

脂代谢相关基因 PPAR γ 2 和 SCD1 与血管内皮生长因子 VEGF 在肝细胞癌组织的蛋白表达相关性及其临床意义

苏改改,刘红丽,孙永健,彭战,李一鸣,席守民,沈国民

(河南科技大学 医学院,河南 洛阳 471023)

摘要:近年来研究发现肿瘤组织有脂代谢异常,但脂代谢异常在肿瘤发生发展中的作用还不清楚.为了探讨脂代谢异常在肿瘤中的作用,本研究对 45 例肝细胞肝癌患者,用免疫组化方法研究其癌组织中硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 2(PPAR γ 2)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达情况,并结合 ishah 评分和患者的病理检查结果,分析和探讨 PPAR γ 2,SCD1 及 VEGF 在肝细胞癌组织中的表达与肿瘤发生发展的关系、它们相互之间的表达相关性及其临床意义.本研究发现在肝细胞癌组织中,PPAR γ 2,SCD1 及 VEGF 在肿瘤组织中高表达,其高表达率分别为 40.00%、46.70%、75.50%.相关性分析发现 SCD1 和 VEGF 之间存在相关性($r=0.482$, $p\leq 0.001$),但是 PPAR γ 2 和 SCD1($r=0.221$, $p=0.164$),以及 PPAR γ 2 与 VEGF($r=0.219$, $p=0.169$)之间不存在相关性.该研究提示脂代谢相关基因与血管生成相关,但不通过 PPAR γ 2 调控 SCD1 途径;脂代谢相关基因 SCD1 是抑制血管生成和肿瘤发展的潜在靶点.

关键词:肝细胞肝癌;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 2 (PPAR γ 2);血管内皮生长因子(VEGF);硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)

中图分类号:R735.1

文献标志码:A

近年来研究表明肿瘤组织糖脂代谢异常^[1-2].然而相对于糖代谢而言,肿瘤脂代谢的研究较少,但近年来肿瘤组织中脂积累和脂代谢异常开始受到广泛关注^[2].过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 2(peroxisomeproliferator-activated receptor γ 2,PPAR γ 2)可以调控脂肪酸吸收和甘油三酯合成相关基因,因而在脂代谢中起重要作用^[3].有文献报道硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(stearoyl-CoA desaturase 1,SCD1)是 PPAR γ 2 的靶基因^[4].SCD1 不仅在调节脂肪酸合成中发挥核心作用,而且也影响其他脂质的合成,有研究发现高表达的 SCD1 可以活化表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR),通过活化 EGFR 调节 Akt 信号通路的活性,Akt 通路不仅调控细胞增殖和肿瘤生长,而且在血管生成等方面也发挥重要作用^[5].然而 SCD1 是否通过 Akt 通路影响血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,进而影响血管生成还需进一步研究.血管生成是肿瘤生长和转移发生的重要病理基础,而 VEGF 是诱导血管生成的重要细胞因子.因此,本研究采用免疫组织化学法检测脂代谢关键因子 PPAR γ 2 和 SCD1,以及 VEGF 在原发性肝癌组织中的表达情况,从而探究 PPAR γ 2 和 SCD1 与肝癌细胞脂积累的关系以及与肿瘤组织血管生成的关系,探索 SCD1 在肝癌防治中作为靶点的可行性.

1 材料与方法

1.1 病理材料基本信息

2013 年 01 月至 2017 年 10 月间,选择在河南科技大学第一附属医院经病理学确诊的原发性肝癌 45 例,

收稿日期:2019-09-23;修回日期:2019-12-10.

基金项目:国家自然科学基金青年基金(31301076)

作者简介(通信作者):沈国民(1979—),男,河南商丘人,河南科技大学副教授,硕士生导师,博士,研究方向为肿瘤代谢异常的机制,E-mail:shenba433@163.com.

有完整的临床资料,其中男性 39 例,女性 6 例,年龄 27~74 岁,中位年龄 50 岁.所有患者术前均未行放疗和化疗,经影像学检查确认无远处转移.组织病理学中分化、中低分化、低分化癌分别为 21、17、7 例.所有患者均签署知情同意书,同意参与本研究.

