

• 论 著 •

血清高迁移率族蛋白 B1 水平在肝癌患者中的诊断价值

王小燕¹, 邱胜丰^{2△}(1. 江苏省无锡市锡山人民医院鹤湖分院检验科 214116; 2. 南京医科大学
第一附属医院检验医学部, 南京 210036)

摘要:目的 观察肝癌患者血清和组织高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 水平的变化, 探讨 HMGB1 在肝癌发生、发展中的作用。方法 应用酶联免疫吸附试验和免疫印迹试验定量检测 40 例对照组、38 例良性肝病组患者及 40 例肝癌组患者的术前血清和组织 HMGB1 水平, 并分析其与临床病理分期、肿瘤大小、分化程度以及淋巴结转移之间的关系。结果 肝癌患者血清 HMGB1 水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 且血清 HMGB1 水平与 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移密切相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与肿瘤大小无关, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); HMGB1 在肝癌组织中的相对表达值明显高于癌旁组织和健康肝脏组织。结论 HMGB1 水平在肝癌患者血清中明显升高, 同时 HMGB1 在肝癌组织中高表达, 提示 HMGB1 检测对肝癌的早期诊断有重要价值。

关键词: 高迁移率族蛋白 B1; 肝癌; 酶联免疫吸附试验; 免疫印迹试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.20.015 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)20-3015-04

Diagnostic value of HMGB1 level in patients with hepatic carcinoma

WANG Xiaoyan¹, QIU Shengfeng^{2△}(1. Department of Clinical Laboratory, Ehu Brauh of Xishan People's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214116, China;
2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210036, China)

Abstract: Objective To investigate the change of serum and tissue high mobility group box 1 (HMGB1) levels in the patients with hepatic carcinoma and its role in the occurrence and progress of hepatic carcinoma. **Methods** The enzyme-linked immunosorbent assay and Western-blot were used to measure the levels of liver tissue and serum HMGB1 in 40 cases of hepatic carcinoma group, 38 cases of benign liver diseases group and 40 controls group. Then their relation with clinicopathologic stage, tumor size, differentiation degree and lymph node metastasis was analyzed. **Results** Serum HMGB1 level in hepatic carcinoma patients was significantly higher than that in healthy controls, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$), moreover the serum HMGB1 level was closely related with the TNM stage, tumor differentiation degree and lymph node metastasis, the difference was statistically significant ($P < 0.01$), however, had no relation with the tumor size, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The relative expression of HMGB1 in liver carcinoma tissue was significantly higher than that in the paracancerous tissue and healthy liver tissue. **Conclusion** The level of serum HMGB1 is increased in the patients with hepatic carcinoma, meanwhile HMGB1 is highly expressed in liver carcinoma tissue, prompting that the HMGB1 determination has an important value in early diagnosis of hepatic carcinoma.

Key words: high mobility group protein B1; hepatoma; enzyme-linked immunosorbent assay; Western-blot

高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 作为一种存在于细胞核中与 DNA 结合的非组蛋白, 参与核内多种功能, 包括 DNA 的修复、基因转录与重组等生物学过程。HMGB1 还能作为染色体结合因子, 使 DNA 发生局部变形, 进而易与不同蛋白之间进行相互作用, 同时其还能够作为一种细胞外因子, 参与机体细胞的分化与迁移, 炎症反应以及肿瘤转移等过程。近年研究表明, HMGB1 在宫颈癌、乳腺癌、直肠癌和肺癌等恶性肿瘤中的表达明显上调, 其与肿瘤的发生、发展、浸润以及转移等关系密切, 并可作为血清标志物对肿瘤的进展和预后评估提供参考价值, 但 HMGB1 与肝癌的相关研究报道少见^[1-2]。原发性肝癌即通常所说的肝癌, 是最常见、病死率极高的一种恶性肿瘤, 在我国的发病率在全球高居首位, 约占全世界一半以上。虽然肝癌的早期诊断技术和治疗手段目前有了明显的提高和改善, 手术切除的成功率也有了明显的提高, 肝移植技术不断进步,

