

文章编号 1006-8147(2019)03-0246-05

论著

LCMT1 在肝癌中的表达和预后的意义

廖诗哈¹, 赵秀兰¹, 张艳辉², 刘铁菊¹, 董学易¹, 车娜¹, 梁晓辉¹, 李逸仙¹

(1.天津医科大学基础医学院病理学教研室, 天津 300070; 2.天津医科大学肿瘤医院病理科, 天津 300060)

摘要 目的:探讨亮氨酸羧基甲基转移酶 1(LCMT1)在肝癌中的表达和预后的意义。方法:通过收集网络数据库 GEPIA 中有关信息进行 LCMT1 表达情况的分析、相关性分析和生存分析,然后通过免疫组化染色进一步分析 LCMT1 在肝癌中的表达和预后。结果:LCMT1 在肾上腺皮质癌、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、肝癌和胸腺瘤中的表达和正常组织的表达相比具有统计学意义 ($P<0.05$)。LCMT1 在肝癌中高表达,且高表达的患者生存时间短,更容易发生转移。LCMT1 和金属蛋白酶 2(MMP2)之间的相关系数为 0.324 ($P<0.05$)。LCMT1 和丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)存在正相关关系且相关系数为 0.76 ($P<0.05$)。结论:LCMT1 在肝癌中高表达,且高表达与患者的不良预后有关,LCMT1 可能通过激活 MAPK3 的磷酸化而促进肝癌的发生。

关键词 LCMT1; GEPIA 数据库; MMP2; MAPK3; 肝癌

中图分类号 R365

文献标志码 A

The expression and prognostic significance of LCMT1 in hepatocellular carcinoma

LIAO Shi-han¹, ZHAO Xiu-lan¹, ZHANG Yan-hui², LIU Tie-ju¹, DONG Xue-yi¹, CHE Na¹, LIANG Xiao-hui¹, LI Yi-xian¹

(1.Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Pathology, Tianjin Cancer Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To investigate the expression and prognostic significance of LCMT1 in hepatocellular carcinoma.

Methods: Through collecting relevant information in GEPIA network database, the expression of LCMT1 was analyzed; correlation analysis and survival analysis were carried out. **Results:** The expression of LCMT1 in adrenal cortical carcinoma, diffuse large B-cell lymphoma, hepatocellular carcinoma and thymoma was significantly higher than that in normal tissues. LCMT1 was highly expressed in hepatocellular carcinoma, and the survival time of patients with high expression of LCMT1 was short, as well as the metastasis. The correlation coefficient between LCMT1 and MMP2 was 0.324. There was a positive correlation between LCMT1 and MAPK3 and the correlation coefficient was 0.76. **Conclusion:** LCMT1 and MAPK3 are highly expressed in hepatocellular carcinoma, and their high expressions are associated with poor prognosis. LCMT1 is highly expressed in hepatocellular carcinoma and is associated with poor prognosis. LCMT1 may promote the occurrence of hepatocellular carcinoma by activating the phosphorylation of MAPK3.

Key words LCMT1; GEPIA database; MMP2; MAPK3; hepatocellular carcinoma

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其中肝细胞肝癌是原发性肝癌中最常见的类型,死亡率在恶性肿瘤中居第二位^[1]。目前肝细胞肝癌的发病机制还未完全确定,并且肝癌的早期发现、早期诊断、早期治疗以及预后的判断不尽如人意。因此,发现潜在的肿瘤分子标记物具有很重要的意义。亮氨酸羧基甲基转移酶(leucine carboxyl methyltransferase 1, LCMT1)是哺乳动物中一个重要的甲基转移酶^[2-3]。研究显示,LCMT1 高表达可保护叶酸缺乏所致的细胞损伤,也可保护 β 淀粉样蛋白诱导的认知,但是还鲜少有人提到它与肿瘤发生的关系^[4-5]。

1 材料与方法

1.1 材料 在 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 数据库中笔者收集到了 369 例肝癌患者和 160 例

