DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2024.03.007

· 基础医学 ·

GLIS3 在肝细胞癌中的表达及临床意义

张瑞珏　冯振博
(广西医科大学第一临床医学院病理科,南宁 530021)

摘　要　目的　探讨锌指蛋白 GLIS3 在肝细胞肝癌(HCC)中的表达及其临床意义。**方法**　收集 TCGA、GTEx 和 GEO 等数据库中 GLIS3 在肝细胞肝癌中的表达值,对 2101 例 HCC 组织和 1448 例正常肝组织进行综合分析,利用实时定量逆转录聚合酶链反应技术检测肝细胞癌细胞系(MHCC-97H、SK-HEP-1)和正常肝细胞细胞系(LX2)中 GLIS3 mRNA 的表达,使用免疫组化技术检测 96 例 HCC 组织及其相邻的 96 例非癌组织中 GLIS3 蛋白的表达水平。**结果**　数据库分析结果显示,GLIS3 在癌组织中的表达明显低于非癌组织($P<0.001$)。GLIS3 在 MHCC-97H、SK-HEP-1 肝细胞癌细胞系中的表达明显低于正常肝细胞细胞系($t=2.933$, $P<0.05$; $t=11.892$, $P<0.05$)。GLIS3 蛋白表达在不同 HCC 患者肿瘤数目方面差异具有统计学意义($P<0.05$)。GLIS3 与 HCC 患者预后相关($P<0.05$)。**结论**　GLIS3 在肝细胞肝癌组织中表达较低,可能成为肝细胞癌治疗潜在的靶点、诊断和预后判断的标记物。

关键词　肝细胞癌;锌指蛋白;GLIS3
中图分类号:R735.7　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2024)06-201-05

Expression and clinical significance of GLIS3 in hepatocellular carcinoma

ZHANG Ruijue, FENG Zhenbo
(*Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning* 530021, *China*)

Abstract: Objective　To evaluate the expression and clinical relevance of zinc finger protein GLIS3 in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods**　Expression data for GLIS3 were extracted from TCGA, GTEx, and GEO databases for analysis involving 2101 HCC and 1448 normal liver samples. GLIS3 mRNA expression was quantified in HCC cell lines (MHCC-97H, SK-HEP-1) and a normal liver cell line (LX2) using real-time quantitative PCR. GLIS3 protein expression levels were assessed via immunohistochemistry in 96 paired samples of HCC and adjacent non-tumor tissue. **Results**　The results of database analysis showed that GLIS3 expression was significantly lower than that in HCC tissues compared to normal liver tissue ($P<0.001$). Lower GLIS3 expression was confirmed in MHCC-97H and SK-HEP-1 HCC cell lines relative to the normal liver cell line ($t=2.933$, $P<0.05$; $t=11.892$, $P<0.05$). There is statistically significant difference between GLIS3 protein expression and tumor number in HCC patients. GLIS3 was associated with prognosis in HCC patients. **Conclusion**　Reduced GLIS3 expression in HCC suggests its potential as a therapeutic target and prognostic biomarker.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; Zinc finger proteins; GLIS3

肝癌是导致全球肿瘤相关死亡的主要原因[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占原发性肝癌的 75%~85%,是第五大最常见的恶性肿瘤,居癌症相关死亡率第二位[2]。慢性乙型和丙型病毒性肝炎,代谢相关性脂肪肝病、酒精性脂肪肝和自身免疫性肝炎等都是 HCC 的主要危险因素。目前 HCC 的治疗手段包括肝移植、肝叶切除术和局部射频消融术等[3],但都具有较高复发率和预后差等特点[4]。因此,寻找发现肝癌相关的诊断及新的治疗靶点,对改善预后具有重要意义。

锌指蛋白(zinc finger proteins, ZFPs)是人类最

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No. 82260581)
[通信作者]冯振博,E-mail:guanghu1963@126.com

