

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2006)21-1937-03

肝细胞肝癌组织中 p34^{cdc2} 表达及其与细胞增殖和凋亡的关系张晓战¹ 南克俊² 李春利² 陈玲²(¹ 遵义医学院第五附属医院肿瘤科 广东 珠海 519100 ; ² 西安交通大学第一医院肿瘤科 陕西 西安 710061)**Expression of p34^{cdc2} in hepatocellular carcinoma and its relationship with cell proliferation and apoptosis**ZHANG Xiao-Zhan¹, NAN Ke-Jun², LI Chun-Li², CHEN Ling²¹Department of Oncology, Fifth Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zhuhai 519100, China, ²Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To study the expression of p34^{cdc2} in hepatocellular carcinoma (HCC) and the relationship between the expression of p34^{cdc2} and proliferative index (PI), apoptotic index (AI) of HCC. **METHODS:** Forty-seven cases of HCC with 42 specimens of neighboring non-cancerous tissues and 10 healthy hepatocellular tissues were selected for the study. These samples were detected by S-P immunohistochemical and TUNEL methods. All data were processed by SPSS 10.0 version in computer. **RESULTS:** The expression of p34^{cdc2} was localized in cytoplasm and nuclear of HCC tissues, and neighboring non-cancerous tissues, showing brownish yellow or yellow. There was p34^{cdc2} overexpression in HCC, compared to normal liver tissues ($P < 0.01$). PI of HCC and neighboring non-cancerous tissue was (30.34 ± 4.46)% and (27.88 ± 5.89)% respectively. AI of HCC and neighboring non-cancerous tissue was (8.62 ± 2.28)% and (7.38 ± 2.61)% respectively. AI and PI in HCC were higher than those in neighboring non-cancerous tissue ($P < 0.05$). PI was significantly higher in p34^{cdc2} protein positive tissues [(49.26 ± 4.81)%] than in p34^{cdc2} protein negative tissues [(23.07 ± 4.15)%] ($P < 0.05$), but p34^{cdc2} protein expression was not significantly related to AI ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** There is an overexpression of p34^{cdc2} in HCC. AI and PI in HCC are both higher than those in neighboring non-cancerous tissue. Although it is not a prerequisite for HCC cell apoptosis, p34^{cdc2} expression is positively associated with PCNA expression in HCC, and can together with PCNA serve as a sensitive parameter for detecting HCC cell proliferation.

【Keywords】 p34^{cdc2}; PCNA; hepatocellular carcinoma; cell cycle

【摘要】目的:探讨 p34^{cdc2} 激酶在肝细胞肝癌(HCC)发生发展中的作用及与增殖和凋亡的关系。方法:收集 HCC(含癌旁组织 42)标本 47 例,正常肝组织 10 例,采用免疫组织化学 SP 法显示 p34^{cdc2} 激酶的表达并结合增殖与凋亡特征进行分析。结果:在肝癌组织、癌旁肝组织及正常肝组织细胞中 p34^{cdc2} 表达定位于胞质中,在癌组织中过表达,差异有统计学意义($P < 0.01$)。肝癌、癌旁组织中的增殖指数(PI)分别为 (30.34 ± 4.46)% 与 (27.88 ± 5.89)% ,肝癌组织明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。肝癌、癌旁组织中的凋亡指数(AI)分别为 (8.62 ± 2.28)% 与 (7.38 ± 2.61)% ,肝癌组织明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。p34^{cdc2} 蛋白阳性组 PI(49.26 ± 4.81)% 显著高于阴性表达组(23.07 ± 4.15)% ($P < 0.05$) ,AI 无明显差异($P > 0.05$)。结论:HCC 中增殖与凋亡均高于癌旁组织;p34^{cdc2} 和 PCNA 一样可作为反映 HCC 细胞分裂增殖能力的有效指标,p34^{cdc2} 并不是 HCC 凋亡所必须。