非肝癌患者 LCMT1 表达情况,以及 182 例肝癌患者和 182 例非肝癌患者的预后情况。其次,笔者收集 2014—2018 年天津医科大学肿瘤医院的 104 例肝细胞肝癌患者的石蜡切片标本,这些患者均由两位以上病理医师确诊,同时收集患者的临床病理资料。这些标本及病例资料的使用均已经接受天津医科大学肿瘤医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 将 104 例肝细胞肝癌组织进行脱蜡处理,然后用含 3% H_2O_2 的甲醇溶液去除切片中内源性过氧化物酶。将上述切片用枸橼酸 6.0 修复液进行微波修复共 12 min,放置室温冷却。将冷却后的切片用 PBS 缓冲液处理 5 min 后再用山羊血清封闭液进行封闭,室温放置 30 min。弃去切片上的血清封闭液滴加 LCMT1 抗体(浓度为 1:200, ORIGENE 公司,货号为 TA503127),将切片在室温下孵育 1 h 后放入 4℃冰箱过夜。转天从冰箱取出

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81572872)

作者简介 廖诗哈(1992-),女,硕士在读,研究方向:病理学;通信作者:赵秀兰, E-mail:xiulanzhao@aliyun.com。

切片,在室温放置1 h。将切片用PBS缓冲液振荡洗涤3次,一次5 min,之后在切片上加入小鼠二抗继续孵育1 h,然后用PBS振荡洗涤3次。将切片放入DAB显色液中显色约20 min。然后用苏木素复染细胞核。最后进行常规封片。

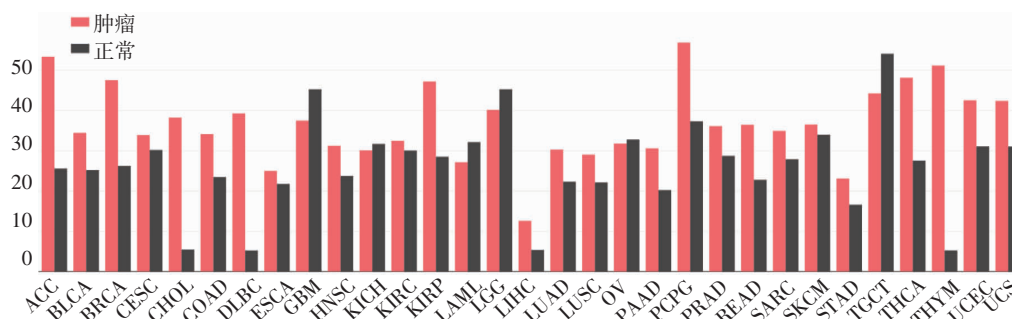
1.2.2 免疫组织化学染色的结果判定 阳性率按Mattern积分法计数,每例切片选择5个视野($\times 400$),结合阳性细胞数量和阳性强弱来判断。阳性细胞数量占视野中总细胞数的百分比分4级:无阳性细胞记为0分、1%~25%记为1分、26%~50%记为2分、50%以上记为3分;阳性强度分4级:无阳性着色记为0分、浅黄色1分、深黄色2分、棕黄色3分。最终按二者的乘积进行统计,乘积大于3分记为阳性表达。

1.3 统计学分析 数据通过SPSS17.0软件进行统计学分析,用四格表 χ^2 检验分析LCMT1、金属蛋白酶-2(matrix metalloprotein-2, MMP2)在肝细胞肝癌患者癌组织和癌旁组织中表达的差异,通过Spearman相关性分析LCMT1、MMP2以及LCMT1、

丝裂原活化蛋白激酶3(mitogen-activated protein kinase-3, MAPK3)之间的关系。用Kaplan-Meier分析患者的预后情况。

