

## 原发性肝细胞肝癌组织中 IMP3 表达与临床特点和基因甲基化相关性的研究

黄新立<sup>1</sup>,高园园<sup>2</sup>,丁 军<sup>3</sup>,王学浩<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院肝脏外科,江苏 南京 210029;<sup>2</sup>常州市第二人民医院普通外科,江苏 常州 213000;<sup>3</sup>中山大学附属第一医院惠亚医院急诊科,广东 惠州 516081)

**[摘要]** 目的:研究 IMP3 在原发性肝细胞肝癌中的表达意义以及基因甲基化同 IMP3 表达的关系。方法:免疫组化检测 162 例肝细胞肝癌组织中 IMP3 的表达。分析临床因素与 IMP3 表达水平的相关性,并随访所选 162 例术后患者生存情况作生存分析。提取正常肝组织、肝癌组织的 DNA,通过甲基化特异性定量 PCR 测定 IMP3 启动子 CpG 岛甲基化状态。培养正常肝脏细胞 L02 和 Huh-7 肝癌细胞,通过 Western blot 检测 IMP3 蛋白的表达。提取两组细胞 DNA,分别对 IMP3 基因启动子区域 CpG 岛进行甲基化状态检测。结果:原发性肝细胞肝癌组织中 IMP3 阳性率为 67.90%;IMP3 表达与患者年龄、肿瘤大小、分级、分期、AFP、早期复发均存在相关性;而与性别、HBsAg 无明显相关性。随访显示 IMP3 阳性患者长期生存明显低于 IMP3 阴性者。CpG 岛甲基化检测显示肝癌组织中 P1 和 P2 位点高度去甲基化,而正常肝脏组织中 P1 和 P2 则处于甲基化状态。正常肝脏细胞 IMP3 表达阴性,Huh-7 肝癌细胞 IMP3 表达强阳性。正常肝细胞 P1 和 P2 位点处于高度甲基化状态,而 Huh-7 肝癌细胞 P1 和 P2 位点处于去甲基化状态。结论:IMP3 在原发性肝细胞肝癌中具有高表达,IMP3 高表达提示不良预后;基因的甲基化同 IMP3 的表达存在一定的相关性。

**[关键词]** 胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3;IMP3;原发性肝细胞肝癌;基因甲基化;启动子

**[中图分类号]** R735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)05-537-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140501

## Correlation of genetic methylation with IMP3 expression and clinical features in primary hepatocellular carcinoma

Huang Xinli<sup>1</sup>, Gao Yuanyuan<sup>2</sup>, Ding Jun<sup>3</sup>, Wang Xuehao<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Liver Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of General Surgery, Changzhou NO.2 People's Hospital, Changzhou 213000; <sup>3</sup>Department of Emergency, HuiYa Hospital of the First Hospital, Sun Yat-Sen University, Huizhou 516081, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the clinical significance of IMP3 expression, and to detect the relationship between IMP3 expression and genetic methylation. **Methods:** Paraffin sections of tumor tissues from 162 patients with HCC were examined for IMP3 expression by immunohistochemistry. Correlation analysis of clinical factors and IMP3 expression level was performed. One hundred and sixty-two patients with post-operation of HCC were follow-up for long-term survival analysis. P1 and P2 of IMP3 gene from normal and tumor tissues were detected by methylation-specific PCR and DNA sequencing. IMP3 protein was detected by Western Blot from cultured normal liver cells L02 and Huh7 hepatoma cells. DNA was extracted from two groups of cells, and the methylation status of promoter region CpG islands in IMP3 gene was detected. **Results:** IMP3 was expressed in 67.90% of HCC. IMP3 expression is related to age, tumor size, grading, staging, AFP, early relapse, but not gender and HBsAg. One hundred and sixty-two cases of postoperative follow-up found that postoperative long-term survival rate of IMP3 negative group was significantly higher than that of the IMP3-positive group ( $P < 0.01$ ). Detection of P1 and P2 by methylation-specific PCR showed that CpG islands from P1 and P2 of tumor tissues showed unmethylated modification, however, those of normal tissues showed methylated modification. Normal liver cells

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81273262)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangxh@njmu.edu.cn

were IMP3 negative, Huh-7 hepatoma cells showed strongly positive IMP3 expression. P1 and P2 of normal liver cells were highly methylated, and P1 and P2 of Huh-7 hepatoma cells showed unmethylated status. **Conclusion:** The level of IMP3 expression is high in HCC, and high IMP3 expression suggests poor prognosis; DNA methylated modification may participate in the processes, which regulates and controls IMP3 expression.