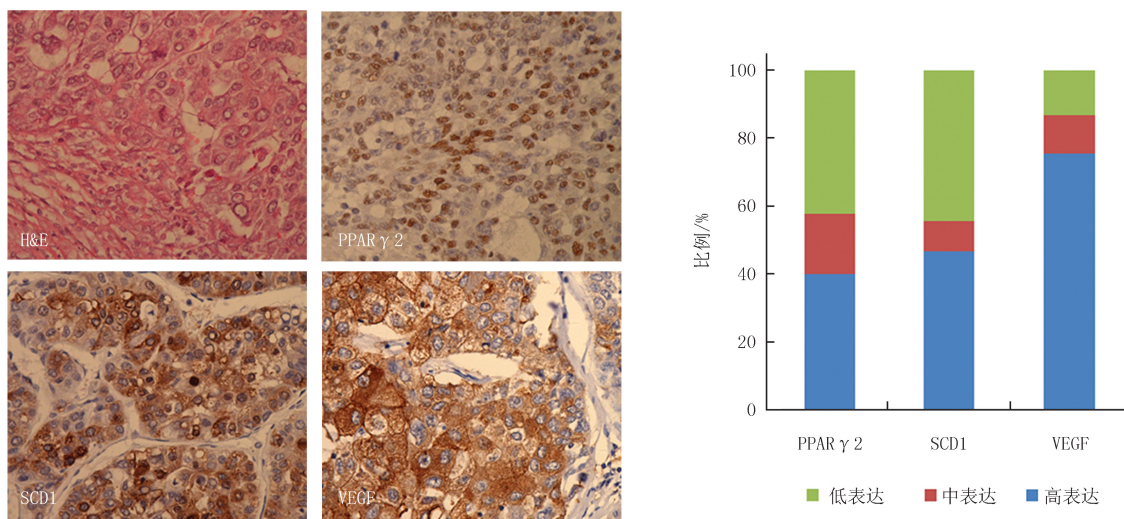
1.2 免疫组织化学染色,结果判定与分析

将肝癌标本蜡块制备成 5 μ m 厚连续切片,进行 SCD1,VEGF,PPAR γ 2 免疫组化染色.免疫组化检测试剂盒 PV-6000 和 PV-6001 购自中杉公司,免疫组化方法按试剂盒进行^[6].鼠源抗 PPAR γ 2 单抗(货号 sc-166731,Santa cruz 公司)按 1:50 稀释,兔源抗 VEGF 多抗(货号 19003-1-AP,Proteintech 公司)按 1:300 稀释,鼠源抗 SCD1 单抗(货号 sc-81776,Santa cruz 公司)按 1:200 稀释.免疫组化结果分析与统计按文献方法进行^[7].用 SPSS16.0 统计软件分析 SCD1,PPAR γ 2,VEGF 在肝细胞癌中的表达情况,结合 ishak 评分和患者的病理检查结果运用偏相关进行 SCD1,PPAR γ 2 和 VEGF 蛋白表达的相关性分析, $p < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组化结果

用免疫组化方法研究 PPAR γ 2、SCD1 和 VEGF 在肝细胞肝癌样本中的表达情况,在 45 例患者中,PPAR γ 2 在细胞核内表达(图 1(A)),其 PPAR γ 2 高表达率为 40%(图 1(B));SCD1 蛋白定位于胞浆(图 1(A)),其高表达率为 46.70%(图 1(B));VEGF 蛋白定位于胞浆(图 1(A)),其高表达率为 75.5%(图 1(B)).



(A) 肝细胞肝癌样本中 PPAR γ 2, SCD1 以及 VEGF 的阳性免疫组化结果, HE 染色为对照组

(B) 肝细胞肝癌样本中 PPAR γ 2, SCD1 以及 VEGF 的表达情况统计

图1 PPAR γ 2, SCD1 和 VEGF 的表达分析

Fig.1 Expression analysis of PPAR γ 2, SCD1 and VEGF

2.2 PPAR γ 2, SCD1 和 VEGF 的免疫组化结果与临床病理的统计

在 45 例肝癌样本中,SCD1,PPAR γ 2,VEGF 在不同年龄中表达情况相差不大(表 1).在分化程度上,在中分化的样本中,PPAR γ 2 表达较低,而在低分化和中低分化样本中,PPAR γ 2 表达较高;在中分化的样本中,SCD1 表达较低,而在中低分化样本中,SCD1 表达较高;而 VEGF 高表达主要分布在中分化和中低分化样本中.由于样本较小,PPAR γ 2,SCD1 和 VEGF 与 ishak 分级无明显相关性.