新型基因靶向治疗药物应用于临床, 这些都使肝癌的治疗有了划时代的进步, 但肝癌患者的预后仍然较差, 病死率与发病率几乎相等^[3]。本研究旨在通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和蛋白质印迹法 (Western-blot) 对肝癌患者术前血清和组织中 HMGB1 表达水平的变化进行观察, 进一步探讨 HMGB1 在肝癌发生、发展中的作用, 为肝癌诊治和预后评估提供新的理论依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2017 年 3 月江苏省无锡市锡山人民医院鹤湖分院肝胆外科进行根治性切除术的 40 例肝癌患者的术前血清样本作为肝癌组, 其中男 19 例、女 21 例, 年龄 28~72 岁, 均为经组织病理学证实、术前未经放疗和化疗等其他治疗者; 肿瘤直径 < 2 cm 的 14 例, ≥ 2 cm 的 26 例; TNM 分期 I~II 期 18 例, III~IV 期 22 例; 高分化癌 11 例, 中

低分化癌 29 例;术后收集 40 例患者的新鲜肝癌组织和与其配对的距肝癌组织边缘 2 cm 的癌旁组织作为癌旁组。同时选取同期 38 例良性肝病患者的血清标本作为良性肝病组,其中男 17 例,女 21 例,年龄 30~63 岁;40 例健康志愿者血清标本作为对照组,其中男 27 例、女 13 例,年龄 27~56 岁,无饮酒和吸烟等不良嗜好,且各项体检结果均健康;另选取 11 例同期因肝外伤或者肝血管瘤等其他良性病变进行部分肝切除手术患者的健康肝脏组织作为健康肝脏组,其中男 6 例、女 5 例,年龄 27~56 岁,术后经病理证实患者无其他类型肝脏疾病。所有参与研究的患者和志愿者均详细了解本研究,且与本院签署了《知情同意书》。

1.2 方法

1.2.1 血清制备方法 采集对照组、良性肝病组及肝癌组患者行根治性切除术和肝部肿块切除术前空腹 12 h 以上的静脉血,取血 0.5 h 内在 3 000 r/min 条件下离心 10 min,取上层血清,进行 10 倍稀释后,置于-80 °C 条件下保存。

1.2.2 血清 HMGB1 水平测定方法 采用日本 SHINO-TEST 公司生产的人 HMGB1 ELISA 检测试剂盒,美国 Bio-Rad 公司生产的 Model-550 型酶标仪,其他试剂选择国产分析纯。严格按产品使用说明书用 ELISA 测定对照组、良性肝病组及肝癌组患者血清 HMGB1 水平。具体操作步骤如下:制备 200 ng/mL 水平的标准品,进行一系列水平稀释,得到水平分别为 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000 和 200.000 ng/mL 的标准品溶液。将待测样品和系列水平的标准品各 100 μL 加入到反应板的微孔中,震荡混匀,盖好后转入 37 °C 中;2 h 后将液体用移液枪取出弃去,加入生物素标记抗体工作液 100 μL,盖好后转入 37 °C 中;1 h 后将液体用移液枪取出弃去,反复洗板,5 次后加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记亲和素工作液,盖好后转入 37 °C 中;1 h 后将液体用移液枪取出弃去,再反复洗板 5 次,加入 100 μL TMB 溶液,盖好后转入 37 °C 中;0.5 h 后加入 50 μL 终止液使反应终止。用酶标仪测定个孔的吸光度,测定波长为 450 nm,用标准曲线计算各组患者血清 HMGB1 水平。

