

# ZBP-89 与缺氧信号因子 HIF-1 $\alpha$ 在肝癌细胞中的相关性研究

李 闯,叶劲松,刘 昕,陈小红,刘利平,程书榜

(广东省深圳市龙华区人民医院胃肠外科,广东 深圳 518000)

**摘要:**目的 探讨 ZBP-89 在肝癌组织中的表达与缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  的相关性,为证实 ZBP-89 通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /Notch1 信号通路降低肝癌干细胞“干性”提供依据。方法 选择 2016 年 8 月~2018 年 8 月深圳市龙华区人民医院与深圳市人民医院肝胆外科 120 例原发性肝癌患者作为研究对象,收集病理标本,采用免疫组化染色方法来检测肝癌细胞及癌旁组织中 ZBP-89、HIF-1 $\alpha$  的相关表达,分析二者之间的相关性。结果 ZBP-89 在肝癌组织中呈现出低表达状态,而在癌旁组织中却呈现出高表达状态,分别为 34.17%、62.50%;ZBP-89 在癌旁组织中表达高于肝癌组织( $P<0.05$ )。而在肝癌组织细胞中发现 ZBP-89 的表达与缺氧信号因子 HIF-1 $\alpha$  的表达呈负相关( $P<0.05$ )。结论 ZBP-89 很可能为肝癌发生、发展过程中一个潜在的抑癌基因,通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /Notch1 通路进而抑制肝癌干细胞增殖、增强肝癌干细胞对化疗药物的敏感性,可能是其发挥抑癌效应的重要机制。

**关键词:**肝癌;ZBP-89;HIF-1 $\alpha$ ;缺氧调控因子

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.15.023

文章编号:1006-1959(2019)15-0074-03

## Correlation between ZBP-89 and Hypoxia Signaling Factor HIF-1 $\alpha$ in Hepatoma Cells

LI Chuang, YE Jin-song, LIU Xin, CHEN Xiao-hong, LIU Li-ping, CHENG Shu-bang

(Department of Gastrointestinal Surgery, People's Hospital of Longhua District, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

**Abstract:** Objective To investigate the correlation between the expression of ZBP-89 in hepatocarcinoma and the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ , and to provide evidence for ZBP-89 to reduce the "dryness" of liver cancer stem cells by inhibiting HIF-1 $\alpha$ /Notch1 signaling pathway. Methods From August 2016 to August 2018, 120 patients with primary liver cancer in the Department of Hepatobiliary Surgery of Shenzhen Longhua District People's Hospital and Shenzhen People's Hospital were selected as subjects. Pathological specimens were collected and immunohistochemical staining was used to detect liver cancer cells. The correlation expressions of ZBP-89 and HIF-1 $\alpha$  in adjacent tissues were analyzed, and the correlation between them was analyzed. Results ZBP-89 showed low expression status in liver cancer tissues, but high expression status (41/120, 75/120) in adjacent tissues 34.17%, 62.50%, respectively; ZBP-89 in adjacent tissues the expression was higher than that of liver cancer tissues ( $P<0.05$ ). The expression of ZBP-89 was negatively correlated with the expression of hypoxia signal factor HIF-1 $\alpha$  in hepatocarcinoma cells ( $P<0.05$ ). Conclusion ZBP-89 is likely to be a potential tumor suppressor gene in the development and progression of hepatocarcinoma. It can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma stem cells and enhance the sensitivity of liver cancer stem cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting HIF-1 $\alpha$ /Notch1 pathway. An important mechanism of effect.

**Key words:** Liver cancer; ZBP-89; HIF-1 $\alpha$ ; Hypoxia regulator

ZBP-89(zinc-finger binding protein-89)是 1996 年由 Merchant 等首先发现,是 Krüppel-type(Cys2-His2-type)锌指蛋白家族成员之一。因其 N 端含有四个锌指结构域和分子量大小为 89 kD,所以命名为 ZBP-89<sup>[1]</sup>。ZBP-89 是一个具有双向调节功能的转录因子,通过结合富含 GC 的 DNA 序列激活或抑制基因表达<sup>[2]</sup>。目前发现受其上调的靶基因有 p21、Bak、MMP3、pdc4、IAP、stromelysin、GHR 等,受其下调的靶基因有 gastrin、ENA-78、SOX18、Pax7 等<sup>[3]</sup>。ZBP-89 可以通过直接结合来稳定 p53 的表达,通过促进 p53 在核内的滞留而提高其转录活性,引起细胞周期阻滞和凋亡<sup>[4]</sup>。目前关于 ZBP-89 的表达调控的研究显示 HIF-1 $\alpha$  在细胞水平上可以上调 ZBP-89 的表达,并且 ZBP-89 启动子上有潜在的 HIF-1 $\alpha$  仅结合位点,但两者在肝癌组织中的相关性未见报道,本研究通过实验数据论证 ZBP-89 在肝癌及癌旁组织中的表达阳性率,分析转录蛋白 ZBP-89 与

