

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.014

# 肝细胞癌中 $\beta$ -arrestin1、MMP-9 表达的相关性

戴毅<sup>1</sup>,李敬东<sup>1</sup>,赵国刚<sup>1</sup>,刘慧<sup>2</sup>,龙娟<sup>2</sup>,邹琳<sup>2</sup>

## Correlative Expressions of $\beta$ -arrestin1 and MMP-9 in Hepatocellular Carcinoma Tissues

DAI Yi<sup>1</sup>, LI Jing-dong<sup>1</sup>, ZHAO Guo-gang<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>, LONG Juan<sup>2</sup>, ZOU Lin<sup>2</sup>

1. No. 3 Department of General Surgery, The Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 2 Center for Clinical Molecular Medicine, Children's Hospital, Chongqing Medical University

Corresponding Author: ZOU Lin, E-mail: zoulin\_74@yahoo.com.cn

**Abstract: objective** To investigate the expressions and significance of  $\beta$ -arrestin1 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in hepatocellular carcinoma patients. **Methods** The tumor tissues and tumor-adjacent tissues were simultaneously collected from 35 patients in operation with diagnosed hepatocellular carcinoma, which included 23 cases of phase II and 12 cases of phase III. And 15 non-tumor tissues were enrolled in this study as the normal control (NL group). Then the mRNA and protein expression of  $\beta$ -arrestin1 were detected by using quantitative real-time RT-PCR and Western blot respectively. The protein concentration of MMP-9 of these tissues was measured by ELISA. **Results** All the mRNA and protein expressions of  $\beta$ -arrestin1 were measured in the samples of normal liver tissues, HCC tumor and its adjacent tissues. Compared with the normal group and tumor-adjacent group, the mRNA and protein expressions of  $\beta$ -arrestin1 in HCC group of different clinical phases increased significantly ( $P < 0.05$ ). The expression level was increased with the advanced phases. The concentration of MMP-9, increased in HCC tumor tissues, was positively correlated with  $\beta$ -arrestin1 expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expressions of  $\beta$ -arrestin1 significantly up-regulated in HCC tumor tissues, which was positively related to the concentration of MMP-9, indicating that they might be related to progression of hepatocellular carcinoma and to be the diagnosis and therapy target of HCC.

**Key words:** Hepatocellular Carcinoma;  $\beta$ -arrestin1; Matrix Metalloproteinase-9

**摘要:目的** 探讨  $\beta$ -arrestin1 和 MMP-9 在肝细胞癌组织中的相关表达及意义。**方法** 收集不同临床分期与病理分级的肝细胞癌组织标本 35 例,其中 II 期 23 例,III 期 12 例,同时收集这些病人的癌旁组织作为对照,以非肝癌患者的肝组织 15 例为正常对照。采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测  $\beta$ -arrestin1 mRNA 的表达,并用 Western blot 方法检测  $\beta$ -arrestin1 蛋白水平变化,ELISA 方法检测 MMP-9 蛋白浓度。**结果** 正常肝、肝细胞癌和癌旁组织中均有  $\beta$ -arrestin1 mRNA 和蛋白的表达。与正常和癌旁组相比,不同分期的肝细胞癌组织中的  $\beta$ -arrestin1 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ),且其表达水平随临床分期增加而增加;其表达水平与 MMP-9 的浓度密切相关 ( $P < 0.05$ )。**结论** 肝细胞癌组织中  $\beta$ -arrestin1 和 MMP-9 呈现明显相关表达,这对肝癌血管生成和转移可能具有重要作用。

**关键词:** 肝细胞癌;  $\beta$ -arrestin1; MMP-9

**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)02-0170-04

**收稿日期:** 2010-01-22; **修回日期:** 2010-05-27

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (90919013, 30871103); 重庆市自然科学基金资助项目 (20082207); 教育部“新世纪优秀人才计划”基金资助项目 (2009-07)

