

热休克转录因子 1 在人肝细胞癌中的表达及转录活性

滕洪飞 宋振顺 李煜环 范子扬

摘要 **目的** 观察人肝细胞癌组织及对应癌旁组织中热休克转录因子 1 (heat shock transcription factor 1, HSF1) 表达量及转录活性。**方法** 用免疫组织化学方法及 Western blot 方法测定 30 例人肝细胞癌组织及对应癌旁组织中 HSF1 的表达量及磷酸化水平, 并比较 HSF1 的表达量及磷酸化水平在肝细胞癌组织及对应癌旁组织中的差异。**结果** 免疫组织化学及 Western blot 结果显示: ①人肝细胞癌组织中 HSF1 的表达量明显高于对应癌旁组织; ②人肝细胞癌组织中 HSF1 的磷酸化水平明显高于对应癌旁组织。**结论** HSF1 在人肝细胞癌中的表达量及转录活性明显增高。

关键词 热休克转录因子 1 肝细胞癌 表达 磷酸化

Expression and Transcriptional Activity of HSF1 in Human Hepatocellular Carcinoma. Teng Hongfei, Song Zhenshun, Li Yuhuan, Fan Ziyang. Department of Hepatobiliary and Pancreato-Splenic Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Shaanxi 710032, China

Abstract **Objective** To observe the expression and transcriptional activity of HSF1 in human hepatocellular carcinoma. **Methods** The expression and phosphorylation of HSF1 in several cases of human hepatocellular carcinoma tissues and adjacent tissues was detected by immunohistochemical and Western Blot methods. The differences was analyzed between them. **Results** The results of immunohistochemical and Western blot suggest. expression of HSF1 in human hepatocellular carcinoma tissues was higher than that in adjacent tissues, the level of phosphorylation of HSF1 in human hepatocellular carcinoma tissues was higher than that in adjacent tissues too. **Conclusion** Expression and transcriptional activity of HSF1 in human hepatocellular carcinoma tissues were higher than those in adjacent tissues.

Key words HSF1; HCC; Expression; Phosphorylation

肝细胞癌是恶性程度较高的肿瘤, 病死率高, 耐药性强, 临床治疗效果差^[1]。寻找特异性较高的靶分子实现对肝细胞癌的靶向治疗具有重要意义。本实验通过测定 HSF1 在人肝细胞癌及对应癌旁组织、肝癌细胞及肝细胞中的表达及磷酸化水平, 比较二者存在的差异, 探讨 HSF1 成为治疗肝细胞癌新的靶分子的可能性。

材料与方法

1. 材料: 新鲜的肝细胞癌及对应癌旁组织各 30 例取自第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科。BCA 蛋白浓度试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF (碧云天), 兔抗人 HSF1 单克隆抗体、兔抗人磷酸化 HSF1 单克隆抗体 (Bioworld Technology, Inc), 辣根酶标记山羊抗兔单克隆抗体 (北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司), Sp 两步法试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), NC 膜、ECL Western blot Kit (北京康为世纪生物技术有限公司)。

2. 免疫组织化学染色: (1) HSF1 表达量: 将新鲜冷冻肝细胞癌组织及对应癌旁组织送往第四军医大学病理科实验室

做冷冻切片, 组织切片厚度为 4~8mm, 10% 甲醛稀释液固定 5min, 室温下自然晾干。检测 HSF1 表达量及磷酸化时使用 SP 法。在癌及癌旁组织切片上加入 1:100 稀释的兔抗人 HSF1 单克隆抗体于 4℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 5min × 3 次, 加入生物素标记的山羊抗兔二抗, 37℃ 孵育 30min 后再加入辣根酶标记链霉卵白素, 37℃ 再次孵育 30min, PBS 洗涤 5min × 3 次, 加入显色剂 DAB 显色, 自来水冲洗后苏木静衬染。(2) HSF1 磷酸化水平: 癌及癌旁组织切片上加入 1:100 稀释的兔抗人 p-HSF1 单克隆抗体, 其余步骤同前。

