·论　著·

HIF-1α 和 MRP 的表达在肝癌组织中的相关性分析

李大帅[1]，陈　英[1]，马小菁[2]

（上海市长宁区妇幼保健院：1. 检验科；2. 病理科，上海 200051）

摘　要：目的　对肝癌组织中的低氧诱导因子-1α（HIF-1α）蛋白表达和多药耐药蛋白（MRP）表达之间的相关性进行分析。**方法**　收集本院从 2012 年 3 月至 2013 年 3 月病理科的肝癌石蜡包埋标本共 83 例，对标本进行处理，制作组织切片，观察 HIF-1α 的阳性表达、MRP 的阳性表达情况。**结果**　83 例标本中有 50 例的 HIF-1α 呈阳性表达，阳性率为 60.2%；其中中高分化肿瘤样本的 HIF-1α 阳性率为 74.1%，明显高于低分化的 28.0%（$P<0.05$）；而淋巴结肿瘤转移与否的 HIF-1α 阳性率则无显著性差异（$P>0.05$）。83 例样本中，有 58 例样本的 MRP 呈阳性，阳性率为 70.0%；其中中高分化度的 MRP 阳性率为 77.6%，明显要高于低分化的 52.0%（$P<0.05$）；而淋巴结肿瘤转移与否的 MRP 阳性率分别为 76.3%、64.4%，其差异无统计学意义（$P>0.05$）。在同一标本中 MRP 表达为阳性的，其 HIF-1α 表达也明显升高。**结论**　肝癌组织中 HIF-1α 蛋白的表达与 MRP 表达有一定的相关性。

关键词：HIF-1α 蛋白；　多药耐药蛋白；　肝癌组织；　相关性分析

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.034　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2015)14-2029-03

Correlation Analysis of the expression of HIF-1α and MRP in hepatocellular carcinoma

Li Dashuai[1], *Chen ying*[1], *Ma Xiaojing*[2]

(1. *Department of Clinical Laboratory*; 2. *Department of Pathology*, *Shanghai Changning District Maternal and Child Health Hospital*, *Shanghai* 200051, *China*)

Abstract: Objective　To analyze the correlation between liver tissue hypoxia inducible factor-1α(HIF-1α) protein expression and multidrug resistance protein (MRP) expression between. **Methods**　Our hospital from March 2012 to March 2013 the Department of Pathology of the liver paraffin-embedded specimens of a total of 83 cases of specimen processing, production of tissue sections, HIF-1α expression was observed, the positive expression of MRP. **Results**　83 cases of specimens in HIF-1α 50 cases were positive, the positive rate was 60.2%; of which the well-differentiated tumor samples of HIF-1α positive rate was 74.1%, significantly higher than the 28.0% poorly differentiated ($P<0.05$); and the absence of lymph node metastasis positive rate of HIF-1α was no significant difference ($P>0.05$). In 83 cases of samples, 58 samples were MRP positive, the positive rate was 70.0%; MRP positive rate among the high degree of 77.6%, significantly higher than the 52.0% poorly differentiated ($P<0.05$); and lymph node tumors MRP positive rate of metastasis were 76.30, 64.4% respectively, the difference was not statistically significant ($P>0.05$). MRP expression in the same samples were positive, the HIF-1α expression was also significantly increased. **Conclusion**　HCC HIF-1α protein expression and MRP expression has some relevance.

Key words: hypoxia inducible factor;　multidrug resistance protein;　hepatocellular carcinoma;　correlation analysis

