文章编号:1000-5404(2008)06-0485-04

论著

Cyr61与β-catenin在肝癌组织和细胞株中表达的相关性研究

孙世俊,司维柯,丁 伟,潘 静,李招权,赵 宸 (第三军医大学医学检验系临床血液学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究Cyr61与β-catenin在肝细胞肝癌和肝癌细胞株中的表达及其相关性,探讨二者在肝癌发生中的作用。**方法** 采用免疫组化法检测32例肝细胞肝癌患者肝癌组织中Cyr61与β-catenin蛋白的表达水平;免疫组化法和RT-PCR检测正常肝细胞株L02和肝癌细胞株$HepG_2$、QGY-7701、H_{22}中Cyr61与β-catenin蛋白与mRNA的表达水平;并比较二者的相关性。**结果** 65.63%(21/32)肝癌标本Cyr61蛋白阳性表达,71.88%(23/32)肝癌标本β-catenin蛋白阳性表达,二者合并阳性表达有56.25%(18/32),合并阴性表达有18.75%(6/32),Cyr61表达与β-catenin表达呈正相关($r=0.425$, $P<0.05$);正常肝细胞株L02及肝癌细胞株$HepG_2$、QGY-7701、H_{22}中Cyr61与β-catenin mRNA与蛋白均有表达,二者表达一致性达100%。**结论** Cyr61与β-catenin在肝癌和肝癌细胞株中高度一致阳性表达,提示Cyr61的表达可能与β-catenin的表达有关,二者可能在肝癌的发生中起到重要作用。

关键词: Cyr61;β-catenin;癌,肝细胞
中图法分类号: R341;R394.3;R735.7 **文献标识码:** A

Relationship of Cyr61 and β-catenin in hepatocellular carcinoma tissues and hepatoma carcinoma cells

SUN Shi-jun, SI Wei-ke, DING Wei, PAN Jing, LI Zhao-quan, ZHAO Chen (Department of Clinical Hematology, College of Medical Laboratory Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate expressions of Cyr61 and β-catenin and their relationship in hepatocellular carcinoma tissues and hepatoma carcinoma cells, and explore their roles in hepatocarcinogenesis. **Methods** Expressions of Cyr61 and β-catenin were studied by immunohistochemistry in 32 patients with hepatocellular carcinoma, hepatocyte L02 and hepatoma carcinoma cell $HepG_2$, QGY-7701 and H_{22} cells. Cyr61 mRNA and β-catenin mRNA were detected by RT-PCR in hepatocyte L02 and hepatoma carcinoma cell $HepG_2$, QGY-7701 and H_{22} cells. The relationship of their expressions were studied. **Results** The expressions of Cyr61 protein and β-catenin protein were found in 65.63% (21/32) and 71.88% (23/32) of 32 patients, both Cyr61 protein and β-catenin protein were negatively expressed detected in 18.75% (6/32) and positively in 56.25% (18/32) respectively. Expression of Cyr61 protein was positively correlated with the expression of β-catenin protein ($r=0.425$, $P<0.05$). Expressions of Cyr61 and β-catenin at both mRNA and protein levels were found in hepatocyte L02 and hepatoma carcinoma cell $HepG_2$, QGY-7701, H_{22}, co-expression of Cyr61 and β-catenin was 100% of all cells. **Conclusion** Cyr61 and β-catenin are expressed in hepatocellular carcinoma tissues and hepatoma carcinoma cells. Expression of Cyr61 is related with expression of β-catenin, and they may participate in hepatocarcinogenesis.