3. 测定 HSF1 的表达量: 将新鲜的人肝细胞癌组织及对应癌旁组织各 100mg 冰浴中充分匀浆, 加入 RIPA 裂解液 1ml 充分裂解 10min, 4℃ 条件下 12000r/min 离心 30min, 收集上清液并在相同条件下再次离心后取上清液; BCA 法测定蛋白浓度后取相当于 40μg 蛋白量的上清液用 Western blot 法测定 HSF1 的表达量。

4. 测定 HSF1 的磷酸化水平: 取相当于 40μg 蛋白质的上清液, 经电泳 (110V, 2h)、转膜 (130V, 2h)、封闭 (脱脂奶粉, 1.5h) 后加入兔抗人 p-HSF1 单克隆抗体, 4℃ 孵育过夜, 加入 1:20000 稀释的辣根酶标记山羊抗 p-HSF1 单克隆抗体后检测 HSF1 磷酸化水平。

5. 统计学方法: 利用 Quantity One 分析软件对 Western blot 条带进行分析, SPSS 对结果进行统计分析, 盲法半定量

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学第一附属医院肝胆外科

通讯作者: 宋振顺, 电子信箱: songzs@fmmu.edu.cn

分析比较免疫组织化学结果,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 免疫组织化学:采用半定量法统计结果。笔者设定以每高倍视野(10×40)中阳性细胞数占总细胞数的百分比作为判断标准:0% 为“-”, $< 25\%$ 为“+”, $25\% \sim 50\%$ 为“++”, $50\% \sim 75\%$ 为“+++”, $> 75\%$ 为“++++”,采用盲法统计阳性细胞百分比。结果显示,肝细胞癌组织中 HSF1 抗体染色呈“++”(图 1A),对应癌旁组织中呈“-”(图 1B);肝细胞癌组织中 p-HSF1 抗体染色呈“++”(图 2A),对应癌旁组织呈“-”(图 2B)。

2. Western blot 结果:(1) HSF1 的表达量的测定:

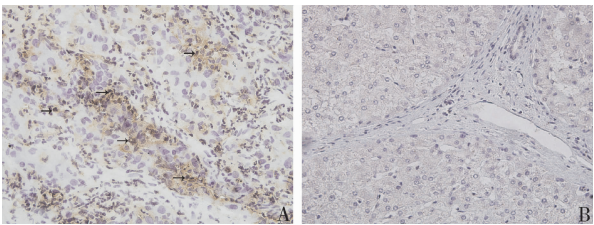


图 1 免疫组化结果($\times 400$)

肝细胞癌组织中 HSF1 的表达为“+++”,对应癌旁组织中 HSF1 表达为“-”。图中黑色箭头指示的黄染的细胞为 HSF1 抗体染色阳性

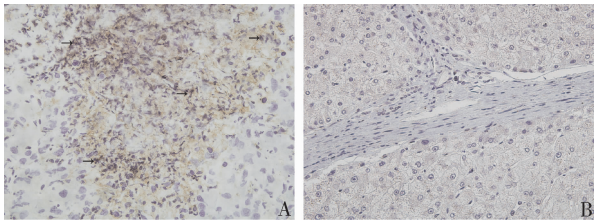


图 2 免疫组化结果($\times 400$)

肝细胞癌组织中 HSF1 的磷酸化水平为“++”,对应癌旁组织中 HSF1 表达为“-”。图中箭头所指细胞为 p-HSF1 抗体染色阳性细胞

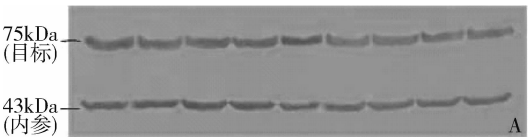


图 3 Western blot 结果

A. 肝细胞癌组织中 HSF1 的目标条带(75kDa 条带)及内参(43kDa);B. 对应癌旁组织中目标条带及内参

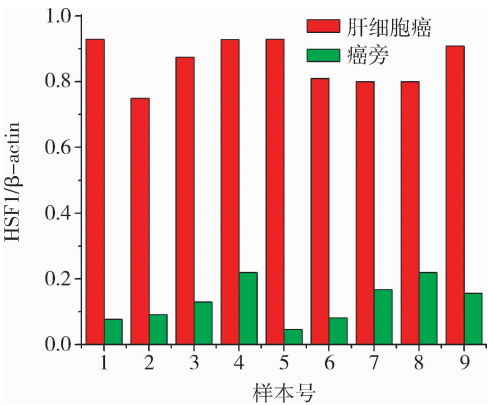


图 4 横、纵坐标分别为标本号、HSF1/ β -actin 比值

红、绿色柱状图分别代表肝细胞癌后对应癌旁组织中经消除背景色彩后目标条带与 β -actin 的灰度值之比。图 4 中我们可以看出二者之间存在统计学差异, $P = 0.002$