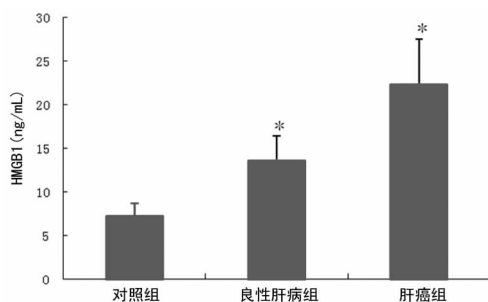
1.2.3 组织 HMGB1 的提取及水平检测 取新鲜组织 0.5 g 于组织匀浆器中,加入总蛋白提取液 1 mL,匀浆 15 min,使组织破碎,冰浴 15 min,再次匀浆 15 min,取出置于离心管中,超声离心,取上清液用 Western-blot 法进行测定。选择的标准品为牛血清蛋白,用二金鸡钠蛋白测定试剂盒进行蛋白水平的测定,严格按产品使用说明书测定组织 HMGB1 水平。具体步骤如下:向试管中加入待测样品和蛋白标准溶液,用去离子水将体积不足 10 μL 的样品补足;加入蛋白反应液(A+B) 200 μL,混匀;37 °C 条件下孵育 0.5 h;测定标准品和待测样品的吸收值,检测波长为 562 nm;计算待测样品中 HMGB1 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件对数据进行处理,计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用双侧 *t* 检验进行不同分化程度肝癌患者 HMGB1 水平等,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,选择 Pearson 对组间的相关性进行相关性分析。

2 结 果

2.1 对照组、良性肝病组、肝癌组研究对象血清 HMGB1 水平的改变 对照组、良性肝病组、肝癌组研究对象的术前血清

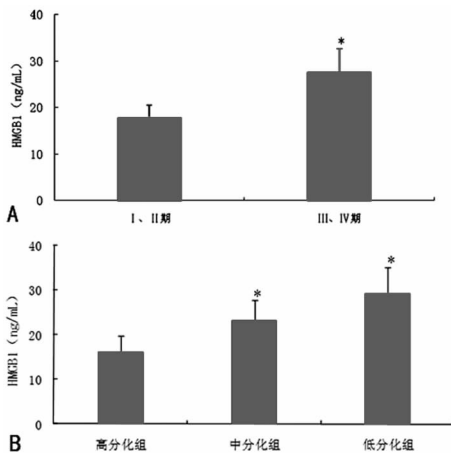
HMGB1 水平分别为(7.2 ± 1.7)、(13.6 ± 3.4)、(22.3 ± 5.2) ng/mL,组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,良性肝病组和肝癌组血清 HMGB1 水平升高,尤以肝癌组升高明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。



注:与对照组比较,* $P < 0.01$

图 1 肝癌患者血清 HMGB1 水平

2.2 肝癌组患者血清 HMGB1 水平与临床资料的关系比较 肝癌组 TNM 分期 III~IV 期患者血清 HMGB1 水平明显高于 I~II 期患者,差异有统计学意义($P < 0.01$);血清 HMGB1 水平在肿瘤分化程度组之间差异有统计学意义($P < 0.05$);中低分化组明显低于高分化组,差异有统计学意义($P < 0.01$);但肝癌血清 HMGB1 水平与肿瘤直径大小无关,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2、表 1。



注:A 为与 I、II 期组比较,* $P < 0.01$;B 为与高分化组比较,* $P < 0.01$

* $P < 0.01$

图 2 肝癌组患者血清 HMGB1 水平与临床资料的关系

表 1 肝癌患者临床资料与 HMGB1 水平的关系($\bar{x} \pm s$)

临床病理参数	n	HMGB1 (ng/mL)	P
肿瘤直径(cm)			
<2	14	21.8 ± 4.7	>0.05
≥2	26	23.2 ± 6.3	
TNM 分期			
I ~ II 期	18	18.5 ± 3.9	<0.01
III ~ IV 期	22	28.2 ± 4.1	
分化程度			
高分化	11	29.1 ± 5.6	<0.01
中低分化	29	20.4 ± 6.3	

续表 1 肝癌患者临床资料与 HMGB1 水平的关系($\bar{x} \pm s$)