Key words: Cyr61; β-catenin; carcinoma, hepatocellular

Cyr61(Cysteine-rich 61)是一种分泌型的细胞外基质蛋白,编码该蛋白的基因是CCN家族中最早被发现和克隆的基因[1]。Cyr61有多种功能,如介导细胞外基质的形成,促进细胞增殖、分化、黏附、迁移以及血管形成并与肿瘤发生有关[2,3]。近来研究表明Cyr61与肿瘤发生有关,且在不同癌组织Cyr61表达不一致,但与肿瘤确切关系及机制至今不明,值得深入研究。Wnt/β-catenin信号转导通路异常激活可导致胚胎发

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30672393)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30672393)
作者简介: 孙世俊,男,重庆市万州区人,硕士研究生,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。电话:(023)66820679,E-mail: xiaozisun@hotmail.com
通信作者: 司维柯,电话:(023)68752312,E-mail: weikesi@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-11-19;**修回日期:** 2007-12-20

育异常和肿瘤发生。在肝癌中,普遍认为该通路的核心环节 APC/β-catenin/Tcf 各成员基因突变可能与肿瘤发生有关[4,5]。已有研究表明 Cyr61 与 Wnt/β-catenin 信号转导通路有关,在非洲爪蟾 Wnt 信号能刺激或抑制 Cyr61 同源基因 XCyr61 的表达[6];我们前期研究也表明 Wnt3A 可诱导间充质干细胞 Cyr61 表达[7]。本研究探讨了 Cyr61 与 β-catenin 在肝癌组织和细胞株中的表达及其相互关系,为进一步研究 Cyr61 的与 Wnt/β-catenin 信号转导通路间的关系以及在肝癌乃至其它肿瘤发生中的作用打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 病例标本

收集第三军医大学西南医院病理科 2003 年 3 月至 2005 年 1 月肝细胞肝癌石蜡包埋组织标本 32 例,全部符合全国肝癌防治会议的诊断标准[8],其中男性 27 例,女性 5 例,年龄 28 ~ 73 (46 ± 11)岁。

1.2 细胞株

正常人肝细胞株 L02 由第三军医大学西南医院传染病科惠赠,人肝癌细胞株 $HepG_2$ 由重庆市儿童医院外科研究所惠赠,QGY-7701 购自重庆市肝病研究所,小鼠肝癌细胞株 H_{22} 购自重庆市中药研究所。细胞在 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中(H_{22} 细胞接种在 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中),内含 100 U/ml 青霉素和 100 ng/ml 链霉素,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

1.3 试剂

细胞培养基 RPMI 1640、DMEM 为 Gibco 公司产品,小牛血清为杭州四季清生物公司产品。β-catenin 单克隆抗体和兔抗人/鼠 Cyr61 多克隆抗体为 Santa Crus 公司产品,SP-9001/9002 试剂盒为中杉金桥公司产品。tripure 为 Invitrogen 公司产品,逆转录系统为 TOYOBO 公司产品,引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.4 方法

1.4.1 免疫组化法检测肝癌组织中 Cyr61 和 β-catenin 蛋白

按试剂公司说明书进行。组织切片染色前均进行高温修复,切片以 DAB 显色,苏木精轻度复染。磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。Cyr61、β-catenin 阳性结果用 NIS-Elements 图像分析系统对其染色强度和范围进行分析,每张组织切片随机选取 4 个高倍镜视野(40 倍放大),设定基线标准染色强度的判定标准后,以平均光密度为测定指标,Cyr61 以平均光密度超过 0.335 7 记为阳性表达,β-catenin 以平均光密度超过 0.489 6 记为阳性表达。

1.4.2 免疫组化法检测细胞中 Cyr61 和 β-catenin 蛋白

L02 细胞、$HepG_2$ 细胞、QGY-7701 细胞培养爬片,48 h 达对数生长期后用 4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定 30 min;H_{22} 细胞为悬浮细胞,收集对数生长期细胞,离心后用小牛血清重悬,涂于载玻片上后用丙酮 4 ℃ 固定 30 min,其余染色方法同组织切片免疫组化方法。

1.4.3 RT-PCR 检测 Cyr61 和 β-catenin mRNA

取对数生长期的细胞,用 Trizol 试剂所提供的方法提取总 RNA,并以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA;以 cDNA 为模板进行 PCR 合成,引物序列设计见表 1,反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 26 个循环;72 ℃ 再延伸 10 min,产物4 ℃ 保存;PCR 产物 1.6% 琼脂糖凝胶电泳。