基金项目:深圳市龙华区科技创新局基金项目(编号:2017020)

作者简介:李闯(1987.8-),男,湖北松滋人,硕士,主治医师,主要从事普外科临床工作

肝癌组织细胞的相关性及肝癌组织中 ZBP-89 对于肝癌细胞增殖凋亡的影响,通过实验镜下观察收集数据说明 ZBP-89 与缺氧信号调控因子 HIF-1 $\alpha$  蛋白的相关性,进一步论证 ZBP-89 通过抑制缺氧信号因子 HIF-1 $\alpha$  的转录来抑制肝癌细胞的增殖生长,现报道如下。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 本阶段实验研究总共收集深圳市龙华区人民医院普通外科和深圳市人民医院肝胆胰外科 2016 年 8 月~2018 年 8 月原发性肝癌手术后石蜡固定病理标本共 120 组,其中男性 91 例,女性 29 例,所有肝癌患者均未接受术前新辅助化疗及生物治疗。每组包括:①肿瘤组织:在肝癌手术标本中心留取肝癌组织;②癌旁组织:均取自距离肿瘤边缘 2 cm 以上正常肝组织。

**1.2 试剂与仪器** 选用兔抗人 ZBP-89 多克隆抗体和鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体均由 Santa Cruz 公司提供,免疫试剂盒 SP-9001 由北京中衫金桥技术公司生产提供;Nikon TE2000-U 显微镜。

**1.3 方法 免疫组化染色:** 先行将 2 种石蜡病理标本切片脱蜡,用磷酸盐缓冲液冲洗 15 min,反复冲洗 3 次。然后将切片放于 pH 9.0 的缓冲液中修复,在微波中修复 20 min(95℃),冷却 30 min 后,再次缓冲液冲洗 3 次,再加入山羊血清进行封闭,至于温箱(37℃)放置 1 h,然后滴加一抗(1:200 稀释兔抗 ZBP-89 多克隆抗体),放入冰箱静置 12 h,复温后用缓冲液冲洗 3 次,滴加生物素二抗(1:100 稀释鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体),置于 37℃温箱 15 min,再次用缓冲液冲洗 3 次;然后滴加 DA 染色液显色,用水中止反应,苏木素复染、脱水、封片,镜下观察结果。

**1.4 观察指标** 免疫组化染色后,镜下观察 120 组病理标本中肝癌组织及癌旁组织中转录蛋白 ZBP-89 的表达阳性结果、肝癌组织细胞中 ZBP-89 与 HIF-1 $\alpha$  的表达阳性结果。ZBP-89 和 HIF-1 $\alpha$  的表达阳性评分标记参考已发表的文献<sup>[6]</sup>。

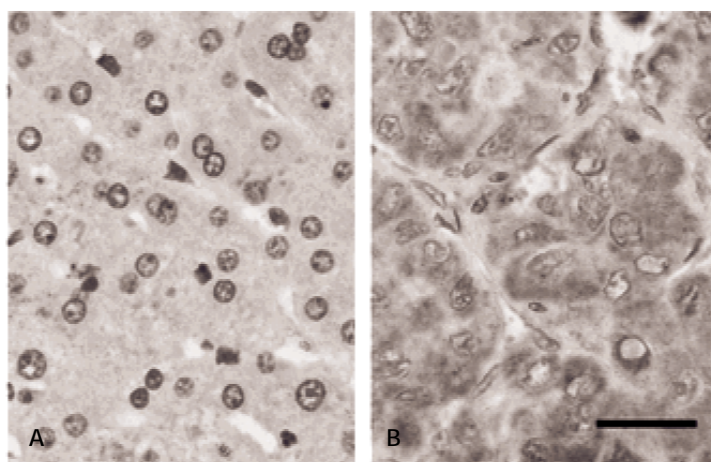
**1.5 统计学方法** 使用 SPSS 15.0 进行统计学分析,计数资料均以  $\chi^2$  检验表示,使用 Pearson 相关系数

