doi:10.11659/jjssx.09E021094

·基础研究·

IFITM1 在肝癌组织中的表达及临床意义

吴埈梦[1],马志健[2],章 维[1],袁 静[1],罗 良[1],米日古丽[1],郑威楠[3] (1.成都医学院公共卫生学院预防医学系,四川 成都 610500;2.海南医学院人体解剖学教研室,海南 海口 571199;3.成都医学院基础医学院人体解剖学与组织胚胎学教研室/发育与再生四川省重点实验室,四川 成都 610500)

[摘 要] **目的** 探讨肝癌组织中干扰素诱导的跨膜蛋白1(IFITM1)的表达及其在病理分级中的意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测 IFITM1 在肝癌组织中的表达并分析其与病理分级的关系。**结果** IFITM1 在肝癌组织中的表达低于正常肝组织,差异有显著统计学意义($P<0.01$);肝癌组织病理分级与 IFITM1 表达呈正相关,肝癌组织的分化程度越高,IFITM1 表达水平越高,肝癌的恶性程度越低;而肝癌组织的分化程度越低,IFITM1 表达水平越低,肝癌的恶性程度越高,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。**结论** IFITM1 在肝癌组织中低表达,不同病理分级中 IFITM1 的表达不同,可能与肝癌的发生有关。

[关键词] 肝癌;IFITM1;病理分级;免疫组织化学

[中图分类号] R73 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-09-20

Expression and clinical significance of IFITM1 in liver cancer tissues

WU An-meng[1], MA Zhi-jian[2], ZHANG Wei[1], YUAN Jing[1], LUO Liang[1], MI Riguli[1], ZHENG Wei-nan[3] (1. Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu Sichuan 610500, China; 2. Department of Human Anatomy, Hainan Medical University, Haikou Hainan 571199, China; 3. Department of Human Anatomy and Histology and Embryology, School of Basic Medicine, Chengdu Medical College/Development and Regeneration Key Lab of Sichuan Province, Chengdu Sichuan 610500, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) in liver cancer tissues and its significance in pathological grade. **Methods** The expression of IFITM1 in liver cancer tissues was detected by immunohistochemistry method and its relationship with pathological grade was analyzed. **Results** The expression of IFITM1 in liver cancer tissues was lower than that in the normal liver tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The pathological grade of liver cancer tissues was positively correlated with IFITM1 expression. The higher the differentiation degree of liver cancer tissues, the higher the expression level of IFITM1, and the lower the malignancy degree of liver cancer. The lower the differentiation degree of liver cancer tissues, the lower the expression level of IFITM1, and the higher the malignancy degree of liver cancer, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The expression of IFITM1 is low in liver cancer tissues, and the expression of IFITM1 varies in different pathological grades, which may be related to the occurrence of liver cancer.

Keywords: liver cancer; IFITM1; pathological grade; immunohistochemistry

世界卫生组织公布全球每年肿瘤患者病死人数约占总死亡人数的1/6[1],2018年癌症数据显示,每分钟里有7人诊断为癌症[2]。肝癌是癌症相关死亡的第三大因素,全球每年肝癌病死人数超过500 000人[3-4]。肝癌发病原因复杂,治疗效果差,易复发,因此,寻找新的筛查指标具有重要意义。干扰素诱导的跨膜蛋白1(interferon-induced transmembrane protein 1,IFITM1)定位于人类11号染色体pl5.5区域,其缺失与多种肿瘤的发病机制密切相关[5]。有研究表明,IFITM1与肿瘤的发生、发展密切相关,其可参与肿瘤同型黏附和增生信号的转导,与增生、病毒感染等有关[6-7]。IFITM1在肝癌的发生发展过程中可抑制病毒的表达,从而发挥抗病毒作用,因此,IFITM1有可能成为新的肝癌肿瘤标记物和筛查指标。前期研究发现IFITM1在维吾尔族妇女宫颈癌组织中低表达,但IFITM1表达水平与宫颈癌的病理分级无相关性[8],且既往研究未阐明IFITM1在肝癌组织病理分级中的意义。因此,本研究探讨IFITM1在肝癌组织中的表达及其在病理分级中的意义,以期为临床提供诊断依据。

1 材料与方法

1.1 标本与试剂

选取2015~2019年海南医学院附属医院肝癌手术中切除的术前未经放疗及化疗的新鲜组织标本和活

[基金项目] 海南省应用技术研发与示范推广项目(ZDXM2015079);四川省国家级大学生创新创业训练计划项目(201813705033;S202013705042);发育与再生四川省重点实验室研究基金(SYS18-07)