【关键词】 p34^{cdc2} 激酶;增殖细胞核抗原;肝细胞癌;细胞周期

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A

0 引言

p34^{cdc2} 激酶(简称 cdk1)在真核生物细胞周期 G2 → M 期检查点起着正性调节作用。人们发现细胞周期失控是细胞恶变的重要原因。p34^{cdc2} 激酶在多种实体瘤中有过表达现象。为检测 HCC 中 p34^{cdc2} 激酶的表达情况及其与增殖和凋亡的关系,我们采用免疫组织化学法对 47 例 HCC 组织(42 例含癌旁组织)及 10 例正常肝组织进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 1999-01/2004-01 西安交通大学第一医院手术切除 47(男 38,女 9)例 HCC 标本,42 例含癌旁组织。年龄 29 ~ 77(平均 54.3)岁。所有标本均经病理明确诊断。低分化 18 例,中分化 21 例,高分化 8 例。TNM 分期 I 期 1 例,II 期 12 例,III 期 16 例,IV 期 18 例。另 10 例正常肝组织标本取自健康成年男性意外死亡者。浓缩型 mAb p34^{cdc2} SP 试剂盒购自美国 NeoMarkers 公司。PCNA 购自北京中山生物技术公司。原位细胞凋亡检测试剂盒购自德国保灵曼公司。羊血清及 DAB 试剂盒购自福州迈新公司。

收稿日期 2006-03-15; 接受日期 2006-08-18

作者简介:张晓战,硕士生(导师南克俊)。Tel: (0756)8209458

Email: zhangxiaozhan282@sina.com

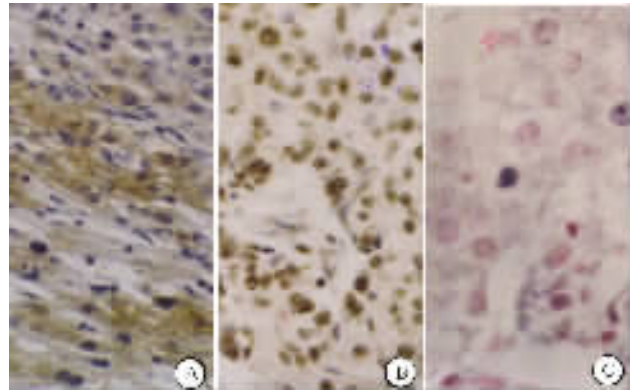
1.2 方法 p34^{cdc2}、PCNA 常规免疫组化 SP 法。石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,抗原修复(切片置于 10 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 pH 6.0 内,热修复 5 min × 3),1:50 正常羊血清封闭 20 min,PBS 冲洗,加入 1:50 稀释的一抗,温盒内 37℃ 孵育 2 h,PBS 冲洗,加二抗,DAB 显色,苏木素复染。以 PBS 代替一抗设立空白对照,以切片内癌旁区作自身对照,p34^{cdc2}或 PCNA 阳性片作阳性对照。凋亡:TUNEL 法按操作手册方法进行,其步骤简述如下:切片常规脱蜡、水化,PBS 缓冲液冲洗 5 min × 3,同免疫组化微波热修复处理 15 min,PBS 缓冲液冲洗 5 min × 3,加 TUNEL 液(A 液和 B 液按 1:9 混合而成)50 μL,37℃ 下恒温箱内孵育 1 h,PBS 缓冲液冲洗 5 min × 3,每张切片加上抗荧光素抗体(C 液)50 μL,湿盒内 37℃ 下孵育 40 min,PBS 缓冲液冲洗 5 min × 3,加入新鲜配制的 BCIP/NBT 显色液,显微镜下观察显色 15~30 min,自来水冲洗,核快红复染,脱色、透明、中性树脂封片。以 PBS 代替 TUNEL 液设空白对照,阳性对照用凋亡阳性片。结果判定 p34^{cdc2}:光镜下每张切片在 HCC 组织中随机选取高倍视野计数 500 个细胞。先按阳性细胞百分率记分,阳性细胞 ≤ 5% 为 0 分,阳性细胞数 6%~25% 为 1 分,阳性细胞数 26%~50% 为 2 分,阳性细胞数 51%~75% 为 3 分,阳性细胞数 > 75% 为 4 分。其次按染色强度计分,无染色 0 分,弱染色 1 分,强染色 2 分。最后将两项合并,得 0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++)5~6 分为强阳性(+++)。PCNA 阳性染色为细胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒,凋亡阳性细胞为细胞核内出现蓝紫色颗粒。根据光镜下观察的显色反应,采用双盲法,随机选择 5 个高倍镜视野,计数总细胞数及染色阳性细胞数。染色指数 > 10% 的切片为阳性切片。增殖指数(proliferating index,PI = PCNA 染色阳性细胞数/总细胞数 × 100%)及凋亡指数(apoptotic index,AI = TUNEL 染色阳性细胞数/肿瘤细胞数 × 100%)。

