

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.008

HMGB1 在肝细胞癌中的表达及其与 VEGF、MVD 的关系

周宝勇, 郑 军, 侯俊丞, 黄军伟

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨高迁移率族蛋白 1(High mobility group protein box-1, HMGB1)在肝细胞癌组织中的表达及其与血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)表达、肿瘤微血管密度(Microvascular density, MVD)的关系和临床意义。方法:免疫组织化学 SP 法检测 HMGB1、VEGF 和 CD34 在 37 例人肝癌组织及相应癌旁肝组织和 10 例人正常肝组织中的表达;并用抗 CD34 抗体标记微血管,计数微血管密度;应用 Western blot 技术定量检测 HMGB1 在 10 例肝癌及相应癌旁和 5 例正常肝组织的表达情况。结果:HMGB1 蛋白在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织及正常肝组织。HMGB1 的表达与肿瘤大小、门静脉侵犯相关($P=0.018$; $P=0.036$)。肝癌组织中 HMGB1 表达与 VEGF 表达及 MVD 间均呈正相关($r=0.544$, $P=0.001$; $r=0.672$, $P<0.05$)。结论:肝癌组织中异常表达增高的 HMGB1、VEGF 与肝癌微血管生成过程相关, HMGB1 可能成为阻断肝癌血管生成的有效靶点。

【关键词】肝癌;高迁移率族蛋白 1;血管内皮生长因子;微血管密度

【中国图书分类法分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-05-30

Correlations of HMGB1 expression with VEGF and microvascular density in hepatocellular carcinoma

ZHOU Baoyong, ZHENG Jun, HOU Juncheng, HUANG Junwei

(Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the correlations of high mobility group protein box-1 (HMGB1) expression with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and microvessel density (MVD) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its clinical significance. **Methods:** Expressions of HMGB1, VEGF and CD34 were detected with immunohistochemistry in 37 specimens of HCC tissues and the corresponding adjacent-tumor tissues, and 10 cases of normal hepatic tissues. The MVD was calculated using CD34 antibody as an endothelial marker. Western blot was performed in 10 HCC tissues and the corresponding adjacent-tumor tissues, and 5 normal hepatic tissues. **Results:** Expression of HMGB1 appeared at a high level compared to adjacent-tumor tissues and normal hepatic tissues. HMGB1 expression was significantly correlated with the tumor size and the portal venous invasion. HMGB1 expression was positively correlated with VEGF expression and MVD in HCC ($r=0.544$, $P=0.001$; $r=0.672$, $P<0.05$). **Conclusion:** Upregulation of HMGB1 and VEGF are involved in the angiogenesis of HCC, and HMGB1 may be a therapeutic target for angiogenesis in HCC.

【Key words】 hepatocellular carcinoma; high mobility group protein box-1; vascular endothelial growth factor; microvascular density

高迁移率族蛋白 1(High mobility group protein box-1, HMGB1)是真核细胞核内一类非组蛋白染色质蛋白。HMGB1 作为一种多功能蛋白因子,在维持核小体稳定和 DNA 重组、复制、修复及基因转录中发挥着重要作用^[1]。近年研究发现, HMGB1 高表达于多种肿瘤组织,可能参与肿瘤细胞的增殖、浸润、转移等。然而,国内外在肝癌中 HMGB1 与血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤

微血管密度(Microvascular density, MVD)关系的研究报道少见。本研究采用免疫组织化学方法检测肝癌组织中 HMGB1、VEGF 的蛋白表达,用 CD34 抗体标记肿瘤微血管计算肿瘤 MVD。探讨肝癌组织中 HMGB1 表达与 VEGF 表达、MVD 的关系,并初步讨论 HMGB1 在肝癌微血管形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 标本取自 2010 年 4 月至 12 月重庆医科大学附属第一医院肝胆外科手术切除的 37 例原发性肝癌及

