

· 论著 ·

乙肝病毒X蛋白对肝细胞癌甲硫氨酸腺苷转移酶1A表达的影响

刘春莉* 周兴悦 张厚亮

天津市静海区医院免疫科 (天津 301600)

【摘要】目的 探讨乙肝病毒X蛋白(HBx)对肝细胞癌甲硫氨酸腺苷转移酶1A(MAT1A)表达的影响。**方法** 选取2019年1月至2022年4月期间医院收治的80例乙肝相关性肝细胞癌患者,术中采集患者癌及癌旁组织,采用免疫组化法检测HBx蛋白、HAT1A表达,统计其阳性率,分析HBx蛋白与HTA1A之间相关性。**结果** 肝细胞癌组织患者HBx蛋白与癌旁组织表达比较($P>0.05$),但MAT1A阳性表达低于癌旁组织,肝细胞癌组织共同阳性表达高于癌旁组织($P<0.05$)。不同年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤分化、TNM分期、门静脉癌栓、肝硬化等患者HBx蛋白、MAT1A阳性表达比较($P>0.05$);但不同血清甲胎蛋白(AFP)水平患者HBx蛋白、MAT1A阳性表达比较($P<0.05$)。采用Spearman等级相关分析,HBx蛋白、MAT1A阳性表达呈负相关性($r=-0.816$, $P<0.05$)。**结论** 乙肝相关性肝细胞癌患者癌组织HBx蛋白、MAT1A阳性表达高,癌组织HBx蛋白与MAT1A表达呈负相关性。

【关键词】HBx蛋白; MAT1A; 肝细胞癌

【中图分类号】R735.7

【文献标识码】A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.03.018

Effect of Hepatitis B Virus X Protein on the Expression of Methionine Adenosine Transferase 1A in Hepatocellular Carcinoma

LIU Chun-li*, ZHOU Xing-yue, ZHANG Hou-liang.

Jinghai District Hospital of Tianjin, Tianjin 301600, China

Abstract: Objective To investigate the effect of hepatitis B virus X protein (HBx) on the expression of methionine adenosine transferase 1A (MAT1A) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** a total of 80 patients with hbV-associated hepatocellular carcinoma admitted to our hospital from January 2019 to April 2022 were selected. During the operation, the cancer and adjacent tissues of the patients were collected, and the expression of HBx protein and HAT1A was detected by immunohistochemical method. The positive rate of HBx protein and HTA1A were analyzed. **Results** The expression of HBx protein in hepatocellular carcinoma tissues was compared with that in para-cancer tissues ($P>0.05$), but the positive expression of MAT1A was lower than that in para-cancer tissues, and the co-positive expression of MAT1A was higher in hepatocellular carcinoma tissues than that in para-cancer tissues ($P<0.05$). The positive expressions of HBx protein and MAT1A in patients with different age, gender, tumor diameter, tumor differentiation, TNM stage, portal vein tumor thrombus and cirrhosis were compared ($P>0.05$). However, the positive expression of HBx protein and MAT1A in patients with different serum AFP levels was compared ($P<0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that positive expression of HBx protein and MAT1A was negatively correlated ($R=-0.816$, $P<0.05$). **Conclusion** The positive expression of HBx protein and MAT1A is high in patients with hepatitis B associated hepatocellular carcinoma, and the expression of HBx protein and MAT1A is negatively correlated.