大的转录因子家族之一,具有指状 DNA 结合结构域,在多种生理、病理学过程中扮演关键角色[5]。人类 GLIS3 基因位于染色体 9p24.2 上,共有 11 个外显子,编码 960 个氨基酸[6],其表达异常与多种疾病相关,如甲状腺功能减退、多囊肾和糖尿病等疾病的发生有关[7]。GLIS3 异常表达与癌症相关,但 GLIS3 在不同类型癌症中的表达可能有很大的差异,过表达的 GLIS3 可以激活 NF-κB 通路促进三阴性乳腺癌细胞的增殖侵袭和迁移[8];GLIS3 表达下调可抑制体外培养的黑色素瘤细胞的侵袭和黑色素瘤在鸡移植模型中的迁移[9];GLIS3 表达与胃癌免疫浸润呈正相关[10]。但 GLIS3 在 HCC 中的表达情况尚未清楚。本研究旨通过在公共数据库、GLIS3 在 HCC 中 mRNA 的表达以及免疫组化综合探讨 GLIS3 在 HCC 中的表达以及与临床病理参数之间的联系。

1　材料与方法

1.1　材料

HCC 细胞株(SK-HEP-1、MHCC-97H)及正常肝细胞株 LX2 购自中国科学院细胞库;总 RNA 提取试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Prime-Script RT Master Mix 逆转录试剂盒购自宝日医生物技术有限公司;PCR 试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;石蜡标本来自广西医科大学第一附属医院病理科(伦理审号 2024-E201-01);GLIS3 多克隆抗体购自 abclonal 抗体官方网站。

1.2　方法

1.2.1　基于公共数据库 GLIS3 mRNA 和芯片数据的获取与分析　整合癌症基因组图谱(TCGA, https://cancerge-nome.nih.gov/)和基因型组织表达(GTEx, https://www.gtexportal.org/home/)中肝细胞癌和癌旁正常肝组织的 mRNA 数据集。随后,在 GEO 数据库中检索 2101 例 HCC 组织和 1448 例正常肝组织数据,使用 R 语言对不同的平台进行合并,并去除平台批次效应。所有数据处理前,对原始表达数据标准化,表达值进行 $\log_2$ 下标处理。

1.2.2　细胞培养　取 MHCC-97H、SK-HEP-1 及 LX2 冻存细胞管放入 37℃的恒温水浴锅中加热中 1min,使细胞冻存液融化。转移至 15ml 离心管,迅速加入 3ml 完全培养基(含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 培养基)混合均匀,离心 1000 转/分,5min。完成后,去上清,吸入 3ml 完全培养基,重悬吹打细胞,转移到 T25 培养瓶中,摇匀后放入细胞培养箱中培养。每次取 3 瓶同株细胞提取总 RNA,重复实验 3 次。

1.2.3　实时定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)　使用离心柱式 RNAeasy 动物 RNA 抽提试剂盒对 HCC 细胞株(MHCC-97H、SK-HEP-1)及正常肝细胞株 LX2 提取总 RNA,使用 Nano Drop One 检测 RNA 浓度,逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。GLIS3 引物序列 GLIS3-F 5′-AGCCAG-GTCTCTACAGCA-3′ GLIS3-R 5′-GACGCCAAAGAC TCACG-3′使用 7500 定量 PCR 仪(Thermo fisher)进行上机。

1.2.4　免疫组织化学技术(immunohistochemical, IHC)　标本收集:收集 2021 年 1 月至 2022 年 12 月在广西医科大学第一附属医院经病理科确诊为 HCC 患者的石蜡标本,包括 96 例癌组织石蜡标本及对应癌旁组织,癌旁组织石蜡标本作为对照组,并收集患者的临床资料。纳入标准:原发性 HCC、术前未接受放疗、化疗以及内分泌治疗等辅助治疗的患者。免疫组化实验主要方法:石蜡切片烤箱 75 ℃烘烤脱蜡,梯度酒精浸泡、高压加热 EDTA 修复液 2min、过氧化物酶阻断 20min,滴加一抗(GLIS3 抗体浓度为 1 ∶ 200),37 ℃烤箱孵育 1.5h,PBS 冲洗后滴加二抗,室温孵育二抗 30min,PBS 冲洗后 DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。GLIS3 阳性对照为经预实验证明阳性表达的正常甲状腺组织及肾组织。染色评估:高倍显微镜下随机取 10 个高倍视野,根据染色强度及阳性细胞百分比计算评分。评分如下:1)染色强度。0 分无染色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕褐色为 2 分,深褐色为 3 分;2)阳性细胞百分比。小于 5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,76%~100%为 4 分。免疫组化染色总分数为染色强度和阳性细胞百分率乘积。≥6 分为高表达,<6 分为低表达。免疫组化结果判定由 3 名高年资病理科医师独立完成,最终结果取平均值。