**作者单位:** 1. 637000 四川南充, 川北医学院附属医院 普外三科; 2. 重庆医科大学儿童医院临床分子医学中心

**通信作者:** 邹琳, E-mail: zoulin\_74@yahoo.com.cn

**作者简介:** 戴毅 (1971-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事肝胆外科和血管外科的基础和临床研究

## 0 引言

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 恶性程度高, 起病隐匿, 病情进展快。早期诊断困难, 容易延误治疗时机。检测与肝癌发生相关的基因表达对于肝癌的早期诊断早期治疗具有重要的意义<sup>[1-3]</sup>。

$\beta$ -arrestin ( $\beta$ -Arr) 是人体内广泛分布的一类衔

接蛋白家族,常见的类型为  $\beta$ -arrestin1 ( $\beta$ -Arr1) 和  $\beta$ -arrestin2 ( $\beta$ -Arr2), 能通过多种蛋白形成复合物, 参与 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs) 以及其他多种细胞表面信号分子的调控, 与这些信号分子的脱敏、运输和转导有关, 在肿瘤的发生发展中发挥着十分重要的作用<sup>[4,7]</sup>。基质金属蛋白酶 9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 由于其具有降解细胞基质和多种胶原蛋白的作用, 与肿瘤的转移、肿瘤血管的生成有密切关系。前期研究表明 MMP-9 对肿瘤新生血管的作用受  $\beta$ -Arr1 的调控, 说明这两种蛋白质存在某种相互作用的关系<sup>[8]</sup>。为进一步了解  $\beta$ -Arr1 和 MMP-9 对肿瘤发生发展的作用, 检测了临床肝癌组织中两者的表达情况。

## 1 资料与方法

### 1.1 患者资料

肿瘤及癌旁标本来源于川北医学院附属医院肝胆外科 2007 年 10 月—2009 年 6 月肝细胞癌患者, 共 35 例, 均系自愿入组并签署相关知情同意书。其中男 26 例, 女 9 例, 年龄 36~75 岁, 中位年龄 53 岁。均经病理组织学检查确诊为肝细胞癌。AFP 值高于正常 27 例 (230~208 482  $\mu$ g/L), 占 77.1%。HAsBg 阳性 23 例, 占 65.7%。35 例肿瘤中, 单发病灶 28 例, 多发病灶 7 例, 肿瘤最大径 (或总直径) <5cm 者 3 例, 5~10cm 者 23 例, >10cm 者 9 例, 合并门静脉癌栓 3 例。国际 UICC 分期 (1977) II 期 23 例, III 期 12 例。15 例对照正常肝组织系胆道结石、肝脏外伤等非肿瘤疾病手术时留取。

### 1.2 试剂

RNA 提取 Trizol 试剂和 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 试剂盒均为 TAKARA 公司产品; 肿瘤组织蛋白提取试剂 RIPA 及蛋白酶抑制剂为申能博采公司产品; 羊抗人  $\beta$ -Arr1 一抗为美国 Santa Cruz 公司产品; 兔抗人  $\beta$ -actin 一抗、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗和兔抗羊 IgG 二抗为北京中杉金桥公司产品; 化学发光试剂为 Millipore 公司产品; PCR 引物由上海生工公司合成; MMP-9 ELISA 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品。

### 1.3 标本采集与处理

肝细胞癌组织、癌旁组织和正常肝组织于手术时留取, 立即分装 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。标本各取 5mg, 分别在总 RNA 提取试剂 Trizol、蛋白裂解液 RIPA 或 ELISA 标本制取液 1ml 进行冰上匀浆, 高速离心后取上清液进行实验。