[Key words] insulin-like growth factor II mRNA binding3; IMP3; hepatocellular carcinoma; HCC

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 537-542]

胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3 (insulin-like growth factor II mRNA binding3, IMP3) 是 IMPs 蛋白家族的一员<sup>[1]</sup>。同其他成员一样, IMP3 仅在胚胎早期表达, 在成人体内检测不到, 主要通过同 mRNA 相结合, 促进 mRNA 的转运、稳定和定位。在胚胎发育过程中很多组织器官可检测出高表达的 IMP3, 如肌肉组织、上皮组织、胎盘组织等<sup>[2]</sup>。最近研究发现 IMP3 在很多恶性肿瘤组织中具有高表达, 如胰腺癌、肾癌、肺癌、乳腺癌、食管癌、宫颈癌和子宫内膜癌等<sup>[3-10]</sup>。在肿瘤的发生发展中, IMP3 促进了恶性肿瘤细胞的增殖和伪足的形成, 同时提高了肿瘤细胞的黏附性, 所以 IMP3 可以作为肿瘤细胞增殖和发生转移的新肿瘤标志物, 用于评价肿瘤患者的预后<sup>[11-12]</sup>。本研究通过对原发性肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中 IMP3 蛋白表达的研究探索其与术后生存的相关性。

IMP3 在多种肿瘤细胞中可以被检出, 然而其在肿瘤中表达的分子调控机制还不是很清楚。表观遗传学阐述了基因修饰在调控基因表达中起到了一定的作用。而最新一项研究显示向骨肉瘤细胞中加入 DNA 甲基转移酶抑制剂, 明显增强了 IMP3 的表达, 而加入甲基转移酶后, IMP3 的表达明显降低<sup>[15]</sup>。本文首次通过扫描 IMP3 基因的启动子区域, 发现其区域内存在 2 个 CPG 岛, 通过对不同组织和细胞中 IMP3 启动子的 2 个 CpG 岛甲基化状态的检测, 探索 IMP3 表达与基因甲基化存在的相关性。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

收集 2007 年 1 月~2009 年 1 月在南京医科大学第一附属医院肝脏外科接受手术治疗的原发性肝细胞肝癌病例 162 例: 女 35 例, 男 127 例; >55 岁 93 例, ≤55 岁 69 例; 肿瘤直径 ≤5 cm 80 例, >5 cm 82 例; 乙肝表面抗原 (HBsAg) 阴性 34 例, 阳性 128 例; 甲胎蛋白 (AFP) 高于正常值 73 例, ≤200 ng/ml 89 例。所有患者术前无其他基础疾病; 均未接受放化疗或者介入治疗。162 例石蜡固定组织由病理科

提供。石蜡标本 HE 染色切片由本院 2 位有经验病理医生阅读确认。肿瘤病理分级、分期均按照现行国际标准。对 162 例术后患者作长期随访。实验相关所有患者资料均得到伦理委员会审批。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组化

先行石蜡固定标本, 5 μm 切片, 分别用二甲苯浸泡 2 次脱蜡, 每次 10 min; 后梯度酒精水化。经 0.01 mol/L 柠檬酸, pH 值 6.0, 100℃, 10 min 抗原修复; 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗 3 次, 每次 5 min; 滴加正常小牛血清封闭液, 室温 20 min, PBS 洗去多余血清; 滴加 IMP3 抗体 (1:100 稀释, Abcam 公司, 美国) 4℃ 冰箱孵育过夜, PV9000 室温孵育 45 min; DAB 显色, 苏木素复染。5% 小牛血清代替一抗为阴性对照。结果由病理科 2 名医生读片。依据细胞着色强度和着色数量判定: 着色细胞数 < 5%, 判为阴性; 着色细胞数 ≥ 5%, 判为阳性。

