

· 论 著 ·

## 乙型肝炎病毒及黄曲霉毒素暴露的肝细胞癌中 $\beta$ -catenin、PTEN 的 mRNA 表达\*

陈德凤<sup>1</sup>, 齐鲁楠<sup>2</sup>, 彭涛<sup>3</sup>, 罗国容<sup>4</sup>, 黎乐群<sup>2△</sup>

(1. 广西医科大学研究生学院, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科, 广西南宁 530021; 3. 广西医科大学第一附属医院肝胆外科, 广西南宁 530021; 4. 广西医科大学基础医学院, 广西南宁 530021)

**摘要:**目的 研究  $\beta$ -catenin、PTEN 基因在乙型肝炎病毒(HBV)及黄曲霉毒素 B1(AFB1)暴露下肝细胞癌(HCC)中 mRNA 表达,探讨在双暴露情况下  $\beta$ -catenin、PTEN 与 HCC 发生、发展的关系。方法 根据 HBV 与 AFB1 的暴露情况,将 108 例肝细胞癌手术切除研究对象分为 4 组, A 组: HBV(+)/AFB1(+), 48 例; B 组: HBV(+)/AFB1(-), 27 例; C 组: HBV(-)/AFB1(+), 19 例; D 组: HBV(-)/AFB1(-), 14 例。同时收集正常肝组织 20 例, 分别来自肝外伤、肝血管瘤、肝移植供体等手术切除标本作为正常对照组。采用逆转录-PCR(RT-PCR)法检测  $\beta$ -catenin 基因与 PTEN 基因的 mRNA 表达情况, 分别对各组的表达情况进行比较。结果 RT-PCR 显示,  $\beta$ -catenin 基因 mRNA 的半定量平均灰度值 A 组(1.13±0.14)、C 组(1.16±0.18)分别与 D 组(1.01±0.13)相比, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 此外, A、B(1.06±0.18)、C、D 组与正常对照组比较, 差异均有统计学意义( $P<0.001$ )。PTEN 基因 mRNA 的半定量平均灰度值 A 组(0.54±0.13)、B 组(0.59±0.16)分别与 C 组(0.97±0.16)及 D 组(0.92±0.13)相比, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。此外, A、B、D 组与正常对照组相比, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论  $\beta$ -catenin 基因的高表达率可能与 AFB1 高暴露有关, PTEN 基因的失活与 HBV 高感染率有关。

**关键词:**癌, 肝细胞; 乙型肝炎; 黄曲霉毒素 B1;  $\beta$ -catenin 基因; PTEN 基因; mRNA 表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)14-1681-03

### The mRNA expression of $\beta$ -catenin and PTEN in Hepatocellular carcinoma exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1\*

Chen Defeng<sup>1</sup>, Qi Lunan<sup>2</sup>, Peng Tao<sup>3</sup>, Luo Guorong<sup>4</sup>, Li Lequn<sup>2△</sup>

(1. Graduate School of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 4. School of Basic Inedicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the mRNA expression of  $\beta$ -catenin and PTEN in hepatocellular carcinoma exposed to hepatitis B virus(HBV) and aflatoxin B1(AFB1). **Methods** 108 HCCs came from different districts of Guangxi province were labeled as four categories based on their biomarkers of HBV and AFB1 exposure. Group A: HBV(+)/AFB1(+), 48 cases, group B: HBV(+)/AFB1(-), 27 cases, group C: HBV(-)/AFB1(+), 19 cases, group D: HBV(-)/AFB1(-), 14 cases. And normal hepatic tissue from 20 cases of hepatic hemangioma, liver resection and liver transplant donor were chosen as normal control group. And the mRNA expression of  $\beta$ -catenin and PTEN were detected by RT-PCR. **Results** The mean expression level of  $\beta$ -catenin gene mRNA in group A, B, C, D and control group were(1.13±0.14), (1.06±0.12), (1.16±0.18), (1.01±0.13) and(0.085±0.13) respectively. There were significant differences between group A and C, A and D. And there were significant differences between these four groups and control group(all  $P<0.05$ ). The mean expression level of PTEN gene mRNA in four subgroup A, B, C, D and control group were(0.54±0.13), (0.59±0.16), (0.97±0.16), (0.92±0.13) and(1.10±0.16) respectively. There were significant differences between group A and D, C and D. And there were significant differences between group A and C( $P=0.002$ ), A and D( $P=0.032$ ), B and C( $P<0.001$ ) and B and D( $P=0.011$ ). And there were significant differences between subgroup A, B and D and control group(all  $P<0.05$ ). **Conclusion** The over expression  $\beta$ -catenin of HCC cases may be associated with the exposure to AFB1 while the loss of gene PTEN may relate to the exposure to HBV.

