

# 自分泌运动因子及受体 mRNA 表达与肝癌临床分期的关系

蒲葵宏<sup>1</sup>, 郭丽华<sup>1</sup>, 张国元<sup>2</sup>, 樊瞿明<sup>2</sup> (1. 四川省广元市中心医院检验科 628000; 2. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000)

**【摘要】目的** 探讨自分泌运动因子(AMF)、自分泌运动因子受体(AMFR) mRNA 表达与肝癌临床分期的关系。**方法** 对 96 例肝癌患者进行分期, 采用逆转录实时荧光定量 PCR 测定患者肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达。**结果** II、III 期肝癌患者 AMF、AMFR mRNA 水平显著高于 I 期, III 期肝癌患者 AMF/AMFR mRNA 水平显著高于 II 期。肝癌转移组中 AMF、AMFR mRNA 表达明显高于未转移组。**结论** AMF、AMFR mRNA 水平与肝癌严重程度密切相关, 可能对临床判断肝癌的严重程度具有一定的预测价值。

**【关键词】** 受体, 细胞表面; 肝肿瘤; 肿瘤分期; 逆转录聚合酶链反应; 自分泌运动因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.18.020 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)18-2219-02

**Relationship between AMF and AMFR mRNA level with clinical stages of liver cancer** PU Kui-hong<sup>1</sup>, GUO Li-hua<sup>1</sup>, ZHANG Guo-yuan<sup>2</sup>, FAN Qu-ming<sup>2</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, Guangyuan Municipal Central Hospital, Guangyuan, Sichuan 628000, China, 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**【Abstract】Objective** To explore the relationship between AMF and AMFR mRNA level with the clinical stages of liver cancer. **Methods** 96 liver cancer sufferers were divided into three groups: the first stage, the second stage and the third stage groups. The expression of AMF and AMFR mRNA in cancer tissue was determined by realtime RT-PCR method. **Results** The levels of AMF and AMFR mRNA in the second stage and the third stage patients were significantly higher than those in the first stage group, and their expression in the third stage patients were significantly higher than that in the first stage group. The levels of AMF and AMFR mRNA in the of metastasis group were significantly higher than those in the non-metastasis group. **Conclusion** The levels of AMF and AMFR mRNA in cancer tissue are closely related with the severity of liver cancer, which maybe have some predictive value to judge the severity liver cancer in clinic.

**【Key words】** receptors, cell surface; liver neoplasms; neoplasm staging; reverse transcriptase polymerase chain reaction; autocrine motility factor

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率均居各种恶性肿瘤的前列, 复发和转移是导致其病死率居高不下的主要原因。活跃的细胞移动能力是肿瘤侵袭周围组织、发生远处转移的重要因素, 认识肝癌侵袭转移的分子机制, 对于揭示肝癌侵袭转移的本质有着重要意义。既往研究发现, 自分泌运动因子/自分泌运动因子受体(AMF/AMFR)的表达与原发胃癌的转移有关<sup>[1-2]</sup>, 但 AMF/AMFR 与肝癌的严重程度和转移的关系尚少见报道。本研究拟观察 AMF/AMFR 与肝癌临床分期的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择本院 2009 年 1~12 月收治的肝癌患者 96 例(病理检查证实), 年龄 41~75 岁, 平均 62 岁, 女 35 例, 男 61 例。淋巴结未转移 47 例, 淋巴结转移 49 例。按照美国癌症研究联合会(AJCC)癌症分期手册第 6 版 TNM 分期标准进