肝癌是最为常见的恶性肿瘤，其发病率以及死亡率也相对其他的恶性肿瘤要高。肝癌一般是由环境或者遗传等多种因素所导致诱发的一种恶性肿瘤。近年来，从分子水平研究恶性肿瘤的耐药性、治疗效果以及肿瘤转移等是新兴的研究方向。大量的临床调查研究发现，肿瘤缺氧的微环境是导致肿瘤治疗的治疗效果未能达到理想预期效果的主要原因[1-3]。研究表明恶性肿瘤在缺氧的环境下，可以通过低氧诱导因子-1（HIF-1）促进肿瘤内部的新生血管生成，改变细胞代谢，从而满足肿瘤快速生长的需要。HIF-1 广泛存在在哺乳动物和人体内的一种逆转录因子。主要是由 HIF-1α 和 HIF-1β 两个亚型单位组成。另外，肿瘤细胞的多耐药问题是影响化疗效果以及治疗预后等的重要原因。特别是肝癌的多耐药问题是多因素以及多机制共同导致和参与的结果。其中多药耐药蛋白是其中一种重要的蛋白。本文主要探讨肝癌组织中 HIF-1α 表达和多药耐药蛋白的相关性研究。

1　资料和方法

1.1　一般资料　收集本院从 2012 年 3 月到 2013 年 3 月病理科的肝癌石蜡包埋标本共 83 例。其中男 44 例，女 39 例。年龄 32～74 岁，平均年龄在 42.2 岁。其中小细胞癌有 23 例，鳞癌有 33 例，腺癌有 15 例，细支气管肺泡癌有 13 例。根据 2003 年 AJCC 第 6 版标准分期，Ⅰ期有 33 例，Ⅱ期有 21 例，Ⅲ期有 18 例，Ⅳ期有 11 例。

1.2　仪器与试剂　试验中所用的试剂包括有：HIF-1α 多克隆抗体，由美国的 Santa Cruz 公司生产。P-gp 和 MRP 鼠抗人单克隆抗体由北京中山生物技术有限公司提供。光学显微镜用日本奥林巴斯生产，电热恒温箱为重庆实验设备有限公司提供。

1.3　方法　所有 83 例肝癌组织样本来源于手术切除标本。在取样注意避免采集坏死组织。样本用福尔马林进行固定后用石蜡包埋约 5 微米的组织切片。将已用福尔马林固定和石蜡包埋的肝癌组织切片采用 SP 法，先用二甲苯脱蜡，梯度乙醇洗脱至水化。然后用 3%的过氧化氢灭活标本中存在的内源性过氧化物酶活性，在 3%的过氧化氢溶液中室温浸泡约 20 min。浸泡后需要用磷酸缓冲溶液冲洗 3 遍。冲洗后根据不同

作者简介：李大帅，男，检验技师，主要从事免疫学和生物化学研究。

抗体的需要,对样本组织进行抗原的修复。将组织切片放置在 100 ℃的枸橼酸缓冲液中,加热浸泡 10 min,冷却后再用磷酸缓冲溶液将表面的枸橼酸缓冲液冲洗掉。在孵育箱中,用山羊血清 37 ℃封闭孵育 20 min。将血清移除后,滴加抗体。分别加入抗 HIF-1α 多克隆抗体,抗 P-gp 单克隆抗体以及 MRP 单克隆抗体,分别稀释 1∶50、1∶100 和 1∶100 倍。样本组织置于 4℃冰箱低温下孵育过夜。将样本组织用磷酸缓冲液冲洗 3 遍后,滴加生物素化通用型的 IgG,然后室温孵育 30 min 后,用磷酸盐冲洗 2 次。再滴加 SP 复合物,室温孵育 30 min,再用磷酸缓冲液冲洗 2 次。滴加二氨基联苯胺进行显色,再加入苏木素进行复染,脱水透明处理,然后用中性树胶进行封固处理。

1.4　判断指标　组织切片结果分别由 2 位病理医师进行阅片判断。根据肿瘤细胞的阳性率以及着色的深浅强度判断。阳性细胞少于 5%的记为 0 分,6%～25%记为 1 分,50%以下,26%以上为 2 分,在 51%～75%之间的有 3 分,大于 75%的记为 4 分;上色深浅程度,没有着色为 0 分,淡黄色有 1 分,黄色有 2 分,棕黄色则记为 3 分。根据两组数据的乘积得出阴性,阳性,弱阳性,强阳性等结果。其中 0 分为阴性(－),1 分到 2 分为弱阳性(＋),3 分到 4 分为阳性(＋＋),5 分及以上则为强阳性(＋＋＋)。