表 1 PCR 引物序列

	序列	产物大小
人 Cyr61	上游引物:5′-ACTTCATGGTCCCAGTGCGC-3′	100 bp
	下游引物:5′-AAATCCGGGTTTCTTTCACA-3′	
小鼠 Cyr61	上游引物:5’-GGATGAATGGTGCCTTGC-3’	121 bp
	下游引物:5’-GYCCACATCAGCCCCTTG-3’	
人 β-catenin	上游引物:5′-AAAGCGGCTGTTAGTCACTGG-3′	132 bp
	下游引物:5′-GACTTGGGAGGTATCCACATCC-3′	
小鼠 β-catenin	上游引物:5′-GAAGGTGCTGTCTGTCTGCTCTA-3′	150 bp
	下游引物:5′-TTAGTCGCTGCATCTGAAAGGT-3′	
GAPDH	上游引物:5′-CATCATCTTCCAGGAGCG-3′	443 bp
	下游引物:5′-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3′	

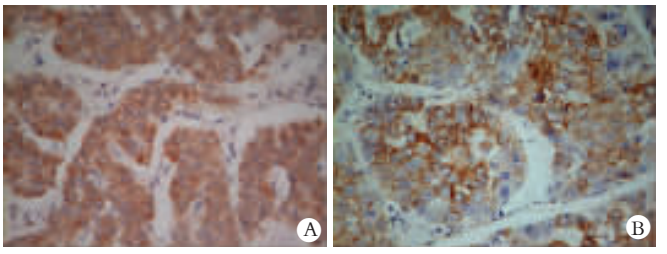
1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行秩相关分析。

2 结果

2.1 Cyr61 蛋白与 β-catenin 蛋白在肝癌病人癌组织的表达及相关性

肝癌组织切片中,Cyr61 蛋白主要表达于肝癌细胞细胞质中,β-catenin 蛋白也主要表达于肝癌细胞细胞质中,部分表达于癌细胞细胞核中;癌旁正常肝组织 Cyr61 蛋白呈阴性表达,β-catenin 蛋白呈阴性表达或少量的细胞膜表达(图 1)。32 例肝癌病例中 Cyr61 蛋白阳性表达率为 65.63% (21/32),β-catenin 蛋白阳性表达率为 71.88% (23/32)。Cyr61 蛋白表达阳性的肝癌组织中 β-catenin 蛋白阳性表达率为 85.71%,Cyr61 蛋白表达阴性的肝癌组织中 β-catenin 蛋白阳性表达率为 45.45%,二者呈明显的正相关($r = 0.425$, $P < 0.05$),见表 2。

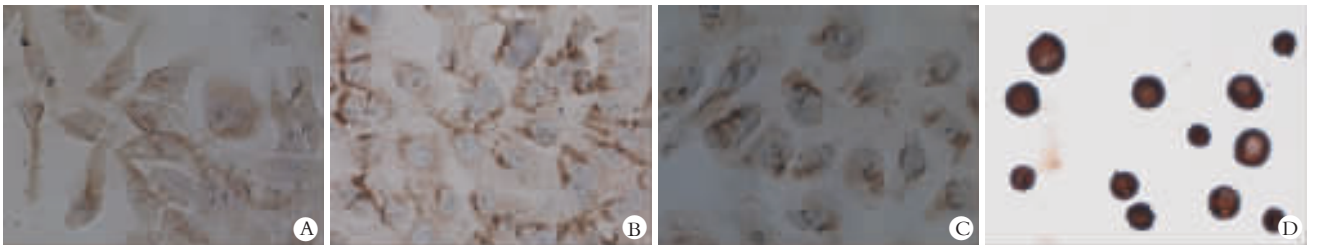


A:癌组织中 Cyr61 呈阳性表达;B:癌组织中 β-catenin 呈细胞质、细胞核阳性表达

图 1 Cyr61 与 β-catenin 在肝癌组织中的表达 (S-P × 400)