**Key words:** carcinoma, hepatocellular; hepatitis B; aflatoxin B1;  $\beta$ -catenin; PTEN; mRNA

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 是全世界最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 其发病率在中国呈逐年上升趋势, 2007 年卫生部统计肝癌死因位于恶性肿瘤死因的第二位, 并且乙型肝炎病毒(HBV)的高感染率和黄曲霉毒素 B1(AFB1)的高暴

露是原发性肝癌高发的主要因素之一<sup>[2-3]</sup>。有研究表明<sup>[4]</sup>,  $\beta$ -catenin 基因突变与肝癌发生有关, 而 HBV 与 AFB1 的高暴露均能够导致  $\beta$ -catenin 基因的突变并同时影响  $\beta$ -catenin 蛋白的磷酸化。9.5% 肝癌患者抑癌基因第 10 号染色体缺失与

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960021); 广西科学基金资助项目(0632007-1E)。作者简介: 陈德凤(1979-), 讲师, 在读博士, 主要从事肝癌抗原分子生物学研究。△ 通讯作者, Tel:(0771)5301253, E-mail: Li\_lequn@263.net。

*PTEN* 基因存在第 4、5 和 8 外显子的突变<sup>[5]</sup>。肝癌的发生是一个多基因和多步骤的过程,肝癌发生、发展过程中 HBV 与 AFB1 可能共同作用促使 *βcatenin* 基因和 *PTEN* 基因发生改变,为探索 HBV 和 AFB1 不同暴露情况下 *βcatenin* 基因和 *PTEN* 基因 mRNA 表达与 HCC 的关系,本研究运用逆转录-PCR(RT-PCR)法从基因水平检测 *βcatenin* 和 *PTEN* 基因表达情况,为 HBV 及 AFB1 高暴露的地区开展 HCC 的预防和早期诊疗研究提供新的理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 108 例 HCC 组织标本收集于广西医科大学附属第一附属医院肝胆外科和广西医科大学附属肿瘤医院的标本库,标本时间为 2008 年 5 月至 2010 年 7 月,同时设正常对照组 20 例,取自正常肝组织标本,主要为肝血管瘤、肝外伤、肝移植供体标本。手术标本的病例包括男 95 例,女 13 例;年龄 28~78 岁,平均 48.6 岁;肝癌直径为 2.0~16.5 cm,平均 6.8 cm。HBV 暴露阳性标准为血清中 HBsAg(+),AFB1 暴露标准为癌组织中 AFB1-DNA 加合物免疫组织化学阳性<sup>[6]</sup>。根据上述检测结果以及研究目的,108 例 HCC 患者根据 HBV 与 AFB1 的暴露情况,分为 4 组,A 组:HBV(+)/AFB1(+),48 例;B 组:HBV(+)/AFB1(-),27 例;C 组:HBV(-)/AFB1(+),19 例;D 组:HBV(-)/AFB1(-),14 例。所有患者术前均未接受放化疗处理,术后病理诊断均证实为 HCC,所有选取的病例均履行告知义务并签署知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 AFB1-DNA 加合物检测方法** 免疫组织化学染色:参照 Santella 等<sup>[7]</sup>的染色步骤。需同时设立阳性和阴性对照(对照组的大鼠肝组织均由美国哥伦比亚大学 Regina M. Santella 教授惠赠)。阳性对照取 1 年雄性 SD 大鼠行腹腔注射 AFB1 1.0 mg/kg 和 2.5 mg/kg 剂量,2 h 后处死取大鼠肝组织,未行腹腔注射 AFB1 的大鼠肝组织作为阴性对照。经免疫组织化学染色后在显微镜下观察,阳性定义标准为切片背景清晰同时肝细胞核结构完整,在细胞核内出现紫黑色点状颗粒。阴性定义标准为在肝细胞核内无紫黑色点状颗粒。

## 1.2.2 RT-PCR 法检测 *βcatenin* 与 *PTEN* 基因的表达

**1.2.2.1 癌组织总 RNA 的提取、RNA 逆转录成 cDNA** 以 Trizol 试剂提取总 RNA,紫外分光光度计测 OD 值,计算 RNA 含量和纯度。用 Fermentas 公司的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒进行 RNA 逆转录。

**1.2.2.2 PCR 引物的设计与合成** 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。根据 Genebank 中公布的人 *βcatenin* 基因、*PTEN* 和 *GAPDH* 基因的 mRNA 序列,使用 Primer Premier5.0 引物设计软件进行设计,并使用 BLAST 验证为基因的特异性引物(各基因的正义引物和反义引物序列均跨至少一个内含子)。