肝细胞癌组织中 HSF1 表达较高,Western blot 结果表现为目标条带较宽,颜色较深(图 3A);对应癌旁组织中 HSF1 表达相对较低,Western blot 结果表现为目标条带较窄,颜色较浅(图 3B)。应用 Quantity One 软件分析条带并用 Origin7.0 绘图软件绘图(图 4),统计学分析二者比较差异有统计学意义($P = 0.002$)。(2) HSF1 磷酸化水平的测定:肝细胞癌组织中 HSF1 的磷酸化水平相对较高,表现为对应 Western blot 条带颜色较深(图 5A),而癌旁组织中 HSF1 的磷酸化水平相对较低,对应条带颜色较浅(图 5B),应用 Quantity One 软件分析条带并用 Origin7.0 绘图软件绘图(图 6),统计学分析二者比较差异有统计学意义($P = 0.008$)。

讨 论

HSF1 是一种存在于真核细胞胞质中的蛋白质分子,其结构和功能高度保守。HSF1 在进化上有两个高度保守的结构域,即位于 N 端的 DNA 结合区域(DNA-binding domain, DBD)和含有数个疏水亮氨酸拉链的三聚化结构域(trimerization domain)。DBD 的三维结构为螺旋-转角-螺旋结构基元(helix-turn-helix motif),该结构具有 DNA 结合蛋白的特征性。三聚化结构域由 3 个疏水七氨基酸重复序列的螺旋环结构形成的,主要功能为调节 HSF1 的活化。