2 结果

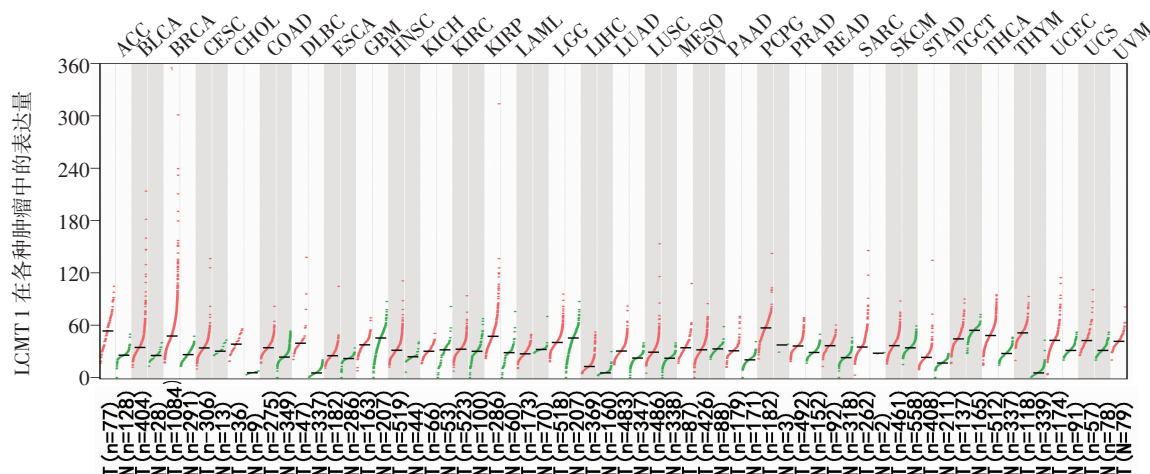
2.1 LCMT1在不同肿瘤中的表达情况 在GEPIA自有的数据库中笔者收集到31种不同肿瘤类型(包括肝癌)的正常组和肿瘤组LCMT1基因表达的研究结果。笔者可以发现LCMT1在肾上腺皮质癌(ACC)、膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润性癌等25种癌中是高表达的,但是只有在ACC、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBC)、肝癌(LIHC)和胸腺瘤(THYM)中的表达和正常组织的表达相比具有统计学意义。LCMT1在胶质母细胞瘤(GBM)、肾嫌色症(KICH)、急性髓细胞白血病(LAML)、脑低级别胶质瘤(LGG)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)和睾丸生殖细胞肿瘤(TGCT)中呈现低表达,但是与正常组织中表达的含量差异不具有统计学意义。结果如图1和图2所示。



ACC: 肾上腺皮质癌; BLCA: 膀胱尿路上皮癌; BRCA: 乳腺浸润性癌; CESC: 宫颈鳞状细胞癌与宫颈腺癌; CHOL: 胆管癌; COAD: 结肠腺癌; DLBC: 弥漫性大B细胞淋巴瘤; ESCA: 食管癌; GBM: 多形性胶质母细胞瘤; HNSC: 头颈部鳞状细胞癌; KICH: 肾嫌色症; KIRC: 肾透明细胞癌; KIRP: 肾乳头状细胞癌; LAML: 急性髓细胞白血病; LGG: 脑低级别胶质瘤; LIHC: 肝细胞癌; LUAD: 肺腺癌; LUSC: 肺鳞状细胞癌; MESO: 间皮瘤; OV: 卵巢浆液性囊腺癌; PAAD: 胰腺腺癌; PCPG: 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤; PRAD: 前列腺腺癌; READ: 直肠癌腺癌; SARC: 肉瘤; SKCM: 皮肤黑色素瘤; STAD: 胃腺癌; TGCT: 睾丸生殖细胞肿瘤; THCA: 甲状腺癌; THYM: 胸腺瘤; UCEC: 子宫体子宫内膜癌; UCS: 子宫癌肉瘤; UVM: 葡萄膜黑色素瘤