统计学处理:使用 SPSS.10 统计软件。表 1 资料应用 Kruskal Wallis 秩和检验进行分析,组间多重比较用 Wilcoxon 秩和检验进行分析。两样本均数比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 p34^{cdc2}表达的测定 在 HCC 细胞、癌旁细胞及正常肝细胞中 p34^{cdc2} 均主要定位于细胞质中,呈棕黄色或黄色,胞核中也有棕黄色或黄色着色(图 1)。在肝癌组织、癌旁组织和正常肝组织 p34^{cdc2} 的阳性表达

率分别为 81.4%、67.4%、40.0%。Kruskal Wallis 秩和检验分析显示 p34^{cdc2} 在不同组织中表达强度有统计学意义($\chi^2 = 27.698$, $P = 0.000$)。与正常肝组织比较 p34^{cdc2} 在癌组织中有过表达现象($P = 0.001$),而在癌旁组织中表达无统计学差异($P = 0.115$,表 1)。



A: p34^{cdc2}(+); B: PCNA(+); C: 凋亡。

图 1 HCC 中 p34^{cdc2}、PCNA、凋亡的表达 SP × 400

表 1 p34^{cdc2} 在不同肝组织部位的表达

组别	n	p34 ^{cdc2} 表达			
		-	+	++	+++
HCC 组织	47	8	11	19	9
癌旁组织	42	14	27	1	0
正常肝组织	10	6	4	0	0

2.2 PCNA 的测定 PCNA 定位于细胞核,为棕黄色或棕褐色颗粒(图 1)。HCC 组织 PI 高于癌旁肝组织(30.34 ± 4.46)% vs (27.88 ± 5.89)%,有统计学意义($P = 0.028$)。

2.3 凋亡的测定 凋亡细胞在 HCC 组织中呈散在分布(图 1),HCC 组织中 AI 高于癌旁肝组织[(8.62 ± 2.28)% vs (7.38 ± 2.61)%],有统计学意义($P = 0.019$)。

2.4 HCC 组织中 p34^{cdc2} 蛋白表达与细胞增殖和凋亡的关系 p34^{cdc2} 蛋白阳性组 PI 为(49.26 ± 4.81)%,阴性表达组为(23.07 ± 4.15)%,有统计学意义($P = 0.021$)。p34^{cdc2} 蛋白阳性组 AI 为(8.72 ± 1.83)%,阴性表达组为(8.43 ± 2.55)%,无统计学意义($P = 0.632$)。

3 讨论

HCC 的发生、发展与细胞增殖、凋亡失衡密切相关。在细胞周期中 PCNA 是 S 期 DNA 复制的必需物质,参与 DNA 合成并在细胞周期中起着主要的调控

作用^[1],许多学者采用免疫组化技术对多种肿瘤进行研究,结果表明在生长迅速的肿瘤组织中,PCNA均呈阳性反应^[2],PCNA作为评价细胞增殖状态的有效指标,已被广泛应用于肿瘤的研究^[3]。p34^{cdc2}蛋白是cdc2基因编码的 M_r 为 34×10^3 的周期蛋白依赖性激酶,在细胞周期调控中起着G2→M期转移的作用。周期检查点是细胞周期调控中确保周期演进按序进行的控制点^[4],在G2后期,周期素B与p34^{cdc2}结合,形成有丝分裂促进子(MPF)的主要组份,再由一些磷酸酶和激酶作用,使其激活,促进细胞进入M期。在恶性分裂细胞中过表达的p34^{cdc2}与Cyclin B形成过多的MPF,并在活性和功能异常的Wee1/Mi1k,CAK和CDC25C的作用下,形成不成熟的Cyclin B/p34^{cdc2}/CDC25C的自动连锁式反馈环,触发并通过恶性细胞有缺陷的G2/M期检测点而引发核内重要蛋白结构的改变并进入M期,使遗传不稳定性固定在增殖的细胞中^[5]。本研究中,HCC组织中PI高于癌旁肝组织,p34^{cdc2}在癌组织过表达,在癌旁组织中增强表达。而且p34^{cdc2}阳性表达组的PI较阴性表达组的明显增高,说明HCC中,细胞合成与分裂均高于癌旁肝组织,PCNA,p34^{cdc2}可作为反映HCC细胞分裂增殖能力的有效指标^[6-7]。