#### 1.2.2 细胞培养

正常肝脏细胞 L02、肝癌细胞 Huh-7 均购自中科院上海细胞库。胰酶、青链霉素双抗、DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国)。细胞培养皿为碧云天公司产品。二氧化碳培养箱 (Forma 公司, 美国), 低温离心机 (Eppendorf 公司, 美国)。两组细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的条件下用含 10% 胎牛血清和双抗的 DMEM 高糖培养基培养。

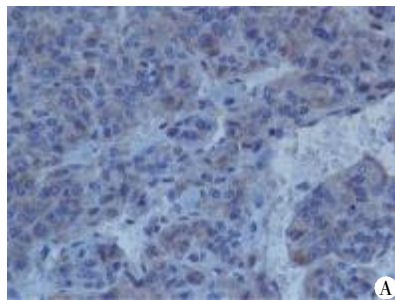
#### 1.2.3 启动子甲基化分析

通过 Ensembl 网站查找 IMP3 基因, 所得基因号为 ENSG00000136231。选取该基因启动子区域 2 000 bp 作为预测 CpG 岛片段。通过 EMBOSS CpGPlot 检测该段启动子区域, 发现该区域存在 2 个 CpG 岛, 长度分别为 283 和 309 bp, 分别命名为 P1 和 P2 位点。P1 和 P2 位点分别含有 29 和 19 对 CpG 二核苷酸。分别从组织和细胞中提取总 DNA 后, 经过 MethylCode™ 亚硫酸盐处理试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国) 的亚硫酸盐处理。对亚硫酸盐处理后的 CpG 岛进行 PCR 并 TA 克隆测序。所用试剂盒为 dNTP-mix、Platinum-DNA-Polymerase, 均购自美国

Invitrogen 公司。P1 上游引物 5'-AGGTTTTYGAY-GATTTTAGTTTT-3', 下游引物 5'-AAA-ACCR-CAAACACRTTTCTA-3'; P2 上游引物 5'-TAGYGTTGAGGAATTGTTTGTAG-3', P2 下游引物 5'-AACRCAAAAAACRAAAAAA-ATC-3'。

#### 1.2.4 Western blot

蛋白提取试剂盒购自碧云天公司, 2 组细胞各取  $(5\sim 10) \times 10^5$  个, 按说明步骤提取细胞蛋白。50  $\mu\text{g}$  蛋白上样后 80 V 电泳, 待蛋白跑出浓缩胶, 进入分离胶后改为 100 V 继续电泳, 共约 2 h。250 mA, 恒流湿转, 65 min。转膜完成后, 以 5%BSA 封闭 2 h, 加入 IMP3 抗体(1:1 000, Abcam 公司, 美国)后 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。TBST 洗膜 3 遍, 每次 10~15 min。然后加入二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱孵育, TBST 洗膜 3 遍, 每次约 10~15 min。显影液显影, 凝胶成像仪获取曝光图像。



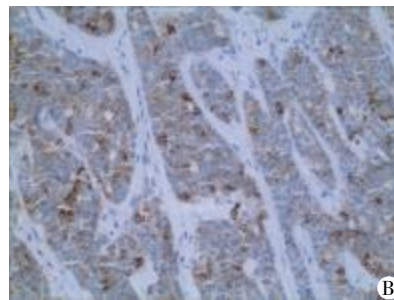
#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行分析, 各组间 IMP3 表达阳性率的比较采用四格表  $\chi^2$  检验。不同 IMP3 表达组之间的生存分析采用 Kaplan-Meier 分析 Log-rank 检验; 所有检验均以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IMP3 在肝细胞肝癌中表达