HSF1 在机体正常发育成熟过程中不可或缺,研究表明缺失 HSF1 导致果蝇卵子发育异常以及小鼠胚胎发育缺陷^[2,3]。

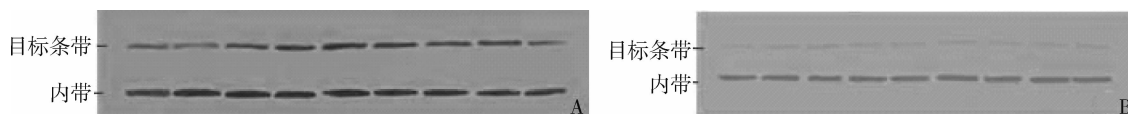


图5 Western blot 结果

A. 肝细胞癌组织中 p-HSF1 的目标条带及内参; B. 对应癌旁组织的目标条带及内参

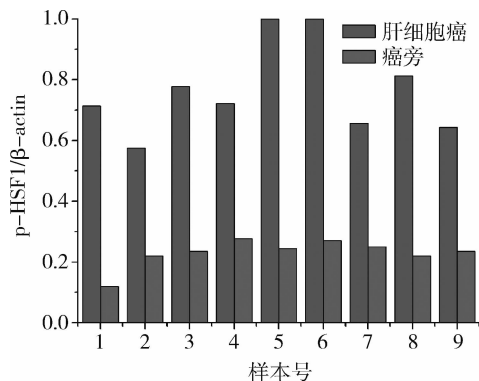


图6 横、纵坐标分别为标本号、HSF1/β-actin 比值

红、绿色柱状图分别代表肝细胞癌后对应癌旁组织中经消除背景色彩后目标条带与 β-actin 的灰度值之比

HSF1 不但在机体的正常发育过程中有重要作用,其表达量的异常还与多种恶性肿瘤的发生及恶性程度相关。Hoang 等^[4]首先发现 HSF1 与人前列腺癌发生相关,在此基础上 Tang 等^[5]发现在恶性程度越高的前列腺癌组织中,HSF1 表达水平越高。此后多篇文献^[6-8]相继报道 HSF1 与恶性肿瘤如散发性胃肠癌,乳腺癌,多发性骨髓瘤相关,但是 HSF1 在肝细胞癌的发生发展过程中是否起作用国内外报道较少。李伟等^[9]报道肝细胞癌组织中 HSF1 mRNA 表达水平高于对应癌旁组织, Jin 等^[10]发现肝细胞癌发展过程中 HSF1 是一个重要的因素, Fang 等^[11]报道体外实验发现 HSF1 促进肝细胞癌的侵袭和转移。因此,研究 HSF1 的表达及活性在肝细胞癌发生发展的作用对于诊断及治疗肝细胞癌具有重要潜在的临床价值。

本研究采用自体配对设计,很好地避免了因个体差异而导致的选择偏倚。实验中我们应用免疫组织化学及分子生物学方法测定并比较人肝细胞癌及对应癌旁组织中 HSF1 的表达量,结果显示肝细胞癌组织中 HSF1 的表达量明显高于对应癌旁组织,二者之间有统计学意义 ($P=0.002$),提示 HSF1 可能与肝细胞癌的发生相关。

正常情况下,HSF1 在胞质中以无活性单体状态存在,当机体应激时 HSF1 迅速被激活并转变为三聚

体移至胞核,该过程中 HSF1 的转录活性与其转录活化结构域中磷酸化位点的高度磷酸化相关,即 HSF1 活化后其磷酸化水平会明显增高^[12,13]。实验中我们发现在肝细胞癌组织中 HSF1 磷酸化水平明显高于对应癌旁组织,二者比较差异有统计学意义 ($P=0.008$),提示 HSF1 在肝细胞癌中的转录活性增强。

我们的研究显示肝细胞癌组织中 HSF1 的表达量及转录活性明显增高,提示 HSF1 可能与肝细胞癌的发生发展相关,但是 HSF1 通过何种机制促进肝细胞癌的发生发展目前仍不清楚。Zou 等^[14]报道 HSP90 在胞质中与 HSF1 单体结合,阻止其三聚体形成,从而起到抑制 HSF1 活性的作用。Ali 等^[15]向爪蟾卵母细胞中注射 HSP90 抗体引起 HSF1 与 HSE 结合增强,该过程能被注射纯化的 HSP90 逆转。Chen 等实验发现 HSP90 抑制剂联合 HSF1 基因敲除可明显抑制多种肿瘤细胞生长,其中包括肝癌细胞。上述报道提示在 HSF1 的活化过程中 HSP90 对 HSF1 的抑制功能可能受到破坏,从而使 HSF1 在细胞内转录活性增强。多种因素可以引起 HSP90 抑制功能受损,如肿瘤细胞中某种或某些分子合成大量增加,竞争结合 HSPs,或者是产生了能与 HSF1 上 HSP 结合位点结合能力较强的分子等。据此我们推测:在肝细胞癌中某种或某些分子合成增加,竞争性地结合 HSP90 或 HSF1 从而达到阻断 HSP90 对 HSF1 的抑制作用。进一步研究 HSF1 在肝细胞癌发生发展中的作用机制是我们今后的研究方向,深入探讨其成为治疗肝细胞癌特异性靶分子可能性具有较大的临床价值。

参考文献

- Voiculescu M, Winkler RE, Moscovici M, *et al.* Chemotherapies and targeted therapies in advanced hepatocellular carcinoma: from laboratory to clinic[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2008, 17(3): 315 - 322
- Jedlicka P, Mortin MA, Wu C. Multiple function of Drosophila heat shock transcription factor in vivo[J]. EMBO J, 1997, 16(9): 2452 - 2462
- Xiao X, Zuo X, Davis AA, *et al.* HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice[J]. EMBO J, 1999, 18(21): 5943 - 5952