Keywords: HBx Protein; MAT1A; Hepatocellular Carcinoma (HCC)

肝细胞癌是临床常见的肝癌类型,具有恶性程度高、发展快、易复发、易转移等特点^[1]。尽管以手术为主的综合疗法能相应提高患者存活率,但因肿瘤细胞转移快、发病机制复杂,使患者就诊时多为中晚期,死亡率仍旧较高^[2]。有研究^[3]指出,我国肝细胞癌中合并乙肝病毒(HBV)感染患者高达80%,HBV感染与肝细胞癌发生、发展关系密切,在HBV基因组中,X基因与肝细胞癌的发生、进展的相关性最受临床关注。乙肝病毒X蛋白(HBx)是HBV感染患者呈高表达,是一个多功能蛋白,作用广泛,与肝细胞癌关系最为紧密^[4]。S-腺苷甲硫氨酸在肝脏中分布丰富,主要是由甲硫氨酸腺苷转移酶(MATs)催化合成,是细胞存活的关键因子。其中MAT1A是其主要基因,主要分布在肝组织,是肝细胞高分化的重要标志,在胆管细胞型肝癌几乎不表达^[5]。因此为了为肝细胞癌的诊治提供思路,我们拟通过实验分析HBx蛋白与MAT1A表达的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2020年1月至2022年4月期间医院收治的80例乙肝相关性肝细胞癌患者,男性48例,女性32例;年龄28~73(54.25 ± 6.39)岁;肿瘤分化:高分化21例,中分化35例,低分化24例;肿瘤直径: $<5\text{cm}$ 36例, $\geq 5\text{cm}$ 44例。

纳入标准:入组患者经血清乙肝表面抗原检测为阳性,丙肝

核心抗体检测为阴性,符合肝细胞癌诊断标准^[6];术前未接受化疗、生物靶向等抗肿瘤治疗;均在医院接受肝脏切除术;患者对研究知情,并签署同意书。排除标准:入组患者伴丙肝、甲肝等肝脏传染性疾病;伴血液疾病、免疫缺陷性疾病;术前经抗癌治疗;伴其他恶性肿瘤者。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 兔抗人MAT1A多克隆抗体(Santa-Cruz生物技术公司),HBx鼠抗单克隆抗体(Chemicon公司),磷酸盐缓冲液(PBS)、柠檬酸抗原修复缓冲液、SP试剂盒、DAB酶底物显色剂购自福建迈新生物技术开发有限公司,荧光倒置显微镜(OLYMPUS)。

1.2.2 检测方法 采集患者肝细胞癌组织、距离病灶边缘2cm处采集癌旁组织,用10%福尔马林固定,石蜡包埋。将肿瘤蜡块连续切片,厚度0.4 μm ,贴在防脱玻片,置入烘箱,70 $^{\circ}\text{C}$,烘烤3h。随后将切片进行二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,随后将玻片置入柠檬水抗原修复缓冲液内浸泡,再用PBS缓冲液反复冲洗3次,每次3min;然后滴入5% H_2O_2 ,反应10min,37 $^{\circ}\text{C}$,再用PBS缓冲液反复冲洗3次,每次3min;滴加抗原封闭血清,反应10min,37 $^{\circ}\text{C}$,丢弃封闭血清,滴加一抗(1:50 HBx, 1:200 MAT1A),置入温箱,孵育2h,37 $^{\circ}\text{C}$,用PBS缓冲液反复冲洗3次,每次3min;再滴加二抗,孵育20min,37 $^{\circ}\text{C}$ 。然后用免疫组化法检测HBx蛋白、MAT1A表达,在DAB镜下显色3min,苏木素复染2min,镜下观察,再梯度

【第一作者】刘春莉,女,主管检验师,主要研究方向:免疫与分子免疫。E-mail: 3586365932@qq.com

【通讯作者】刘春莉

乙醇脱水，烘干，中性树胶封片。选择集聚视野10个，镜下观察整张切片，阳性反应：切片细胞呈棕褐色为3分；呈橙黄色为2分，呈浅黄色为1分，细胞未出现染色为0分。显色阳性细胞数：3分：显色阳性细胞数占所有癌细胞的50%以上；2分：显色阳性细胞数是所有癌细胞的25%~50%；1分：显色阳性细胞数占所有癌细胞的25%以下。阳性：阳性细胞染色强度+染色数量超过3分；反之则为阴性。