图1 LCMT1在不同肿瘤中表达情况的柱状图分析

Fig 1 Histogram analysis of the expression of LCMT1 in different tumors

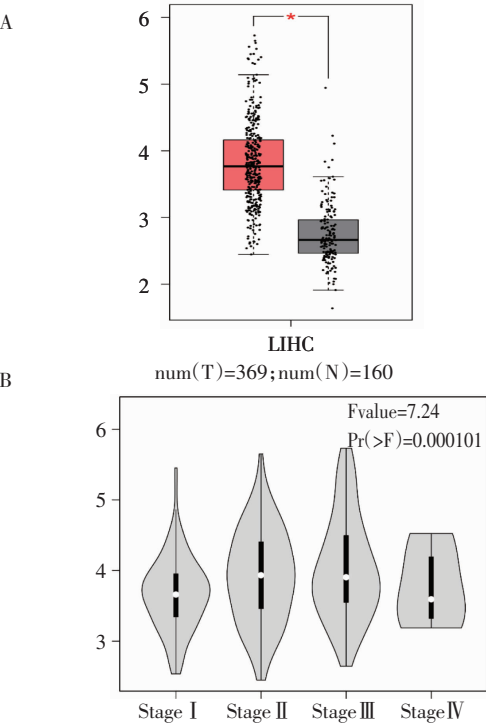


图中红色代表肿瘤组织,绿色代表正常组织,图中上方红色字体标出的为在肿瘤组织和正常组织中表达具有统计学意义($P < 0.05$)的4种肿瘤

图2 LCMT1在不同肿瘤中的表达情况

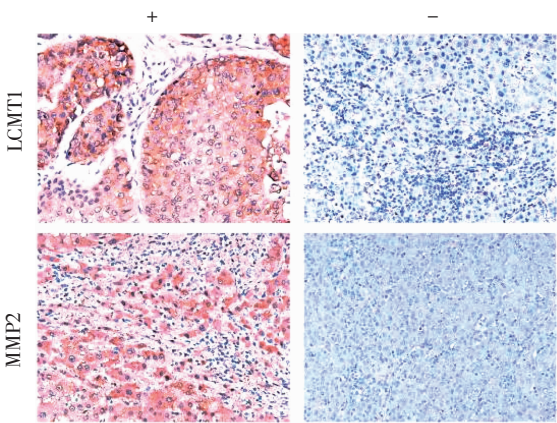
Fig 2 The expression of LCMT1 in different tumors

2.2 LCMT1 在肝癌中的表达 对 GEPIA 数据库进行深入的挖掘,提取与肝癌有关的数据,找到其中 369 例肝癌患者和 160 例正常组织的信息,通过统计学的分析发现 LCMT1 在肝癌的患者中呈现高表达,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。同时分析了 369 位患者 TNM 分期和 LCMT1 表达的关系,发现处于 TNM I 期的患者 LCMT1 的表达明显少于 TNM II、III、IV 期的患者,且表达差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果如图 3 所示。



A.LCMT1 在肝癌和正常肝组织中的表达,红色为肝癌组织,灰色为正常肝组织;B.LCMT1 在不同的 TNM 分期肝癌中的表达
图 3 LCMT1 在肝癌中的表达情况
Fig 3 The expression of LCMT1 in hepatocellular carcinoma

随后通过免疫组织化学染色对上述结果进行验证,笔者收集了 2014–2018 年经病理医师确诊过的 104 例肝细胞肝癌患者石蜡切片进行 LCMT1 和 MMP2 的染色。其中有 73 例(70.2%)患者 LCMT1 呈阳性表达,71 例(68.3%)患者 MMP2 呈阳性表达。染色结果如图 4 所示。肿瘤组织和癌旁组织中 LCMT1 的表达情况如表 1 所示,有 33 例患者癌旁组织也有 LCMT1 的阳性表达。随后我们分析了 LCMT1 和代表转移的指标 MMP2 之间的关系,发现二者呈正相关关系,相关系数为 0.324($P<0.05$),结果如表 2 所示。然后笔者对 104 例患者的临床病理资料进行了分析,发现患者的 LCMT1 高表达与患者的年龄、肿瘤大小、组织学分级无明显关系($P>0.05$),而与患者的 TNM 分期和转移之间有直接关系($P<0.05$),结果如表 3 所示。



左侧为阳性表达,右侧为阴性表达(200×)
图 4 LCMT1 和 MMP2 的免疫组织化学染色结果
Fig 4 Immunohistochemical staining results of LCMT1 and MMP2

表 1 癌组织和癌旁组织中 LCMT1 的表达情况
Tab 1 The expression of LCMT1 in cancer tissues and adjacent tissues