临床病理参数	n	HMGB1 (ng/mL)	P
淋巴结转移			
有	23	29.7 ± 3.2	<0.01
无	17	21.1 ± 4.6	

2.3 肝癌组、健康肝脏组、癌旁患者组患者组织中 HMGB1 水平检测结果 提取肝癌组、健康肝脏组、癌旁患者组患者肝癌组织、癌旁组织以及健康肝脏组中的总蛋白,用 Western-blot 检测,结果表明 HMGB1 在肝癌组中的相对表达值(0.312 ± 0.087)明显高于癌旁组(0.142 ± 0.049)和健康肝脏组(0.092 ± 0.039),差异有统计学意义($P < 0.01$);但癌旁组与健康肝脏组中的相对表达值差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

HMGB1 是哺乳动物各种组织细胞中广泛存在的一种非组蛋白,在生物进化过程中由于氨基酸序列能够高度保守,人类与啮齿类动物的 HMGB1 序列仅在 C 末端的重复序列中具有 2 个有差异的氨基酸。HMGB1 是一种存在于细胞核内的参与多种生物学功能的传统 DNA 结合蛋白,在基因的复制与转录、DNA 的重组和修复、核小体结构的维持和稳定以及固醇激素的调控等多项生命活动中发挥着重要的作用^[4]。上皮细胞、免疫细胞以及内皮细胞等许多种类的细胞当受到缺血缺氧、脂多糖以及生物活性脂等胞外诱导因素的诱导时能够主动分泌 HMGB1,释放至胞外的 HMGB1 是一种重要的晚期炎症介质,参与介导细胞增殖分化等^[1]。近年诸多研究表明,在人直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌等恶性肿瘤中 HMGB1 表达和释放明显上调,其与肿瘤的发生、发展、浸润以及转移等关系密切^[5]。

目前,主要认为 HMGB1 在肿瘤的发生和发展中有双向作用。一方面,其能够加速肿瘤新生血管的生长,使肿瘤慢性局部炎症反应得以维持,提供肿瘤生长和转移的必要条件,避免肿瘤细胞发生凋亡;另一方面, HMGB1 具有促进肿瘤树突状细胞成熟和肿瘤抗原递呈的作用,激发机体的免疫反应,同时提高抗肿瘤药物的治疗效果。有文献报道,在许多肿瘤细胞中发现 HMGB1 高度表达,在上皮细胞源性肿瘤中更加明显^[5]。肝癌患者的血清 HMGB1 水平明显上升,且其与甲胎蛋白水平呈正相关。癌细胞坏死后能够释放出更多的 HMGB1,同时 HMGB1 可以引起慢性炎症反应,其能够使癌细胞更易存活、生长以及转移^[6]。同时 HMGB1 水平还会影响到肝癌患者的预后。肝癌动物模型表明,用丙酮酸乙酯抑制 HMGB1 的释放能够抑制肝脏内直肠癌细胞的种植以及生长,使癌细胞发生凋亡,同时能减少甚至避免单核细胞、自然杀伤细胞、T 淋巴细胞以及 B 淋巴细胞向肝脏浸润^[7-8]。

本研究通过检测血清 HMGB1 水平发现,与对照组相比,良性肝病组和肝癌组的血清 HMGB1 水平均升高明显,尤以肝癌组升高最明显。血清 HMGB1 水平升高可能主要是由癌变肝细胞主动分泌到胞外或血浆,也有少部分可能是坏死的肿瘤细胞被动释放。本次研究选择的肝癌组、与其配对的癌旁组以及健康肝脏组中肝组织均有 HMGB1 表达,但肝癌组中

