

PTPRO 在肝细胞肝癌中表达的性别差异及其与预后的关系

侯嘉杰,姜润秋,邓 蕾,陈 晨,孙倍成*

(南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心,卫生部活体肝移植重点实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:** 检测受体 O 型蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase receptor-type O, PTPRO) 在人类肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中的表达水平, 研究该基因的表达是否具有性别差异, 并是否与 HCC 肝切除术后肿瘤复发相关, 是否可以作为判断预后的指标。**方法:** ①利用实时荧光定量聚合酶链反应和免疫组织化学的方法, 分别检测 59 例男性及 22 例女性 HCC 患者肿瘤组织及癌旁组织中 PTPRO 及雌激素受体 (estrogen receptors, ERs) 的表达水平; ②通过 *t* 检验分析 PTPRO、ERs 在肿瘤、癌旁及不同性别间的表达差异, 并通过相关性分析及 *F* 检验了解 PTPRO 表达与 ERs 是否具有相关性; ③通过 Kaplan-Meier 曲线研究不同 PTPRO 表达水平与 HCC 患者术后复发率之间的关系。**结果:** ①PTPRO、ER α 在 HCC 组织中的 mRNA 及蛋白水平明显低于癌旁肝硬化组织 ($P < 0.000 1$); ②HCC 癌旁组织中 PTPRO、ER α 的表达水平, 男性显著低于女性 ($P < 0.05$); ③Kaplan-Meier 曲线及 Log-rank 检验表明 HCC 癌旁组织中 PTPRO 水平与 HCC 复发水平呈负相关 ($P < 0.000 1$)。**结论:** PTPRO 是一种具有性别差异性的抑癌基因, 可作为判断 HCC 肝切除术后预后的指标。

[关键词] PTPRO; 雌激素受体; 肝细胞肝癌; 复发率

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-784-06

Study of PTPRO level in human hepatocellular carcinoma and its correlation with gender and prognosis

HOU Jia-jie, JIANG Run-qiu, DENG Lei, CHEN Chen, SUN Bei-cheng*

(Institute of Liver Transplantation, Key Laboratory of Liver Transplantation of Health Ministry, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and gender disparity of protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) in human hepatocellular carcinoma (HCC), the correlation of PTPRO with carcinoma recurrence after hepatectomy, and whether PTPRO can be served as a desirable prognostic index. **Methods:** PTPRO expression of HCC tissue and adjacent tissue in 59 male and 22 female patients were determined by real-time PCR and immunohistochemistry (IHC), as well as estrogen receptors (ERs). Gender disparity of PTPRO and ERs and the correlation between PTPRO and ERs were analyzed by *t* test, correlation analysis and *F* test; The correlation between PTPRO level and post-hepatectomy recurrence rate of HCC patients were analyzed by Kaplan-Meier curve and log-rank test. **Results:** Expression of PTPRO and ER α in HCC tissues were significantly lower than adjacent cirrhotic tissues ($P < 0.000 1$); Expressions of PTPRO and ER α of adjacent tissue was lower in male than in female ($P < 0.05$); Expression of PTPRO was negatively correlated to recurrence of HCC patients ($P < 0.000 1$). **Conclusion:** PTPRO is a potential tumor suppressor with gender disparity, and can serve as a candidate for predicting recurrence after surgical resection of HCC.

[Key words] PTPRO; estrogen receptor; hepatocellular carcinoma; recurrence

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 784-789]

[基金项目] 卫生部科研基金(LW201001); 国家自然科学基金(81072029 和 91029721); 教育部大学新世纪杰出人才计划(NCET -09-0160); 南京医科大学第一附属医院创新团队发展计划和江苏省高等教育委员会优先学术计划的部分支持

*通讯作者, E-mail: sunbc@njmu.edu.cn

受体 O 型蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase receptor-type O, PTPRO), 是受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTP)^[1] 的一种, 最初在肾小球上皮细胞中被发现, 又名 GLEPP1^[2]。PTPRO 有 6 种转录变体, 全长 PTPRO 在肾和脑中表达最高, 在其他组织包括肝脏、乳腺等