对 162 例肝细胞肝癌组织、部分癌旁组织以及正常肝脏组织分别进行免疫组化检测。162 例癌组织标本中, IMP3 免疫染色阴性 52 例, 阴性率 32.09%; 着色阳性的癌组织有 110 例, 阳性率 67.90%。IMP3 着色主要定位于细胞质中, 在肿瘤组织中典型的染色阴性和阳性可见图 1。



A: 癌组织着色阴性; B: 癌组织着色阳性。

图 1 IMP3 在原发性肝细胞肝癌中的表达(免疫组化,  $\times 200$ )

Figure 1 Expression of IMP3 in HCC (Immunohistochemistry,  $\times 200$ )

### 2.2 肝细胞肝癌中临床因素及术后生存时间与 IMP3 表达的相关性

尽管 IMP3 在多种恶性肿瘤中被检出, 然而 IMP3 在 HCC 中的表达与多种临床因素之间的关联却不是很明确。如表 1 所示, 患者年龄、肿瘤大小、AFP 表达量、肿瘤分级、肿瘤分期、早期复发均与 IMP3 的阳性存在相关性; 而患者性别、HBsAg 与 IMP3 表达情况未见明显相关性。通过对 162 例患者长达 5.5 年的随访, 发现最短生存时间为 3 个月, 最长为 61 个月, 中位生存时间为 31 个月, 95% 可信区间为  $(24.90 \pm 18.08)$  个月。1 年复发 85 例, 复发率为 52.46%, 5 年生存率为 31.00%。对随访 5.5 年的术后患者生存时间作 Kaplan-Meier 生存分析, 结果显示 IMP3 阳性组的患者术后生存情况明显较阴性组差, 具有显著统计学差异  $P = 0.003$  (图 2)。

### 2.3 正常肝脏和肝癌组织中 IMP3 基因甲基化和蛋白表达情况

#### 2.3.1 甲基化特异性定量 PCR 测定 IMP3 启动子

#### CpG 岛甲基化状态

对 IMP3 基因启动子区域 2 000 bp 通过 EMBOSS CpGPlot 检测发现, 存在 2 个 CpG 岛位点即 P1 和 P2 位点(图 3A)。通过对 5 例正常肝脏组织的检测发现 P1 和 P2 位点处于高度甲基化状态(图 3B、D)。而对肝癌组织进行检测发现: P1 和 P2 位点处于去甲基化状态(图 3C、E), 具体对应测序结果如图 4。

#### 2.3.2 Western blot 检测 IMP3 蛋白表达

通过分别对正常肝细胞 L02 和侵袭力较强的肝癌细胞 Huh-7 中 IMP3 的表达检测, Huh-7 中 IMP3 表达强阳性, 而 L02 中则为阴性(图 5)。

## 3 讨论

原发性肝细胞肝癌是我国常见和高发的恶性肿瘤之一。外科手术切除是 HCC 最为有效的治疗方案。然而尽管如此, HCC 的术后长期生存率仍然很低<sup>[16]</sup>。很显然, 寻找一种新的肿瘤标志物对患者预后

表 1 IMP3 蛋白表达与原发肝细胞肝癌患者临床资料的关系

Table 1 Expression of IMP3 in HCC in relation to clinical factors

项目	总例数	阳性[例数(%)]	P 值
年龄(岁)			0.036
> 55	93	57(61.29)	
≤55	69	53(76.81)	
性别			0.761
男	127	83(65.35)	
女	35	27(77.14)	
大小(cm)			0.033
≤5	80	48(60.00)	
> 5	82	62(75.61)	
HBsAg			0.202
-	34	20(58.82)	
+	128	90(70.31)	
AFP(ng/ml)			<0.001
≤200	89	46(51.68)	
> 200	73	64(87.67)	
肿瘤分级			<0.001
1~2	109	62(56.88)	
3~4	53	48(90.56)	
肿瘤分期			<0.001
I	70	31(44.28)	
II	49	40(81.63)	
III~IV	43	39(90.69)	
早期复发			<0.001
-	77	41(53.24)	
+	85	69(81.17)	