HMGB1 水平要明显高于与其配对的癌旁组织和健康肝脏组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 HMGB1 除了能够调控健康肝脏组织的生成,同时还有可能影响到肝癌的发生以及发展。在本研究中,癌旁组的 HMGB1 水平虽高于健康肝脏组,但差异无统计学意义($P > 0.05$),这可能与患者的肝纤维化和肝硬化有关。文献^[9-11]报道通过动物试验发现肝纤维化组织中 HMGB1 的水平较健康肝脏组织明显升高, HMGB1 在肝硬化患者组血清中水平明显高于对照组,但本研究中的原因还需做进一步的试验研究。Lee 等^[12]研究表明,结肠癌组织中 HMGB1 高表达, HMGB1 表达与肿瘤分期具有正相关性,且与患者生存期关系密切;通过 siRNA 对 HMGB1 生成进行干扰后,患者结肠癌细胞侵袭力明显下调。Wang 等^[13]和 Bao 等^[14]报道, HMGB1 在胃癌组织中的表达较非癌组织明显升高, HMGB1 水平与患者经胃腺癌切除术后的无癌症生存期具有正相关性,且高表达的胃癌患者预后要好于低表达者。本研究未发现血清 HMGB1 水平与肿瘤大小有关,可能由于试验样本量相对较少,后续还需要增加样本量进行更深入的研究。本试验结果表明,肝癌患者血清 HMGB1 水平与临床资料具有密切的关系, TNM 分期 III ~ IV 期患者的血清 HMGB1 水平明显高于 I ~ II 期患者,中低分化组明显低于高分化组,与以上学者的研究结果一致。提示 HMGB1 在肝癌的发生、发展中起着至关重要的作用,其过表达可能与肝癌的侵袭以及转移相关,影响患者的预后,为 HMGB1 水平将来作为肝癌诊断以及判断其预后的指标提供了可能性依据,但其具体因果机制有待进一步研究。Cheng 等^[15]通过测定肝癌患者血清中 HMGB1 水平与临床病理因素的相关性认为患者 HMGB1 水平能够作为诊断肝癌的标志物,并可以用来预测患者的预后。但本研究因患者术后时间不长,无法探讨血清及组中 HMGB1 水平与患者预后的相关性,同时因为样本量的限制,需进一步增加样本数量来进行患者预后与 HMGB1 水平之间关系的研究。

综上所述,肝癌患者血清及肝脏组织中 HMGB1 水平明显升高,同时与患者临床病理分期、分化程度及是否发生淋巴结转移密切相关,可作为肝癌进展和预后判断的一种有效指标,有望成为肝癌诊断和治疗的一个潜在新靶点,值得关注和进一步深入研究。

参考文献

- [1] Wang X, Xiang L, Li H, et al. The role of HMGB1 signaling pathway in the development and progression of hepatocellular carcinoma; a review[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9):22527-22540.
- [2] 王婷婷, 韩菲菲. 高迁移率族蛋白 B1 与消化系统恶性肿瘤[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(10):1083-1087.
- [3] Tinkle CL, Haas-Kogan D. Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools[J]. Biologics, 2012, 6(1):207-219.
- [4] Finger EC, Giaccia AJ. Hypoxia, inflammation and the tumor microenvironment in metastatic disease[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(2):285-293.
- [5] Zhang QY, Wu LQ, Zhang T, et al. Auto-(下转第 3020 页)

mmol/L, 较试剂盒说明书的 0.11~2.59 mmol/L 的高、低界值均要高, 线性范围的高界值更高具一定的临床价值, 因此可准确检测到更高的临床结果, 对临床的疾病判断更为有利; 低界值未达到说明书要求, 原因不明, 但由于检测结果在参考区间的低参考值以下无临床诊疗意义, 故在临床应用上的价值没有高值线性提高的大。本试验所得的女性老年组参考区间较试剂说明书所给的参考区间高, 可能与统计的年龄分布以及女性的激素分泌水平有关, 且 sdLDL-C 水平受年龄的影响。

总之, 本次检测的 sdLDL-C 各项评估指标与厂家提供的说明书参数相符, 能满足临床的常规检测要求, 适用于临床实验室全自动生化仪上检测, 可在临床上广泛推广运用。

参考文献

[1] King RL, Florkowski CM, Yeo J, et al. What is the best predictor of the atherogenic LDL subclass phenotype 'pattern B' in patients with type 2 diabetes mellitus? [J]. *Ann Clin Biochem*, 2011, 48(Pt 2):166-169.

