

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.033

PAR2 在肝细胞癌组织及其门静脉癌栓中的表达

闪海霞,范崇桂,张怀宏

(河南省南阳市中心医院感染性疾病科 473000)

[摘要] **目的** 探讨蛋白酶激活受体 2(PAR2)在肝细胞癌组织及其门静脉癌栓(PVTT)中的表达水平及其临床价值。**方法** 采用免疫荧光染色、RT-PCR 及 Western blot 等技术手段分别检测 21 例肝细胞癌患者组织、癌旁正常组织和门静脉癌栓中 PAR2 的表达水平。**结果** PAR2 在肝细胞癌组织、癌旁正常组织及其门静脉癌栓组织中均有不同程度的表达,其中肝细胞癌与癌旁正常组织的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),肝细胞癌与门静脉癌栓的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** PAR2 在 HCC 及其 PVTT 中具有较高的表达;PAR2 的表达与肝细胞癌的发生及转移密切相关。

[关键词] 癌,肝细胞;门静脉癌栓;蛋白酶激活受体 2

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)25-3553-03

Expression of PAR2 in portal vein cancer embolus and hepatocellular carcinoma

Shan Haixia, Fan Chonggui, Zhang Huaihong

(Department of Infectious Diseases, Nanyang Central Hospital of Henan Province, Nanyang, Henan 473000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of proteinase active receptor 2(PAR2) protein in hepatocellular carcinoma(HCC) and portal vessel tumor thrombosis(PVTT) to evaluate its clinical value. **Methods** Immunofluorescence, RT-PCR and Western blot were used to examine the expression of PAR2 protein in cancer tissue, tumor thrombosis and cancer-adjacent normal tissue from 21 patients with HCC. **Results** The expression pattern of PAR2 protein was different cancer tissue and cancer-adjacent normal tissue. PAR2 labeling index was significantly higher in cancer tissue and PVTT than cancer-adjacent normal tissue($P < 0.05$). Although PAR2 labeling index was lower in cancer tissue than in tumor thrombosis, no statistical significance was observed in PAR2 labeling index between them($P > 0.05$). **Conclusion** PAR2 is over-expressed in HCC and PVTT. PAR2 expression is related with the development and progression of HCC.

[Key words] carcinoma, hepatocellular; portal vessel tumor thrombosis; proteinase activated receptor 2

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)在我国是常见的恶性肿瘤之一,其病死率已占我国恶性肿瘤病死率的第 2 位,据估计全球每年新增病例超过 100 万^[1],部分患者可因早期发现、早期诊断、早期治疗而获得长期生存,但大部分患者确诊时已处于中晚期,治疗效果差,预后不理想。且肝细胞癌的转移侵袭能力高,门静脉癌栓(portal vein tumor thrombus)的发生是影响肝细胞癌患者预后的重要因素之一。目前肝细胞癌患者的总 5 年生存率仍低于 5.0%^[2]。因此研究和阐明肝细胞癌发生及转移侵袭机制,探索有效的治疗阻断靶点具有重要的意义。蛋白酶激活受体(PARs)属于与 G 蛋白相耦联蛋白。PAR2 在消化道肿瘤中表达显著升高,与多种消化系肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关,并在一定程度上参与了肿瘤的增殖、黏附、基质降解和血管形成的调节等^[3]。本研究通过免疫荧光染色、RT-PCR 和 Western blot 等手段检测人肝细胞癌组织、癌旁正常组织及门静脉癌栓中 PAR2 的表达情况,初步探索了 PAR2 在肝细胞癌中有较高的表达,并且与肿瘤组织的生长与侵袭能力有着重要的相关性。现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 标本取自本院普外科、肿瘤科 2009~2013 年肝细胞癌手术后保存的组织石蜡标本,取其中带有门静脉癌栓的标本 21 例,设为肝细胞癌组织组,同一标本距离肿瘤边缘 5 cm 以外的肝组织为癌旁正常组织组,标本中的癌栓设为门静脉癌栓组。全部患者通过病史、体征症状、胸部平片检查、CT 等进

