

# ALDH1A1在肝细胞癌中的表达及临床诊断价值探讨

刘瑞<sup>1</sup>, 陈元堃<sup>1</sup>, 戴楠楠<sup>2</sup>, 杨仪君<sup>1</sup>, 陈贤珍<sup>1</sup>, 刘佩云<sup>1</sup>, 张福威<sup>1</sup>, 许德栋<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>海南医学院第二附属医院感染病与热带病科, 海南 海口

<sup>2</sup>海南医学院第二附属医院肿瘤放射治疗科, 海南 海口

<sup>3</sup>海南医学院第二附属医院神经外科, 海南 海口

收稿日期: 2023年6月25日; 录用日期: 2023年7月19日; 发布日期: 2023年7月26日

## 摘要

目的: 分析乙醛脱氢酶1A1 (ALDH1A1)在肝细胞癌(HCC)与正常肝脏中的表达差异, 探讨ALDH1A1在HCC诊断中的价值。方法: 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)和免疫印迹法(Western blot)分别检测人肝癌细胞株HepG<sub>2</sub>与人正常肝细胞株LO<sub>2</sub>中ALDH1A1 mRNA及蛋白的表达情况; 免疫组织化学法(IHC)检测49例HCC及其癌旁组织中ALDH1A1的表达情况。结果: 人肝癌细胞株HepG<sub>2</sub>中ALDH1A1 mRNA及蛋白的表达均明显高于人正常肝细胞株LO<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.0001$ ); HCC组织中ALDH1A1的表达明显高于癌旁组织( $P < 0.05$ )。结论: ALDH1A1在HCC中的表达升高, ALDH1A1有望作为诊断HCC的有效分子标志物。

## 关键词

乙醛脱氢酶1A1, 肝细胞癌, 临床, 诊断

# The Expression and Clinical Diagnostic Value of ALDH1A1 in Hepatocellular Carcinoma

Rui Liu<sup>1</sup>, Yuankun Chen<sup>1</sup>, Nannan Ji<sup>2</sup>, Yijun Yang<sup>1</sup>, Xianzhen Chen<sup>1</sup>, Peiyun Liu<sup>1</sup>, Fuwei Zhang<sup>1</sup>, Dedong Xu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious and Tropical Diseases, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan

<sup>2</sup>Department of Radiotherapy, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan

<sup>3</sup>Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan

\*通讯作者。

文章引用: 刘瑞, 陈元堃, 戴楠楠, 杨仪君, 陈贤珍, 刘佩云, 张福威, 许德栋. ALDH1A1 在肝细胞癌中的表达及临床诊断价值探讨[J]. 临床医学进展, 2023, 13(7): 11864-11869. DOI: 10.12677/acm.2023.1371662

## Abstract

**Objective:** To analyze the differential expression of acetaldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) in Hepatocellular carcinoma (HCC) and normal liver, and to explore the value of ALDH1A1 in the diagnosis of HCC. **Methods:** qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of ALDH1A1 mRNA and protein in HepG<sub>2</sub> and LO<sub>2</sub>, respectively; IHC was used to detect the expression of ALDH1A1 in 49 HCC and paracancerous tissues. **Results:** The expression of ALDH1A1 mRNA and protein in HepG<sub>2</sub> was significantly higher than that in LO<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.0001$ ); The expression of ALDH1A1 in HCC tissue was significantly higher than that in paracancerous tissues ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of ALDH1A1 is elevated in HCC, and ALDH1A1 is expected to serve as an effective molecular marker for the diagnosis of HCC.

## Keywords

ALDH1A1, HCC, Clinical, Diagnosis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤,其发病率在世界范围内居恶性肿瘤的第六位,死亡率排第四位[1] [2],造成了沉重的社会经济负担[3]。HCC高死亡率与其容易侵袭和转移密切相关[4] [5],故鉴定具有诊断价值的分子标志物是重要的科学问题,对HCC精准治疗及改善患者预后具有实用价值[6]。乙醛脱氢酶 1A1 (acetaldehyde dehydrogenase 1A1, ALDH1A1)在视黄醇转化为视黄醛并最终转化为视黄酸的过程中起到关键的催化氧化作用,而视黄酸信号通路在肿瘤干细胞中参与基因表达调控等多个环节。近年来多项研究表明,ALDH1A1的表达越高,肿瘤患者的预后越差,这提示ALDH1A1的表达水平可能与肿瘤的发生、进展、侵袭和转移密切相关。尤其在消化系肿瘤领域,近年对ALDH1A1表达水平与肿瘤病理特征及患者预后的关系进行了广泛而深入地探讨。然而,ALDH1A1在肝癌中的表达及作用目前仍存在较大争议。故本研究通过实时荧光定量PCR (qRT-PCR)、蛋白质印迹法(Western blot)、免疫组织化学法(IHC)检测肝癌细胞及肝癌组织中ALDH1A1的表达情况,并探讨ALDH1A1在HCC中的诊断价值。