判断相关性;实验数据非正态分布资料使用 Mann-Whitney 检验,判断相关性用 Spesarn 等级相关及 Spesan 秩相关检验,使用 Spearman 等级相关及秩相关检验判断相关性。检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

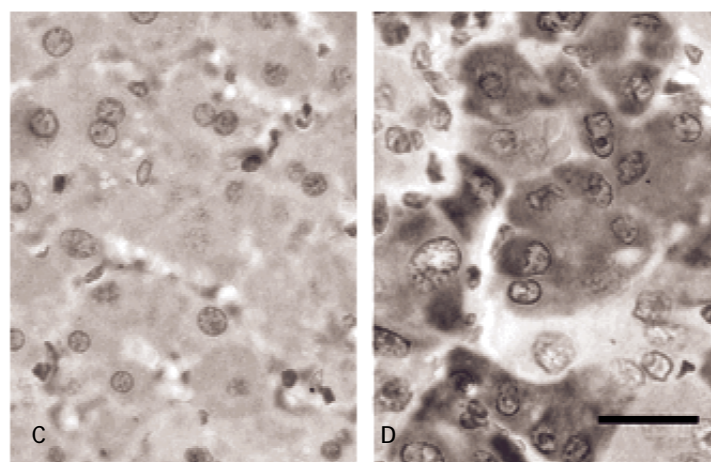
**2.1 ZBP-89 在肝癌组织及癌旁组织中的表达** ZBP-89 在肝癌组织中呈现出低表达状态,阳性表达主要位于肝癌细胞细胞核及胞浆;而在癌旁组织中却呈现出高表达状态,分别为 34.17%(41/120)、62.50%(75/120);ZBP-89 在癌旁组织中表达高于肝癌组织( $P<0.05$ )(图 1)。HIF-1 $\alpha$  在肝癌组织中呈现高表达状态( $P<0.05$ )(图 2)。

**2.2 ZBP-89 与缺氧信号调控因子 HIF-1 $\alpha$  的相关性分析** 在总肝癌病理标本中 ZBP-89 与缺氧信号调控因子 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达呈现负相关性 ( $\chi^2=9.606$ ,  $P=0.002$ ),见表 1。



注:A:肝癌组织,B:癌旁组织

图 1 ZBP-89 在组织中的表达(SABC $\times 200$ )



注:C:肝癌组织,D:癌旁组织

图 2 HIF-1 $\alpha$  在组织中的表达(SABC $\times 200$ )

表 1 ZBP-89 与缺氧信号调控因子 HIF-1 $\alpha$  的相关性分析

ZBP-89	HIF-1 $\alpha$		合计
	高表达	低表达	
低表达	56	24	80
高表达	9	31	40
合计	65	55	120

### 3 讨论

实体瘤微环境通常存在缺氧,缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1,HIF-1)居于核心调控位置<sup>[7]</sup>。HIF-1 由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基组成,其中  $\alpha$  亚基受细胞内氧气浓度精密调控,对 HIF-1 功能的发挥起关键作用;在常氧条件下  $\alpha$  亚基极易被脯氨酸羟化酶(PHD)羟基化,然后与 pVHL 蛋白靶向结合,最后经泛素化蛋白酶途径而被降解;在正常氧状态下,HIF-1 $\alpha$  的半衰期 $<5$  min。而缺氧条件时  $\alpha$  亚基的羟基化作用被完全抑制,致使  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基发生异二聚化并转运进入细胞核,然后通过招募转录共激活因子 p300/CBP,与靶基因的启动子上的缺氧反应元件(hypoxia response elements,HREs)相结合,调控多种缺氧反应基因<sup>[8]</sup>。前期研究发现,Notch1 基因启动子上含有多个 HRE,HIF-1 $\alpha$  过表达可增加肝癌细胞 Notch1、EpCAM、CD13 蛋白的表达,提示 Notch1 可能为 HIF-1 $\alpha$  下游靶基因。因此,在缺氧微环境中 HIF-1 $\alpha$ /Notch1 通路对肝癌干细胞“干性”的维持起重要作用。