### 1.4 实时荧光定量 RT-PCR 检测 $\beta$ -Arr1 mRNA 表达

以 Trizol 试剂提取总 RNA, 用核酸分析仪检测含量,  $OD_{260/280nm}$  比值均在 1.8~2.0。各标本 1 $\mu$ g 总 RNA 分别反转录合成 cDNA, 采用 SYBR Green I 荧光染料实时定量 PCR 方法检测  $\beta$ -Arr1 mRNA 的表达, 以 GAPDH 作为内参基因。引物序列分别为  $\beta$ -Arr1: 上游引物: 5'-GGGACGCGAGTGT-TCAAGAA-3', 下游引物: 5'-ACAAACAGGTC-CTTGCGAAAG-3'; GAPDH: 上游引物: 5'-CAT-GAGAAGTATGACAACAGCCT-3', 下游引物: 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'。反应在 Gene-Rotor 6000 荧光定量 PCR 仪上进行。PCR 反应总体系为 25 $\mu$ l, 其中包括 cDNA 2 $\mu$ l, SYBR mix 12.5 $\mu$ l, 10pmol/L 的上下游引物各 1 $\mu$ l, 去离子水补足至 25 $\mu$ l。反应条件为: 预变性 98 $^{\circ}$ C, 1min $\rightarrow$ 变性 98 $^{\circ}$ C, 10s; 退火 57 $^{\circ}$ C, 15s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 30s, 40 个循环, 在延伸步骤采集荧光。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  值表示基因相对表达量<sup>[9]</sup>, 柱形统计图结果表示为各组  $\beta$ -Arr1/GAPDH 相对表达量与正常对照组相比的倍数。

### 1.5 Western blot 检测 $\beta$ -Arr1 蛋白表达

组织中加入适量的 RIPA 试剂及蛋白酶抑制剂 PMSF 和 Cocktail, 冰上放置 30min, 4 $^{\circ}$ C、20 000g 离心 30min。吸取上清液, 测定蛋白浓度。每泳道加 30 $\mu$ g 蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳后, 电转至 PVDF 膜, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后, 按顺序加入 1:200 稀释的一抗和 1:5 000 稀释的二抗溶液反应并洗脱, 进行化学发光反应, 室温 2min 后置化学发光成像系统成像。 $\beta$ -actin 作为内参, 用 Quantity One 软件进行图像分析, 分别计算  $\beta$ -Arr1 与  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值, 以  $\beta$ -Arr1/ $\beta$ -actin 的灰度比值代表  $\beta$ -Arr1 蛋白的相对含量, 柱形统计图结果表示为各组  $\beta$ -Arr1/ $\beta$ -actin 蛋白相对含量与正常对照组相比的倍数。

### 1.6 ELISA 方法检测 MMP-9 蛋白浓度

组织中加入适量的 ELISA 标本制取液, 冰上放置 30min 后, 4 $^{\circ}$ C、20 000g 离心 30min。吸取上清液, 进行 ELISA 检测 MMP-9 蛋白浓度, 测定  $OD_{450nm}$ , 以各组的  $OD_{450nm}$  数值代表 MMP-9 的相对浓度, 柱形统计图结果表示为各组 MMP-9 浓度的相对含量与正常对照组相比的倍数。

### 1.7 统计学方法

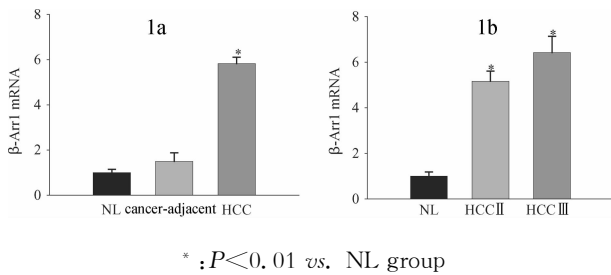
各项数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用方差分析, 多组间两两比较用 Student-Newman-Keuls 检验, 相关分析采用 Spear-

man 分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义, 数据处理采用 SPSS11.5 软件完成。

## 2 结果

### 2.1 肝细胞癌组织中 $\beta$ -Arr1 mRNA 的表达

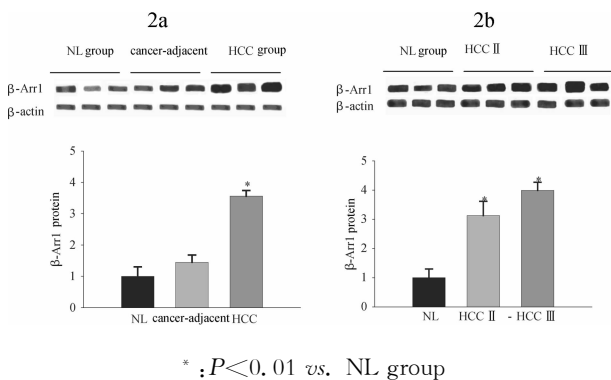
$\beta$ -Arr1 mRNA 在 HCC 组、癌旁组、正常对照组(NL 组)中均有表达。与 NL 组相比, HCC 组  $\beta$ -Arr1 mRNA 的表达水平升高约 5.8 倍( $P < 0.01$ ), 癌旁组的  $\beta$ -Arr1 mRNA 表达水平升高约 1.5 倍( $P > 0.05$ ), 见图 1a; 与癌旁组相比, HCC 组患者  $\beta$ -Arr1 mRNA 的表达水平升高约 3.9 倍( $P < 0.01$ ), 见图 1a; HCC 组的  $\beta$ -Arr1 mRNA 表达水平随肿瘤的临床分期增加而增加, 见图 1b。但 II 期和 III 期肿瘤间的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