## 2. 资料与方法

### 2.1. 一般资料

收集2016年1月至2021年12月海南医学院第二附属医院经病理检查确诊的HCC患者49例,其中男性43例,女性6例;年龄24~77岁,中位年龄56岁;以49例HCC组织的配对癌旁组织作为对照。本研究通过海南医学院第二附属医院伦理委员会审批。

## 2.2. 纳入排除标准

### 2.2.1. 纳入标准

研究对象为经病理组织学确诊为 HCC 的连续性选择病例；影像学检查排除其他肿瘤肝脏转移；未合并其他重大疾病；病例资料完整；接受手术治疗前未接受过其他抗肿瘤治疗。

### 2.2.2. 排除标准

合并其他重大疾病者；病例资料不完整；Aipathwell 软件读取报告异常或脱落者；术前接收其他抗肿瘤治疗者。

## 2.3. 方法

### 2.3.1. 免疫组织化学染色及结果判断

所有组织样本经石蜡包埋，常规切片(厚度 4  $\mu\text{m}$ )。ALDH1A1 免疫组化试剂盒购自英国 Abcam 公司，严格按说明书进行操作。结果判定：应用 Aipathwell 软件经循迹、选色、运算、分析得出分析结果。阳性细胞比率 = 阳性细胞数/细胞总数[7]。IRS = SI (阳性强度)  $\times$  PP (阳性细胞比率)。SI 可分为 3 级，0 级无阳性着色，1 级淡黄色弱阳性，2 级棕黄色中阳性，3 级棕褐色强阳性；PP 可分为 4 级，0 级为 0~5%，1 级为 6%~25%，2 级为 26%~50%，3 级为 51%~75%，4 级为 >75% [8]。按 IRS 评分高低分级：0~6 分设为低表达，7~12 分为高表达。以上结果由两位病理医师独立阅片并记录。

### 2.3.2. 实时荧光定量 PCR 检测

HepG<sub>2</sub> 与 LO<sub>2</sub> 细胞株购置于中科院上海细胞所。ALDH1A1 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。(上游引物：5'-GACAATGCTGTTGAATTTGCAC-3'，下游引物：5'-AAGGATATACTTCTTAGCCCGC-3')。逆转录及荧光定量试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。采用美国 ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪进行检测，设定反应条件如下：95 $^{\circ}\text{C}$  3 min；95 $^{\circ}\text{C}$  5 s；60 $^{\circ}\text{C}$  10s；72 $^{\circ}\text{C}$  15 s，40 个循环。

### 2.3.3. 免疫印迹法检测

ALDH1A1、GAPDH 一抗购于英国 Abcam 公司。蛋白裂解、蛋白定量试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶恒压电泳。湿法电转法恒流 260 mA 将蛋白带转移到 PVDF 膜上，5%脱脂牛奶 37 $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h，加入一抗，4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 洗膜 10 min  $\times$  3 次。加入二抗，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h。TBST 洗膜 5 min  $\times$  5 次。ECL 化学发光显色。Image J 软件分析处理图像。

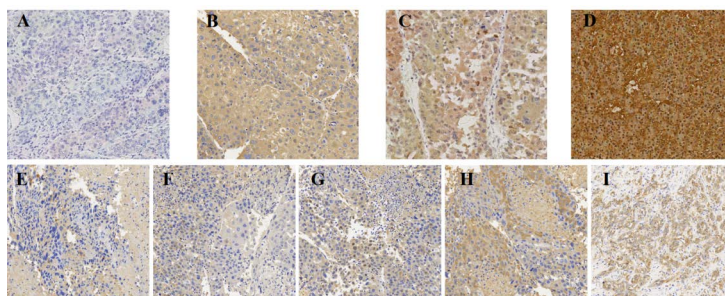
## 2.4. 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行统计学分析。率的比较采用  $\chi^2$  检验，组间比较采用 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. ALDH1A1 在 HCC 及其癌旁组织中的表达情况

ALDH1A1 在 HCC 组织中的表达主要定位于细胞浆，间质细胞有少量表达，呈不同染色程度的棕黄色颗粒。HCC 组织中 ALDH1A1 的 IRS 明显高于癌旁组织，HCC 组织的 ALDH1A1 高表达率为 63.3% (31/49)，癌旁对照组织的 ALDH1A1 高表达率为 40.8% (20/49)，两组差异有统计学意义(P < 0.05)，见图 1。



