

己糖激酶 1 在肾癌中的异常表达^{*}

陈泽波 翟庆娜^① 余振东^{①**} 赵春娟^① 周亮^② 来永庆 史本涛 彭健

(北京大学深圳医院泌尿外科, 深圳 518036)

【摘要】 目的 探讨己糖激酶 1(hexokinase 1, HK1) 基因在人肾癌和癌旁组织中差异表达。 **方法** 提取 47 例肾癌及其癌旁组织的 RNA 和蛋白, 荧光定量实时聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, QPCR) 检测 HK1 的表达水平, 应用免疫组化方法检测 HK1 蛋白在肾癌及相应癌旁组织的表达情况。 **结果** 癌组织 ΔCT 值为 4.43 ± 1.54 , 癌旁组织的 ΔCT 值为 5.59 ± 1.70 , 二者有统计学差异($t = -4.97, P = 0.00$)。37 例(78.7%, 37/47) 肾癌组织样本中 HK1 表达量高于癌旁组织。免疫组化结果显示, HK1 蛋白表达于胞浆内, 在肾癌组织中的表达量明显高于相应的正常组织。 **结论** HK1 高表达于肾癌组织, 可能在肿瘤发生发展的过程中发挥重要作用, 该基因有望成为指导肾癌诊断及治疗的新靶点。

【关键词】 肾癌; 基因; 己糖激酶

中图分类号: R737.11

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2012)03-0280-04

Abnormal Expression of HK1 in Renal Cell Carcinoma Chen Zebo^{*}, Zhai Qingna, Yu Zhendong, et al.^{*} Department of Urology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression difference of hexokinase 1 (HK1) gene in human renal cell carcinoma and the corresponding normal tissues. **Methods** RNA and protein were extracted from 47 cases of renal cell carcinoma and adjacent tissues. The HK1 gene expression level was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR), and HK1 protein in the renal cell carcinoma and corresponding adjacent tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** The ΔCT in the renal cell carcinoma samples was significantly lower than that in the adjacent tissues (4.43 ± 1.54 vs. 5.59 ± 1.70 , $t = -4.97$, $P = 0.00$). In 78.7% (37 cases) of the renal cell carcinoma samples, the expression level of HK1 was significantly higher than that in adjacent tissues. Immunohistochemistry detected HK1 protein in the cytoplasm, and its expression level in renal cell carcinoma was significantly higher than that in the corresponding normal tissues. **Conclusions** HK1 is highly expressed in renal cell carcinoma, indicating that it plays an important role in the development of tumor. The gene is expected to be a new target in the diagnosis and treatment of renal cell carcinoma.

【Key Words】 Renal cell cancer; Gene; Hexokinase

肾癌是泌尿系统常见恶性肿瘤之一^[1]。目前, 临床上尚未发现具有早期诊断及预后判断意义的特异性指标, 因此, 探索肾癌发病机理, 寻找早期诊断及治疗靶标具有重要意义。研究肾癌癌基因的功能、转录调控机制探索肾癌发病机制、确定判断预后的标志物的共同前提是筛选到在肾癌

中高表达且在全身正常组织中基本不表达的基因。己糖激酶(hexokinase, HK)是糖酵解途径的第 1 个酶, 也是糖酵解途径限速酶。肿瘤具有高糖代谢的特点, 而肿瘤细胞中大约有 60% 的 ATP 来源于糖酵解途径。HK 的 4 种同工酶中, HK1 与肿瘤的相关性最大, 多肿瘤细胞系中都有 HK1 的

^{*} 2009 年国家自然科学基金(基金编号:30900817), 2011 年深圳市科技计划项目(基金编号:201102006), 2009 年深港创新圈计划(基金编号:ZYP200907080110A), 2010 年度深圳市科技研发资金基础研究计划资助项目(基金编号:JC201005260208A), 2011 年广东省科技计划项目(基金编号:2011B031800381)

