其表达水平与肺癌肿瘤细胞侵袭性有关,影响肺癌预后。Ohmori 等^[8]证实 HMGB-1 在结直肠癌中对肿瘤的发生和发展过程中起着重要作用,检测其表达水平有助于早期诊断。本研究发现, HMGB-1 在肝癌组中的表达高于健康对照组,其表达水平与患者性别、年龄、肿瘤大小和数目不相关,但与肿瘤的 TNM 分期、分化程度和淋巴转移情况密切相关($P<0.05$)。一般认为, HMGB-1 主要通过抗细胞凋亡作用,诱导抗凋亡蛋白的表达,抑制肿瘤细胞的凋亡,促进肿瘤细胞的发生和生长。另一方面, HMGB-1 还可与其受体 RAGE 结合,通过一系列的细胞内外信号转导促进肿瘤细胞的增殖、浸润和转移,同时促进肿瘤细胞和周围血管的生成,这与肿瘤的良恶性、肿瘤的侵袭程度以及病理相关表现密切相关^[9]。

HMGB-1 的异常表达有抑制细胞凋亡、诱导细胞分化、细胞迁移、细胞增殖等作用。Banerjee 等^[10]等通过实验证明, HMGB-1 蛋白参与 p53 基因转录水平的调节。p53 基因是一种抑癌基因,其编码产物有抑制癌细胞生长的作用。但突变后的 p53 基因失去抑癌作用,具有癌基因功能,会增加癌症的发生率^[11]。Tommasi 等^[12]认为 HMGB-1 蛋白和 p53

蛋白共同参与了 DNA 分子的破坏和修复过程,具有某种分子上的联系。本研究发现, HMGB-1 和 p53 蛋白在肝细胞癌和肝胆管细胞癌患者的血清中都有异常的高表达,且这 2 种

蛋白在肝癌患者的血清中呈正相关($r=0.6603$, $P<0.05$; $r=0.6142$, $P<0.05$)。我们推测, HMGB-1 和 p53 蛋白的异常表达可能共同参与了肝癌的发生发展过程。

表 1 40 例肝癌患者血清 HMGB-1 和 p53 水平与临床病理学参数关系

| 临床参数 | <i>n</i> | HMGB-1 $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$ | <i>P</i> | p53 $\rho_B/(\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$ | <i>P</i> |
|-------------------|----------|---|----------|--|----------|
| 性别 | | | >0.05 | | >0.05 |
| 男 | 22 | 91.3±22.8 | | 259.1±44.3 | |
| 女 | 18 | 88.1±19.5 | | 259.8±51.1 | |
| 年龄(岁) | | | >0.05 | | >0.05 |
| ≥60 | 28 | 89.2±19.0 | | 260.7±31.8 | |
| <60 | 12 | 91.4±22.1 | | 256.4±48.9 | |
| 肿瘤大小 <i>d</i> /cm | | | >0.05 | | >0.05 |
| ≥2 | 16 | 93.8±11.6 | | 264.6±42.8 | |
| <2 | 24 | 87.2±13.9 | | 255.9±31.7 | |
| 肿瘤数目 | | | >0.05 | | >0.05 |
| 单发 | 29 | 90.7±12.7 | | 261.8±23.6 | |
| 多发 | 11 | 87.6±11.4 | | 253.1±21.0 | |
| TNM 分期 | | | <0.05 | | <0.05 |
| I, II | 18 | 72.7±12.1 | | 211.7±22.4 | |
| III, IV | 22 | 103.9±11.8 | | 298.4±26.1 | |
| 分化程度 | | | <0.05 | | <0.05 |
| 高 | 15 | 73.3±10.7 | | 184.8±29.7 | |
| 中、低 | 25 | 99.8±11.2 | | 304.2±23.8 | |
| 淋巴转移 | | | <0.05 | | <0.05 |
| 有 | 15 | 114.3±21.7 | | 331.2±27.1 | |
| 无 | 25 | 75.2±19.4 | | 216.3±26.5 | |

N=40

HMGB-1: 高迁移率族蛋白 B1

本研究还发现 p53 蛋白在肝细胞癌组和胆管细胞癌组的表达水平与患者性别、年龄、肿瘤数目和肿瘤大小不相关,但与 TNM 分期、分化程度和淋巴转移情况有关($P<0.05$)。

综上所述, HMGB-1 和 p53 蛋白在肝癌中表达具有相关性,共同影响肝癌的发生和进展。但目前关于肝癌中 HMGB-1 和 p53 两者相关性的分子机制研究较少见,这方面进一步的深入研究将有利于对肝癌发病机制的全面理解,有助于寻找肝癌的治疗新途径。

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] 陈建国, 张思维, 陈万青. 中国 2004-2005 年全国死因回顾抽样调查肝癌死亡率分析[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44: 383-389.
- [3] Mollnes T E. High mobility group box-1 protein-one step closer to the clinic[J]? Crit Care, 2008, 12: 168.
- [4] Martinez J D. Restoring p53 tumor suppressor activity as an anticancer therapeutic strategy[J]. Future Oncol, 2010, 6: 1857-1862.
- [5] Kostova N, Zlateva S, Ugrinova I, Pasheva E, Pasheva E. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human

malignant tumors[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 337: 251-258.

- [6] Akaike H, Kono K, Sugai H, Takahashi A, Mimura K, Kawaguchi Y, et al. Expression of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2007, 27(1A): 449-457.
- [7] Liu P L, Tsai J R, Hwang J J, Chou S H, Cheng Y J, Lin F Y, et al. High-mobility group box 1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in non-small cell lung cancer contributes to tumor cell invasiveness[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43: 530-538.
- [8] Ohmori H, Luo Y, Kuniyasu H. Non-histone nuclear factor HMGB1 as a therapeutic target in colorectal cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15: 183-193.
- [9] Mantell L L, Parrish W R, Ulloa L. Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders [J]. Shock, 2006, 25: 4-11.
- [10] Banerjee S, Kundu T K. The acidic C-terminal domain and A-box of HMGB-1 regulates p53-mediated transcription [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: 3236-3247.
- [11] Goh A M, Coffill C R, Lane D P. The role of mutant p53 in human cancer [J]. J Pathol, 2011, 223: 116-126.
- [12] Tommasi S, Pinto R, Pilato B, Paradiso A. Molecular pathways and related target therapies in liver carcinoma [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13: 3279-3287.

[本文编辑] 尹 茶