1.5　统计学处理　本试验的所有数据均采用统计学分析软件 SPSS12.0 进行统计学的分析。计数数据采用 χ^2 检验,当 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　HIF-1α 在肝癌组织中的表达　83 例组织标本中有 50 例样本的 HIF-1α 呈阳性表达,阳性率为 60.2%。中高分化的肿瘤,其样本的 HIF-1α 的阳性率明显要高于低分化的肿瘤($P<0.05$);而淋巴结是否出现转移的肿瘤样本其 HIF-1α 的阳性率则没有统计学差异($P<0.05$)。

表 1　HIF-1α 在肝癌组织中的表达

组别	n	HIF-1α 表达			χ^2	P
		阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)		
分化程度					6.213	<0.05
中高分化	58	43	15	74.1		
低分化	25	7	18	28.0		
淋巴结转移					3.921	>0.05
有	38	22	16	57.9		
无	45	28	17	62.2		

表 2　多药耐药蛋白在肝癌组织中表达

组别	n	MRP 表达			χ^2	P
		阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)		
分化程度					7.923	<0.05
中高分化	58	45	13	77.6		
低分化	25	13	12	52.0		
淋巴结转移					4.098	>0.05
有	38	29	9	76.3		
无	45	29	17	64.4		

2.2　MRP 在肝癌组织中表达　83 例肝癌组织样本中,有 58 例样本的 MRP 呈阳性,阳性率为 70.0%。肿瘤分化程度对比,中分化度和低分化度的 MRP 的阳性率为 77.6%,明显要高于低分化肿瘤的 52.0%,两者对比有差异有统计学意义($P<0.05$);而淋巴结转移情况,出现淋巴结转移组织样本 MRP 阳性率为 76.3%,与没有出现淋巴结转移样本的 MRP64.4%的阳性率对比差异无统计学意义($P<0.05$)。

2.3　肝癌组织中 HIF-1α 与 MRP 的表达　在同一标本中 MRP 表达为阳性的样本,其 HIF-1α 表达也明显升高。在 HIF-1α 的阳性表达部位,MRP 的表达率也会有明显表达,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3　肝癌组织中 HIF-1α 蛋白的表达与多药耐药蛋白相关性

HIF-1α 表达	MRP 表达		χ^2	P
	阴性	阳性		
阴性	25	8	16.23	<0.05
阳性	0	50		

3　讨　　论

恶性肿瘤治疗主要是以化学药物治疗和放射治疗为主,但一般化疗或者放疗药物治疗的效果不理想。有研究表明这可能与患者体内存在有多药耐药蛋白有关。恶性肿瘤产生耐药的机制复杂,目前主要有以下几种认识:多药耐药基因以及 P 糖蛋白的表达增加;多药耐药的相关基因以及蛋白表达过度[4-5];肿瘤细胞中的 DNA 修复功能以及肿瘤细胞的抗凋亡能力增加;谷胱甘肽以及相关的转移酶等表达过度等。因此,对于肿瘤患者体内的多药耐药蛋白的研究在实现肿瘤患者的个体化给药治疗过程中有着重要的意义。有报道指出,检测患者体内的 P-gp,LRP,MRP 以及 GST-π 的表达可以作为监测恶性肿瘤细胞原发性耐药的主要指标[6]。

HIF-1α 是人体具有的调节细胞内氧代谢的一种关键调节因子。在有氧的条件下,HIF-1 可以通过羟基化与泛肽连接酶结合,使得人体内的 HIF-1 能够被泛太化而出现降解。当出现缺氧时,HIF-1 不能被有效羟基化,使得其含量增加。一旦 HIF-1 的含量增加时,可以参与多种与恶性肿瘤适应的基因转录,帮助维持肿瘤细胞的能量代谢以及形成新生血管等[7-8]。近年来,在缺氧的条件下,抑制 HIF-1 的表达是一种新型的肿瘤治疗途径[9]。