^{**} 通讯作者, E-mail: dongboyaa@yahoo.com.cn

^① 检验科

^② 男性生殖与遗传实验室

诱发和过表达。本研究应用免疫组化和荧光定量实时聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, QPCR) 方法检测人肾癌组织及癌旁组织中 HK1 的表达水平,探讨 HK1 表达与肾癌发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 标本收集

47 例的肾癌组织标本主要来源于 2010 年 12 月 ~ 2011 年 5 月广东、湖南、安徽和海南等各大医院,癌旁组织选自远离肿块 5 cm 以上的区域,所取组织均经病理学诊断为肾透明细胞癌组织及相应癌旁组织。术后组织立即保存于液氮和 RNAlater 中。所取标本均经过伦理委员会批准 (批文号: 20090017) 和患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司,逆转录试剂盒购自 Forment 公司,PCR 试剂盒购自 Takara 公司,荧光定量试剂盒购自 Invitrogen 公司,普通 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司,荧光定量 PCR 仪 ABI PRISM 7000 购自美国 ABI 公司。鼠抗人 HK1 单克隆抗体购自 Abcam 公司,兔抗鼠单克隆抗体购自上海西唐生物科技公司。

1.2.2 RNA 提取 用 RNeasy Protect Mini Kit 试剂盒 (Qiagen, Germany) 提取储存于液氮中的 47 例肾癌标本及癌旁正常组织标本中的总 RNA,用 1.5% 琼脂糖凝胶上样电泳,紫外照胶仪下观察,并用紫外分光光度计测定其浓度。RNA 保存于 -80°C 低温冰箱。

1.2.3 RT-PCR HK1 引物由 Invetrigen 公司合成: 上游: $5' - \text{TCTCCAAAATCATGCACCAA} - 3'$; 下游: $5' - \text{AAAGTGCTGAAAAGGCAGGA} - 3'$; 本实验选取管家基因 U6 作为内参,上游引物: $5' - \text{CTCGCTTCGGCAGCACA} - 3'$; 下游引物: $5' - \text{ACGCTTCACGAATTTGCGT} - 3'$ 。根据逆转录试剂盒说明书分别加入反应所需试剂、引物、RNA 样品等进行反应。逆转录条件为: 65°C , 5 min; 42°C , 1 h; 70°C , 5 min。PCR 扩增: 95°C , 5 min; 95°C , 30 s, 58°C , 30 s, 72°C , 30 s, 35 个循环; 72°C , 5 min。反应结束后,将样品用 2% 琼脂糖凝胶随机上样电泳,紫外照胶仪下观察。

1.2.4 荧光定量 QPCR 以逆转录合成的 cDNA 作为模板,进行 QPCR 扩增。QPCR 应用 SYBR Green QPCR 试剂盒 (Invetrigen, US),在 ABI PRISM 7000

荧光定量 PCR 系统中进行。条件根据说明书设置为 50°C , 2 min; 95°C , 2 min; 95°C , 15 s; 55°C , 20 s; 70°C , 30 s, 40 个循环, 20 μl 反应体系,结果用 ABI 自带软件分析。

1.2.5 免疫组化 将肾癌和相应的癌旁组织 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μm 连续切片。石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育。1% 枸橼酸缓冲液对抗原进行热修复,加 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液后,加入一抗 (1:100), 37°C 孵育 1 h。滴加生物素标记的二抗, 37°C 孵育 30 min,滴加链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化物酶溶液, 37°C 孵育 30 min 后二氨基联苯胺 (DAB) 显色。常规脱水,透明,封片。以上各步骤均用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗,同时另用 PBS 代替一抗作为阴性对照。免疫反应阳性物质呈棕黄色。

2 结果

2.1 RT-PCR 验证肾癌组织中 HK1 的表达

RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳显示, HK1 位于 100 ~ 200 bp, 所在位置符合其大小,肾癌组织 (C) 中的 HK1 比相应癌旁组织 (N) 中的亮度略亮,提示肾癌组织中 HK1 的表达量高于癌旁组织 (图 1)。