一步明确诊断,术后经病理明确为肝细胞癌。根据 1987 年国际抗癌联盟(UICC)的肝细胞癌 TMN 分期方案,21 例 I 期 3 例,II 期 15 例,III 期 2 例,IV 期 1 例;细胞分型均为肝细胞癌 3,其中男 16 例,女 5 例,平均年龄(59.6±3.1)岁,所有患者术前均未进行任何抗肿瘤治疗。羊多抗 PAR2(C-17):sc-8205 购自 Santa Cruz 公司;FITC 标记抗体、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP),购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;RT-PCR 试剂盒(Takara 公司)购于广州瑞真生物技术有限

1.2 方法

1.2.1 标本处理方法 21 例肝细胞癌术后标本采用 10% 甲醛固定后经石蜡包埋,常规切片后染色观察。

1.2.2 免疫荧光染色 切片常规脱蜡至水化,PBS 液洗;枸橼酸盐缓冲液进行热抗原修复 12 min;0.5% H₂O₂-甲醇封闭内源性过氧化物酶 10 min,PBS 液清洗 2 遍;5%~10% 正常山羊血清封闭;滴加 1:50 PAR2 羊多抗,4℃ 冰箱过夜,PBS 液清洗 2 遍;滴加 FITC 标记二抗工作液,4℃ 冰箱过夜,PBS 液清洗 2 遍;hoechst 染核,PBS 液清洗 1 遍;防荧光淬灭封片剂封片。

1.2.3 Western blot 以含蛋白酶抑制剂的裂解液分别提取肝癌组织、门静脉癌栓及癌旁正常组织的总蛋白,Bradford 法蛋白定量;90 mA 恒流十二烷基硫酸钠(SDS)电泳;90 V 恒压转膜 120 min,将蛋白转至硝酸纤维素膜;丽春红染色,根据 Marker 条带位置和目的蛋白大小剪膜;含 5% 脱脂奶粉和

TBST 封闭液常温封闭膜 1 h; 4 °C 孵育 1 抗过夜; TBST 洗膜 10 min 3 次, 常温孵育 2 抗 1 h; TBST 洗膜 10 min 3 次, ECL 法发光; 图像扫描、分析。

1.2.4 RT-PCR 用 Trizol 试剂提取肝细胞癌组织、门静脉癌栓及癌旁正常组织的总 RNA 并逆转录合成 cDNA。应用 Omega2.0 设计 PAR2 基因引物序列 FP: 5'-AGA AGC CTT ATT GGT AAG GTT-3', RP: 5'-AAC ATC ATG ACA GGT CGT GAT-3', PCR 片段长度为 582 bp, β -actin 基因引物序列 FP: 5'-TGT TTG AGA CCT TCA ACA CCC-3', RP: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3', PCR 扩增目的片段长度为 540 bp, 以上引物均由英潍捷基公司广州合成部合成。提取总 RNA, 并检测 RNA 的含量和纯度 (A260/A280 为 1.8~2.0)。取 1 μ g 细胞总 RNA 用 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行相应基因的扩增。反应体系: Taq 酶 1.25 U, 10 \times PCR Buffer (含 Mg 离子) 5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol) 4 μ L, cDNA 2.5 ng, 引物 1 (20 μ mol) 1 μ L, 引物 2 (20 μ mol) 1 μ L, 灭菌双蒸水补足至 10 μ L。PCR 循环参数为: 94 °C 45 s, 51 °C (PAR2)/58

°C (β -actin) 45 s, 72 °C 60 s, 33 个扩增循环; 2% 琼脂糖电泳 PCR 扩增产物, 在紫外光下观察 DNA 条带, 用紫外分析仪拍照, 数据处理。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理, 计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用成组 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫荧光染色法检测 PAR2 表达 癌旁组织中和门静脉癌栓组织中绿色荧光染色明显较强 (图 1A、B); 免疫荧光染色检测发现 PAR2 在癌旁正常组织中绿色荧光表弱 (图 1C)。肝细胞癌组织中阳性染色细胞百分比为 91.23 ± 7.52 , 门静脉癌栓组织中阳性染色细胞百分比为 93.43 ± 8.45 , 癌旁组织中阳性染色细胞百分比为 51.73 ± 8.41 。分别作成组 *t* 检验后发现, 肝细胞癌组织与癌旁正常组织之间、门静脉癌栓组织与癌旁正常组织之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 肝细胞癌组织与门静脉癌栓组织间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