1.3 观察指标 (1)统计肝细胞癌与癌旁组织中的HBx蛋白、MAT1A阳性表达；(2)分析HBx蛋白表达与MAT1A表达的关系；(3)分析不同临床资料患者癌组织HBx蛋白、MAT1A阳性表达。
1.4 统计学方法 SPSS 20.0统计学软件。计数资料以率(%)表示，采取 χ^2 检验；采用Spearman等级相关分析HBx蛋白、MAT1A阳性表达的关系， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 比较肝细胞癌与癌旁组织中的HBx蛋白、MAT1A阳性表达 肝细胞癌组织患者HBx蛋白与癌旁组织表达比较($P>0.05$)，但MAT1A阳性表达低于癌旁组织，肝细胞癌组织共同阳性表达高于癌旁组织($P<0.05$)，见表1。

组别	例数	HBx蛋白	MAT1A阳性	共同阳性表达
癌组织	80	64(80.00)	11(13.75)	8(10.00)
癌旁组织	80	60(75.00)	22(27.50)	0
χ^2		0.573	4.619	6.447
P		0.449	0.032	0.011

2.2 不同临床资料患者癌组织HBx蛋白、MAT1A阳性表达比较 不同年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤分化、TNM分期、门静脉癌栓、肝硬化等患者HBx蛋白、MAT1A阳性表达比较($P>0.05$)；但不同血清甲胎蛋白(AFP)水平患者HBx蛋白、MAT1A阳性表达比较($P<0.05$)，见表2。

2.3 相关性分析 采用Spearman等级相关分析，HBx蛋白、MAT1A阳性表达呈负相关性($r=-0.816$ ， $P<0.05$)。

3 讨论

乙肝相关性肝细胞癌是肝细胞癌的主要类型，通常肝细胞癌

患者普遍存在HBV感染，HBV感染者患上肝细胞癌风险是非HBV感染者的100~400倍^[7]。HBV基因组分为核心蛋白抗原、表面抗原、DNA多聚酶、X抗原^[8]。其中X基因与肝细胞癌的发生最为密切，HBx是一种多功能蛋白，具有激活宿主细胞、促进病毒基因转录、调控细胞凋亡、抑制细胞受损DNA修复等作用^[9]。HBx蛋白具有反式激活功能，无法与DNA直接性结合，通过与转录调控蛋白相互作用，以此对靶基因转录途径起到激活或抑制作用，或与胞浆蛋白质的作用，影响相关蛋白质功能^[10-11]。MAT1A编码是由正常肝脏表达的 $\alpha 1$ 作为二聚体及四聚体，当肝脏发生病变并逐渐进展至肝细胞癌时，其发生、进展过程与MAT1A沉默密切相关^[12-13]。同时MAT1A转化为MAT2A是肝细胞癌发生、进展的必备环节，通常是因肝脏去分化所致，并提高肝脏的增殖信号，导致肝细胞癌的发生^[14]。

本组研究，肝细胞癌组织患者HBx蛋白、MAT1A阳性表达与癌旁组织表达比较($P>0.05$)，但MAT1A阳性表达低于癌旁组织，肝细胞癌组织共同阳性表达高于癌旁组织($P<0.05$)。由于HBx蛋白是HBV基因组中的常见基因因子，并在乙肝患者组织中呈高表达，故使癌组织与癌旁组织中关于HBx蛋白阳性表达无明显差异。MAT1A是MAT家族中重要表达基因，但在癌组织中呈低表达，一般是因基因启动子高甲基化状态导致，通常启动子甲基化，组蛋白H乙酰化等作用，均会导致肝细胞癌组织中MAT1表达下调^[15]。本组研究，不同年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤分化、TNM分期、门静脉癌栓、肝硬化等患者HBx蛋白、MAT1A阳性表达比较($P>0.05$)；结果表明，HBx蛋白、MAT1A阳性表达并不受患者年龄、性别、肿瘤分期等因素影响，测定稳定性高。但在不同血清AFP水平中的表达差异明显，可能是HBx可抑制P53，而使HBx蛋白、MAT1A表达异常。研究显示Spearman等级相关分析，HBx蛋白、MAT1A阳性表达呈负相关性($r=-0.816$ ， $P<0.05$)。结果显示，HBx蛋白与MAT1A表达关系密切。因MAT1A是肝细胞分化的重要标记，当DNA甲基化水平降低，细胞生长速度加快，并逐渐发展为肿瘤特性时，MAT1A转化为MAT2A；而MAT2A转为MAT1A时，说明DNA甲基化含量升高，而肿瘤细胞的生长、进展将会被抑制。而关于HBx蛋白对MAT1A的作用途径，仍未明确，仍需临床研究探讨HBx蛋白是通过何种途径来影响MAT1A启动子的甲基化状态。