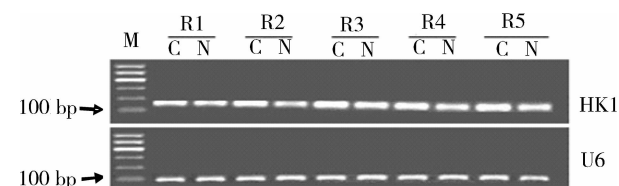


图 1 肾癌 (C) 及相应癌旁组织 (N) 中 HK1 表达的 RT-PCR 产物电泳图 肾癌组织 (C) 中的 HK1 mRNA 水平高于相应的癌旁正常肾组织 (N), U6 为内部参照, R 代表肾癌患者, 1 等数字代表患者序号

2.2 QPCR 验证肾癌组织中 HK1 的表达

本实验选用管家基因 U6 作为内部参照, CT 值与模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, CT 值越小, 即基因的表达量越高, CT 值越小。ABI 自带软件分析结果, 通过 $2^{\Delta\text{CT}}$ 可求得目的基因相对表达量 ($\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{HK1}} - \text{CT}_{\text{U6}}$), 经 \log_2^x ($x = 2^{\Delta\text{CT}}$) 转换后得到 ΔCT 统计分析后, 癌组织 ΔCT 值为 4.43 ± 1.54 , 癌旁组织的 ΔCT 值为 5.59 ± 1.70 , 二者有统计学差异 ($t = -4.97$, $P = 0.00$)。在 47 例样本中, HK1 在癌组织和癌旁组织的表达见图 2, 其中 37 例 (78.7%) 肾癌标本中

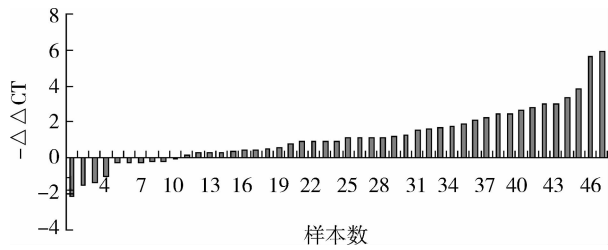


图 2 QPCR 检测 47 例肾癌 (C) 及癌旁组织 (N) 中 HK1 的表达 ($\Delta CT = CT_{HK1} - CT_{U6}$, $-\Delta\Delta CT = \Delta CT_C - \Delta CT_N$)

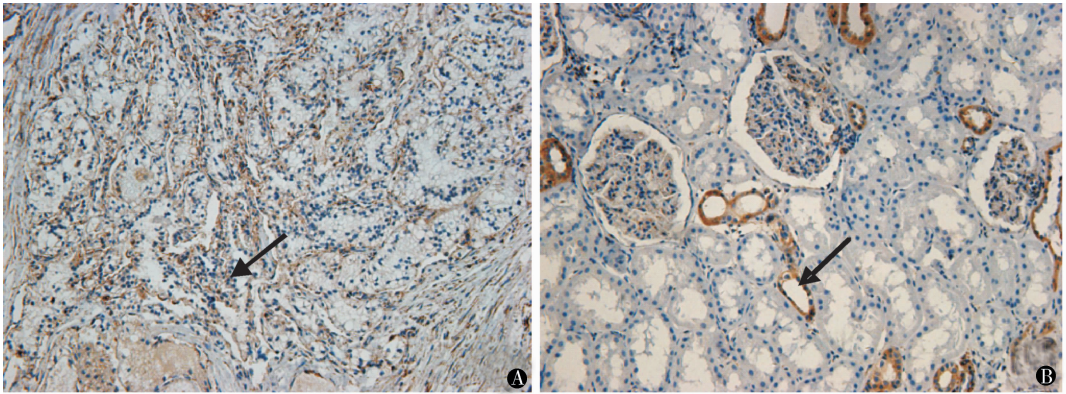


图 3 肾癌组织及癌旁组织中 HK1 的免疫组化 A. 肾癌组织中 HK1 的阳性表达 SP 染色 $\times 200$; B. 癌旁组织中 HK1 的阳性表达 SP 染色 $\times 200$ 。HK1 主要表达于肾小管上皮细胞的胞浆内,肾细胞癌中 HK1 染色强度明显高于癌旁正常组织。箭头所指棕黄色沉积物为 HK1 蛋白表达阳性,棕黄色沉积物广泛分布于组织中,癌旁组织中只有肾小管组织散在分布