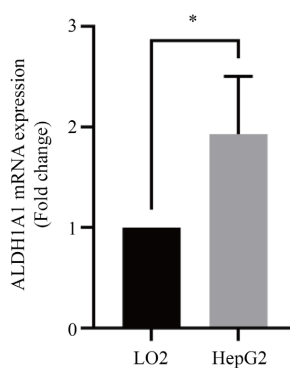
SI 分级: A: 0 级无阳性着色, B: 1 级淡黄色弱阳性, C: 2 级棕黄色中阳性, D: 3 级棕褐色强阳性; PP 分级: E: 0 级为 0~5%, F: 1 级为 6%~25%, G: 2 级为 26%~50%, H: 3 级为 51%~75%, I: 4 级为 >75%

**Figure 1.** Staining score of ALDH1A1 in HCC and aracancerous control tissues ( $\times 200$ )

**图 1.** ALDH1A1 在 HCC 及癌旁对照组织中的染色评分( $\times 200$ )

### 3.2. ALDH1A1 在 HepG<sub>2</sub> 及 LO<sub>2</sub> 细胞株中 mRNA 的表达情况

ALDH1A1 在人肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub> 中 mRNA 的表达明显高于人正常肝细胞株 LO<sub>2</sub>,  $P < 0.05$ 。见图 2。

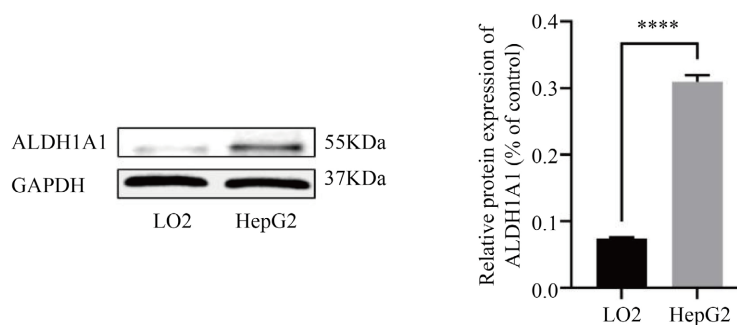


**Figure 2.** mRNA expression of ALDH1A1 in HepG<sub>2</sub> and LO<sub>2</sub>

**图 2.** ALDH1A1 在 HepG<sub>2</sub> 及 LO<sub>2</sub> 细胞株中 mRNA 的表达情况

### 3.3. ALDH1A1 在 HepG<sub>2</sub> 及 LO<sub>2</sub> 细胞株中蛋白的表达情况

ALDH1A1 在人肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub> 中蛋白的表达明显高于人正常肝细胞株 LO<sub>2</sub>,  $P < 0.0001$ 。见图 3。



**Figure 3.** Protein expression of ALDH1A1 in HepG<sub>2</sub> and LO<sub>2</sub>

**图 3.** ALDH1A1 在 HepG<sub>2</sub> 及 LO<sub>2</sub> 细胞株中蛋白的表达情况

## 4. 讨论

HCC 通常晚期才能确诊, 因此死亡率高, 5 年存活率仅有 5%。肝移植是 HCC 唯一有效的治疗手段, 而器官移植的高昂费用及供体的短缺一直是其应用的主要阻碍, 因此探索 HCC 早期诊断新靶点对肝 HCC 的防治刻不容缓[9]。

乙醛脱氢酶类(aldehyde dehydrogenases, ALDHs)是一组胞质酶, 在体内参与乙醇、维生素 A 及环磷酸酰胺等物质的代谢, 可利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)作为辅酶将醛类氧化成相应的羧酸, 发挥重要的生理作用。ALDH1 作为 ALDHs 家族主要成员之一, 常见的基因型包括 ALDH1A1, ALDH1A2 以及 ALDH1A3, 其中 ALDH1A1 广泛表达于人体各个器官组织中。

研究发现, ALDH1A1 可以通过维持癌症干细胞特性、改变代谢、促进 DNA 修复等方式诱发癌症, 是多种癌症的标记物[10]。Liu 等发现, ALDH1A1 促进乳腺癌进展, 可作为乳腺癌生存不良的标志物[11]。Cao 等发现晚期非小细胞肺癌患者的 ALDH1A1 表达水平远高于早期肿瘤患者[12]。在胃癌中, Li 等发现 ALDH1A1 过表达与肿瘤大小、浸润深度及淋巴结转移数量呈正相关, ALDH1A1 可作为患者总生存期与无复发生存期的独立预后因素[13]。Xu 等在结肠癌研究中发现, ALDH1A1 高表达组较低表达组的侵袭转移更为显著。亦有研究表明, 结肠癌中 ALDH1A1 高表达与肿瘤低分化和患者总生存期短相关。此外, 在食管癌、胰腺癌、宫颈癌、前列腺癌等的研究中, ALDH1A1 的促瘤作用也被广泛证实。