1.2.5　生存预后分析　使用 Kaplan-Meier Plot 数据库生成总体生存期(overall survival, OS)及无复发生存期(relapse free survive, RFS),无进展生存期(progress free survive, PFS),疾病特异性生存期(Disease-specific survival, DSS)曲线以阐明 GLIS3 在 HCC 中的预后价值。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据。组间比较采用独立 t 检验。计数资料以百分率(%)表示，组间比较采用 χ^2 检验。运用 STATA 12.0 软件绘制森林图和 SROC 曲线。P<0.05 认为差异有统计学意义。

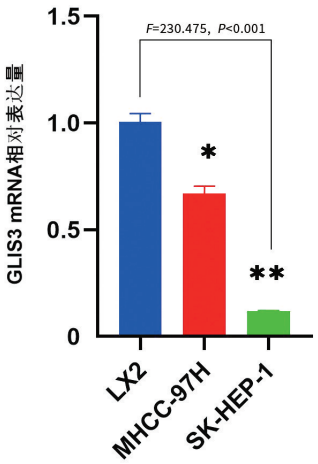
2　结果

2.1　基于数据库 GLIS3 mRNA 的表达

使用 GEO 芯片数据与 TCGA 测序数据合并进行综合分析，结果表明：相较于癌旁肝组织 GLIS3 在 HCC 组织中的 mRNA 表达水平显著降低(P<0.001)；SROC 曲线下面积 AUC 为 0.77，综合敏感为 0.57，特异敏感度为 0.85。

2.2　GLIS3 mRNA 在 HCC 细胞中表达

GLIS3 mRNA 在 HCC 细胞系 MHCC-97H、SK-HEP-1 中的表达明显低于正常肝细胞系 LX2(t=2.933，P<0.05；t=11.892，P<0.05)。见图 1。