[2] Maeda S, Nakanishi S, Yoneda M, et al. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and the risk of atherosclerosis in Japanese-Americans [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19(5):444-452.

[3] Diffenderfer MR, Schaefer EJ. The composition and metabolism of large and small LDL [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(3):221-226.

[4] Zhang Y, Xu RX, Li S, et al. Association of plasma small dense LDL cholesterol with PCSK9 levels in patients with angiographically proven coronary artery disease [J]. *Nutr*

Metab Cardiovasc Dis, 2015, 25(4):426-433.

[5] Toth PP. Insulin resistance, small LDL particles, and risk for atherosclerotic disease [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2014, 12(4):653-657.

[6] 陈力平, 林杰, 孔维菊, 等. 不同血脂人群小而密 LDL 胆固醇分布及其与血脂组分的相关性 [J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(4):354-358.

[7] 于群, 王惠民, 季秋燕, 等. 化学沉淀法检测小而密低密度脂蛋白方法的建立 [J]. *检验医学*, 2014, 29(2):148-152.

[8] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 中国心血管病报告 2013 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2014, 29(7):487-491.

[9] 郭东梅. 冠心病新的危险因素研究进展 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(24):2462-2465.

[10] Kang MY, Hong YC. Inter-correlation between working hours, sleep duration, obesity, and 10-year risk for CHD [J]. *Am J Ind Med*, 2016, 59(4):338-339.

[11] Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, et al. Small dense LDL cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(5):1069-1077.

[12] Hirano T, Ito Y, Yoshino G. Measurement of small dense low-density lipoprotein particles [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2005, 12(2):67-72.

(收稿日期:2017-04-09 修回日期:2017-06-27)

(上接第 3017 页)

phagy mediated HMGB1 release promotes gastric cancer cell survival via RAGE activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4):1630-1638.

[6] 王瀚锋, 徐晓东. 高迁移率族蛋白 B1 肿瘤免疫调节作用及其机制 [J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(12):1359-1362.

[7] He W, Tang B, Yang D, et al. Double-positive expression of high-mobility group box 1 and vascular endothelial growth factor C indicates a poorer prognosis in gastric cancer patients [J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 18(11):161-163.

[8] Ohmori H, Luo Y, Kuniyasu H. Non-histone nuclear factor HMGB1 as a therapeutic target in colorectal cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(2):183-193.

[9] Gong W, Wang ZY, Chen GX, et al. Invasion potential of H22 hepatocarcinoma cells is increased by HMGB1-induced tumor NF- κ B signaling via initiation of HSP70 [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(3):1249-1256.

[10] 王占银. 血清 Corin 水平对非 ST 段抬高急性冠脉综合征预后的意义 [J]. *转化医学电子杂志*, 2015, 2(7):93-96.

[11] Nikolaou K, Sarris M, Talianidis I. Molecular pathways: the complex roles of inflammation pathways in the development and treatment of liver cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(11):2810-2816.

[12] Lee H, Park M, Shin N, et al. High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(2):321-326.

[13] Wang JL, Wu DW, Cheng ZZ, et al. Expression of high mobility group box-B1 (HMGB-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(12):4865-4869.

[14] Bao G, Qiao Q, Zhao H, et al. Prognostic value of HMGB1 overexpression in resectable gastric adenocarcinomas [J]. *World J Surg Oncol*, 2010, 8(1):1-7.

[15] Cheng P, Dai W, Wang F, et al. Ethyl pyruvate inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via regulation of the HMGB1-RAGE and AKT pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(4):1162-1168.

(收稿日期:2017-02-10 修回日期:2017-04-18)