本研究中,凋亡细胞在HCC组织中呈散在分布,HCC组织中AI高于癌旁肝组织,表明在细胞增殖的同时,细胞凋亡也在增加,由于增殖比例超过凋亡比例,因此,肿瘤仍继续增长。Yamamoto等^[8]的研究也发现在肝癌发生发展过程中细胞PI与AI逐渐升高并呈正相关。在正常细胞周期G2/M期转移中,p34^{cdc2}激活启动核膜溶解,核纤层磷酸化和解聚,并促进染色质浓缩^[9]。通过未成熟p34^{cdc2}的激活,启动夭折的有丝分裂是某种凋亡的机制。喜树碱(CPT)引起HL60细胞DNA损伤,而诱导细胞凋亡,细胞发生凋亡时其p34^{cdc2}的活性明显增高且其表达的量并

无变化,细胞周期分析表明细胞处于S期内发生凋亡时,调控周期的其它激酶的活性并无增高,认为HL60细胞在p34^{cdc2}不适当时候被激活引起凋亡发生^[10]。本研究中,p34^{cdc2}蛋白阳性组AI与阴性表达组无统计学差异。可能p34^{cdc2}并不是所有凋亡所必须,可能只是在某些种类细胞凋亡中起用。与Martin等^[9]研究相同。

【参考文献】

- [1] 张传海,许戈良,葛勇胜,等. 亚砷酸对肝癌细胞增殖及PCNA、c-Myc蛋白表达的影响[J]. 第四军医大学学报,2005,26(14):1303-1307.
- [2] 高冰. 弥漫型胃癌组织中增殖核抗原的表达[J]. 郑州大学学报(医学版),2003,38(1):83-84.
- [3] 李小菊,晏培松. 卵巢浆液性癌HSP70及PCNA的表达及其意义[J]. 第四军医大学学报,2003,24(16):1504-1506.
- [4] O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, et al. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer[J]. Cancer Cell,2002,2(1):#3-54.
- [5] Kao GD, McKenna WG, Muschel RJ. p34(Cdc2) kinase activity is excluded from the nucleus during the radiation-induced G2 arrest in HeLa cells[J]. J Biol Chem,1999,274(49):34779-34784.
- [6] 张晓战,南克俊,阮之平等. 肝细胞肝癌组织中p34^{cdc2}表达的临床意义[J]. 第四军医大学学报,2005,26(1):50-52.
- [7] 郑建勇,李开宗,王为忠,等. P27kip1与肝细胞肝癌组织增殖和凋亡的关系[J]. 第四军医大学学报,2003,24(15):1359-1361.
- [8] Yamamoto K, Takenaka K, Kajiyama K, et al. Cell proliferation and cell loss in nodule-in-nodule hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology,1999,46(26):813-819.
- [9] Martin SJ, McGahon AJ, Nishioka WK, et al. P34cdc2 and apoptosis[J]. Science,1995,269(5220):106-107.
- [10] Shimizu T, O'Connor PM, Kohn KW, et al. Unscheduled activation of cyclin B/cdc2 kinase in human promyelocytic leukemia cell line HL60 cells undergoing apoptosis induced by DNA damage[J]. Cancer Res,1995,55(2):228-231.

编辑 许福明

· 消息 · 《第四军医大学学报》荣获第五届中国百种杰出学术期刊

2006年10月27日中国科技论文统计发布会消息,《第四军医大学学报》荣获第五届中国百种杰出学术期刊,在医学大学学报类中是唯一的。2006年版中国科技期刊引证报告(核心版)表明,《第四军医大学学报》影响因子(0.488)和总被引频次(2132)均居同类期刊前列。