虽然 ALDH1A1 被认为是一种致癌因子, 但它在某些癌症中也表现出抑制肿瘤的作用。在 Adam 等人的研究中, ALDH1A1 是胶质母细胞瘤预后较好的指标[14]。Wang 等人的实验中, 低级别腺瘤中 ALDH1A1 的核表达水平明显高于高级别腺瘤、原发性结直肠癌和相应的肝转移[15]。

本研究在细胞学及人体组织学层面研究 ALDH1A1 在肝癌及正常肝脏中的表达。证明人肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub> 中 ALDH1A1 mRNA 及蛋白的表达均明显高于人正常肝细胞株 LO<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.0001$ )。HCC 组织中 ALDH1A1 的表达明显高于癌旁组织( $P < 0.05$ )。这提示 ALDH1A1 的表达可能与 HCC 的恶性程度相关, 因此, 临床上可根据 ALDH1A1 的表达辅助诊断 HCC。

综上所述, ALDH1A1 在 HCC 中表达增加, 有望成为诊断 HCC 的潜在分子靶点, 但 ALDH1A1 在 HCC 中如何发挥致癌作用的分子机制尚需进一步深入研究。

## 基金项目

海南省卫生健康行业科研项目(19A200173)。

## 参考文献

- [1] Kulik, L. and El-Serag, H.B. (2019) Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, **156**, 477-491.E1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.065>
- [2] Giannelli, G., Koudelkova, P., Dituri, F. and Mikulits, W. (2016) Role of Epithelial to Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **65**, 798-808. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.007>
- [3] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [4] Kim, H.S. and El-Serag, H.B. (2019) The Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the USA. *Current Gastroenterology Reports*, **21**, Article No. 17. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0681-x>
- [5] Pessa, M.G. (2020) Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells*, **9**, Article 1370. <https://doi.org/10.3390/cells9061370>
- [6] Shibue, T. and Weinberg, R.A. (2017) EMT, CSCs, and Drug Resistance: The Mechanistic Link and Clinical Implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **14**, 611-629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- [7] Benonisson, H., Altıntaş, I., Sluijter, M., et al. (2019) CD3-Bispecific Antibody Therapy Turns Solid Tumors into In-

- 
- flammatory Sites But Does Not Install Protective Memory. *Molecular Cancer Therapeutics*, **18**, 312-322. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0679>
- [8] Xie, P., Zhang, M.H., He, S., *et al.* (2014) The Covalent Modifier Nedd8 Is Critical for the Activation of Smurf1 Ubiquitin Ligase in Tumorigenesis. *Nature Communications*, **5**, Article No. 3733. <https://doi.org/10.1038/ncomms4733>
- [9] Wang, W. and Wei, C. (2020) Advances in the Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Genes & Diseases*, **7**, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.01.014>
- [10] Yue, H.X., Hu, Z.N., Hu, R., *et al.* (2022) ALDH1A1 in Cancers: Bidirectional Function, Drug Resistance, and Regulatory Mechanism. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article 918778. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.918778>
- [11] C.C., Liu, Qiang, J.K., Deng, Q.D., *et al.* (2021) ALDH1A1 Activity in Tumor-Initiating Cells Remodels Myeloid-Derived Suppressor Cells to Promote Breast Cancer Progression. *Cancer Research*, **81**, 5919-5934. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1337>
- [12] Cao, Y.T., Li, J.H., Wang, Y.T., Fu, Y.W. and Xu, J. (2014) Serum ALDH1A1 Is a Tumor Marker for the Diagnosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Tumori Journal*, **100**, 214-218. <https://doi.org/10.1177/030089161410000216>
- [13] Li, X.S., Xu, Q., Fu, X.Y., *et al.* (2014) ALDH1A1 Overexpression Is Associated with the Progression and Prognosis in Gastric Cancer. *BMC Cancer*, **14**, Article 705. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-705>
- [14] Adam, S.A., Schnell, O., Poschl, J., *et al.* (2012) ALDH1A1 Is a Marker of Astrocytic Differentiation during Brain Development and Correlates with Better Survival in Glioblastoma Patients. *Brain Pathology*, **22**, 788-797. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00592.x>
- [15] Wang, L., Lin, D., Fu, Y. and Lai, M.D. (2016) Nuclear Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) Expression Is a Favorable Prognostic Indicator in Colorectal Carcinoma. *Pathology—Research and Practice*, **212**, 791-799. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.06.009>