**1.2.2.3 PCR 反应条件** 将各试剂按顺序加入到 PCR 反应管中并混合后分装,每管的总反应体系为 25 μL。所用试剂为北京天根公司 2×Tap PCR MasterMix,包括:2×MasterMix 12.5 μL,上下游引物各 1.0 μL,DNA 模板 10~100 ng,灭菌双蒸水补至 25 μL。反应条件:*βcatenin* 基因:95 °C 预变性 5 min;变性 95 °C 30 s,退火 54 °C 40 s,延伸 72 °C 40 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。*PTEN* 基因:95 °C 预变性 5 min;变性 95 °C 30 s,退火 57 °C 40 s,延伸 72 °C 40 s,35 个循环;72 °C

延伸 10 min。*GAPDH* 基因反应条件:95 °C 预变性 5 min;变性 95 °C 30 s,退火 55 °C 40 s,延伸 72 °C 40 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。以上反应均终止于 4 °C。

**1.2.2.4 PCR 产物分析** 将 PCR 产物电泳后的凝胶置于分析仪观察,同时拍下图片进行分析。图片结果采用 Quantity One 软件分析基因的灰度值,平均灰度值减去背景灰度值之差为统计分析数值,*βcatenin* 基因与 *PTEN* 基因的统计值为其灰度值与 *GAPDH* 灰度值之比。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件进行统计学处理。计量资料的各组间均数比较,符合正态分布采用方差分析或成组设计两样本 *t* 检验,不符合正态分布的资料采用秩和检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 *βcatenin* 基因 mRNA 的表达情况** RT-PCR 结果显示,*βcatenin* 基因 mRNA 的平均半定量灰度值 A 组、C 组分别与 D 组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。此外,4 个亚组与正常对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1、图 1。

表 1 各组 *βcatenin* mRNA 半定量灰度值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	灰度值
A 组	48	1.13 ± 0.14
B 组	27	1.06 ± 0.12
C 组	19	1.16 ± 0.18
D 组	14	1.01 ± 0.13 <sup>ac</sup>
正常对照组	20	0.85 ± 0.13 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与 A 组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与 B 组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与 C 组比较;<sup>d</sup>: $P < 0.05$ ,与 D 组比较。

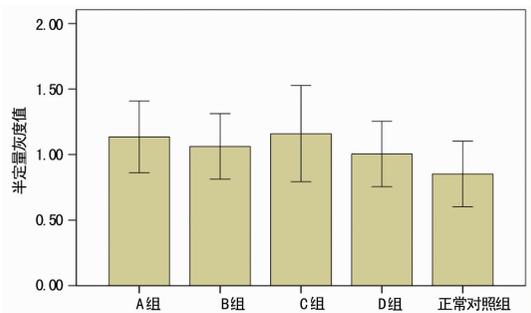


图 1 各组 *βcatenin* mRNA 半定量灰度值

**2.2 *PTEN* 基因 mRNA 的表达情况** RT-PCR 的结果显示,*PTEN* 基因 mRNA 的平均半定量灰度值 A 组与 C 组及 B 组与 D 组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。此外,A、B、D 组与正常对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2、图 2。

表 2 各组 *PTEN* mRNA 半定量灰度值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	灰度值
A 组	48	0.54 ± 0.13
B 组	27	0.59 ± 0.16
C 组	19	0.97 ± 0.16 <sup>ab</sup>
D 组	14	0.92 ± 0.13 <sup>ab</sup>
正常对照组	20	1.10 ± 0.16 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与 A 组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与 B 组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与 D 组比较。

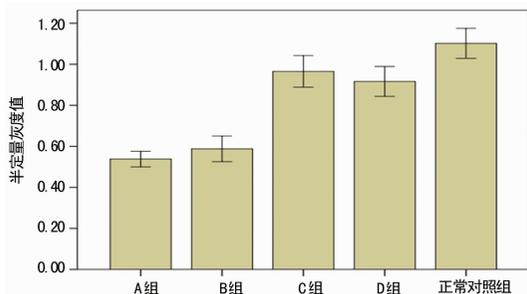


图 2 各组 PTEN mRNA 半定量灰度值

### 3 讨论

本研究结果提示,  $\beta$ -catenin 基因的高表达率可能与 AFB1 高暴露有关。AFT 是寄生曲霉、黄曲霉等真菌的代谢产物, 根据其细微结构的不同可分为 B1、B2、G1、G2、M1、M2 等多种化合物, 化学结构类似, 在环境中广泛存在, 尤其在高温潮湿地区的霉变食品中<sup>[8]</sup>。研究发现, AFB1 的毒性最强且对肝的致癌性最大<sup>[9]</sup>。AFB1 致癌的可能机制是 DNA 损伤引起抑癌基因 p53 和癌基因 ras 突变, DNA 损伤后 DNA 上出现碱基突变或碱基空缺, 使 p53 的 DNA 复制及转录过程受阻<sup>[10]</sup>。