作者介绍:周宝勇(1986-),男,硕士,

研究方向:肿瘤微创治疗。

通信作者:郑 军,男,副教授, Email: zhengjun8901@sina.com。

其相应癌旁组织。肿瘤切除后立即选取组织的典型部分,并选距癌组织边缘 3 cm 以上区域取癌旁组织,所取组织分别部分存于液氮中,部分用 4% 多聚甲醛溶液固定。其中男性 29 例,女性 8 例,年龄 23 ~ 77 岁,平均年龄 (50.48 ± 12.28) 岁;肿瘤直径小于或等于 5 cm 有 11 例,大于 5 cm 有 26 例;Edmondson 标准分级:Ⅰ ~ Ⅱ级 19 例,Ⅲ ~ Ⅳ级 18 例。所选研究对象均经病理组织学切片证实为肝癌组织,且术前均未行化学、放射及免疫抑制等治疗。另取 10 例肝外伤引起的肝破裂或肝血管瘤周围的正常肝组织作为对照。所选标本均进行术前谈话,并获得患者或其家属同意。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 HMGB1 多克隆抗体、兔抗人 VEGF 多克隆抗体、兔抗人 CD34 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒、鼠抗人 β -Actin 抗体、HRP 标记羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);全蛋白提取试剂、ECL 发光试剂盒(碧云天生物技术有限公司);其余实验材料及试剂取自重庆市神经病学重点实验室。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 SP 法 4% 多聚甲醛溶液固定的标本行常规石蜡包埋,制成 4 μ m 厚切片。参照免疫组化试剂盒说明方法操作:切片经二甲苯脱蜡水化后,柠檬酸高温修复抗原,血清封闭,分别加入兔抗人 HMGB1 多克隆抗体(1:100)、兔抗人 VEGF 多克隆抗体(1:100)、兔抗人 CD34 多克隆抗体(1:150)工作液,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;二抗孵育后加入辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育 30 min, DAB 显色;随后苏木素复染,封片后光镜下观察。用 PBS 分别代替 HMGB1、VEGF、CD34 抗体作为空白对照。

1.2.2 Western blot 取 100 mg 组织,用 1.0 ml(含 10% PMSF)组织裂解液溶解,BCA 法进行蛋白定量。标本在 95 $^{\circ}$ C ~ 98 $^{\circ}$ C 中加热 7 min,以 60 μ g/孔加样经 5% 积层胶后进行 10% 分离胶 SDS-PAGE 电泳。电转印至 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1.5 h,兔抗人 HMGB1 多克隆抗体(1:200)4 $^{\circ}$ C 过夜,次日 TBST 洗膜 3 \times 10 min 后加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(1:3 000 稀释),37 $^{\circ}$ C 条件孵育 2 h。再次洗涤 3 \times 10 min, ECL 化学发光显影。 β -Actin 作为内参照,以 HMGB1 的灰度值与 β -Actin 的灰度值的比值表示 HMGB1 蛋白的相对表达水平。

1.2.3 结果判断 在排除非特异性染色的前提下, HMGB1、VEGF 在细胞质内和/或细胞核以黄色、棕黄色、棕褐色为阳性。计分方法 A:按切片中细胞染色的深浅评分,0 分 - 无着色,1 分 - 细胞染色呈浅黄色,2 分 - 细胞染色呈棕黄色,3 分 - 细胞染色呈棕褐色;B:按切片中的阳性细胞比例评分,每例随机观察 5 个视野,每个视野 100 个细胞,计数 500 个细胞中染色阳性的细胞数,0 分 - 显色细胞数小于或等于 5%,1 分 - 显色细胞数占 5% ~ 25%,2 分 - 显色细胞数占 25% ~ 50%,3 分 - 显色细胞数占 50% ~ 75%,4 分 - 75% 以上的细胞显色。每例标本染色积分 = A \times B,若乘积小于或等于 1 为阴性,大于 1 为阳性。按 Weidner 等^[2]报道的微血管计数方法计数微血管量,每一染成棕黄色的、可与周围肿瘤细胞或者组织区分开来的内皮细胞或内皮细胞簇,均作为 1 个单