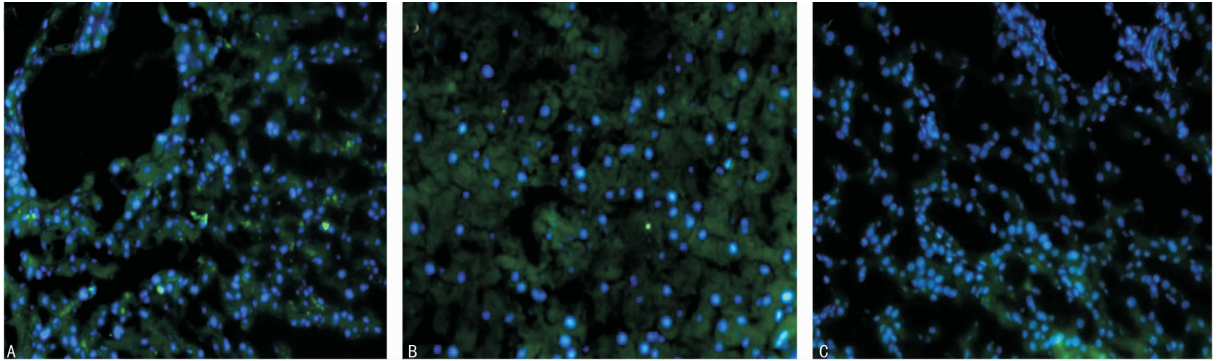
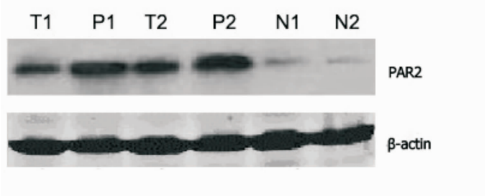


图 1 PAR2 在肝细胞癌、门静脉癌栓及癌旁正常组织中的表达 (免疫荧光染色 $\times 200$)

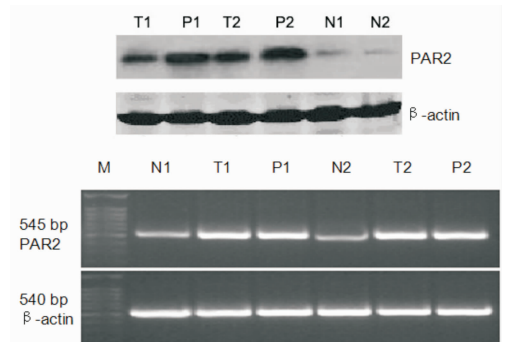
2.2 Western Blot 检测不同组别组织 PAR2 的表达 结果显示肝细胞癌、癌旁正常、门静脉癌栓 3 种组织均有 PAR2 表达, 其中肝细胞癌组织与门静脉癌栓组织表达明显高于癌旁正常肝组织, 见图 2。



T₁ 及 T₂ 分别为样本 1 号及 2 号的门静脉肝细胞癌组织; P₁ 及 P₂ 分别为样本 1 号及 2 号的癌栓组织; N₁ 及 N₂ 分别为样本 1 号及 2 号的癌旁组织。

图 2 PAR 及 β -actin 分别在肝细胞癌、门静脉癌栓及癌旁正常组织中的蛋白表达

2.3 RT-PCR 在不同组织的表达 由于 PAR2 蛋白表达水平在不同组织中存在一定的差异, 假设 PAR2 基因在不同组织中的表达也存在一定的差异。由此本研究设计了 PAR2 基因序列特异引物, β -actin 基因为内参进行 RT-PCR 验证。结果表明, 在各组织中, PAR2 均有表达, 但肝细胞癌组织及门静脉癌栓组织与癌旁正常组织的 PAR2 mRNA 表达存在差异, 这与细胞表面相应蛋白水平是相一致的, 见图 3。