2.3 PPAR γ 2, SCD1 和 VEGF 在癌组织中表达的相关性

通过分析免疫组化结果相同视野下 PPAR γ 2,SCD1 和 VEGF 的表达情况.分析它们之间表达的相关性.其在每张切片镜下选择 5 个高倍视野,计算各个视野中阳性细胞的平均比例,作为该切片的阳性细胞比例,并按计分体系给分(histoscore).通过给出的评分,研究他们之间表达的相关性.因为 PPAR γ 2,SCD1 和 VEGF 在不同年龄和评分间并不是随机分布,因此对它们进行了偏相关分析.发现 SCD1 和 VEGF 之间存在

相关性(图 2), $r=0.482$, $p<0.001$; 但是 PPAR γ 2 和 SCD1($r=0.221$, $p=0.164$), 以及 PPAR γ 2 与 VEGF($r=0.219$, $p=0.169$)之间不存在相关性。

表 1 SCD1, PPAR γ 2, VEGF 蛋白表达与临床病理的关系

Tab.1 Relationship between SCD1, PPAR γ 2, VEGF protein expression and clinicopathology

病理因素	PPAR γ 2 表达病例数			SCD-1 表达病例数			VEGF 表达病例数			
	低表达	中表达	高表达	低表达	中表达	高表达	低表达	中表达	高表达	
年龄	≤50 岁	10	3	9	11	1	10	3	4	14
	>50 岁	9	5	9	9	3	11	3	1	20
分化程度	低	1	1	5	4	3	3	2	2	3
	低~中	7	5	9	6	0	14	2	1	18
	中	11	2	4	10	1	4	2	2	13
ishak 分期	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	1	2	0	0	3	0	1	2
	3	4	2	2	2	0	5	0	1	6
	4	2	1	2	3	0	3	2	1	3
	5	0	1	4	1	1	3	0	0	5
	6	13	3	8	14	3	7	4	2	18