层的微血管均不计数。在低倍镜(40 \times)下选取高血管密度区,之后在高倍镜(400 \times)下计数 3 个视野内被 CD34 染成棕黄色的血管数,取其平均值作为该病例的 MVD 值。

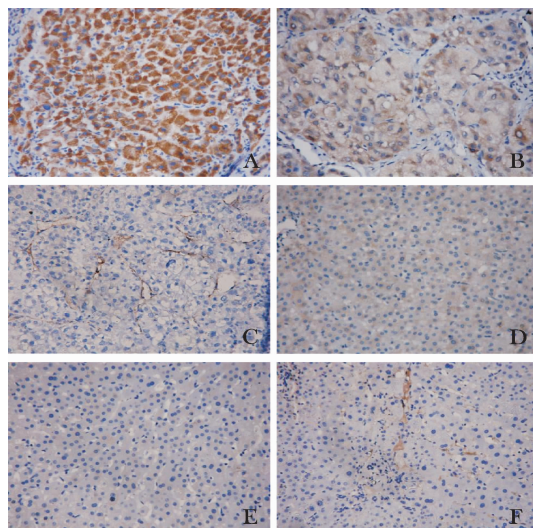
1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。计数资料比较采用 χ^2 检验,而本实验研究样本 37 例,故采用 Fisher 精确概率法;多组数据资料的比较采用方差分析;HMGB1 与 VEGF、MVD 的关系采用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

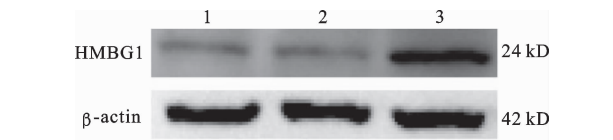
2.1 HMGB1、VEGF、CD34 在不同肝组织的表达

免疫组织化学 SP 法检测 37 例肝癌组织及相应癌旁组织中 HMGB1 表达阳性率分别为 67.6% (25/37)、24.3% (9/37),阳性表达呈棕黄色或棕褐色,分布在细胞胞质和/或细胞核中,主要位于细胞质;VEGF 在肝癌及癌旁阳性率分别为 62.2% (23/37)、18.9% (7/37),染色呈淡黄色或棕黄色,定位于细胞质;CD34 在肝癌组织中均有强阳性表达,呈棕黄色,CD34 定位于血管内皮细胞(图 1)。正常肝组织中 HMGB1 和 VEGF 阳性率分别是 20% (2/10)、10% (1/10),在正常和癌旁组织中 HMGB1 染色位于主要位于胞核,VEGF 染色主要位于胞质。在正常肝组织和癌旁肝组织中 HMGB1、VEGF 和 CD34 的表达水平的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);而在肝癌组织中 HMGB1、VEGF 和 CD34 的表达水平与正常肝组织和癌旁组织的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。应用 Western blot 检测 HMGB1 蛋白表达的实验结果与免疫组化结果相符(图 2),HMGB1 在肝癌组织的表达明显高于癌旁组织和正常组织的表达 ($P < 0.05$) (表 1)。



A、B、C 为肝癌组织,D、E、F 为癌旁组织。A. HMGB1 蛋白高表达;B. VEGF 蛋白高表达;C. 高 MVD;D. HMGB1 蛋白低表达;E. VEGF 蛋白低表达;F. 低 MVD

图 1 HMGB1、VEGF 和 CD34 在肝癌、癌旁组织的表达 (SP, 200 \times)
Fig. 1 Expressions of HMGB1, VEGF and CD34 detected by immunohistochemistry in HCC tissues corresponding adjacent-tumor tissues (SP, 200 \times)



1. 正常肝组织;2. 癌旁组织; 3. 肝癌组织

图2 Western blot 检测 HMGB1 在不同肝组织的表达情况

Fig.2 Western blot analysis of HMGB1 expression in normal hepatic tissues,corresponding adjacent-tumor tissues and HCC tissues