3 讨论

肾癌是泌尿系统发病率第 2 位的恶性肿瘤^[2],在人体所有恶性肿瘤中约占 2%,且新发肾癌病例数呈逐年增加^[3]。尽管认为一些环境因素和遗传因子与肾癌有关,但肾癌发生、发展的分子机制仍不清楚^[4]。肾癌的发生、发展是个多基因、多步骤、多阶段的过程,原癌基因的激活与肾癌密切相关。因此,发现新的肾癌相关癌基因并探讨其功能、转录调控机制对于了解肾癌的发生、发展非常重要。

约 30% 的患者在初次就诊时即有远处转移,其治疗主要依靠肾癌根治性切除术或肾部分切除术^[4],在接受肾癌根治性切除术患者中仍约 40% 会出现局部复发或远处转移^[5]。肾癌对放疗、化疗均不敏感,而目前新出现的分子靶向治疗虽然在一些患者中有效,但仍缺乏长期效果的评估,且费用极高。因此,对患者进行预后评估并根据预后评估结果对肾癌患者进行个性化治疗非常重要,这样既能让预后良好的患者免受过度治疗,减少不必要的痛苦和相关的昂贵费用,又能让预后不良的患者接受充分的治疗而延缓其生命。常规组织病理的分期和

HK1 的表达高于其在癌旁组织中的表达,说明 HK1 的表达在肾癌中有显著高表达,该结果与测序结果一致。

2.3 免疫组化结果

正常肾组织肾小管和肾小球清晰可见, HK1 主要表达于肾小管上皮细胞的胞浆内,肾细胞癌组织的肾小管和肾小球均严重破坏,大量棕黄色沉积物广泛沉积于癌组织,提示肾细胞癌中 HK1 的表达量高于相应的正常组织(图 3)。

临床分级在判断预后方面有一定作用,但对病理形态相似、临床分级相同而恶性潜力不同的肾细胞癌,组织病理检查不能有效地判断其预后。为此,学者们在寻找能够预测预后的肿瘤标志物方面进行了大量的研究工作,虽然已有一批预后标志物^[6,7],但迄今未能常规用于临床。因此,寻找能够有效预测其生物学行为、判断患者预后的预后标志物对判断预后和指导治疗具有重要的意义。

研究肾癌癌基因的功能、转录调控机制明确肾癌发病机制、确定判断预后的标志物的共同前提是筛选到在肾癌中高表达且在全身正常组织中基本不表达的肾癌高表达基因。本研究应用 QPCR 和免疫组化等方法检测到肾癌组织中 HK1 表达量与癌旁组织相比明显升高,预示其可能作为癌基因在肾癌的发生发展过程中发挥着重要作用,也可能成为判断预后的标志物。

Sebastian 等^[8]认为 HK 的 4 种同工酶中, HK1 与肿瘤的相关性最大,多肿瘤细胞系中都有 HK1 的诱发和过表达。众多研究表明, HK1 与多种肿瘤的发生发展都存在着密切联系。在切除的肺、胃肠、乳腺癌的组织中其 HK 含量也有明显增高^[9,10]。在乳

腺癌组织中,当病灶发生转移时,HK 活性更高,它使得肿瘤组织在乏氧的情况下,仍能获取足够能源,并且糖酵解的中间产物可被瘤细胞利用合成蛋白质、核酸和脂类等,为瘤细胞本身的生长和增生提供了必需的物质基础^[11]。另外,Burt 等^[12]在鼠的结直肠癌模型研究结果显示,HK 的水平与肿瘤的生长速度呈正相关,即肿瘤恶性程度越高,组织中 HK 含量越高。Deron 等^[13]研究显示,在头颈部鳞状细胞癌中,HK1 表达上调,虽然和肿瘤细胞及凋亡细胞的绝对数量未表现出显著的相关性,但仍然是肿瘤发生的一个相关因素。