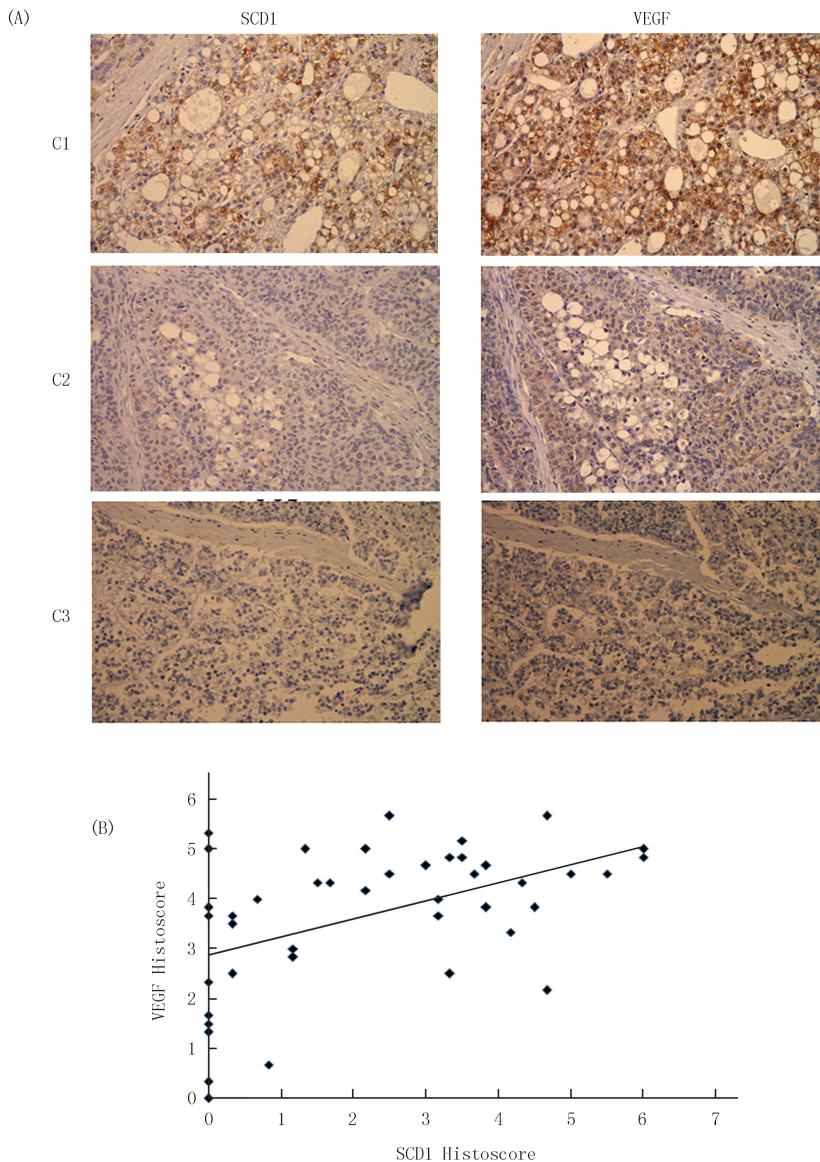
3 讨论

PPAR γ 2 作为低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF1)的靶基因调控脂肪酸吸收和甘油三酯合成的相关基因^[7], 进而调控细胞内甘油三酯的积累, 肿瘤组织周围的氧浓度与正常组织相比明显降低, 从而诱导 HIF1 的合成使其适应低氧微环境。在低氧下, 葡萄糖代谢异常是肿瘤细胞的一个重要特征^[7]。目前对于糖代谢异常的研究已经非常深入, 但关于肿瘤组织中脂积累和脂代谢异常的研究才刚刚兴起, 并且脂代谢在肿瘤发生发展中的作用还不清楚^[7-8]。本研究通过分析 PPAR γ 2, SCD1 和 VEGF 在肝细胞肝癌组织中的表达关系, 探索 SCD1 在肝癌防治中作为靶点的可行性。在 45 例肝癌患者中, PPAR γ 2 的高表达率为 40%, 其表达与患者年龄、病理类型无明显的关系, 但与肿瘤的分化程度密切相关, 提示在肝癌发生过程中 PPAR γ 2 表达的改变可能影响脂积累和脂代谢的过程, 但其机制还需进一步探究。

SCD1 是人体内唯一的硬脂酰辅酶 A 去饱和酶, 在脂肪酸合成的过程中起到枢纽作用^[9]。脂肪酸是合成磷脂和其他脂质的主要原料。在细胞增殖过程中, 磷脂的合成必不可少。磷脂是生物膜的主要成分, 没有膜结构就没有细胞, 因此磷脂合成增加是细胞增殖的必要条件。一些流行病学研究表明脂肪酸水平的改变与癌症的发病率和死亡率相关^[10]。此外, 单不饱和脂肪酸比饱和脂肪酸更适合作为磷脂以及甘油三酯等脂质合成的底物, 对于快速增殖的肿瘤细胞, 单不饱和脂肪酸是细胞更理想的脂肪酸底物^[11]。本研究中, SCD1 在肝细胞肝癌样本中的高表达率为 46.70%, 提示 SCD1 可能在肝癌组织脂代谢中发挥重要作用。有文献报道 SCD1 是 PPAR γ 2 的靶基因, 但本研究的结果发现 PPAR γ 2 和 SCD1 之间不存在相关性, 推测在人类肝癌发生过程中 SCD1 表达的改变并不是由 PPAR γ 2 直接调控的。

除了调节脂质合成外, SCD1 还可以通过影响信号通路的活性调控肿瘤生长。有研究发现高表达的 SCD1 可以活化 EGFR, 通过活化 EGFR 调节 Akt 信号通路的活性从而促进肿瘤细胞的生长^[12]。血管生成是肿瘤生长和转移发生的重要病理基础, 而 VEGF 是诱导血管生成的重要细胞因子。有研究表明一些脂代谢相关基因影响 VEGF 的表达, 如环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX2)通过促进 PGE2 的生成促进 VEGF 的表达^[13], 低氧诱导蛋白 2(Hypoxia-inducible protein 2, HIF2)过表达也可增加 VEGF 的表达^[14], 这提示脂代谢可能影响肿瘤的血管生成。因此本研究探讨了 SCD1 与 VEGF 表达的相关性。在本研究中, 肝细胞肝癌样本的免疫组化结果显示 VEGF 和 SCD1 存在共表达关系($r=0.482$, $p<0.001$)。提示 SCD1 影响 VEGF 的表达, 肝细胞肝癌中 SCD1 的高表达可能与肿瘤的发生发展相关。我们推测 SCD1 可能通过 Akt 通

路影响 VEGF 的表达,进而影响血管生成,但具体的机制还需进一步研究.因此,在后续的研究中需要探讨 SCD1 对肿瘤血管生成影响的分子机制,这对于揭示 SCD1 在血管生成中所起的作用有着重要意义.总之,本研究首次在原发性肝癌中探讨 PPAR γ 2,SCD1 与 VEGF 的表达相关性,发现 SCD1 与 VEGF 表达呈显著正相关,提示肿瘤组织脂代谢相关基因在肿瘤血管生成方面可能起着重要作用,脂代谢相关基因 SCD1 可能是抑制肿瘤发展和血管生成的潜在靶点.



(A) 部分肝细胞肝癌样本的免疫组化结果. C1, C2, C3代表不同肝癌样本. C1样本为SCD1和VEGF两者高表达; C2样本为两者中表达; C3样本为两者低表达. (B) 在45例肿瘤样本中VEGF和SCD1表达相关性分析, $r=0.482$, $p<0.001$, 提示VEGF和SCD1存在共表达关系.