也有较高的表达;非全长转录变体主要在 B 淋巴细胞^[3]、巨噬细胞中表达,在脑及其他组织中表达较低。最初,研究者发现过度表达全长 PTPRO 可导致白血病细胞系 U937 在佛波酯诱导的终末期分化过程中发生细胞凋亡^[4]。最近, Jacob 等报道了 PTPRO 在人类慢性白血病^[5]、肺癌^[6]、乳腺癌^[7]以及大鼠肝细胞肝癌^[8]中由于启动子甲基化,表达受到明显抑制,而体外通过去甲基化药物 5-氮胞苷(5-azacytidine)处理可恢复肺癌细胞系 A549 以及乳腺癌细胞系 MCF-7 中 PTPRO 的表达。

原发性肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的男性发病率要远高于女性,为 8~9:1。很多 HCC 研究都围绕着这种明显的性别差异展开,而逐渐得到的共识是雌激素在 HCC 的发生发展过程中起着十分重要的作用,雌激素相关 HCC 发生性别差异的分子机制也已经得到了部分阐明^[9]。此外,雌激素与其受体(estrogen receptors, ERs)结合后形成的复合物,发挥着转录因子(transcriptional factors, TFs)样活性^[10],通过对一系列基因的调控,参与许多重要的细胞生物学过程。大量研究显示 ERs 广泛表达于人正常肝脏^[11-13]及某些肿瘤组织,参与肝细胞的生理代谢,影响 HCC 的发生发展^[14-16]。本研究针对 HCC 发病的性别差异这一现象,研究抑癌基因 PTPRO 分别在男性及女性肝癌中的表达,并结合病史,研究 PTPRO 与肝癌复发的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究中 81 例 HCC 患者(年龄 41~75 岁,平均 56 岁;其中男 59 例,女 22 例)来自南京医科大学第一附属医院肝移植中心,于 2009 年 1 月~2010 年 1 月接受肝癌切除治疗。病例入选标准为:病理诊断为肝细胞肝癌,一般情况良好,无重要脏器器质性病变,肿瘤大小 < 10 cm。术后常规随访入选患者,并记录术后 2 年内的复发情况。

1.2 方法

1.2.1 荧光实时定量 PCR

采集提取研究对象的组织样本,采用 TRIzol 抽提法提取总 RNA,按照反转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本)说明书合成 cDNA,反应体系为 20 μ l。5 \times PCR 缓冲液 4 μ l, oligo dT 以及随机 6 聚体引物各 1 μ l,总 RNA 为 2 μ l,逆转录酶混合物 1 μ l,加 ddH₂O 至 20 μ l。引物的设计与合成:根据 NCBI 网站提供的 mRNA 序列,使用 Oligo6.0 软件设计,由

上海英骏生物工程有限公司合成。PTPRO 上游引物序列:5'-GCTGTTTCTTCCCATGTCGTG-3',下游引物序列:5'-CGGCTATGAACGTAGGGACAC-3';ER α 上游:5'-CCCAGCTCCTCCTCATCCT-3'下游:5'-GGC-TAGTGGGCGCATGTAG-3';ER β 上游:5'-GCTCTG-GTCTGGGTGATTGC 下游:5'-GTTAGCCAGGCG-CATGGA-3';GAPDH 为内参照,上游:5'-GAGA-GACCCTCACTGCTG-3',下游:5'-GATGGTACAT-GACAAGGTGC-3'。荧光实时定量 PCR(real-time PCR)使用日本 TaKaRa 公司的 SYBR Green I mix 试剂盒,反应体系为 20 μ l,其中 2 \times SYBR Green Mix 10 μ l, Rox 染料 0.3 μ l, cDNA 1.5 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,加水至 20 μ l。使用美国 ABI 公司 7300 型 real-time PCR 仪,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 35 个循环。扩增反应完成后进行熔解曲线的制作,确保扩增的特异性:95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 58 $^{\circ}$ C, 15 s; 再由 58 $^{\circ}$ C 缓慢上升到 95 $^{\circ}$ C, 温度上升速率为 0.1 $^{\circ}$ C/s。结果以样本中 GAPDH 的表达水平进行标准化。