项目	LCMT1(+)	LCMT1(-)	P
癌组织	73	31	0.001
癌旁组织	33	71	

表 2 LCMT1 和 MMP2 之间的关系
Tab 2 Relationship between LCMT1 and MMP2

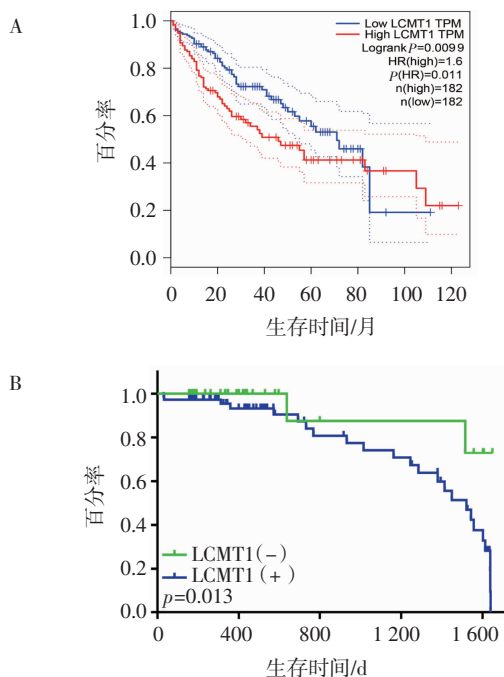
项目	LCMT1(+)	LCMT1(-)	r	P
MMP2(+)	57	14	0.324	0.001
MMP2(-)	16	17		

表 3 LCMT1 与临床病理资料之间的关系
Tab 3 Relationship between LCMT1 and clinicopathological data

项目	LCMT1(+)	LCMT1(-)	P
年龄			
≤60	47	15	0.097
>60	26	16	
TNM			
I	11	17	0.001
II	15	10	
III	20	2	
IV	27	2	
肿瘤大小			
≤5 cm	45	15	0.278
>5 cm	28	16	
组织学分级			
I-II	47	14	0.084
III	26	17	
转移			
(+)	50	23	0.011
(-)	13	18	

2.3 LCMT1 表达对患者生存时间的影响 笔者对 GEPIA 数据库中有临床资料的 364 位患者进行了 Kaplan–Meier 生存分析,结果发现 LCMT1 高表达的患者平均生存时间比 LCMT1 低表达的患者平均生

存时间短,通过分析收集的 104 例肝细胞肝癌患者的生存时间,我们得出一致的结果,结果如图 5 所示。

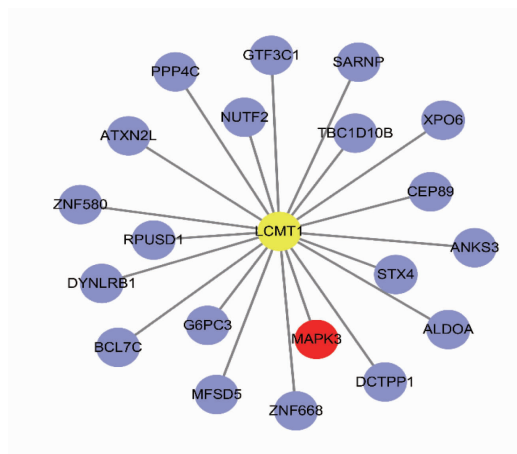


A.GEPIA 分析得到的结果;B.104 例肝细胞肝癌患者分析的结果

图 5 LCMT1 的表达与肝癌患者生存时间的关系

Fig 5 The relationship between LCMT1 expression and survival time of patients with hepatocellular carcinoma

2.4 LCMT1 的生物信息学分析 我们对 LCMT1 进行了生物信息学的分析,发现了 20 个和 LCMT1 最有关联的基因,结果如图 6 所示。其中 MAPK3 引起我们的注意,有文献报道过 MAPK3 能被很多转录因子激活导致其发生磷酸化而促进肿瘤的发生。所以我们通过对数据库的数据进行相关性分析,得到 LCMT1 和 MAPK3 的相关系数为 0.76,且具有统计学意义。结果如图 7 所示。