图2 VEGF 和SCD1在肝细胞肝癌样本中的表达相关性

Fig.2 Correlation between expression of VEGF and SCD1 in hepatocellular carcinoma samples

参 考 文 献

- [1] CHEN M, HUANG J. The expanded role of fatty acid metabolism in cancer: new aspects and targets[J]. *Precis Clin Med*, 2019, 2(3): 183-191.
- [2] YU X H, REN X H, LIANG X H, et al. Roles of fatty acid metabolism in tumorigenesis: Beyond providing nutrition(Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6): 5307-5316.

- [3] AMMAZZALORSO A, MACCALLINI C, AMOIA P, et al. Multitarget PPAR γ agonists as innovative modulators of the metabolic syndrome[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 173:261-273.
- [4] STRAND E, BJORN DAL B, NYGARD O, et al. Long-term treatment with the pan-PPAR agonist tetradecylthioacetic acid or fish oil is associated with increased cardiac content of n-3 fatty acids in rat[J]. *Lipids Health Dis*, 2012, 11:82.
- [5] JIANG B H, LIU L Z. AKT signaling in regulating angiogenesis[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(1):19-26.
- [6] STRAUB B K, HERPEL E, SINGER S, et al. Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(3):480-492.
- [7] ZHAO Y Z, LIU X L, SHEN G M, et al. Hypoxia induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression via HIF-1-dependent mechanisms in HepG2 cell line[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 543:40-47.
- [8] SHEN G, NING N, ZHAO X, et al. Adipose differentiation-related protein is not involved in hypoxia inducible factor-1-induced lipid accumulation under hypoxia[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(6):8055-8061.
- [9] BROWN J M, RUDEL L L. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 inhibition and the metabolic syndrome: considerations for future drug discovery[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2010, 21(3):192-197.
- [10] LI L O, KLETT E L, COLEMAN R A. Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(3):246-251.
- [11] COLEMAN R A, LEE D P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation[J]. *Prog Lipid Res*, 2004, 43(2):134-176.
- [12] NASHED M, CHISHOLM J W, IGAL R A. Stearoyl-CoA desaturase activity modulates the activation of epidermal growth factor receptor in human lung cancer cells[J]. *Exp Biol Med(Maywood)*, 2012, 237(9):1007-1017.
- [13] KAIDI A, QUALTROUGH D, WILLIAMS A C, et al. Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor(HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13):6683-6691.
- [14] GIMM T, WIESE M, TESCHEMACHER B, et al. Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1[J]. *FASEB J*, 2010, 24(11):4443-4458.

Protein expression relationship and clinical significance of lipid metabolism-related genes of PPAR γ 2, SCD1 and VEGF in hepatocellular-carcinoma

Su Gaigai, Liu Hongli, Sun Yongjian, Peng Zhan, Li Yiming, Xi Shoumin, Shen Guomin

(College of Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: Some studies have found that abnormal lipid metabolism is often observed in tumor tissue, but it is unclear about the role of abnormal lipid metabolism in tumorigenesis and development. To explore the role of abnormal lipid metabolism in tumorigenesis and development, we determined the expression of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), peroxisome proliferator activated receptor γ 2 (PPAR γ 2), and vascular endothelial growth factor (VEGF) by immunohistochemistry in 45 cases of hepatocellular carcinoma tissues. Combined with the ishik score and pathological examination, we investigated the relationship between the expression of PPAR γ 2, SCD1 and VEGF in hepatocellular carcinoma, and their relationship to tumorigenesis and clinical significance. In this study, we found that PPAR γ 2, SCD1 and VEGF were highly expressed in hepatocellular carcinoma tissues, and their rate of high expression was 40.00%, 46.70% and 75.50% respectively. Correlation analysis revealed a correlation between SCD1 and VEGF ($r=0.482, p \leq 0.001$), but there was no correlation between PPAR γ 2 and SCD1 ($r=0.221, p=0.164$) and PPAR γ 2 and VEGF ($r=0.219, p=0.169$). This study suggests that lipid metabolism-related gene SCD1 is associated with angiogenesis, but SCD1 was not regulated by PPAR γ 2 in hepatocellular carcinoma. SCD1 may be a potential target for inhibiting angiogenesis and tumor development.

Keywords: hepatocellular carcinoma; peroxisome proliferator activated receptor γ 2 (PPAR γ 2); vascular endothelial growth factor (VEGF); stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)