评估和指导后期综合治疗显得尤为重要。本研究通过对手术完整切除的 162 例肿瘤的 IMP3 表达情况

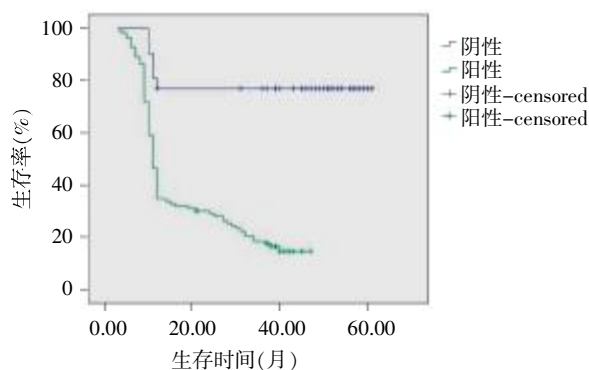
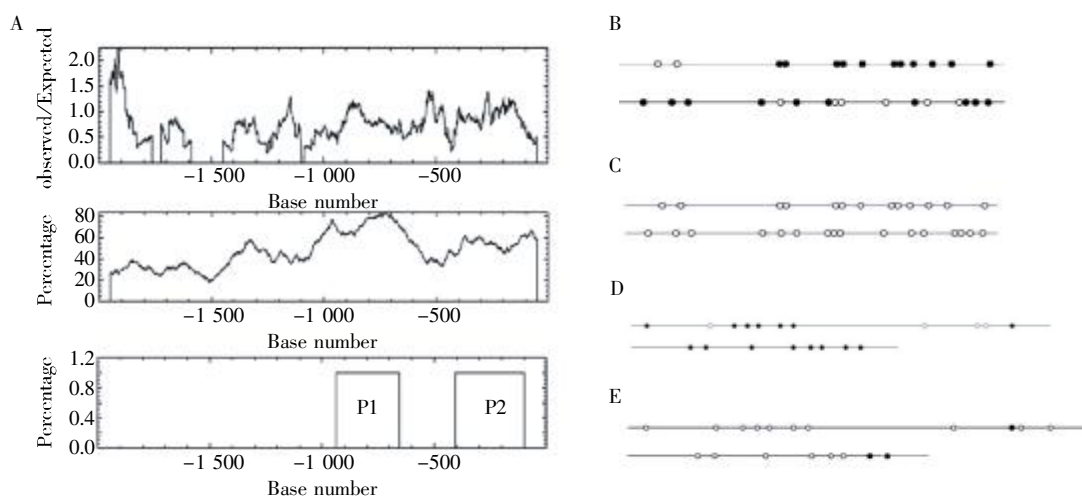


图 2 162 例术后患者 Kaplan-Meier 生存分析

Figure 2 Survival analysis of 162 cases of postoperative patients by Kaplan-Meier

进行研究发现,IMP3 主要表达于肝癌组织中。长期随访资料发现,IMP3 表达阳性的患者其长期生存率明显低于阴性组,提示 IMP3 的表达增加了肿瘤的恶性度,促进了肿瘤的早期复发。多项体外实验发现,IMP3 诱导细胞伪足形成,提高细胞的增殖能力和浸润性<sup>[11]</sup>。在胰腺癌、胆管癌、肠癌、肺癌等恶性肿瘤中 IMP3 的表达预示早期复发和术后生存率差<sup>[17-21]</sup>;同时,IMP3 可以作为腺癌诊断的一种新的肿瘤标志物<sup>[22]</sup>。本研究组对 IMP3 表达同肿瘤的大小、肿瘤分级、分期等因素的研究表明,IMP3 的表达同样提示 HCC 不良预后和术后生存率差,也从一定程度上阐明了 IMP3 对肿瘤的发生和发展起到一定的促进作用。