[通信作者] 郑威楠,E-mail:89529090@qq.com

检新鲜肝组织标本108例,所有取材均经患者同意,并经海南医学院附属医院伦理委员会审核批准(HYLL-2021-378)。其中肝癌的石蜡标本60例,正常肝组织的石蜡标本48例。所有切片均由2位临床病理学副主任医师采用双盲法阅片诊断。

实验所用IFITM1兔抗人单克隆抗体购于美国MILLIPORE公司,二抗试剂(SP9001山羊抗兔)购于北京中杉金桥公司。

1.2 *方法*

正常肝组织HE染色:二甲苯(Ⅰ、Ⅱ)脱蜡各10 min;100%、90%、80%、70%酒精脱水各5 min;苏木精染色4 min,流水轻轻冲洗;5%乙酸分化1 min,流水冲洗,用吸管滴加5%乙酸,布满玻片上的组织即可。伊红染色1 min,流水冲洗;70%、80%、90%、100%酒精醇洗及脱水各10 s;最后二甲苯透明1 min,自然晾干5 min,滴中性树胶封片。

采用免疫组织化学法对肝癌的石蜡标本进行染色,以PBS代替一抗作为阴性对照。常规二甲苯(Ⅰ、Ⅱ)脱腊处理(各20 min),并以100%、95%、80%、70%酒精脱水处理(各10 min)。灭活内源性过氧化物酶:30%过氧化氢37 ℃孵育10 min,PBS冲洗5 min,循环3次。抗原修复:标本在0.01%枸橼酸缓冲液(pH为6.0)中孵育2~3 min,自然冷却50 min,PBS冲洗5 min,循环3次。使用正常羊血清封闭。滴加一抗,4 ℃冰箱孵育过夜,PBS冲洗5 min;滴加二抗,37 ℃孵育30 min,PBS冲洗5 min,循环3次。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素,37 ℃孵育30 min,PBS冲洗5 min,循环3次。DAB显色、苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片。阳性细胞判断标准:染色后IFITM1细胞浆或细胞膜呈棕黄色颗粒。标本染色结果评分标准:标本染色结果评分标准:阳性细胞数低于1%,为阴性(-),记0分;阳性细胞数占1%~15%,为弱阳性(+),记1分;阳性细胞数占15%~50%,呈棕黄色,为阳性(++),记2分;阳性细胞数占50%以上,呈棕褐色,为强阳性(+++),记3分。

1.3 *统计学分析*

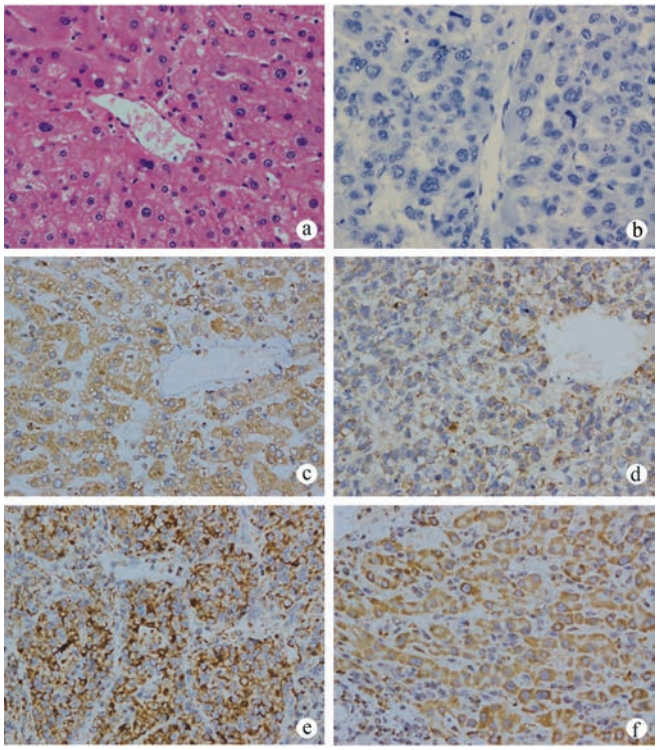
采用SPSS 21.0统计学软件处理数据,数据以率(%)表示,采用χ^2检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *IFITM1在肝癌不同病理分级的免疫组化结果*

在正常肝组织中IFITM1高表达,表达较均一,而肝癌组织中IFITM1低表达,表达不均一,且肝癌分化程度不同,蛋白表达水平也不同;肝癌组织病理分级与IFITM1表达水平密切相关,肝癌组织的分化程度越高,IFITM1表达水平越高,肝癌的恶性程度越低;而肝癌组织的分化程度越低,IFITM1表达水平越低,肝癌的恶性程度越高,差异有显著统计学意义($P<0.01$),见图1。