综上所述，乙肝相关性肝细胞癌患者癌组织HBx蛋白、MAT1A阳性率呈高表达，癌组织HBx蛋白与MAT1A表达呈负相关性。但关于HBx蛋白是通过何种途径对MAT1A启动子的甲基化状态进行影响，仍需临床研究继续探讨，因此为肝细胞癌的防治提供基础。

表2 不同临床资料患者癌组织HBx蛋白、MAT1A阳性表达比较[n(%)]

临床资料		HBx蛋白阳性(n=64)	HBx蛋白阴性(n=16)	χ^2	P	MAT1A阳性(n=14)	MAT1A阴性(n=66)	χ^2	P
性别	男(n=48)	38(79.17)	10(20.83)	0.051	0.819	8(16.67)	40(83.33)	0.058	0.810
	女(n=32)	26(81.25)	6(18.75)			6(18.75)	26(81.25)		
年龄(岁)	≤60(n=45)	36(80.00)	9(20.00)	0.079	0.778	8(16.67)	40(83.33)	0.058	0.810
	>60(n=35)	28(80.00)	7(20.00)			6(18.75)	26(81.25)		
肿瘤直径	<5cm (n=36)	25(69.44)	11(30.56)	3.438	0.064	5(13.88)	31(86.11)	0.591	0.442
	≥5cm(n=44)	39(81.82)	5(11.36)			9(20.45)	35(79.55)		
肿瘤分化	高分化(n=21)	18(85.71)	3(14.29)	0.070	0.792	3(14.29)	18(85.71)	0.070	0.792
	中分化(n=35)	25(71.43)	10(28.57)			8(22.86)	27(77.14)		
	低分化(n=24)	21(87.50)	3(12.50)			3(12.50)	21(87.50)		
AFP(ng/mL)	≤400(n=48)	34(70.83)	14(29.17)	6.302	0.012	2(4.17)	46(95.83)	14.776	0.001
	>400(n=32)	30(93.75)	2(6.25)			12(37.50)	20(62.50)		
TNM分期	I期(n=18)	11(61.11)	7(38.89)	2.629	0.105	3(16.67)	15(83.33)	0.087	0.769
	II期(n=34)	29(85.29)	5(14.71)			5(14.71)	29(85.29)		
	III期(n=18)	15(83.33)	3(16.67)			4(22.22)	14(77.78)		
	IV期(n=10)	9(90.00)	1(10.00)			2(20.00)	8(80.00)		
门静脉癌栓	有(n=15)	14(93.33)	1(6.67)	1.534	0.283	3(20.00)	12(80.00)	0.009	0.925
	无(n=65)	50(76.92)	15(23.08)			11(16.92)	54(83.08)		
肝硬化	有(n=20)	15(75.00)	5(25.00)	0.104	0.747	2(10.00)	18(90.00)	0.131	0.718
	无(n=60)	49(81.67)	11(18.33)			10(16.67)	50(83.33)		

(下转第 60 页)