在肿瘤细胞快速生长的过程中,由于恶性肿瘤细胞的迅速增殖导致细胞内部的缺氧。在多种肿瘤中可以发现 HIF-1 的过度表达,发现 HIF-1 参与肿瘤的生长,浸润以及转移等过程[10]。根据本文的研究结果,HIF-1 的过度表达可以促进多药耐药蛋白的表达。其作用原理初步推测,在肿瘤细胞出现缺氧时,HIF-1α 的表达增加,而同时 MRP 具有相同的蛋白同源性结果。在正常的生理条件下其主要功能是维持细胞内环境的稳定。但当细胞出现缺氧时,MRP 的表达增高则是有利于保持细胞内部的缺氧环境的稳定。

临床结果提示肝癌组织中 HIF-1 的表达和 MRP 的表达有一定的 相关性,会影响肿瘤治疗的效果。肝癌组织中的 HIF-1α 蛋白和 MRP 的相关性研究还需要进一步深入探讨。同时针对抑制 HIF-1 的研发对于肿瘤治疗以及肿瘤治疗的耐药性等有着重要的意义。这对于开展肝癌患者的个性化治疗有着指导性意义。

(下转第 2033 页)

2 个实验室认可的国际标准 ISO/IEC17025[6]（检测和校准实验室能力的通用要求）和 ISO15189[7]（医学实验室-质量和能力的专用要求）都对检测结果的溯源性和可比性提出了明确要求，强调方法学比较试验（比对试验）是实现准确度溯源和患者标本检验结果可比性的重要途径[8]。

对于 ADVIA2400 和 BS-2000M 2 台生化分析仪，本室均配备了相应的试剂和操作程序，从而形成检测系统。虽然酶类项目，例如此次实验的 CK、AST、LDH，2 种试剂采用的方法大致相同，但由于样本量、试剂量以及仪器差异等因素，2 种检测系统的结果需要进行比对分析和偏倚评估，以保证结果的准确性和可比性。

在整个比对实验中，必须保证 2 种分析系统处于在控状态，为此，作者先做了批内和批间精密度实验，结果表明，CK、AST、LDH3 项的 *CV*% 均低于 CLIA′88 规定的允许误差范围，说明比对实验数据有效可靠。

随后相关回归分析表明，待评方法与参比方法间的相关系数（*r*）均大于 0.975，表明 X 值取值范围合适，可用线性回归来估算斜率和截距。将 3 种项目的不同医学决定水平浓度 Xc 带入各自的线性回归方程，计算出医学决定水平点的系统误差和相对偏倚，以相对偏倚小于 1/2CLIA′88 允许总误差范围为临床可接受性能的判断标准[9-10]。结果表明，除 LDH 在低医学决定水平不具有可比性外，其余项目在 ADVIA2400 和 BS2000M2 种生化分析系统间均具有可比性。所以，当有两个检测系统对同一检验项目进行检测时，有必要进行比对分析和偏倚评估，以保证检验结果的准确性和可比性。

关于不同检测系统检验结果可比性的制定标准，国际上还没有一致的看法，用 CLIA′88 规定的允许总误差范围显得范围过宽，不适合用于比对实验中可接受性能的评价。作者查阅大量文献，发现张秀明等[8]、刘怀明等[11]张勤寂等[12]采用 1/2CLIA′88 规定的允许总误差范围作为判断标准，故认为此标准操作性和可行性较好，适合作为可接受性能评价的依据。

参考文献

[1] 丛玉隆，冯仁丰，陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京：中国医药科技出版社，2004：111-114.

[2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. Wayne，PA，USA：NC CLS，2002.

[3] 冯仁丰. 临床实验室质量管理技术基础[M]. 上海：上海科学技术文献出版社，2003：5-8.

[4] 托马斯. 临床实验诊断学：实验结果的应用和评估[M]. 朱汉明，沈 霞，吕 元，等译. 上海：上海科学技术出版社，2004：10-57.