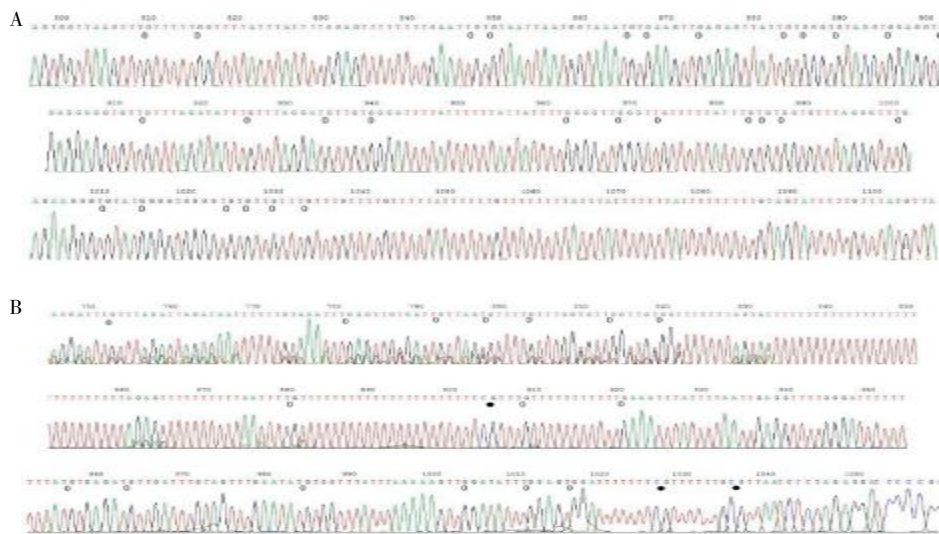
然而对于 IMP3 表达的机制却鲜有揭示。DNA 甲基化和组蛋白修饰,向来是表观遗传学的研究重



A:通过 EMBOSS 检测 IMP3 基因启动子区域发现两个 CpG 岛分别为 P1 和 P2 位点;B、D:分别为正常组织中处于甲基化状态的 P1 和 P2 位点;C、E:分别表示 IMP3 阳性的癌组织中处于去甲基化状态的 P1 和 P2 位点。○表示去甲基化状态,●表示甲基化状态。

图 3 BSP 法检测组织中 IMP3 基因启动子区域甲基化状态

Figure 3 Detection of methylation in the IMP3 promoter from tissues by BSP



A、B: 分别表示 IMP3 阳性癌组织中 P1 和 P2 位点测序结果。○: 去甲基化状态; ●: 甲基化状态。

图 4 IMP3 启动子区域测序结果

Figure 4 Sequencing results of IMP3 promoter

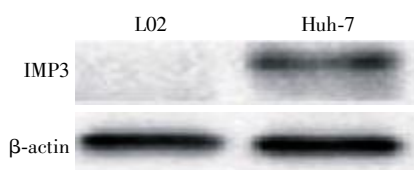


图 5 正常肝细胞和肝癌细胞中 IMP3 表达情况

Figure 5 IMP3 expression in L02 cells and Huh-7 cells

点。日本最新一项研究显示:向骨肉瘤细胞中加入甲基转移酶抑制剂后,IMP3 的表达量明显上调,而再向这些细胞中加入甲基转移酶后,IMP3 的表达量明显下调<sup>[15]</sup>。通过对 IMP3 基因启动子区检测发现存在两个 CpG 岛,本实验针对正常组织和癌组织分别进行了检测,结果显示,正常组织 2 个 CpG 岛处于高度甲基化状态,而肿瘤组织处于去甲基化状态。分别对肝脏细胞 L02 和肝癌细胞 Huh-7 控制 IMP3 表达的基因启动区域 CpG 岛进行检测,进一步证实了组织中的研究结果。所以本研究提示,DNA 甲基化和去甲基化对 IMP3 的表达可能存在一定的调控机制,当 DNA 处于甲基化状态时,IMP3 的基因处于沉默状态,从而抑制了 IMP3 的表达;当 DNA 处于去甲基化状态,IMP3 的基因被激活,促使 IMP3 表达。