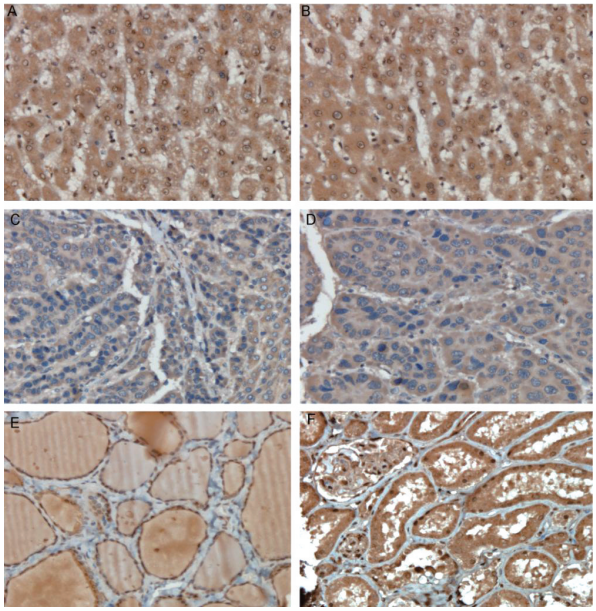


注：与 LX2 相比，$^*P$<0.05，$^{**}P$<0.001。

图 1　GLIS3 在 HCC 细胞系 MHCC-97H、SK-HEP-1 及正常肝细胞系 LX2 的表达

2.3　HCC 组织 GLIS3 蛋白表达情况

2.3.1　GLIS3 蛋白在 HCC 组织中的表达　相较于癌旁肝组织，GLIS3 蛋白在 HCC 组织中呈低表达。在 HCC 组织中，GLIS3 蛋白定位于细胞核，为棕黄色颗粒。在 96 例 HCC 组织中，21 例 GLIS3 蛋白呈高表达(21.9%)，75 例 GLIS3 蛋白呈低表达(78.1%)；在 96 例癌旁肝组织中 55 例 GLIS3 蛋白呈高表达(57.2%)，41 例 GLIS3 蛋白呈低表达(46.8%)。与癌旁肝组织相比，GLIS3 蛋白在 HCC 组织中的表达显著降低(P<0.0001)。见图 2、表 1。



注：A、B. 肝细胞癌癌旁组织细胞核染色阳性；C、D. 肝细胞癌组织细胞核染色阴性；E、F. 人正常甲状腺组织及肾组织。

图 2　GLIS3 免疫组化染色结果(A、B、C、D、E、F 为 400×)

表 1　GLIS3 在 HCC 组织及癌旁肝组织中的表达[n(%)]

组别	例数	GLIS3 蛋白		χ^2	P
		高表达	低表达		
HCC 组织	96	21(21.9)	75(78.1)	25.176	<0.001
癌旁肝组织	96	55(57.2)	41(46.8)		

2.3.2　GLIS3 蛋白表达与 HCC 患者临床病理参数之间的关系　GLIS3 蛋白表达在不同肿瘤数目差异有统计学意义(P<0.05)，而在 HCC 患者性别、年龄、AFP、HBV 感染、肿瘤大小、远处转移等方面差异无统计学意义(均 P>0.05)。见表 2。

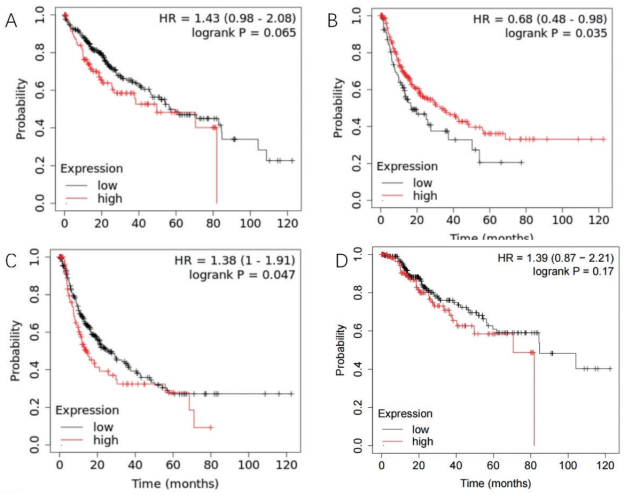
2.4　GLIS3 与 HCC 患者预后关系

通过 Kaplan-Meier Plot 数据库分析 GLIS3 的预后，RFS 显示低表达 GLIS3 的 HCC 患者预后不良(P<0.05)，OS、PFS、DSS 均显示 GLIS3 与 HCC 患者预后无关，提示 GLIS3 可能与 HCC 预后相关。见图 3。

表 2　GLIS3 与临床病理相关性

临床特征	n	GLIS3		χ^2	P
		高表达	低表达		
性别				0.399	0.518
男	67	12	55		
女	29	3	26		
年龄/岁				0.152	0.697
>60	55	8	47		
≤60	41	4	37		
肝硬化				0.394	0.53
肝硬化	59	11	48		
无肝硬化	37	6	31		
脾亢				0.693	0.415
有	30	5	25		
无	66	7	59		
AFP/(ng·mL^{-1})				0.040	0.841
≥400	22	2	20		
<400	74	8	66		
HBV-DNA/(IU·mL^{-1})				0.198	0.657
>500	31	4	27		
≤500	65	5	60		
肿瘤大小/cm				0.053	0.891
≥5	45	8	37		
<5	51	10	41		
肿瘤数目				5.270	0.022
多发	18	6	12		
单发	78	9	69		
微血管侵犯				0.145	0.703
有	36	2	34		
无	60	6	54		
大血管侵犯				0.003	0.960
有	3	1	2		
无	93	14	79		
远处转移				<0.001	0.999
有	16	2	14		
无	80	8	72		
微卫星结节				<0.001	0.999
有	12	2	10		
无	84	10	74		
KI67				0.056	0.814
+	39	4	35		
−	57	8	49		
P53				0.122	0.727
+	82	6	76		
−	14	2	12		
VEGF				0.427	0.513
+	51	8	43		
−	45	5	40		
P21				0.098	0.754
+	38	3	35		
−	58	7	51		
NM23				<0.001	0.999
+	85	12	73		
−	11	2	9		