表 1 Western blot 检测 HMGB1 蛋白在肝癌、癌旁、正常肝组织的表达

Tab.1 Western blot analysis of HMGB1 expression in HCC tissues,corresponding adjacent-tumor tissues and normal hepatic tissues

组别	HMGB1 蛋白表达	<i>P</i>
肝癌组织	0.639 ± 0.129	<0.05 ^a
癌旁组织	0.395 ± 0.096	=0.372 ^b
正常肝组织	0.344 ± 0.070	<0.05 ^c

注:a,与癌旁组织组比较, $P < 0.05$;b,与正常肝组织组比较, $P = 0.372$;c,与肝癌组织组比较, $P < 0.05$

2.2 HMGB1 蛋白表达与临床病理特征的关系(表2)

免疫组化结果显示在肝癌直径小于或等于 5 cm 组、有门静脉侵犯组中 HMGB1 阳性率高于肿瘤直径大于 5 cm 组、无门静脉侵犯组 ($P = 0.018, P = 0.036$)。在肝癌单发组与多发组、AFP ≤ 50 组与 AFP > 50 组、Edmondson 分级 I ~ II 组与 III ~ IV 组差别无统计学意义 ($P = 0.367, P = 0.728, P = 0.295$)。

表 2 HMGB1 蛋白表达与临床病理参数的关系

Tab.2 Relationship between HMGB1 expression and clinic pathologic features

病理参数	<i>n</i>	HMGB1 蛋白表		<i>P</i> 值
		阳性	阴性	
肿瘤大小				0.018 *
≤5 cm	11	4	7	
>5 cm	26	21	5	
肿瘤数量				0.367
单发	31	22	9	
多发	6	3	3	
门静脉侵犯				0.036 *
有	8	8	0	
无	29	17	12	
AFP				0.728
≤50	19	12	7	
>50	18	13	5	
Edmondson 分级				0.295
I ~ II	19	11	8	
III ~ IV	18	14	4	

注:*,Fisher 精确检验, $P < 0.05$,差异有统计学意义

2.3 HMGB1、VEGF、MVD 间的相互关系(表3)

Pearson 相关分析,肝癌中 HMGB1 表达与 VEGF 表达呈正相关($r = 0.544, P = 0.001$);HMGB1 表达与 MVD 计数呈正相关($r = 0.672, P < 0.05$);VEGF 与 MVD 计数之间呈正

相关($r = 0.575, P < 0.05$)。

表 3 HMGB1、VEGF 与 MVD 在肝癌中的相关性

Tab.3 Correlations of HMGB1 expression with VEGF expression and MVD in HCC

	HMGB1	VEGF	MVD
HMGB1			
<i>r</i>	1	0.544	0.672
<i>P</i>	—	0.001	<0.05
VEGF			
<i>r</i>	0.544	1	0.575
<i>P</i>	0.011	—	<0.05
MVD			
<i>r</i>	0.672	0.575	1
<i>P</i>	<0.05	<0.05	—

3 讨 论

高迁移率族蛋白 (High mobility group protein, HMG) 早于 20 世纪 70 年代在牛胸腺细胞中发现,因其在聚丙烯酰胺凝胶中的高迁移率而得名。HMGB1 为 HMG 蛋白家族之一,HMGB1 基因位于染色体 13q12;HMGB1 含 219 个氨基酸残基,可分为 3 个功能区:N-末端(包括 A 盒和 B 盒),富含带正电荷的赖氨酸;C 末端(C 区)富含带负电荷的天冬氨酸和谷氨酸^[3]。HMGB1 是一种多功能蛋白分子。在细胞核中,HMGB1 做为一种非组蛋白染色体蛋白质,结合于 DNA 双螺旋小沟内,引起 DNA 构象变化,参与构建核小体,维持其稳定性;在胞外,HMGB1 可与其配体(如:RAGE、TLR-2、TLR-4 和 TLR-9 等)结合,激活 p38、JNK 和 p42/p44 等 MAPK 信号通路,以及使核转录因子 NF-κB 和 Spl 等发生核移位,作为炎症、细胞分化、细胞迁移和肿瘤转移的信号分子^[4,5]。