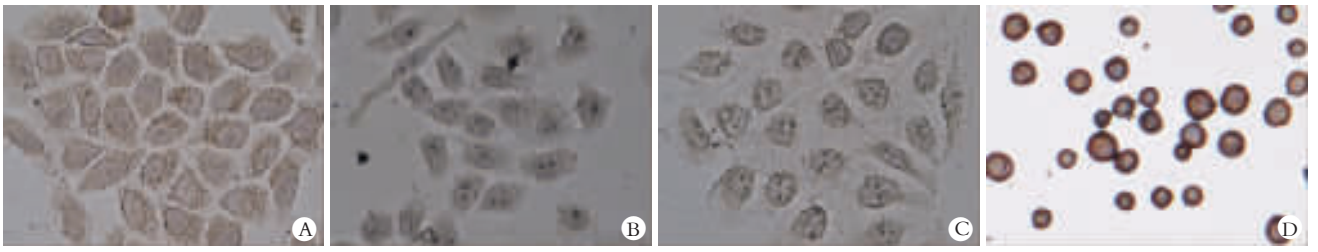
2.2 Cyr61 与 β-catenin 蛋白在肝癌细胞株的表达

Cyr61 蛋白与 β-catenin 蛋白在肝癌细胞 $HepG_2$、QGY-7701、H_{22} 细胞和正常肝细胞 L02 细胞中均见阳性表达,表达一致率为 100%。Cyr61 蛋白主要表达于细胞质,染为不同程度的黄色或棕黄色颗粒,β-catenin 蛋白主要表达于细胞膜和细胞质,少数有核表达,染色均呈棕黄色颗粒(图 2,3)。



A:L02 细胞 Cyr61 阳性表达(S-P×200); B:$HepG_2$ 细胞 Cyr61 阳性表达(S-P×200); C:QGY-7701 细胞 cyr94 阳性表达(S-P×200); D:H_{22} 细胞 Cyr61 阳性表达(S-P×400)

图 2　Cyr61 在细胞株中的表达



A:L02 细胞 β-catenin 阳性表达(S-P×200);B:$HepG_2$ 细胞 β-catenin 阳性表达(S-P×200);C:QGY-7701 细胞 β-catenin 阳性表达(S-P×200);D:H_{22} 细胞阳 β-catenin 性表达(S-P×400)

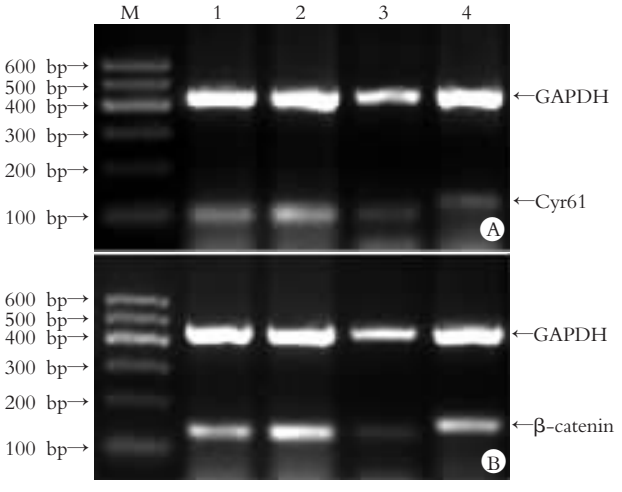
图 3　β-catenin 在细胞株中的表达

表 2　患者肝癌组织中 Cyr61 与 β-catenin 蛋白表达相互关系

Cyr61	例数	β-catenin 阳性表达		χ^2	P
		例数	百分率(%)		
阳性	21	18	85.71	5.788	$P<0.05$
阴性	11	5	45.45		

2.3　Cyr61 与 β-catenin mRNA 在肝癌细胞株的表达

mRNA 水平,三株肝癌细胞 $HepG_2$、QGY-7701、H_{22} 中 Cyr61 与 β-catenin 均有表达,表达一致率为 100%,在正常肝细胞株 L02 细胞中 Cyr61 与 β-catenin 也有表达(图 4)。



A:Cyr61 在肝癌细胞中的表达;B:β-catenin 在肝癌细胞中的表达;M:标准; 1:L02 细胞; 2:$HepG_2$ 细胞; 3:QGY-7701 细胞; 4:H_{22} 细胞