免疫组织化学法分析显示,60例肝癌组织中强阳性1例(1.67%)、阳性11例(18.33%)、弱阳性41例(68.33%)、阴性7例(11.67%),48例正常肝组织中强阳性1例(2.08%)、阳性40例(83.33%)、阳性7例(14.58%)。肝癌组织中IFITM1低表达或不表达,与正常肝组织相比,差异有显著统计学意义($\chi^2=46.292$,$P<0.01$)。



a:正常肝组织HE染色;b:阴性对照;c:正常肝组织中IFITM1的表达;d:高分化肝癌组织中IFITM1的表达;e:中分化肝癌组织中IFITM1的表达;f:低分化肝癌组织中IFITM1的表达

图1 IFITM1在肝癌不同病理分级的染色结果(×200)

2.2 *IFITMI在肝癌患者中的表达与临床特征的关系*

60例肝癌组织分为高、中、低分化癌,其中5例高分化肝癌组织中强阳性2例、阳性2例、弱阳性1例;15例中分化肝癌组织中强阳性3例、阳性7例、弱阳性5例;40例低分化肝癌组织中强阳性1例、阳性3例、弱阳性35例、阴性1例。肝癌组织中包膜完整16例,包膜不完整44例。16例包膜完整的肝癌组织中阳性3例、弱阳性7例、阴性6例;44例包膜不完整的肝癌组织中强阳性1例、阳性8例、弱阳性34例、阴性1例。肿瘤直径小于5 cm的肝癌组织16例;肿瘤

直径大于或等于 5 cm 的肝癌组织 44 例。16 例肿瘤直径小于 5 cm 的肝癌组织中阳性 1 例、弱阳性 10 例、阴性 5 例;44 例肿瘤直径大于或等于 5 cm 的肝癌组织中强阳性 1 例、阳性 10 例、弱阳性 31 例、阴性 2 例。肝癌患者不同病理分级 IFITM1 表达水平比较差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

表 1 IFITM1 在不同病理分级肝癌患者中的表达与临床特征的关系[例(%)]

临床特征		n	IFITM1				χ^2	P
			强阳性	阳性	弱阳性	阴性		
性别	男	54	1(1.9)	10(18.5)	37(68.5)	6(11.1)	0.267	0.966
	女	6	0(0)	1(16.7)	4(66.7)	1(16.7)		
年龄	<60 岁	49	1(2.0)	8(16.3)	35(71.4)	5(10.2)	1.676	0.642
	≥60 岁	11	0(0)	3(27.3)	6(45.5)	2(18.1)		
肿瘤直径	<5 cm	16	0(0)	1(6.3)	10(62.5)	5(31.3)	9.382	0.025
	≥5 cm	44	1(2.3)	10(22.7)	31(7.5)	2(4.5)		
肿瘤包膜	完整	16	0(0)	3(18.8)	7(43.8)	6(37.5)	14.776	0.002
	不完整	44	1(2.3)	8(18.2)	34(77.3)	1(2.3)		
分化程度	低分化	40	1(2.5)	3(7.5)	35(87.5)	1(2.5)	29.971	0.001
	中分化	15	3(20.0)	7(46.7)	5(33.3)	0(0)		
	高分化	5	2(40.0)	2(40.0)	1(20.0)	0(0)		

3 讨论

2018 年全球消化道恶性肿瘤的患者死亡人数占全部肿瘤相关死亡人数的 40% 以上[9]。海南地区肝癌病死率居各类恶性肿瘤的第一位[10],其中海南南部地区少数民族人群的肝癌病死率较高,地域分布特征明显[11]。海南肝癌高发与病毒感染及生活环境、习惯等相关[11]。

干扰素诱导的跨膜蛋白(interferon-induced transmembrane protein,IFITM)是一个小的同源蛋白家族,定位于细胞浆和内溶酶体膜,可赋予细胞对许多病毒的抗性,IFITM 家族有 IFITM1、IFITM2、IFITM3,是抗多种 RNA 病毒的宿主效应蛋白。人类 11 号染色体 pl5.5区域的缺失被认为与多种癌症的发病机理密切相关,而 IFITM1 定位于此区域[5],最初是作为淋巴细胞的表面抗原而被发现[12-14]。