近年研究发现,HMGB1 在结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌等肿瘤组织中高表达;敲除 RAGE-HMGB1 信号可以抑制肿瘤细胞的生长和转移^[6~9]。在体外,针对 HMGB1 的 shRNA 可以抑制前列腺癌细胞的增殖和促进其凋亡^[10]。贺新春等观察了以 HMGB1 为干扰因素,人肝癌细胞株 HepG2 增殖的情况,结果也提示:HMGB1 可以促进 HepG2 细胞增殖^[11]。本实验结果显示 HMGB1 在肝癌组织中的表达高于相应癌旁组织和正常肝组织的表达,且 HMGB1 蛋白的表达增高与肿瘤大小、有门静脉侵犯有关,认为 HMGB1 可以促进肝癌细胞的增殖和转移。这与以往研究报道 HMGB1 在大多数肿瘤组织高表达,且与肿瘤生长、转移、血管生成等有关具有一致性,就其促进肝癌细胞增殖和转移的机制还需要进一步研究。HMGB1 在正常细胞内可分布在细胞胞质和细胞核中,然以细胞核为主。Kang 等^[12]研究表明在结肠癌中 HMGB1 存在由胞核到胞质易

位的现象。本实验中 HMGB1 在肝癌组织中染色主要位于细胞胞质中,而正常肝组织中主要位于细胞核。这提示 HMGB1 的易位可能参与了肝癌的发生和发展,这需要进行进一步的研究来阐明。

血管生成在肿瘤生长过程中起关键作用,只有充足的血供才能为肿瘤的生长、浸润和转移提供条件^[13]。血管内皮因子在血管生成中发挥重要作用。血管内皮因子不仅是内皮细胞特异的强效有丝分裂原,而且能促进内皮细胞产生并调节纤溶酶原激活物及其抑制因子,导致细胞分裂、迁移,形成大量新生血管,满足肿瘤不断生长的需要。VEGF 广泛分布于人的许多组织中,在正常情况下维持低表达的水平。然而,在几乎所有的人体肿瘤和肿瘤细胞株中皆有高表达。MVD 通常被用来反映肿瘤微血管的增殖情况,本研究采用 CD34 免疫组织化学染色计数肝癌的 MVD。鉴于 HMGB1 在 HCC 中的表达特点,本研究进一步探讨了 HMGB1 表达与 VEGF 表达及 MVD 的关系。Tang 等^[14]认为 HMGB1 与血管内皮细胞的出芽、增殖有关,本实验中肝癌组织 HMGB1 与 VEGF 的表达呈正相关。结合最新研究进展和本实验结果,认为在肝癌中 HMGB1 可能与 VEGF 表达的调控有关,将在肝癌细胞水平进行进一步的研究与探讨。细胞外的 HMGB1 可以由激活的巨噬细胞或者坏死的细胞释放,也可以由表达 HMGB1 的肿瘤细胞向周围分泌。肿瘤细胞外的 HMGB1 与其受体 RAGE 结合后,可以激活 MAPK、NF-KB 等途径,而这些信号通路在部分肿瘤细胞中已证明与 VEGF 的表达调节有关^[15,16]。本实验结果提示, HMGB1 和 VEGF 的表达均与 MVD 呈正相关, Qiu 等^[17]用 HMGB1 作为干扰因素刺激淋巴管内皮细胞,结果提示 HMGB1 可以促进淋巴管内皮细胞的增殖、转移和淋巴管生成,所以认为 HMGB1 在肝癌中也有可能起到类似于血管生长因子的作用,参与血管的出芽、修剪、成熟等过程。

综上所述,肝癌组织中 HMGB1 的高表达与其微血管的异常增生相关。目前阻断肿瘤血管形成已成为临床肿瘤治疗研究的热点,如何选择有效的治疗靶点阻断肿瘤新生血管形成是有噬解决的问题。本研究结果显示在人肝癌中 HMGB1 表达与 VEGF 表达及 MVD 密切相关,抑制肝癌中 HMGB1 的高表达可能起到下调 VEGF 表达和直接抑制血管生成的效果,有望成为阻断肝癌发生发展过程中血管生成的有效靶点。这还需要进一步的研究与探讨。

参 考 文 献

[1] Muler S, Ronfani L, Bianchi M E. Regulated expression and subcellular location of HMGB1, a chromatin protein with cytokine function[J]. Int

Med, 2004, 255(3):323-343.