本研究发现 AFB1 高暴露组的  $\beta$ -catenin 基因表达率显著高于其他各组, C 组的表达趋势高于 B 组, 作为单独因素存在时, AFB1 的效应要高于 HBV, 而  $\beta$ -catenin 表达在 A 组中最高, 则提示当两种因素同时存在时, 对  $\beta$ -catenin 表达可能具有协同效应。Tien 等<sup>[11]</sup>的研究发现癌细胞高及中分化的 HCC 中  $\beta$ -catenin 显著增高, 与本研究结果一致。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与肿瘤形成有关, 通过转录翻译后修饰激活靶基因启动肝癌再生程序<sup>[12-13]</sup>。 $\beta$ -catenin 基因的高表达率可能是  $\beta$ -catenin 在细胞膜的积聚影响细胞间的黏附, 进而影响 HCC 的发生、发展。

在本研究中, 在 HBV 高感染组中, PTEN 基因的 mRNA 表达半定量灰度值低于其他各组, 提示 PTEN 基因失活与 HBV 高感染率有关。PTEN 是继 p53 及 Rb 之后发现的重要抑癌基因, 在多种恶性肿瘤中存在此基因表达降低<sup>[14-15]</sup>, PTEN 在细胞内的主要作用机制是影响细胞内蛋白质磷酸化水平, 通过其脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶发挥作用, PTEN 低表达促使肿瘤发生、发展。本研究中运用 RT-PCR 技术检测 PTEN mRNA 表达的半定量灰度值在 A 组与 B 组中要显著低于 C 组与 D 组。而前两组的共同点均为 HBV 感染阳性。由此本研究推断 HBV 的感染是导致 PTEN 基因失活的因素之一, HBV 的影响途径可能是通过引起 PTEN 的缺失来降低 PTEN 基因的表达。HBV/AFB1 双暴露的 HCC 中, PTEN 的表达水平明显下降, 推断与 HBV 和 AFB1 具有协同作用有关, 而 PTEN 基因的表达下调则可能主要与 HBV 感染有关, AFB1 对 PTEN 基因的表达下调可能有辅助协同作用。

### 参考文献:

[1] Seeff LB, Hoofnagle JH. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in areas of low hepatitis B and hepatitis C endemicity[J]. Oncogene, 2006, 25(27):3771-3777.

[2] Murakami Y, Saigo K, Takashima H, et al. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas[J]. Gut, 2005, 54(8):1162-1168.

[3] Smela ME, Hamm ML, Henderson PT, et al. The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(10):6655-6660.

[4] Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN, et al. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 48(19):2047-2063.

[5] 郭双平, 王丽, 王文亮, 等. 抑癌基因 PTEN 在肝癌组织中的突变及其对肝癌细胞增殖和凋亡的调控作用[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(8):467-472.

[6] Denissenko MF, Cahill J, Koudriakova TB, et al. Quantitation and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B1-8,9-epoxide and microsomal activation systems[J]. Mutat Res, 1999, 425(2):205-211.

[7] Santella RM, Zhang YJ, Chen CJ, et al. Immunohistochemical detection of aflatoxin B1-DNA adducts and hepatitis B virus antigens in hepatocellular carcinoma and nontumorous liver tissue[J]. Environ Health Perspect, 1993, 99:199-202.

[8] 陆建华, 陆卫中, 陈建国. 黄曲霉毒素检测方法及其应用[J]. 中华医学实践杂志, 2005, 4(3):1411.

[9] Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, et al. Activation and detoxication of aflatoxin B1[J]. Mutat Res, 1998, 402(1/2):121-128.

[10] 蒿艳蓉, 苏建家. 黄曲霉毒素 B1(AFB1)体内代谢研究进展[J]. 现代预防医学, 2009, 6(1):146-149.

[11] Tien LT, Ito M, Nakao M, et al. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(16):2398-2401.

[12] Nejak-Bowen KN, Monga SP. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1):44-58.

[13] 郑勤, 徐瀚峰. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在肝癌中的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2010, 30(2):76-78.

[14] 谢智惠, 王蕾, 陈进, 等. Cyclin E、p53 与 PTEN 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 重庆医学, 2012, 41(35):3710-3712.

[15] Bignell GR, Greenman CD, Davies H, et al. Signatures of mutation and selection in the cancer genome[J]. Nature, 2010, 463(7283):893-898.

(收稿日期:2013-11-14 修回日期:2014-02-05)