- 4 Hoang AT, Huang J, Rudra – Ganguly N, *et al.* A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156 (3) : 857 – 864
- 5 Tang D, Khaleque MA, Jones EL, *et al.* Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 10 (1) : 46 – 58
- 6 Wang J, He H, Yu L, *et al.* HSF1 down – regulates XAF1 through transcriptional regulation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (5) : 2451 – 2459
- 7 Khaleque MA, Bharti A, Gong J, *et al.* Heat shock factor 1 represses estrogen – dependent transcription through association with MTA1[J]. *Oncogene*, 2008, 27 (13) : 1886 – 1893
- 8 Heimberger T, Andrulis M, Riedel S, *et al.* The heat shock transcription factor 1 as a potential target in multiple myeloma[J]. *Br J Haematol*, 2013, 160 (4) : 465 – 476
- 9 李伟, 王葵. 热休克转录因子 1 在肝细胞癌中的表达及意义[J]. *临床医药实践*, 2009, 18 (7) : 490 – 492
- 10 Jin X, Moskopidhis D, Mivechi NF. Heat shock transcription factor 1 is a key determinant of HCC development by regulating hepatic steatosis and metabolic syndrome[J]. *Cell Metab*, 2011, 14 (1) : 91 – 103
- 11 Fang F, Chang R, Yang L. Heat shock factor 1 promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. *Cancer*, 2012, 118 (7) : 1782 – 1794
- 12 Nieto – Sotelo J, Wiederrecht G, Okuda A, *et al.* The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions [J]. *Cell*, 1990, 62 (4) : 807 – 817
- 13 Wignmore SJ, Sangster K, McNally SJ, *et al.* Derepression of heat shock transcription factor 1 in interleukin – 6 – treated hepatocytes is mediated by downregulation of glycogen synthase kinase 3beta and MAPK/ERK – 1[J]. *Int J Mol Med*, 2007, 19 : 413 – 420
- 14 Zou J, Guo Y, Guettouche T, *et al.* Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress – sensitive complex with HSF1 [J]. *Cell*, 1998, 94 (4) : 471 – 480
- 15 Ali A, Bharadwaj S, O’Carroll R, *et al.* HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18 (9) : 4949 – 4960

(收稿日期:2013 – 04 – 17)

(修回日期:2013 – 05 – 07)

CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 调节性 T 细胞在小鼠 H22 原位肝癌模型中的表达和意义

林秀清 黄智铭 王剑虹 蔡 勇 张 豪 吴金明 吴建胜

摘 要 **目的** 检测小鼠原位肝癌模型中 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 调节性 T 细胞的表达,探讨其在肝癌免疫中的作用。**方法** Balb/C 小鼠随机分为肝癌模型组、生理盐水对照组、空白对照组各 10 只,采用细胞悬液直接注射法制成原位肝癌模型。模型制作后第 30 天处死动物;流式细胞术检测分离纯化后的各组新鲜肝组织和脾脏 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞的相对比例;实时 RT – PCR 检测各组肝组织 FoxP3 基因表达水平。**结果** 肝癌模型组肿瘤组织 CD4⁺ CD25⁺ T/CD4⁺ T 细胞的比例增高,与肝癌模型组癌旁远端组织、生理盐水对照组肝组织、空白对照组肝组织比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而各对照组之间的比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肝癌模型组脾脏 CD4⁺ CD25⁺ T/CD4⁺ T 细胞的比例增高,与生理盐水对照组脾脏、空白对照组脾脏比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而各对照组之间的比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肝癌模型组肿瘤组织 FoxP3 mRNA 的表达水平高于肝癌模型组癌旁远端组织、生理盐水对照组肝组织组织和空白对照组肝组织,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而各对照组之间 FoxP3 mRNA 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** Treg 细胞在小鼠原位肝癌模型中表达升高,且对细胞免疫起抑制作用。

关键词 肝癌模型 Treg 细胞 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 FoxP3

Expression and Its Significance of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T Regulatory Lymphocytes in H22 Orthotopic Tumor Model of Hepatocellular Carcinoma in Mice. Lin Xiuqing, Huang Zhiming, Wang Jianhong, Cai Yong, Zhang Hao, Wu Jinming, Wu Jiansheng. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2090660)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院消化内科(林秀清、黄智铭、王剑虹、张豪、吴金明、吴建胜),移植科(蔡勇)

通讯作者:黄智铭,电子信箱:wyyhzhiming@126.com