Pan 等[15]研究发现,IFITM1 在维吾尔族妇女宫颈癌组织中低表达,但 IFITM1 在宫颈癌中的表达水平与病理分级无关。IFITM1 在不同组织器官中的表达形式、表达水平不同[16]。IFITM1 在卵巢癌[17]、子宫内膜异位症[18]、小细胞肺癌[19]、口腔癌及头颈部肿瘤[20]、胆囊鳞状细胞癌/腺鳞癌和腺癌[21]、直肠癌[22]、乳腺癌[23]等患者的肿瘤组织中呈高表达,但在胰腺癌[24]、低级别扩散的星型细胞瘤[25]等患者的肿瘤组织中呈低表达甚至不表达。在肝癌和乳腺癌中,miR-29a 以及 Ras-GTP 酶激活蛋白 SH3 结构域结合蛋白均能与 IFITM mRNA 的 3'-UTR 结合,而 IFITM mRNA 的 3'-UTR正向调控 IFITM1 表达[26-28],但其机制尚未明确。肝炎病毒感染是全球肝细胞癌和肝硬化发生的主要原因之一,Wilkins 等[29]的研究证实 IFITM1 是一种肝细胞紧密连接蛋白,也是一种有效的抗丙型肝炎病毒的效应分子,IFITM1 表达在Ⅰ型干扰素治疗肝细胞的早期被诱导,通过与丙型肝炎病毒共受体(包括 CD81 和 occludin 闭合蛋白)相互作用,从而破坏病毒进入的过程,提示 IFITM1 可通过阻断病毒共受体功能来控制丙型肝炎病毒感染。Xie 等[30]研究显示,IFITM1作为 p53 的下游效应因子,可能受到 p53 介导的自噬及母参碱诱导的人肝癌细胞自噬的调控,使自噬转变为凋亡,对肝癌具有抑制作用。本研究结果显示,正常肝组织中 IFITM1 表达水平较高,而肝癌组织中 IFITM1 表达水平明显较低,IFITM1 在肝癌中的表达与性别、年龄无关,但与肿瘤直径、肿瘤包膜完整性及分化程度有关。IFITM1 肝癌组织病理分级及 IFITM1表达水平与肝癌预后不良密切相关,肝癌的分化程度越高,IFITM1 表达水平越高,肝癌的恶性程度相对越低;而分化程度越低,IFITM1 表达水平相对越低,肝癌的恶性程度相对越高。由此,IFITM1 表达与患者预后不良相关,IFITM1有可能是一个潜在的抑制肝癌发展的基因,可能成为肝癌诊断、治疗的标志物。

[参考文献]

[1] World Health Organization. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGS[R/OL]. Geneva2017[2018-07-15]. http://nianjian.xiaze.com/international/2017/world-health-statis-tics-2017.html.

[2] Chen W, Sun K, Zheng R, et al. Cancer incidence and mortality in China,2014[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(1): 1 - 12. doi: 10.21147/j.issn.1000 - 9604.2018.01.01.

[3] Gao Q, Zhu H, Dong L, et al. Integrated proteogenomic characterization of HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. Cell, 2019, 179(2): 561 - 577. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.052.

[4] Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepaticellular carcinoma[J]. Cell, 2019, 179(4): 829 - 845.e20. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.003.

[5] Arion D, Unger T, Lewis DA, et al, Molecular evidence for increased expression of genes related to immune and chaperone function in the prefrontal cortex in schizophrenia[J]. Biol Psychiatry, 2007, 62(7): 711 - 721. doi:10.1016/j.biopsych.2006.12.021.

[6] Smith SE, Gibson MS, Wash RS et al. Chicken IFITM3 restricts influenza viruses and lyssaviruses in vitro[J]. J Virol, 2013, 87(23): 12957 - 12966. doi:10.1128/JVI.01443 - 13.

[7] Everitt AR, Clare S, Pertel T, et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza[J]. Nature, 2012, 484(7395): 519 - 523. doi:10.1038/nature10921.

[8] 郑威楠,韩 虎,赵志敏,等. 不同民族妇女子宫颈癌组织中 IFITM1 蛋白表达[J]. 中国公共卫生,2012,28(3):335 - 337.

[9] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394 - 424. doi:10.3322/caac.21492.

[10] 尹有宽. 肝癌与遗传密切相关[J]. 中国肿瘤临床与康复,2018,25(8):1001.

[11] 林升康,黄丽菊,羊轶驹,等. 海南南部地区 132 例原发性肝癌临床流行病学资料分析[J]. 家庭医药,2019(4):50 - 51.

[12] Yáñez DC, Ross S, Crompton T. The IFITM protein family in adaptive immunity[J]. Immunology, 2020, 159(4): 365 - 372. doi:10.1111/imm.13163.