[2] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36:169-180.

[3] Muller S, Scafidi P, Degryse B, et al. The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal[J]. EMBO, 2001, 20(16):4337-4340.

[4] Taguchi A, Blood D C, del Toro G, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signaling suppresses tumor growth and metastasis[J]. Nature, 2000, 405(6784):354-360.

[5] Luan Z G, Zhang H, Yang P T, et al. HMGB1 activates nuclear factor- κ B signaling by RAGE and increases the production of TNF- α in human umbilical vein endothelial cells[J]. Immunobiology, 2010, 215(12):956-962.

[6] 宋舟, 刘屹, 包国强, 等. HMGB1 在大肠癌组织中的表达及其意义[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(7):1191-1194.

Song Z, Liu Y, Bao G Q, et al. The expression of HMGB1 in Colorectal cancer and its significance[J]. Modern Oncology, 2008, 16(7):1191-1194.

[7] Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, et al. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer[J]. J Pathol, 2002, 196(1):163-170.

[8] Kuniyasu H, Chihara Y, Kondo H, et al. Amphoterin induction in prostatic stromal cells by androgen deprivation is associated with metastatic prostate cancer[J]. Onol Rep, 2003, 10(6):1863-1868.

[9] Kuniyasu H, Chihara Y, Takahashi T, et al. Co-expression of receptor for advanced glycation end products and the ligand amphoterin associates closely with metastasis of colorectal cancer[J]. Onol Rep, 2003, 10(2):445-448.

[10] Gnanasekar M, Thirugnanam S, Ramaswamy K, et al. Short hairpin RNA (shRNA) constructs targeting high mobility group box-1 (HMGB1) expression leads to inhibition of prostate cancer cell survival and apoptosis[J]. Int J Oncol, 2009, 34(2):425-431.

[11] 贺新春, 范学工, 周蓉蓉, 等. HMGB1 对人肝癌细胞株 HepG2 体外增殖的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2010, 35(5):451-457.

He X C, Fan X G, Zhou R R, et al. Effect of HMGB1 on human hepatoma cell line-HepG2 proliferation[J]. CentSouth Univ (Med Sci), 2010, 35(5):451-457.

[12] Kang H J, Lee H, Choi H J, et al. Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers[J]. Lab Invest, 2009, 89(8):948-959.

[13] 高渝, 张唯力, 曾翔, 等. VEGF 反义寡核苷酸对裸鼠膀胱癌移植瘤的抑制作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(9):1084-1087.

Gao Y, Zhang W L, Zeng X, et al. Inhibition of VEGF antisense oligonucleotides on human bladder carcinoma in nude mice[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2008, 33(9):1084-1087.

[14] Tang D L, Kang R, Herbert J, et al. High-mobility group box 1 and cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1799:131-140.

[15] Heish C Y, Chen C, Chou C H, et al. Overexpression of Her-2/NEU in epithelial ovarian carcinoma induces vascular endothelial growth factor C by activating NF- κ B: implications for malignant ascites formation and tumor lymphangiogenesis[J]. J Biomed Sci, 2004, 11(2):249-259.

[16] Greenberger S, Adini I, Boscolo E, et al. Targeting NF- κ B in infantile hemangioma-derived stem cells reduces VEGF-A expression[J]. Angiogenesis, 2010, 13(4):327-335.

[17] Qiu Y, Chen Y, Fu X, et al. HMGB1 promotes lymphangiogenesis of human lymphatic endothelial cells in vitro[J]. Med Oncol, 2012, 29(1):358-363. (责任编辑:唐秋姗)