\*:  $P < 0.01$  vs. NL group  
图 1 肝细胞癌及对照组组织中  $\beta$ -Arr1 mRNA 的表达  
Figure 1 The expression of  $\beta$ -Arr1 mRNA in HCC and control tissues

### 2.2 肝细胞癌组织中 $\beta$ -Arr1 蛋白的表达

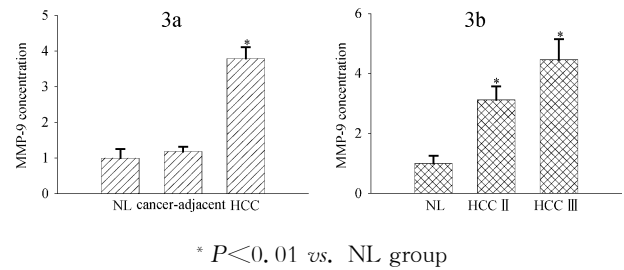
$\beta$ -Arr1 蛋白在肝细胞癌组、癌旁组和 NL 组中均有不同程度表达, 肝细胞癌组  $\beta$ -Arr1 的蛋白表达水平显著高于癌旁组和 NL 组( $P < 0.01$ ), 见图 2a; III 期肝癌的  $\beta$ -Arr1 蛋白表达较 II 期肝癌多, 但不同临床分期的肝细胞癌组间表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 其变化趋势与其 mRNA 水平变化一致, 见图 2b。



\*:  $P < 0.01$  vs. NL group  
图 2 肝细胞癌及对照组组织中  $\beta$ -Arr1 蛋白的表达  
Figure 2 The expression of  $\beta$ -Arr1 protein in HCC and control tissues

### 2.3 肝细胞癌组织中 MMP-9 蛋白的表达

分泌型 MMP-9 蛋白能在肝细胞癌、癌旁和 NL 组织中检测到, 肝细胞癌组 MMP-9 的蛋白浓度显著高于癌旁组和 NL 组( $P < 0.01$ ), III 期肝癌的 MMP-9 蛋白浓度较 II 期肝癌高, 但不同临床分期的肝细胞癌组间 MMP-9 浓度差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见图 3。同时, Spermman 相关分析显示 HCC 不同组间的 MMP-9 浓度高低与  $\beta$ -Arr1 表达呈明显正相关( $r = 0.889$ )。



\*  $P < 0.01$  vs. NL group  
图 3 肝细胞癌及对照组中 MMP-9 蛋白的浓度  
Figure 3 The concentration of MMP-9 in HCC and control group