注:“+”代表存在蛋白突变,“−”代表无蛋白突变



注:A. 生成总体生存期;B. 无复发生存期;C. 无进展生存期;D. 疾病特异性生存期。

图 3　GLIS3 与 HCC 患者预后关系

3　讨论

肝癌仍然是一个全球性的健康问题[11],2022 年我国肝癌死亡 31.65 万人,占全部恶性肿瘤的 12.3%,位居第二[12]。HCC 是一种侵袭性肿瘤类型,由于肿瘤发展过程中涉及的多种病因因素、肿瘤的异质性以及 HCC 通常被诊断为晚期,因此预后不良[13]。肝癌的生物学过程十分复杂,多种因素导致了抑癌基因和癌基因失活与激活的平衡被破坏,分子信号通路异常激活,肝癌细胞分化、血管生成等受到调控。基因的变异与肝癌的发生和发展密切相关,涉及原癌基因、抑癌基因以及参与细胞增殖周期、细胞凋亡和细胞分化的关键基因。除了突变,基因还可能经历扩增、删除、插入和易位,导致过度表达和癌症发生[14]。

Dimitri 等[15]报道 12 例 GLIS3 突变型患者表型有 7 例伴有肝脏异常,范围从肝炎到肝纤维化和肝硬化。Alghamdi 等[16]报道 1 例 GLIS3 纯合突变近亲父母的新生儿患者伴有胆汁淤积性肝病。以上病例提示 GLIS3 突变可能导致肝组织异常。Fah 基因缺陷小鼠肝组织在短期治疗停止后表现 GLIS3 的表达增加[17],提示 GLIS3 可能参与肝再生,但具体在 HCC 中表达情况既往文献未见报道。

本研究运用芯片和序列数据综合分析以及在 RT-qPCR、免疫织化学技术的表达情况,从大数据荟萃分析、细胞水平、蛋白水平 3 个层面验证 GLIS3 在 HCC 的表达情况,数据分析整合 2101 例

HCC 组织和 1448 例正常肝组织显示 GLIS3 在 HCC 的表达明显低于癌旁肝组织。RT-qPCR 显示 GLIS3 在 HCC 细胞系 MHCC-97H、SK-HEP-1 的表达低于正常肝细胞系 LX2 的表达。免疫组化检测结果显示 GLIS3 表达于细胞核，癌旁肝组织表达明显高于 HCC 组织，且蛋白的差异表达与肿瘤数目具有统计学意义，表明 GLIS3 对于 HCC 诊断具有一定意义。这些结果都证实 GLIS3 与 HCC 发生相关联，且在 HCC 里显著低表达。提示 GLIS3 可能成为肝癌治疗潜在的靶点和生物标记物，为 HCC 的诊断、预后判断和治疗提供新思路。

虽然此研究表明 GLIS3 与 HCC 发生之间存在关联，但它在 HCC 中的作用很可能是多方面的。我们团队研究发现 4-甲氧基黄檀醌通过上调转录因子 GLIS3 的表达，正反馈调控下游靶基因 GADD45G 转录，从而抑制 JNK 磷酸化（p-JNK）来抑制肝细胞癌增殖、迁移，并诱导凋亡。此实验可证明 GLIS3 作为抑癌因子参与肝细胞癌的发生、发展。因此，进一步了解这些蛋白质和 HCC 相关信号通路之间的分子作用机制也可能为靶向更广泛的 HCC 的信号通路提供方法。

利益冲突：所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献：

[1] Rumgay H, Arnold M, Ferlay J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. J Hepatol, 2022, 77(6): 1598-1606. DOI: 10. 1016/j. jhep. 2022. 08. 021.