行分期, I 期 24 例, II 期 35 例, III 期 37 例。

**1.2 方法** RNA 的提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应(PCR), 取 50~100 mg 肝癌组织, 加入 1 mL Trizol, 用加样枪吹打混匀, 室温静置 5~10 min, 加入 0.2 mL 氯仿, 摇匀, 室温下静置 15 min, 4 °C 12 000×g 离心 15 min, 将上层水相转移至新的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 摇匀, -20 °C 静置 2 h 后, 4 °C 10 000×g 离心 10 min, 弃上清液, 75% 乙醇清洗 1 次, 将 RNA 沉淀晾干, 用 20 μL 无 RNA 酶去离子水溶解, -70 °C 保存待用。逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量 PCR 参见试剂盒说明书: 取 1 μL cDNA 样本作为 PCR 扩增模板, 阴性对照扩增模板为去离子水; 扩增条件为 95 °C 预变性 3 min, 随后 95 °C 30 s, 退火温度下 30 s, 72 °C 15 s, 共 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。采用“primer premier 5.0”软件设计引物(表 1), 引物由上海生工合成。

表 1 引物序列

基因	长度(bp)	Forward(正义)	Reverse(反义)	温度(°C)
AMF	149	5' AGTCTTTCTGCCAGCGTGTC 3'	5' GGGACCTCCTGAAGAGTATGG 3'	61.0
AMFR	110	5' ATTTTCGATGGGTCTCGGATTG 3'	5' TGCATTGAGCTGGGAGTTGC 3'	61.5
GAPDH	107	5' ACCCACTCCTCCACCTTTGA 3'	5' ACCACCCTGTTGCTGTAGCC 3'	61.5

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS10.0 软件进行统计分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 各临床分期肝癌患者肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 的表达** 本实验采用荧光实时定量 PCR 法观察了癌组织中

AMF、AMFR mRNA 的表达情况,肝癌Ⅱ、Ⅲ期患者癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达相对于Ⅰ期患者显著升高,Ⅲ期患者肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达相对于Ⅱ期患者显著升高,结果见表 2。

表 2 各临床分期肝癌患者癌组织中 AMF/AMFR mRNA 表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

肝癌分期	AMF/ $\beta$ -actin	AMFR/ $\beta$ -actin
Ⅰ期	0.087 $\pm$ 0.014	0.140 $\pm$ 0.021
Ⅱ期	0.190 $\pm$ 0.032*	0.270 $\pm$ 0.038*
Ⅲ期	0.310 $\pm$ 0.053* $\Delta$	0.520 $\pm$ 0.072* $\Delta$

注:与Ⅰ期比较,\* $P < 0.01$ ;与Ⅱ期比较; $\Delta P < 0.01$ 。 $\beta$ -actin 为  $\beta$  肌动蛋白。

2.2 淋巴结转移组与未转移组肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达水平比较 本实验采用荧光实时定量 PCR 法观察了淋巴结转移组与未转移组肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 的表达情况,淋巴结转移组患者肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达相对于未转移组显著升高,结果见表 3。

表 3 淋巴结转移组与未转移组肝癌组织中 AMF/AMFR mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	AMF/ $\beta$ -actin	AMFR/ $\beta$ -actin
淋巴结未转移	0.120 $\pm$ 0.018	0.200 $\pm$ 0.034
淋巴结转移	0.270 $\pm$ 0.038*	0.470 $\pm$ 0.062*

注:与淋巴结未转移组比较,\* $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

AMF 是 1986 年 Liotta 等从人黑色素瘤细胞株 A2058 中分离出的一种由肿瘤细胞产生并分泌的、能刺激细胞迁移和运动的细胞因子。AMF 在正常细胞和肿瘤细胞均有表达,但在肿瘤细胞中呈过度表达。AMFR 是相对分子质量为  $78 \times 10^3$  的细胞表面糖蛋白(gp78),属于泛素蛋白酶体系统蛋白,AMF/AMFR 在很多肿瘤组织中表达上调,尤其在膀胱癌、胃癌等侵袭性或转移性肿瘤中表达上调更为明显<sup>[3-4]</sup>。既往研究发现,AMF/AMFR 在原发胃癌组织和淋巴结转移灶中的表达水平显著高于癌旁和正常胃黏膜组织。AMF/AMFR 高表达的胃癌患者淋巴结转移率明显增加,且患者的存活率显著低于低表达者,提示 AMF/AMFR 的表达水平与胃癌的侵袭转移及预后密切相关。AMF 与 AMFR 结合后导致 AMFR 磷酸化,激活其耦联的百日咳毒素敏感的 G 蛋白,随后由蛋白激酶 C、酪氨酸激酶及脂氧合酶等介质信息传递,刺激肌醇代谢,引起细胞内  $Ca^{2+}$  释放,进而激发细胞骨架成分收缩蛋白质的活动导致癌细胞运动,同时能诱导基质降解酶(组织蛋白酶 B)激活和释放,降解细胞外基质成分,形成局部溶解区以构成癌细胞运动通道,促进肿瘤细胞移动<sup>[5]</sup>。AMF/AMFR 还能通过