1.2.2 免疫组织化学

81 例 HCC 及癌旁组织标本于手术切除后 4% 的多聚甲醛固定,经石蜡包埋的组织样本切至 4 μ m 厚切片,经二甲苯和梯度乙醇脱蜡至水,然后在室温下,30 ml/L 的过氧化氢甲醇溶液浸泡 30 min,以抑制内源性过氧化物酶活性。切片在 EDTA(0.01 mol/L, pH8.0)中煮 20 min 以修复抗原。PBS 漂洗 3 次后,切片用正常山羊血清孵育 10 min 以阻断非特异性反应。一抗:抗 PTPRO 抗体(HPA034525, Sigma-Aldrich 公司,美国)1:200 稀释,抗 ER α 抗体(sc-8002, Santa Cruz 公司,美国)1:100 稀释,在湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 漂洗 3 次,滴加二抗试剂(HRP 偶联的山羊抗兔或鼠 IgG),室温下孵育 10 min 后 PBS 漂洗 3 次;滴加链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下孵育 10 min 后再 PBS 漂洗 3 次,最后 DAB 显色,苏木素复染、透明、脱水、封片。以 PBS 替代一抗行阴性对照。

1.2.3 免疫组织化学染色结果判定

使用专业图像分析软件 Image-Pro Plus(版本号 5.0)分析图片,每张切片选取 5 个视野(\times 200),经软件分析求得平均光密度值(integrated optical density, IOD),用此种方法对每张切片中目的蛋白的表达做出定量的评价。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的方式表示;

HCC 组织、癌旁组织、正常肝脏组织以及男性、女性中 PTPRO 的表达比较应用单因素方差分析,使用 SPSS17.0 软件进行线性相关性分析,并进行 *F* 检验;采用 Kaplan-Meier 曲线分析复发率,用 Log-rank 检验方法分析不同 PTPRO 表达组之间术后复发率的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTPRO 及 ERs 在 HCC 中的表达

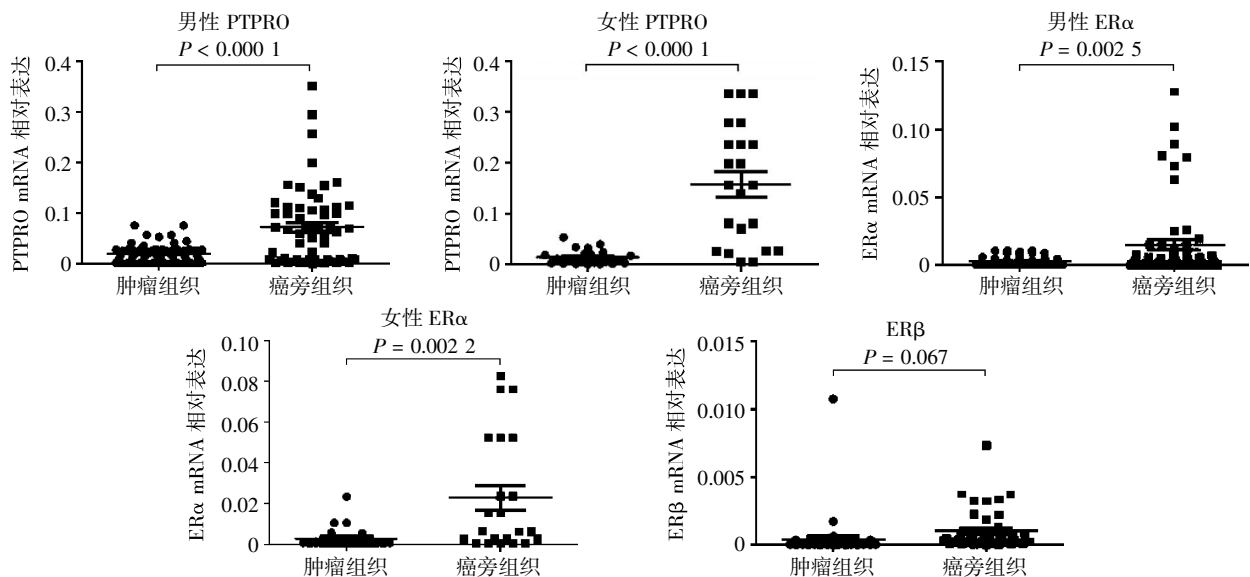
患者详细临床资料见表 1。使用 real-time PCR 检测 81 对肝细胞 HCC、癌旁肝硬化组织 PTPRO 及 ER α 、ER β 的表达,按性别分组并进行统计学分析,结果如图 1 所示。PTPRO、ER α 在 HCC 中的 mRNA 水平显著低于癌旁肝硬化组织及正常肝组织(PTPRO:癌 vs. 癌旁,男性癌 vs. 男性癌旁,女性癌 vs. 女性癌旁, P 均 $< 0.000 1$;ER α : 男性癌 vs. 男性癌旁 $P = 0.002 5$,女性癌 vs. 女性癌旁 $P = 0.002 2$),且 PTPRO、ER α 在男性癌旁中的 mRNA 表达显著低于女性(PTPRO: 男性癌旁 vs. 女性癌旁 $P = 0.009 7$,ER α :男性癌旁 vs.女性癌旁 $P = 0.019$)。图 1C 显示 ER β 在 HCC 及癌旁组织中的表达差异无统计学意