图 4　Cyr61 和 β-catenin 转录水平在肝癌细胞株中的表达

3　讨论

近年来,Cyr61 与肿瘤的关系日益受到关注。在胃癌中,Cyr61 高表达与胃癌细胞的活动力、侵袭性呈正相关,与淋巴转移及恶性进展一致[9]。在神经胶质瘤细胞中 Cyr61 高表达,并与肿瘤恶性程度、患者年龄性别和肿瘤预后有关[10]。在胰腺癌胸膜转移时 Cyr61 表达明显增高,转移灶 Cyr61 大于原发灶 2 倍,表明 Cyr61 与胰腺癌转移密切相关可作为胰腺癌及其转移的新标志物和治疗靶点[11]。体外实验中,Cyr61 在神经胶质瘤细胞中高表达,并促进其在软琼脂上集落形成和裸鼠体内肿瘤的生长。我们的实验也发现 Cyr61 可促进骨肉瘤细胞系 143B 细胞的增殖、迁移[12],以上研究表明 Cyr61 似乎起到癌基因的作用。但在前列腺癌、子宫平滑肌瘤、横纹肌肉瘤和非小细胞肺癌中 Cyr61 表达却下调,似乎起到抑癌基因的作用[13]。

肿瘤发生时 Wnt/β-catenin 信号常被异常激活,此时 β-catenin 在细胞质中积聚并向胞核转移,与核内转录因子 TCF4 结合,启动下游靶基因转录表达,如 CyclinD1,c-myc 等,引起细胞增殖、迁移等效应,与肿瘤的发生有关[5]。已证实肝癌中常存在 β-catenin 基因突变,特别是 β-catenin 在浆和核表达时,常与肝癌发生、转移有关[4]。

本研究结果显示 65.63% 的患者 Cyr61 蛋白出现阳性表达,71.88% 的患者 β-catenin 蛋白出现阳性表达。阳性表达的 Cyr61 蛋白主要位于癌细胞的细胞质,在发生癌细胞浸润的区域阳性染色更明显;β-catenin 蛋白也主要积聚在癌细胞细胞质中,部分发生核转移;Cyr61 的表达与 β-catenin 的表达呈正相关($r=0.425$, $P<0.05$)。那么 Cyr61 的表达是否与 β-catenin

的表达有关,两者之间有无因果关系? 在肝癌中是否也有鼠间充质干细胞或爪蟾中观察到的现象,即 Cyr61 的过表达是由 β-catenin 的异常表达所诱导的? 研究表明肝癌细胞株中,无论在蛋白水平还是在 mRNA 水平,Cyr61 与 β-catenin 的表达均具有高度一致性。因此有理由推测:与爪蟾以及我们先前在鼠间充质干细胞中观察到的一样,在肝癌组织/细胞中 Cyr61 的过表达可能与 β-catenin 的过表达有关,即 β-catenin 诱导了 Cyr61 的表达,Cyr61 或 Cyr61 与 β-catenin 共同参与了肿瘤的发生,并与肿瘤细胞的恶性增殖、侵袭与迁移有关。

至于正常肝细胞株 L02 中 Cyr61 与 β-catenin 均有过表达,可能因 L02 为胎肝细胞,Wnt/β-catenin 信号通路作为胚胎发育期的一种增殖信号,在胚胎时期的细胞中呈激活状态,故在 L02 细胞中也过表达,并可能诱导调控了 Cyr61 的表达。总之,本研究表明肝癌组织和细胞中均有 Cyr61 和 β-catenin 过表达,并且二者的表达呈正相关,该研究为进一步研究 Cyr61 与 Wnt/β-catenin 信号转导通路间的关系,以及在肿瘤发生中的作用打下良好的基础。

参考文献:

[1] O'Brien T P, Yang G P, Sanders L, *et al*. Expression of cyr61, a growth factor-inducible immediate-early gene [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(7): 3569 - 3577.