## 3 讨论

Arrestins 家族的主要成员  $\beta$ -Arr1 和  $\beta$ -Arr2 广泛分布于机体的心脏、肝、脾、神经系统及淋巴系统等各个部位, 参与 GPCR,  $\beta_1$  和  $\beta_2$  肾上腺素受体、M2 型乙酰胆碱受体、视紫红质等受体调节作用, 转导体内多种信号, 引起不同的细胞效应<sup>[6,10]</sup>。研究表明,  $\beta$ -Arr 与多种恶性肿瘤密切相关: 卵巢癌细胞中,  $\beta$ -Arr1 被招募到细胞膜与内皮素 A 受体结合, 进一步激活  $\beta$ -catenin 信号转导途径, 导致卵巢癌细胞的侵袭及转移<sup>[7]</sup>;  $\beta$ -Arr2 可以抑制 NK 细胞的信号转导, 导致 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的作用减弱<sup>[9]</sup>, 增加发生肿瘤的机会。  $\beta$ -Arr 不仅在基因水平影响细胞的生长发育及癌细胞的侵袭和转移, 而且  $\beta$ -Arr 介导的信号转导途径也调节蛋白的合成, 在细胞的生长与增殖、肿瘤的发生等起着重要作用<sup>[11]</sup>。肝细胞癌的发生发展受机体多条信号通路的调控。在前期研究中发现,  $\beta$ -Arr1 转基因鼠易形成肝癌移植瘤, 且肿瘤进展迅速<sup>[8]</sup>, 提示  $\beta$ -Arr1 在肝癌发生发展中的重要作用; 在本项研究中, 我们又进一步利用肝细胞癌临床样本, 发现不同临床分期的癌组织中  $\beta$ -Arr1 mRNA 和蛋白水平均明显升高, 与患者病情呈正相关, 证实了  $\beta$ -Arr 对监测肝细胞癌病情的重要意义。

基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 是金属蛋白酶家族最重要的成员之一,

具有降解基底膜和细胞外基质、激活生长因子、抑制肿瘤细胞凋亡、促进血管生成因子的释放等多种生物学功能<sup>[12]</sup>。在多种恶性肿瘤中 MMP-9 都呈高表达,参与肿瘤的新生血管形成,与恶性肿瘤的转移与侵袭能力密切相关<sup>[13]</sup>。本项研究中, $\beta$ -Arr1 和分泌型 MMP-9 在肝细胞癌组织中表达明显增加,与临床分期呈明显的正相关。说明  $\beta$ -Arr1 与 MMP-9 在肝癌组织中的表达强弱可作为判断肿瘤分期、预测预后的指标之一<sup>[14]</sup>。另外, $\beta$ -Arr1 与 MMP-9 两者的表达也呈高度正相关。这也证实我们前期研究的发现:即  $\beta$ -Arr1 转基因肝癌鼠的 MMP-9 活性增加,且 MMP-9 活性和肿瘤新生血管形成受  $\beta$ -Arr1 调节<sup>[8]</sup>,提示  $\beta$ -Arr1 和 MMP-9 之间的确存在相互协同的关系,对肝癌的发展起到了促进作用。但  $\beta$ -Arr1 是如何调节 MMP-9 的活性现在还了解不多,也是今后研究的重点。

#### 参考文献:

- [1] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7):2557-2576.
- [2] 于志坚. 我国肝癌早诊早治研究现状 [J]. *南通大学学报(医学版)*, 2008, 28(2):79-83.
- [3] Barki-Harrington L, Rockman HA.  $\beta$ -arrestins: Multifunctional cellular mediators [J]. *Physiology(Bethesda)*, 2008, 23: 17-22.
- [4] Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction receptor signals by beta-arrestins [J]. *Science*, 2005, 308(5721):512-517.
- [5] Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(2):79-94.
- [6] Rosanò L, Cianfrocca R, Masi S, et al. Beta-arrestins links endothelin A receptor to  $\beta$ -catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (8):2806-2811.
- [7] 钱炎珍,黎江,李林芳,等. 人肝癌细胞系 EH-H1 的建立及其相关生物学特性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(1):84-87.
- [8] Zou L, Yang R, Chai J, et al. Rapid xenograft tumor progression in beta-arrestin1 transgenic mice due to enhanced tumor angiogenesis[J]. *FASEB J*, 2008, 22(2):355-364.
- [9] Yu MC, Su LL, Zou L, et al. An essential function for beta-arrestin2 in the inhibitory signaling of natural killer cells [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(8):898-907.
- [10] 程智洁,裴钢. Arrestins 家族:一类在 G 蛋白偶联受体的信号传导中起关键作用的蛋白质 [J]. *生命科学*, 1999, 11(4):169-171.
- [11] DeWire SM, Kim J, Whalen EG, et al. Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(16):10611-10620.
- [12] Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(5):558-564.
- [13] Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis [J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6(9):478-482.
- [14] 孙珂,刘纯. 苯丁酸钠对甲状腺滤泡癌细胞侵袭能力及 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(1):67-70.

[编辑:黄园玲;校对:周永红]