义($P = 0.067$)。另,女性患者的 ER 表达水平与年龄并不具有相关性。

使用免疫组织化学的方法检测 81 对肝细胞 HCC、癌旁肝硬化组织 PTPRO 及 ER α 的表达,按性别分组并进行软件分析(图 2)。通过专业图像分析软件 Image-Pro Plus 逐一分析染色的 IOD 值。结果证实 PTPRO、ER α 蛋白在 HCC 中的表达显著低于癌旁肝硬化组织,PTPRO 蛋白在男性中的表达显著低于女性(图 2)。

表 1 81 例 HCC 患者临床资料

Table 1 Clinical characteristics of 81 patients with HCC	男性(n = 59)	女性(n = 22)
绝经(有/无)	--	9/13
年龄,岁(≥ 48 / < 48)	33/26	14/8
HbeAg(阴性/阳性)	9/50	4/18
肝硬化(有/无)	52/7	19/3
ALT, U/L (≥ 45 / < 45)	32/27	13/9
AFP, ng/ml (≥ 13.6 / < 13.6)	48/11	16/6
肿瘤大小, cm (≥ 5 / < 5)	33/26	11/11
肿瘤多发性(单发/多发)	39/20	17/5
血管浸润(有/无)	42/17	15/7
TNM 分期(I + II/III+IV)	16/43	8/14



图中每个黑点代表每例组织中相对于 GAPDH 的 mRNA 表达值。

图 1 荧光定量 PCR 测定 PTPRO 及 ER 在 HCC 及癌旁组织中的表达

Figure 1 Detection of PTPRO and ER expression in HCC and adjacent tissue by real-time PCR

2.2 PTPRO 表达与 ER α 的相关性分析

实时荧光定量 PCR 检测 81 例 HCC 标本 PTPRO、ER α 的 mRNA 相对量使用 SPSS 软件进行相关性分析及 *F* 检验,结果显示 PTPRO 的表达与 ER α 呈明显的线性正相关($r^2 = 0.936 4$, $P < 0.000 1$,图 3)。

2.3 PTPRO 表达与 HCC 术后复发率的相关性分析

对 81 例 HCC 癌旁组织的免疫组化结果(IOD 值)进行分析,得出癌旁平均 IOD 值为 1 200。将所有 HCC 病例根据其癌旁 PTPRO 的表达水平分为两组,分别为 PTPRO 低表达组(L 组 45 例,IOD $< 1 200$),