[2] Kireeva M L, Mo F E, Yang G P, *et al*. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(4): 1326 - 1334.

[3] Brigstock D R. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61) [J]. Angiogenesis, 2002, 5(3): 153 - 165.

[4] Joo M, Lee H K, Kang Y K. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin D1 expression [J]. J Korean Med Sci, 2003, 18(2): 211 - 217.

[5] Moon R T, Bowerman B, Boutros M, *et al*. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin[J]. Science, 2002, 296(5573): 1644 - 1646.

[6] Latinkic B V, Mercurio S, Bennett B, *et al*. Xenopus Cyr61 regulates gastrulation movements and modulates Wnt signalling[J]. Development, 2003, 130(11): 2429 - 2441.

[7] Si W, Kang Q, Luu H H, *et al*. CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(8): 2955 - 2964.

[8] 汤钊猷,杨秉辉. 原发性肝癌[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 128 - 129.

[9] Lin M T, Zuon C Y, Chang C C, *et al*. Cyr61 induces gastric cancer cell motility/invasion via activation of the integrin/nuclear factor-kappaB/cyclooxygenase-2 signaling pathway [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(16): 5809 - 5820.

[10] Xie D, Yin D, Tong X, *et al*. Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways[J]. Cancer Res, 2004, 64(6): 1987 - 1996.

[11] Holloway S E, Beck A W, Girard L, *et al*. Increased expression of Cyr61 (CCN1) identified in peritoneal metastases from human pancreatic cancer [J]. J Am Coll Surg, 2005, 200 (3): 371 - 377.

[12] 司维柯,何通川. 过表达外源性 CCN1 对人骨肉瘤细胞系 143B 生长和迁移的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(7): 565 - 570.

[13] Chien W, Kumagai T, Miller C W, *et al*. Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(51): 53087 - 53096.

(编辑 栾 嘉)

(上接 484 页)

3 讨论

本组治疗对象是关节内股骨头骨折,传统的金属螺丝钉内固定,有可能发生螺丝钉帽擦损关节内的软骨,发生创伤性关节炎。髋关节还得再次脱位以取出内固定物,进一步损害关节内软骨。

可吸收材料具有一定的拉伸强度和弯曲强度,体内强度维持时间 6 个月,植入体内 2 h 时内产生纵向收缩、径向膨胀的自动加压作用,使固定更牢固。可吸收材料能在体内降解,生成水和二氧化碳后排出体外,无任何毒副作用[2]。可吸收材料在处理关节内骨折中骨块撕脱,劈裂骨折等相对简单损伤的疗效是比较满意的[3]。虽然有报道:使用可吸收材料,术后早期出现局部发热、肿胀,轻度疼痛与未将可吸收材料尾部埋入关节面下导致可吸收材料与关节液可能发生的炎性反应有关[3]。本组临床未见此表现,估计与髋关节较深、周围软组织丰富有关,因此临床表现不明显。本疗法的优点是,可吸收材料对于股骨头骨折的治疗适用性较好,能有效地解决关节内骨折片内固定问题,无传统的金属螺丝钉内固定发生螺丝钉帽擦损关节内的软骨,发生创伤性关节炎的缺陷,避免过多的损伤关节内软骨,其显著的优点是可以避免第二次手术取出内固定物的问题。

对本组病例的治疗,认为可吸收材料对治疗股骨头骨折是一种有效手段。股骨头骨折需要复位内固定的患者,可以考虑首选该法治疗。

关键词: 可吸收螺钉;可吸收棒;内固定;股骨头骨折
中图法分类号: R687.1 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 綦建军. 可吸收螺丝钉及固定棒在关节内骨折中的应用[J]. 中原医刊, 2002, 29(1): 15 - 16.

[2] 郑佳状, 蒋电明. 可吸收材料在骨折内固定中的研究与应用[J]. 重庆医学, 2005, 34(11): 1715 - 1717.

[3] 胡晓亮, 张爱敏, 陆美群, 等. 生物可吸收材料在关节内骨折应用的临床评价[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2006, 21(9): 733 - 734.

(编辑 汪勤俭)