本课题组前期研究应用大规模平行测序技术,对 10 例肾癌及相应的癌旁组织进行全基因组测序,结果显示 HK1 基因表达量在肾癌组织中显著上调的,随后应用 QPCR 技术对测序的标本进行了验证,也得到相同的结果^[14]。本研究扩大了样本量,应用免疫组化的方法,检测 HK1 蛋白在组织中的定位和表达情况。结果显示,在肾癌组织中的表达量明显高于相应的正常组织,并且 HK1 蛋白主要表达于肾小管上皮细胞胞浆中,预示其可能作为癌基因提高肾小管上皮细胞的能量供应,引起肾小管上皮细胞无限制的增殖,破坏正常结构,从而在肾癌的发生发展过程中发挥着重要作用。

HK1 基因在肾癌中的表达量明显比癌旁组织中表达量高,HK1 蛋白在肾癌组织的表达也明显高于癌旁组织,它有可能作为癌基因促进肾癌的发生和发展。另外,HK1 有可能作为肾癌的分子标志物指导肾癌的诊断和治疗。然而,由于标本量的限制,本研究未能进一步分析 HK1 与肾癌的病理分期等是否存在相关性,以及它在肾癌的作用机制和它是否与肾癌的预后相关。尽管如此,本研究结果对下一步相关研究奠定了重要基础,目前,确定 HK1 基因的功能及预测预后等研究正在我们实验室里进行。虽然有关肿瘤中 HK 的特点和机制前人也已经做了大量的工作,但是其详细的分子生物学机制及潜在的临床应用价值仍需要进一步的探索。

参考文献

1 Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer Statistics. CA Cancer J

- Clin, 2010,60:277-300.
- 2 Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. Nat Rev Urol,2010,7(5):245-257.
- 3 马建辉,李 鸣,张思维,等.中国部分市县肾癌及泌尿系其他恶性肿瘤发病趋势比较研究.中华泌尿外科杂志,2009,30(8):511-514.
- 4 Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. Eur Urol,2010,58(3):398-406.
- 5 Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM: Renal-cell carcinoma. N Engl J Med 1996,335(12):865-875.
- 6 Sabatino M, Kim-Schulze S, Panelli MC, et al. Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. J Clin Oncol, 2009,27:2645-2652.
- 7 Banks RE, Craven RA, Harnden P, et al. Key clinical issues in renal cancer: a challenge for proteomics. World J Urol,2007,25:537-556.
- 8 Sebastian S, Kenkare UW. Expression of two type II-like tumor hexokinase RNA transcripts in cancer cell lines. Tumour Biol, 1998,19(4):253-260.
- 9 Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are eubiquitously over expressed in 24 cancer classes. Genomics,2004,84(6):1014-1020.
- 10 Neary CL, Pastorino JG. Nucleocyt oplasmic shuttling of hexokinase II in a cancer cell. Biochem Bio phys Res Commun,2010,394(4):1075-1081.
- 11 Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, et al. Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. Mol Cancer Res,2009,7(9):1438-1445.
- 12 Burt BM, Humm JL, Kooby DA, et al. Using positron emission tomography with [(18)F] FDG to predict tumor behavior in experimental colorectal cancer. Neoplasia,2001,3(3):189-195.
- 13 Deron P, Vangestel C, Goethals I. FDG uptake in primary squamous cell carcinoma of the head and neck. The relationship between over expression of glucose transporters and hexokinases, tumor proliferation and apoptosis. Nuklearmedizin,2011,50(1):15-21.
- 14 Zhou L,Chen J,Li Z,et al. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs; microRNAs located on Xq27.3 associated with clear cell renal cell carcinoma. PLoS One,2010,5(12):e15224.

(收稿日期:2011-10-18)

(修回日期:2012-01-04)

(责任编辑:李贺琼)