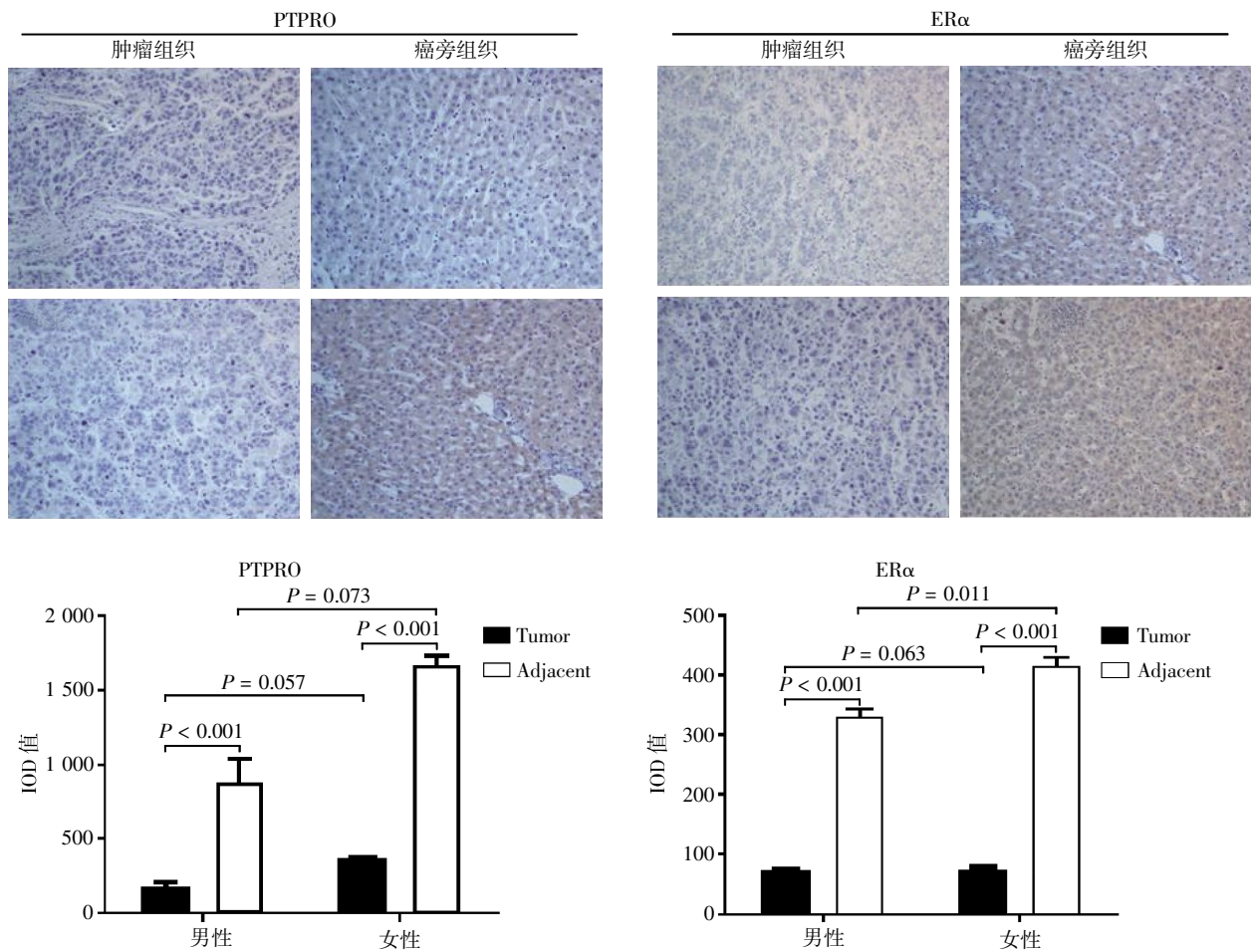
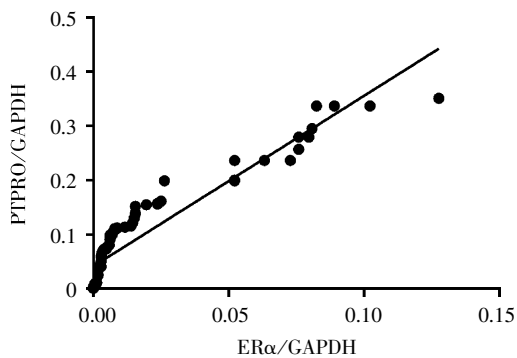


图 2 免疫组织化学检测 PTPRO 及 ER-α 在 HCC 及癌旁组织中的表达(免疫组化,× 200)