红色的 MAPK3 为选中的关联基因

图 6 LCMT1 的生物信息学分析

Fig 6 Bioinformatics analysis of LCMT1

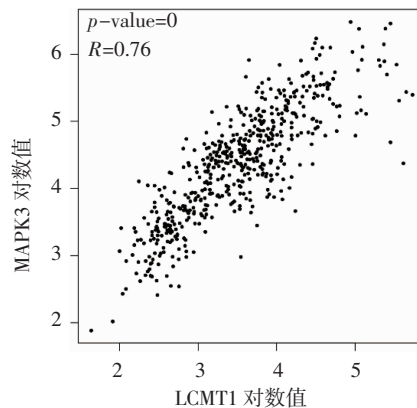


图 7 LCMT1 和 MAPK3 的相关性分析

Fig 7 Correlation analysis of LCMT1 and MAPK3

3 讨论

肝癌是一种最常见的恶性肿瘤之一,由于肝脏具有丰富的血供,肝癌的患者通常发生早期远处转移,导致患者的治疗效果不佳^[6]。有研究证明靶向治疗可以显著提高肝癌患者的生存时间,因此发现新的治疗靶点具有很重要的意义^[7-8]。

LCMT1 是一种甲基转移酶,在细胞的转录调控中发挥着重要作用^[2,9]。基质金属蛋白酶家族是蛋白水解酶家族的重要成员,能够分泌蛋白酶降解细胞外基质,从而在肿瘤的转移过程中起重要作用^[10-12]。MMP2 是基质金属蛋白酶家族的一个重要成员,不仅可以降解细胞外基质,还能够使基底膜发生改变,进而帮助肿瘤迁移和侵袭到其他组织中去,在肿瘤组织中通常伴有 MMP2 的升高^[10]。在本研究中,不仅从公共的数据库进行数据统计发现 LCMT1 在肝癌中呈现高表达,而且收集的 104 例肝细胞肝癌患者的染色结果也支持这一结论。本实验也证明了 LCMT1 和 MMP2 之间呈正相关关系,说明 LCMT1 能够促进肝癌细胞的转移。对临床病理资料进行分析时发现,存在 LCMT1 高表达的患者生存时间明显比 LCMT1 低表达的患者生存时间短,同时通过公共数据库和 104 例患者的病例资料进行分析发现 LCMT1 的表达与 TNM 分期和患者的转移之间存在关系,LCMT1 高表达的患者基本处于 TNM III 或 TNM IV 期,并且大部分患者都存在转移。

LCMT1 能够调节 PP2A C 亚基端 leu309 位点的甲基化和 PP2A 活性,它在 PP2A 结合催化亚基 B/B55 和 B α 形成三聚体的过程中也起着至关重要的作用^[13]。Palanichamy 等^[2]对胶质母细胞瘤的研究发现烟酰胺-N-甲基转移酶(Nicotinamide N-methyltransferase, NNMT) 是其预后的标志物,NNMT 可以调节蛋白质的甲基化使肿瘤抑制因子失活或者使癌基因激活而发挥作用,进一步的研究发现抑制

NNMT 可以增加 LCMT1 甲基化 PP2A 的甲基可用性,从而抑制丝氨酸/苏氨酸激酶。在一项研究中发现 LCMT1 可以调节 PP2A 和 PP4 形成异源三聚体复合物亚群的功能,而且 LCMT1 是唯一的 PP2A C 亚基端甲基转移酶^[14]。而 MAPK 信号转导通路是细胞内重要的信号转导系统,细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)是 MAPKs 家族其中一个重要亚族,而 ERK1 和 ERK2 是其中两个重要家族成员,ERK 能够通过有丝分裂原激活各种生长因子,并且进入细胞核作用在转录因子上,促进某些基因的转录与表达,并且可以促进细胞增殖、分化、迁移、侵袭和抑制细胞凋亡^[15-18]。有研究指出胰腺癌中 PR55 α 的表达显著增高,在 RNAi 介导的胰腺癌细胞株中 PR55 α 的缺失可以使蛋白激酶 B 和 MAPK3 的磷酸化降低,而 PR55 α 是 PP2A 调节的亚单位,最终促进胰腺癌的发展^[19]。之前对 MAPK3 的研究显示 MAPK3 是通过发生磷酸化而促进肿瘤的迁移侵袭,对 LCMT1 的研究提示 LCMT1 是一种甲基转移酶,能够调节 PP2A C 亚基端 leu309 位点的甲基化和 PP2A 活性,因此我们猜测 LCMT1 可能通过促使 PP2A C 亚基端 leu309 位点的甲基化以及促使 PP2A 活性增加引起 MAPK3 的磷酸化,进而促进肝癌的转移。