T₁ 及 T₂ 分别为样本 1 号及 2 号的门静脉肝细胞癌组织; P₁ 及 P₂ 分别为样本 1 号及 2 号的癌栓组织; N₁ 及 N₂ 分别为样本 1 号及 2 号的癌旁正常组织。

图 3 PAR 及 β -actin 分别在肝细胞癌、门静脉癌栓及癌旁正常组织中的 mRNA 表达

3 讨 论

1994 年, 研究者发现了一种与凝血酶受体晶体结构和活化机制相似的蛋白 PAR2, PAR2 是一种属于 G 蛋白酶耦联蛋白激活酶受体超家族成员的细胞膜表面受体。人源 PAR2 基因结构域与小鼠编码的 PAR2 基因结构类似, 人源 PAR2 蛋白属于跨膜蛋白, 由开放阅读框编码的 397 个氨基酸组成, 与小鼠编码的 PAR2 蛋白同源性达 85.0%, PAR2 跨膜蛋白主要由胞外蛋白 (N 末端)、跨膜区域 (7 个跨膜螺旋结构) 及胞内结构

(细胞内衬及 C 末端)组成,人源 PAR2 与小鼠编码的 PAR2 都含有 7 个跨膜螺旋结构。PAR2 蛋白 N 端丝氨酸蛋白酶位点和细胞外伴在蛋白活化过程中起着重要作用,C 端在一定程度上介导信号转导作用。凝血因子Ⅻa、Ⅹa、膜型丝氨酸蛋白酶-1、人气道胰蛋白酶样蛋白酶等皆可激活 PAR2,常用的人工 PAR2 激活剂为 SLIGKV,但 SLIGKV-NH₂ 不能裂解受体 N 末端,可以直接与细胞外衬区域直接激活 PAR2^[4],能够在体内外重复相应配体的作用,目前已被广泛应用于各个领域。PAR2 广泛分布于消化系统的各种组织结构,有大量研究表明,PAR2 的上调表达可促进消化道肿瘤细胞转移和浸润,对肿瘤细胞增殖和血管形成以及基质降解等生理生化过程具有重要的调节作用。研究表明,除消化系统肿瘤外,在如乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤中,PAR2 的表达也有所增加,在对食管癌等肿瘤的研究显示肿瘤的淋巴转移程度、浸润深度、静脉远处转移等与 PAR2 表达呈高度正相关^[5-7]。有学者在人肝细胞癌细胞系 HepG2 上发现 PAR2 激动剂在不同浓度(1~50 μmol/L)均可刺激肝细胞癌细胞增殖,并呈剂量依赖性^[8]。同时,有学者在对原发性肝细胞癌组织和癌旁正常组织进行分析后,发现 PAR2 在原发性肝细胞癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织^[9]。