Figure 2 Determination of PTPRO and ERα expression in HCC and adjacent tissue by immunohistochemical staining(IHC,× 200)



X、Y 轴分别为 ERα、PTPRO 相对于 GAPDH 的 Δ CT 值。由图可知两者间呈明显线性正相关($r^2 = 0.9364, P < 0.0001$)。

图 3 PTPRO 表达与 ERα 的相关性分析

Figure 3 Correlation analysis of PTPRO and ERα expression

及 PTPRO 高表达组(H 组 36 例,IOD>1 200)。利用 K-M 曲线对两组 HCC 患者的术后复发率进行分析,结果显示,L 组的术后复发率显著高于 H 组 ($P < 0.0001$,图 4),表明 PTPRO 表达对 HCC 预后监测具有积极的意义,同样提示 PTPRO 具有抑癌基因的特性,可能阻止 HCC 的发生发展。

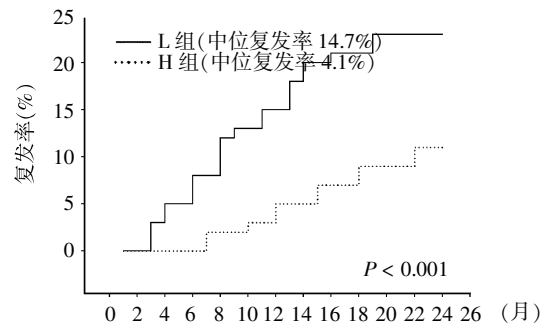


图 4 PTPRO 低表达组及高表达组 HCC 病例的复发率比较
Figure 4 Comparison of recurrence rates of HCC patients with high and low PTPRO levels

3 讨论

蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase,PTK) 和蛋白酪氨酸磷酸酯酶 (protein tyrosine phosphatase,PTP)^[1],调节着蛋白酪氨酸的磷酸化和去磷酸化级联反应,介导了机体大多数细胞信号通路分子的活化和抑制^[17]。PTK 和 PTP 的动态平衡,从分

子水平维持着生物体内各种代谢过程的稳定,包括细胞的增殖、分化、凋亡,细胞周期的调控,以及癌基因的转录等。PTK 在 HCC 等恶性肿瘤中的研究已日益广泛^[18],如 src 家族、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、表皮生长因子受体(EGFR)、血小板内皮生长因子(PDGF)等,然而 PTP 受人们关注却相对较少。PTPRO 作为一种受体型 PTP,以抑癌蛋白的角色出现在人们的视野中,其抑癌机制以及其介导的分子信号通路值得研究和探讨。笔者认为 PTPRO 的肿瘤抑制作用可能与其 PTP 区域功能有关,位于 PTPRO 下游的肿瘤生长关键信号分子(如各种类型的 PTK)在其去磷酸化作用之下失活,相关的信号通路因此而阻断,从而抑制了肿瘤细胞的生长和肿瘤的发生。

HCC 的发生具有显著的性别差异,近年来有大量研究用雌激素-雌激素受体通路相关机制解释了这一问题。由于 ER β 在 HCC 中的差异不具有统计学意义,研究者对 HCC 中 ERs 的研究主要集中于 ER α ,本课题组的前期研究发现雌激素受体 ER α 可作为 IL-1 α 转录抑制因子阻断 IL-1/IL-1 α R 通路,抑制 HCC 的进展^[19]。较类似地,有研究者在乳腺癌中发现,雌激素-雌激素受体 β 复合物(E2-ER β)可以调节 PTPRO 的转录^[7]。本项研究中,也发现了 PTPRO 在肝细胞 HCC 中的表达具有显著性别差异,且跟 ER α 的表达具有明显相关性,由此推断 ER α 可能起着维持肝细胞中 PTPRO 基因转录表达的作用。相关实验将在后续的研究中展开。

肝细胞肝癌,尤其是小肝癌具有较高的手术切除率,然而亦有着较高的术后复发率。因此,筛选出敏感的临床指标用以监测 HCC 术后复发对其预后有着相当重大的意义。本研究显示 PTPRO 在癌旁中的表达水平与肝癌术后复发呈显著负相关,一方面提示 PTPRO 可能是肝癌复发过程中的一个机体保护因子,另一方面也反映 PTPRO 可作为术后监测复发及判断预后的候选指标。如肝癌切除术后癌旁 PTPRO 水平较低的患者,术后应加大随访力度,临床治疗应多采取各项辅助治疗手段,积极预防复发。