[5] Anonymous. Medicare，Medicaid and CLIA programs，regulations implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1998（CLIA）-HCFA：Final rule with comment period[J]. Fed Regist，1992，57(40)：7002.

[6] International Organization for Standardization. ISO/IEC17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S]. Geneva：International Organization for Standardization，1999.

[7] 魏昊，丛玉隆. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京：中国计量出版社，2004：72-75.

[8] 张秀明，庄俊华，徐宁，等. 不同检测系统血清酶学测定结果的偏倚评估与可比性研究[J]. 中华检验医学杂志，2006，29(3)：346-349.

[9] 邱玲，程歆琦，刘荔，等. 多台生化分析仪多项目同时进行比对的实验研究设计及应用[J]. 中华医学检验杂志，2007，30(9)：1001-1004.

[10] 王丽，牛璐璐，权翠侠，等. 组合生化检测系统实验结果偏倚评估[J]. 临床检验杂志，2007，25(6)：425-426.

[11] 刘怀平，孙金芳，陈欣，等. 不同检测系统 21 项常规生化结果的比对与临床可接受性评价[J]. 中国实验诊断学，2009，20(13)：1406-1409.

[12] 张勤寂，刘堂斌，陈丽峰. 室间不同生化检测系统测定结果的比对及偏倚评估[J]. 江西医学检验，2008，26(2)：151-152.

（收稿日期：2015-02-22）

（上接第 2030 页）

参考文献

[1] Huang G，Yang L. Expression of hypoxia-inducible factor 1α and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma：Impact on neovascularization and survival[J]. World J Gastroenterol，2005，11(11)：1705-1708.

[2] Ding L，Chen X，JING K，et al. Inhibition of the VEGF expression and cell growth in hepatocellular carcinoma by blocking HIF-1α and Smad3 binding site in VEGF promoter[J]. J Huazhong Univ Sci Technol：Med Sci，2006，26(1)：75-78.

[3] Zheng SS，Chen XH，Yin X，et al. Prognostic significance of HIF-1α expression in hepatocellular carcinoma：a meta-analysis[J]. PLOS One，2013，8(6)：e65753.

[4] Ma X，Li J，Tan B，et al. Expression of HIF-1α in hepatocellular carcinoma and its relationship with vasculogenic mimicry and clinical pathology[J]. German J Clin Oncol，2013，11(5)：528-531.

[5] Jin J，Huang M，Wei H，et al. Mechanism of 5-fluorouracil required resistance in human hepatocellular carcinoma cell line Bel7402[J]. World J Gastroenterol，2002，8(9)：1029-1034.

[6] Wang H，Chen X. Correlation of expression of multidrug resistance protein and messenger RNA with 99mTc-methoxyisobutyl isonitrile（MIBI）imaging in patients with hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol，2004，9(10)：1281-1285.

[7] Jin J，Huang M，Wei HL et al. Mechanism of 5-fluorouracil required resistance in human hepatocellular carcinoma cell line Bel（7402）.[J]. World Journal of Gastroenterology，2002，8(6)：612-614.

[8] Dong J，Zhiping P. Such as antisense oligonucleotides and ultrasound contrast agent microbubbles combined with ultrasound irradiation transfected hepatoma reversal of multidrug resistance [J]. J Hepatol，2006，14(5)：341-345.

[9] Ding L，Chen X，Zhang Z，et al. Synergistic effect of bromocriptine and tumor necrosis factor-α on reversing hepatocellular carcinoma multidrug resistance in nude mouse MDR1 model of liver neoplasm[J]. World J Gastroenterol，2005，11(54)：5621-5626.

[10] Wang H，Chen XP，Qiu FZ，et al. Correlation of expression of multidrug resistance protein and messenger RNA with（99m）Tc-methoxyisobutyl isonitrile（MIBI）imaging in patients with hepatocellular carcinoma.[J]. World J Gastroenterol，2004，10(9)：923-925.

（收稿日期：2015-02-22）