[13] Li C, Zheng H, Wang Y, et al. Antiviral role of IFITM proteins in classical swine fever virus infection[J]. Viruses, 2019, 11(2): 126. doi:10.3390/v11020126.

[14] Kucher AN, Babushkina NP, Sleptcov AA, et al. Genetic control of human infection with SARS-CoV-2[J]. Russ J Genet, 2021, 57(6): 627 - 641. doi:10.1134/S1022795421050057.

[15] Pan Z, Chen S, Pan X, et al. Differential gene expression identified in Uigur women cervical squamous cell carcinoma by suppression subtractive hybridization[J]. Neoplasma, 2010, 57(2): 123 - 128. doi:10.4149/neo_2010_02_123.

[16] Yan J, Jiang Y, Lu J, et al. Inhibiting of proliferation, migration, and invasion in lung cancer induced by silencing interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1)[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 9085435. doi:10.1155/2019/9085435.

[17] 杨 蓉,张 濉,王 建,等. siRNA 沉默 IFITM1 对卵巢癌细胞系 CP70 生物学效应的影响及机制研究[J]. 现代肿瘤医学,2019,27(13):2231 - 2235. doi:10.3969/j.issn.1672 - 4992.2019.13.002.

[18] 刘 莉,吴春林,邓小艳,等. IFIT1 和 IFITM3 在子宫内膜异位症病灶中的表达研究[J]. 中国计划生育和妇产科,2020,12(9):22 - 26. doi:10.3969/j.issn.1674 - 4020.2020.09.00.

[19] Sakamoto S, Inoue H, Kohda Y, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1(IFITM1) promotes distant metastasis of small cell lung cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4934. doi: 10.3390/ijms21144934.

[20] Yang J, Li L, Xi Y, et al. Combination of IFITM1 knockdown and radiotherapy inhibits the growth of oral cancer[J]. Cancer Sci, 2018, 109(10): 3115 - 3128. doi:10.1111/cas.13640.

[21] Li D, Yang Z, Liu Z, et al. DDR2 and IFITM1 are prognostic markers in gallbladder squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinomas[J]. Pathol Oncol Res, 2019, 25(1): 157 - 167. doi:10.1007/s12253 - 017 - 0314 - 3.

[22] Sari IN, Yang YG, Phi LT, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1(IFITM1) is required for the progression of colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(52): 86039 - 86050. doi: 10.18632/oncotarget.13325.

[23] Provance OK, Geanes ES, Lui AJ, et al. Disrupting interferon-alpha and NF-kappaB crosstalk suppresses IFITM1 expression attenuating triple-negative breast cancer progression[J]. Cancer Lett, 2021, 514: 12 - 29. doi:10.1016/j.canlet.2021.05.006.

[24] Zhang L, Wang Z, Kong D, et al. Knockdown of interferon-induced transmembrane protein 1 inhibited proliferation, induced cell cycle arrest and apoptosis, and suppressed MAPK signaling pathway in pancreatic cancer cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(8): 1603 - 1613. doi: 10.1080/09168451.2020.1762479.

[25] Huang H, Colella S, Kurrer M, et al. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays[J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 6868 - 6874.

[26] Liang YM, Li EL, Min JQ, et al. miR-29a suppresses the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma through IFITM3[J/OL]. Oncol Rep, 2018, 40(6): 3261 - 3272[2020 - 10 - 11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6196607/. doi: 10.3892/or.2018.6745.

[27] Alam U, Kennedy D. G3BP1 and G3BP2 regulate translation of interferon-stimulated genes: IFITM1, IFITM2 and IFITM3 in the cancer cell line MCF7[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 459(1/2): 189 - 204. doi: 10.1007/s11010 - 019 - 03562 - 3.

[28] Li J, Lin TY, Chen L, et al. miR-19 regulates the expression of interferon-induced genes and MHC class Ⅰ genes in human cancer cells[J/OL]. Int J Med Sci, 2020, 17(7): 953 - 964[2020 - 10 - 11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7163354/. doi: 10.7150/ijms.44377.

[29] Wilkins C, Woodward J, Lau DT, et al. IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 461 - 469. doi:10.1002/hep.26066.

[30] Xie SB, He XX, Yao SK. Matrine-induced autophagy regulated by p53 through AMP-activated protein kinase in human hepatoma cells[J]. Int J Oncol, 2015, 47(2): 517 - 526. doi:10.3892/ijo.2015.3023.

(编辑:贺绍梅)