[参考文献]

- [1] Alonso A, Sasin J, Bottini N, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome [J]. *Cell*, 2004, 117(6): 699-711
- [2] Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, et al. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(31): 19953-19962
- [3] Aguiar RC, Yakushijin Y, Kharbanda S, et al. PTPRO: an alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest [J]. *Blood*, 1999, 94(7): 2403-2413
- [4] Seimiya H, Tsuruo T. Functional involvement of PTP-U2L in apoptosis subsequent to terminal differentiation of monoblastoid leukemia cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(33): 21187-21193
- [5] Motiwala T, Majumder S, Kutay H, et al. Methylation and silencing of protein tyrosine phosphatase receptor type O in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(11): 3174-3181
- [6] Motiwala T, Kutay H, Ghoshal K, et al. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) exhibits characteristics of a candidate tumor suppressor in human lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(38): 13844-13849
- [7] Ramaswamy B, Majumder S, Roy S, et al. Estrogen-mediated suppression of the gene encoding protein tyrosine phosphatase PTPRO in human breast cancer: mechanism and role in tamoxifen sensitivity [J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(2): 176-187
- [8] Motiwala T, Ghoshal K, Das A, et al. Suppression of the protein tyrosine phosphatase receptor type O gene (PTPRO) by methylation in hepatocellular carcinomas [J]. *Oncogene*, 2003, 22(41): 6319-6331
- [9] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production [J]. *Science*, 2007, 317(5834): 121-124
- [10] Pentecost BT, Song R, Luo M, et al. Upstream regions of the estrogen receptor alpha proximal promoter transcript regulate ER protein expression through a translational mechanism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 229(1-2): 83-94
- [11] Villa E, Camellini L, Dugani A, et al. Variant estrogen receptor messenger RNA species detected in human primary hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(3): 498-500
- [12] Zhai Y, Zhou G, Deng G, et al. Estrogen receptor alpha polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7): 2001-2009
- [13] Villa E, Colantoni A, Camma C, et al. Estrogen receptor classification for hepatocellular carcinoma: comparison with clinical staging systems [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(3): 441-446
- [14] Villa E, Grottola A, Colantoni A, et al. Hepatocellular carcinoma

- cinoma;role of estrogen receptors in the liver [J]. Ann N Y Acad Sci,2002,963:37-45
- [15] Villa E, Moles A, Ferretti I, et al. Natural history of inoperable hepatocellular carcinoma;estrogen receptors' status in the tumor is the strongest prognostic factor for survival [J]. Hepatology,2000,32(2):233-238
- [16] Wang YC, Xu GL, Jia WD, et al. Estrogen suppresses metastasis in rat hepatocellular carcinoma through decreasing interleukin-6 and hepatocyte growth factor expression [J]. Inflammation,2011,35(1):143-149
- [17] Jacob ST, Motiwala T. Epigenetic regulation of protein tyrosine phosphatases;potential molecular targets for cancer therapy [J]. Cancer Gene Ther,2005,12(8):665-672
- [18] Murakami M, Kobayashi S, Marubashi S, et al. Tyrosine kinase inhibitor PTK/ZK enhances the antitumor effects of interferon-alpha/5-Fluorouracil therapy for hepatocellular carcinoma cells [J]. Ann Surg Oncol,2011,18(2):589-596
- [19] Jiang R, Deng L, Zhao L, et al. miR-22 promotes HBV-related hepatocellular carcinoma development in males [J]. Clin Cancer Res,2011,17(17):5593-5603
- [收稿日期] 2012-01-09

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字,必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号,尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名,这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序,写法为:姓前名后,姓全部大写,名的首字母大写,其余字母小写,名间加连字符,如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位,如“南京医科大学第一附属医院心内科”,“南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”,并在论文首页下补充基金的名称、编号,以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑:接雅俐)