本次研究通过对网络上公共数据库进行挖掘,分析结果提示 LCMT1 可能促进 MAPK3 磷酸化引起肝癌的不良预后。这为进一步探索二者的临床应用价值提供了依据,也为肝癌的靶向治疗提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Wu M, Liu Z, Zhang A, et al. Identification of key genes and pathways in hepatocellular carcinoma: A preliminary bioinformatics analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(5): e14287
- [2] Palanichamy K, Kanji S, Gordon N, et al. NNMT silencing activates tumor suppressor PP2A, inactivates oncogenic STKs, and inhibits tumor forming ability[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2325
- [3] Creighton M T, Kolton A, Kataya A, et al. Methylation of protein phosphatase 2A—influence of regulators and environmental stress factors[J]. *Plant Cell Environ*, 2017, 40(10): 2347
- [4] Sontag J M, Wasek B, Taleski G, et al. Altered protein phosphatase 2A methylation and Tau phosphorylation in the young and aged brain of methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) deficient mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 214
- [5] Sontag J M, Sontag E. Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7:16
- [6] Boland P, Wu J. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: beyond sorafenib[J]. *Chin Clin Oncol*, 2018, 7(5): 50
- [7] Harris W P, Wong K M, Saha S, et al. Biomarker-driven and molecular targeted therapies for hepatobiliary cancers [J]. *Semin Oncol*, 2018, 45(3):116
- [8] Kim D H, Cho E, Cho S B, et al. Complete response of hepatocellular carcinoma with right atrium and pulmonary metastases treated by combined treatments (a possible treatment effect of natural killer cell): A case report and literature review[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(42): e12866
- [9] Xia X, Gholkar A, Senese S, et al. A LCMT1–PME–1 methylation equilibrium controls mitotic spindle size [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(12):1938
- [10] Jiang Y, Zhang C, Ma J, et al. Expression of matrix Metalloproteinases–2 and aquaporin–1 in corneoscleral junction after angle-closure in rabbits[J]. *BMC Ophthalmol*, 2019, 19(1): 43
- [11] Qu L, Jiao Y, Jiang Z, et al. Effects of acidification pretreatment for respiratory acidosis on the expression of matrix metalloproteinase–9 in rat lung tissues following ischemia/reperfusion[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2018, 43(11):1177
- [12] Rahajeng R. The increased of MMP –9 and MMP –2 with the decreased of TIMP–1 on the uterosacral ligament after childbirth[J]. *Pan Afr Med J*, 2018, 30: 283
- [13] Chu D, Tan J, Xie S, et al. GSK–3 β is Dephosphorylated by PP2A in a Leu309 methylation –independent manner[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 49(2): 365
- [14] Lee J A, Wang Z, Sambo D, et al. Global loss of leucine carboxyl methyltransferase–1 causes severe defects in fetal liver hematopoiesis[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(25): 9636
- [15] Fan H Y, Liu Z, Shimada M, et al. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility [J]. *Science*, 2009, 324(5929): 938
- [16] Tsubaki M. MET/ERK and MET/JNK pathway activation is involved in BCR–ABL inhibitor–resistance in chronic myeloid leukemia[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2018, 138(12):1461
- [17] Yang W, Cai J, Zhang H, et al. Effects of lidocaine and ropivacaine on gastric cancer cells through down –regulation of ERK1/2 phosphorylation in vitro[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(12): 6729
- [18] Escobar S, Fong G M, Winnischofer S, et al. Anti–proliferative and cytotoxic activities of the flavonoid isoliquiritigenin in the human neuroblastoma cell line SH–SY5Y[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 299: 77
- [19] Hein A L, Seshacharyulu P, Rachagani S, et al. PR55 α subunit of protein phosphatase 2A supports the tumorigenic and metastatic potential of pancreatic cancer cells by sustaining hyperactive oncogenic signaling[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2243

(2019–02–27 收稿)