随着对 IMP3 研究的深入,探讨 IMP3 表达机制的研究就显得非常重要,然而甲基化在 IMP3 的表达中究竟是否起着主导作用;IMP3 基因启动子的甲基化是否是调控 IMP3 表达的主要机制等还需要进一步研究探索。

#### [参考文献]

- [1] Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, et al. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2):1262-1270
- [2] Mueller-Pillasch F, Pohl B, Wilda M, et al. Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis[J]. *Mech Dev*, 1999, 88(1):95-99
- [3] Yantiss RK, Woda BA, Fanger GR, et al. KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer): a novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of the pancreas [J]. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(2):188-195
- [4] Xu H, Bourne PA, Spaulding BO, et al. High-grade neuroendocrine carcinomas of the lung express K homology domain containing protein overexpressed in cancer but carcinoid tumors do not [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(4):555-563
- [5] Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Combination of quantitative IMP3 and tumor stage: a new system to predict metastasis for patients with localized renal cell carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17):5579-5584
- [6] Walter O, Prasad M, Lu S, et al. IMP3 is a novel biomarker for triple negative invasive mammary carcinoma associated with a more aggressive phenotype [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(11):1528-1533
- [7] Lu D, Vohra P, Chu PG, et al. An oncofetal protein IMP3: a new molecular marker for the detection of esophageal ade-

nocarcinoma and high-grade dysplasia [J]. *Am J Surg Pathol*,2009,33(4):521-525

[8] Lu D, Yang X, Jiang NY, et al. IMP3, a new biomarker to predict progression of cervical intraepithelial neoplasia into invasive cancer [J]. *Am J Surg Pathol*,2011,35(11):1638-1645

[9] Zheng W, Yi X, Fadare O, et al. The oncofetal protein IMP3; a novel biomarker for endometrial serous carcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*,2008,32(2):304-315

[10] Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma; a retrospective study [J]. *Lancet Oncol*,2006,7:556-564

[11] Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, et al. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation[J]. *Embo J*,2006,25(7):1456-1468

[12] Li C, Zota V, Woda BA, et al. Expression of a novel oncofetal mRNA-binding protein IMP3 in endometrial carcinomas; diagnostic significance and clinicopathologic correlations[J]. *Mod Pathol*,2007,20(12):1263-1268

[13] 吴孟超. 原发性肝癌的诊断及治疗进展 [J]. *中国医学科学院学报*,2008,30(4):363-365

[14] Zhou XD. Recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma; progress and prospects[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*,2002,1(1):35-41

[15] Ueki A, Shimizu T, Masuda K, et al. Up-regulation of imp3 confers in vivo tumorigenicity on murine osteosarcoma cells[J]. *PLoS One*,2012,7(11):50621

[16] Peng SY, Ou YH, Chen WJ, et al. Aberrant expressions of annexin A10 short isoform, osteopontin and  $\alpha$ -fetoprotein at chromosome 4q cooperatively contribute to progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*,2005,26(4):1053-1061

[17] Schaeffer DF, Owen DR, Lim HJ, et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma correlates with poor survival[J]. *Bmc Cancer*,2010,10(1):59

[18] Jeng YM, Wang TH, Lu SH, et al. Prognostic significance of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression in gastric adenocarcinoma [J]. *Br J Surg*,2009,96(1):66-73

[19] 高园园, 邵文雨, 黄新立, 等. 胆管癌中 IMP3 的表达与临床因素及术后生存率的相关性[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2013,33(6):792-796

[20] Yuan RH, Wang CC, Chou CC, et al. Diffuse expression of RNA-binding protein IMP3 predicts high-stage lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal adenocarcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*,2009,16(6):1711-1719

[21] Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO, et al. IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma[J]. *Hum Pathol*,2010,41(4):477-484

[22] Li C, Rock KL, Woda BA, et al. IMP3 is a novel biomarker for adenocarcinoma in situ of the uterine cervix; an immunohistochemical study in comparison with p16(INK4a) expression[J]. *Mod Pathol*,2007,20(2):242-247

[收稿日期] 2013-10-27