研究发现<sup>[9]</sup>,ZBP-89 在肿瘤组织中普遍存在表达异常,但同肿瘤的关系尚不清楚,且主要集中在 ZBP-89 的转录调控功能上。基于本课题组前期研究结果,再结合 ZBP-89 可协同或促进 p53、p21、pdc4 蛋白引起肿瘤细胞产生凋亡的相关文献报道,推测 ZBP-89 很可能为肝癌发生、发展过程中一个潜在的抑癌基因。抑制 HIF-1 $\alpha$ /Notch1 信号通路进而抑制肝癌干细胞增殖、增强肝癌干细胞对化疗药物的敏感性,可能是其发挥抑癌效应的重要机制。对 HIF-1 $\alpha$  的启动子的分析发现,HIF-1 $\alpha$  的启动子上均存在多个 Sp1 的可能结合位点,文献亦报道 Sp1 可同 HIF-1 $\alpha$  的启动子结合影响其表达。因 ZBP-89 常可竞争结合基因启动子上 Sp1 的结合位点,所以我们推测 ZBP-89 同 HIF-1 $\alpha$  启动子上的 Sp1 结合位点结合进而抑制 HIF-1 $\alpha$  的转录可能是其抑制 HIF-1 $\alpha$  表达的主要机制之一。

本研究通过免疫组化方法对 ZBP-89 在肝癌组织细胞中及癌旁细胞重的蛋白质表达进行检测,发现 ZBP-89 在 62.50%的肝癌旁组织细胞中呈现高表达状态,在 34.16%的肝癌组织细胞中呈现高表达状态,由此可见 ZBP-89 在肝癌组织中的表达明显低于其在癌旁组织中的表达。查阅相关文献显示<sup>[10]</sup>:肝癌

组织中的 ZBP-89 的过度表达可能诱导肝癌细胞的凋亡,进而抑制肝癌细胞的生长。而相关研究发现,HIF-1 $\alpha$  在细胞水平上可以上调 ZBP-89 的表达。本研究在组织学上进一步验证了 HIF-1 $\alpha$  和 ZBP-89 的关系,二者在肝癌组织细胞中呈现负相关性。

由此可见,以 HIF-1 $\alpha$ /Notch1 通路为肿瘤治疗的靶点,可更有效地消除肝癌干细胞,提高肝癌的治疗效果。ZBP-89 表达上调后肝癌干细胞标记物 EpCAM、CD13 的表达减少,HIF-1 $\alpha$  和 Notch1 的表达也显著降低,因此,我们推测 ZBP-89 很可能为肝癌发生、发展过程中一个潜在的抑癌基因。通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /Notch1 通路进而抑制肝癌干细胞增殖、增强肝癌干细胞对化疗药物的敏感性,可能是其发挥抑癌效应的重要机制。该研究有利于进一步揭示 ZBP-89 的生物学功能,增强其对肝癌预后判断的准确性,有望为肝癌治疗提供新的思路。

### 参考文献:

- [1]Su Y,Cheng R,Zhang J,et al.Interferon- $\alpha$ 2b gene-modified human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit hepatocellular carcinoma by reducing the Notch1 levels [J].Life Sci,2015,15(143):18-26.
- [2]Xiao YF,Yong X,Tang B,et al.Notch and Wnt signaling pathway in cancer:Crucial role and potential therapeutic targets[J].Int J Oncol,2016,48(2):437-449.
- [3]Wang R,Sun Q,Wang P,et al.Notch and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway play important roles in activating liver cancer stem cells[J].Oncotarget,2015,7(5):5754-5768.
- [4]Mu X,Espanol-Suner R,Mederacke I,et al.Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment[J].J Clin Invest,2015,125(10):3891-3903.
- [5]Yang SL,Liu LP,Niu L,et al.Downregulation and pro-apoptotic effect of hypoxia-inducible factor 1 alpha in hepatocellular carcinoma[J].Oncotarget,2016,7(23):34571-34581.
- [6]Cai MY,Imo RZ,Li YH,et al.High-expression of ZBP-89 correlates with distal metastasis and poor prognosis of patients in clear cell renal cell carcinoma[J].Biochem Biophys Res commun,2012,426(4):636-642.
- [7]Thienpont B,Steinbacher J,Zhao H,et al.Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity[J].Nature,2016,17,537(7618):63-68.
- [8]Yu Y,Wang YY,Wang YQ,et al.Antiangiogenic therapy using endostatin increases the number of ALDH+ lung cancer stem cells by generating intratumor hypoxia [J].Sci Rep,2016(6):34239.
- [9]Chen YL,Chen PM,Lin PY,et al.ABCG2 Overexpression Confers Poor Outcomes in Hepatocellular Carcinoma of Elderly Patients[J].Anticancer Res,2016,36(6):2983-2988.
- [10]Semenza GL.Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine[J].Cell,2012,148(3):399-408.

收稿日期:2019-7-5;修回日期:2019-7-15

编辑/肖婷婷