信号转导系统激活蛋白激酶和磷脂酰肌醇激酶,导致血管内皮生长因子受体表达上调,加速新生血管的形成及增强肿瘤的侵袭性,并经正反馈作用在转录水平上调 AMFR 的表达,进一步促进肿瘤细胞运动<sup>[6]</sup>。本实验研究发现,相对于肝癌Ⅰ期组,Ⅱ、Ⅲ期组癌组织中 AMF、AMFR mRNA 的表达显著升高;相对于Ⅱ期组,Ⅲ期组癌组织中 AMF、AMFR mRNA 的表达显著升高。说明 AMF、AMFR 的表达与肝癌的严重程度密切相关;在淋巴结转移组中,AMF、AMFR mRNA 的表达显著高于未转移组,说明 AMF、AMFR 的表达与肝癌转移有密切关系。AMF、AMFR 的表达可能对临床判断肝癌的严重程度具有一定的预测价值<sup>[7-8]</sup>。

### 参考文献

- [1] Gong W, Jiang Y, Wang L, et al. Expression of autocrine motility factor correlates with the angiogenic phenotype of and poor prognosis for human gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(16): 5778-5783.
- [2] Kojic LD, Wiseman SM, Ghaidi F, et al. Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase: a potential drug delivery route for tumor cells [J]. PLoS One, 2008, 3(10): e3597-e3604.
- [3] Chiu CG, St Pierre P, Nabi IR, et al. Autocrine motility factor receptor: a clinical review [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(2): 207-217.
- [4] Kojic LD, Joshi B, Lajoie P, et al. Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in breast carcinoma cells [J]. J Biol Chem, 2007, 282(40): 29305-29313.
- [5] Jiang WG, Raz A, Douglas-Jones A, et al. Expression of autocrine motility factor (AMF) and its receptor, AMFR, in human breast cancer [J]. J Histochem Cytochem, 2006, 54(2): 231-241.
- [6] Onishi Y, Tsukada K, Yokota J, et al. Overexpression of autocrine motility factor receptor (AMFR) in NIH3T3 fibroblasts induces cell transformation [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(1): 51-58.
- [7] 王伟, 杨连粤, 杨治力, 等. 自分泌运动因子受体和 Rho C 基因在肝细胞癌侵袭转移中的作用 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2004, 10(6): 408-410.
- [8] 赵志泉, 张国新, 徐顺福, 等. Autotaxin mRNA 在人肝细胞癌中的表达 [J]. 中华消化杂志, 1999, 19(2): 111-113

(收稿日期: 2011-04-09)

(上接第 2218 页)

2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 59.

- [4] 江传慧, 陈燕. 检验结果互认面临的问题与对策 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1234-1235.
- [5] 吴平平, 邓琳娜. 自建生化检测系统检测结果溯源性分析 [J]. 内蒙古医学杂志, 2009, 41(9): 1099-1101.
- [6] 陈文祥. 临床检验参考测量系统与临床检验分析质量保证 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(4): 478-480.

- [7] 汪子伟. 临床实验室的量值溯源和测量不确定度估计 [J]. 现代实用医学, 2009, 21(8): 797-798.
- [8] 张秀明, 李炜焯, 蓝锴, 等. 自建生化检测系统的量值溯源性和可比性研究 [J]. 检验医学, 2007, 22(3): 299-303.
- [9] 秦晓光. “检验结果互认”和质量管理 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 132-135.

(收稿日期: 2011-06-01)