[2] Wen N, Cai Y, Li F, et al. The clinical management of hepatocellular carcinoma worldwide: a concise review and comparison of current guidelines: 2022 update[J]. Biosci Trends, 2022, 16(1): 20-30. DOI: 10. 5582/bst. 2022. 01061.

[3] 国家感染性疾病临床医学研究中心，北京医学会肝病学分会，中国老年学及老年医学学会转化医学分会. 晚期原发性肝癌精细化诊疗管理专家共识（2023 年版）[J]. 中华肝脏病杂志，2023（9）：910-920. DOI：10. 3760/cma. j. cn50113-20230717-00006.

[4] Rebouissou S, Nault JC. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2020, 72(2): 215-229. DOI: 10. 1016/j. jhep. 2019. 08. 017.

[5] Diaba-Nuhoho P. Plant homeodomain-finger protein 5A: a key player in cancer progression[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 169: 115857. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2023. 115857.

[6] Scoville DW, Kang HS, Jetten AM. Transcription factor GLIS3: critical roles in thyroid hormone biosynthesis, hypothyroidism, pancreatic beta cells and diabetes[J]. Pharmacol Ther, 2020, 215: 107632. DOI: 10. 1016/j. pharmthera. 2020. 107632.

[7] Chou CK, Tang CJ, Chou HL, et al. The potential role of krüppel-Like zinc-finger protein Glis3 in genetic diseases and cancers[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2017, 65(5): 381-389. DOI: 10. 1007/s00005-017-0470-x.

[8] Li C, Geng C. GLIS Family zinc finger 3 promotes triple-negative breast cancer progression by inducing cell proliferation, migration and invasion, and activating the NF-κB signaling pathway[J]. Biol Pharm Bull, 2023, 46(2): 209-218. DOI: 10. 1248/bpb. b22-00595.

[9] Jayachandran A, Prithviraj P, Lo PH, et al. Identifying and targeting determinants of melanoma cellular invasion[J]. Oncotarget, 2016, 7(27): 41186-41202. DOI: 10. 18632/oncotarget. 9227.

[10] Ding Y, Wang Z, Chen C, et al. The gene regulatory molecule GLIS3 in gastric cancer as a prognostic marker and be involved in the immune infiltration mechanism[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1091733. DOI: 10. 3389/fonc. 2023. 1091733.

[11] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-1362. DOI: 10. 1016/S0140-6736(22)01200-4.

[12] 郑荣寿，陈茹，韩冰峰，等. 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志，2024，46（3）：221-231. DOI：10. 3760/cma. j. cn112152-20240119-00035.

[13] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗指南（2024 年版）[J]. 中华外科杂志，2024，62（6）：477-503. DOI：10. 3760/cma. j. cn112139-20240417-00187.

[14] Wang Y, Deng B. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanism, targeted therapy, and biomarkers[J]. Cancer Metastasis Rev, 2023, 42(3): 629-652. DOI: 10. 1007/s10555-023-10084-4.

[15] Dimitri P, Habeb AM, Gurbuz F, et al. Expanding the clinical spectrum associated with GLIS3 mutations[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(10): E1362-E1369. DOI: 10. 1210/jc. 2015-1827.

[16] Alghamdi KA, Alsaedi AB, Aljasser A, et al. Extended clinical features associated with novel Glis3 mutation: a case report[J]. BMC Endocr Disord, 2017, 17(1): 14. DOI: 10. 1186/s12902-017-0160-z.

[17] Colemonts-Vroninks H, Neuckermans J, Marcelis L, et al. Oxidative stress, glutathione metabolism, and liver regeneration pathways are activated in hereditary tyrosinemia type 1 mice upon short-term nitisinone discontinuation[J]. Genes (Basel), 2020, 12(1): 3. DOI: 10. 3390/genes12010003.

（收稿日期　2024-03-21）
（本文编辑：石俊强）