本研究表明,PAR2 蛋白在肝细胞癌组织和门静脉癌栓组织中表达量及强度均显著高于癌旁正常组织,在蛋白表达水平上,肝细胞癌组织及门静脉癌栓组织中 PAR-2 的表达要高于癌旁门静脉组织,从分子水平上验证了肝细胞癌组织及门静脉癌栓组织中 PAR2 表达量要高于癌旁正常组织,提示肝细胞癌的生长与侵袭能力可能受到 PAR2 的影响。在 RNA 水平上,肝细胞癌组织及门静脉癌栓组织中 RNA 表达相对值均高于癌旁组织,在肝细胞癌组织及癌栓组织中通过 RNA 调控 PAR2 表达增高,与以往一致^[8,10],提示肿瘤的发生及转移机制与 PAR2 有着密切的联系。因而,本研究分别对比分析肝细胞癌组织与癌旁正常组织、门静脉癌栓组织与癌旁正常组织这一不同角度表明 PAR-2 的过表达对肝细胞癌发生和进展具有促进作用,但此过程的具体分子机制目前推测其可能有:(1) PAR2 受激活后促进磷酸肌醇水解及细胞内 Ca²⁺ 自由移动,激活蛋氨酸受体激活酶,从而促进 p42/p44 MAPK 通路的活动,从而达到促进肿瘤组织生长的目的^[11]。(2) PAR2 经激活后胞内 Ca²⁺ 动员增加,进而使得表皮生长因子被激活,随后激活 ras 依赖的 ERK1/2 通路,从而激活经典 ras 依赖的 ERK1/2 通路,从而引起 DNA 复制、细胞增殖效应^[12]。(3) PAR2 激活后诱导 Jun 激活区域凝蛋白 1 的蛋白修饰作用,促进细胞骨架的重新分布,从而减少机体自身的免疫应答,有利于肿瘤细胞的迁徙移动^[13]。(4) 组织因子激活凝血因子Ⅶ结合后形成的复合物在作为激动剂激活 PAR2 的同时,亦可以特异性上调 IL-8 的表达,从而促进肿瘤组织血管生成,同时改变患者局部凝血功能,形成局部肿瘤微环境,使得肿瘤组织生长侵袭效果增强^[5,14]。(5) 有学者亦发现 CD47(+) 肝细胞癌可通过自身分泌组织蛋白 S 激活 PAR2 通路,从而促进自身的生长,而 CD47 则在肿瘤干细胞中优先表达^[15]。PAR2 的高表达是否标志着肿瘤的恶性程度更高、侵袭能力更强,仍需作进一步的深入研究。综上所述,PAR2 不仅有望作为新一代临床筛选的肿瘤学标志物,更因其定位明确有望成为肝细胞癌靶向治疗的新靶点。

参考文献

[1] Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present

and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(4): 418-424.

[2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[3] Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(12): 1999-2004.

[4] Niessen F, Furlan-Freguia C, Fernández JA, et al. Endogenous EPCR/aPC-PAR1 signaling prevents inflammation-induced vascular leakage and lethality [J]. *Blood*, 2009, 113(12): 2859-2866.

[5] Cole M, Bromberg M. Tissue factor as a novel target for treatment of breast cancer [J]. *Oncologist*, 2013, 18(1): 14-18.

[6] Al-Eryani K, Cheng J, Abé T, et al. Hemophagocytosis-mediated keratinization in oral carcinoma in situ and squamous cell carcinoma; a possible histopathogenesis of keratin pearls [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(10): 1977-1988.

[7] Zhang X, Wang W, Mize GJ, et al. Protease-activated receptor 2 signaling upregulates angiogenic growth factors in renal cell carcinoma [J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 94(1): 91-97.

[8] 郑艳敏, 谢立群, 赵军艳, 等. PAR-2 激动剂对肝癌细胞增殖及 Ca-(2+) 水平的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(12): 2371-2375.

[9] 海鸥, 谢立群, 李轩, 等. 蛋白酶激活受体-2 在原发性肝癌组织中的表达 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 16(20): 2159-2162.

[10] Chen KD, Wang CC, Tsai MC, et al. Interconnections between autophagy and the coagulation cascade in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1244.

[11] Kaufmann R, Oettel C, Horn A, et al. Met receptor tyrosine kinase transactivation is involved in proteinase-activated receptor-2-mediated hepatocellular carcinoma cell invasion [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(9): 1487-1496.

[12] Defea KA, Zalevsky J, Thoma MS, et al. Beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2 [J]. *J Cell Biol*, 2000, 148(6): 1267-1281.

[13] Luo W, Wang Y, Hanck T, et al. Jab1, a novel protease-activated receptor-2 (PAR-2)-interacting protein, is involved in PAR-2-induced activation of activator protein-1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(12): 7927-7936.

[14] 周红, 胡红心, 石文霞, 等. 组织因子(TF)和蛋白酶激活受体(PARs)在肿瘤细胞的表达及其作用 [J]. *血栓与止血学*, 2008, 14(2): 53-59.

[15] Lee TK, Cheung VC, Lu P, et al. Blockade of CD47-mediated cathepsin S/protease-activated receptor 2 signaling provides a therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2014, 60(1): 179-191.

(收稿日期: 2015-03-08 修回日期: 2015-06-07)