

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)01-0050-03

肝细胞肝癌组织中 p34^{cdc2} 表达的临床意义

张晓战, 南克俊, 阮之平, 徐 瑞, 郭 卉 (西安交通大学第一医院肿瘤科 陕西 西安 710061)

Clinical significance of p34^{cdc2} expression in hepatocellular carcinoma tissue

ZHANG Xiao-Zhan, NAN Ke-Jun, RUAN Zhi-Ping, XU Rui, GUO Hui

Department of Oncology, First Hospital, 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 the clinicopathological features of hepatocellular carcinoma. **METHODS:** Forty-three specimens of hepatocellular carcinoma tissues (including pericancerous tissues) and ten specimens of healthy hepatocellular tissues were selected. These samples were detected by S-P immunohistochemical method and the clinicopathological features of hepatocellular carcinoma were analyzed. **RESULTS:** The expression of p34^{cdc2} was localized in the cytoplasm and nuclear of cells of HCC tissues and pericancerous tissues, brownish yellow and yellow in color. Overexpression of p34^{cdc2} was observed in HCC tissues, compared with that in normal liver tissues ($P < 0.05$). The positive expression rate of p34^{cdc2} in clinical I + II stages was higher than that in III + IV stages (80.0% vs 42.8%, $P = 0.026$), and it was also higher in Child-Pugh grade A + B than in grade C (37.8% vs 0.00%, $P = 0.004$). But there was no statistical association between various pathologic degrees, tumor sizes, lymphatic metastasis and the positive expression rate of p34^{cdc2} ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** There is an overexpression of p34^{cdc2} in HCC, which can be used as a marker for clinical stage and the Child-Pugh grade of HCC.

【Keywords】 p34^{cdc2}; 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临床病理特征的关系。方法: 收集肝细胞肝癌(含癌旁组织)标本 43 例, 正常肝组织 10 例, 采用免疫组织化学 SP 法显示 p34^{cdc2} 激酶的表达并结合肝癌的临床病理特征进行分析。结果: 在肝癌组织、癌旁肝组织及正常肝组织

细胞中 p34^{cdc2} 表达定位于胞质和胞核中, 在癌组织中过表达, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。临床分期 I + II 期组 p34^{cdc2} 阳性表达率高于 III + IV 期组($P = 0.026$); Child-Pugh 分级 A + B 级组 p34^{cdc2} 阳性表达率高于 C 级组($P = 0.004$)。而不同病理分级、肿瘤大小、有无淋巴结转移与 p34^{cdc2} 阳性表达率均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: p34^{cdc2} 激酶的高表达与 HCC 的发生发展密切相关, 高表达 p34^{cdc2} 激酶可作为反映肝癌临床分期及 Child-Pugh 分级的指标。

【关键词】 P34^{cdc2} 激酶; 肝细胞肝癌; 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^[1]。p34^{cdc2} 激酶在多种实体瘤中有过表达现象。但是在肝细胞肝癌(HCC)中的表达尚未见报道。为检测 HCC 中 p34^{cdc2} 激酶的表达情况及其与肿瘤的临床病理特征的关系, 我们采用免疫组织化学法对 43 例 HCC 组织、癌旁肝组织及 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 HCC 标本 43(男 36, 女 7)例, 年龄 29 ~ 77(平均 54.3)岁。所有标本均经病理明确诊断。低分化 17 例, 中分化 21 例, 高分化 5 例。TNM 分期 I 期 1 例, II 期 14 例, III 期 12 例, IV 期 16 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, 羊血清及 DAB 试剂盒购自福州迈新公司。

1.2 方法 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} 阳性片作阳性对照。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

收稿日期 2004-09-15; 修回日期 2004-10-21

通讯作者: 南克俊. Email: nankj262@sina.com

作者简介: 张晓战(1969-), 女(汉族), 陕西省周至县人, 硕士生(导师南克俊). Tel: (029) 85331040 Email: zhangxiaozhan282@sina.com

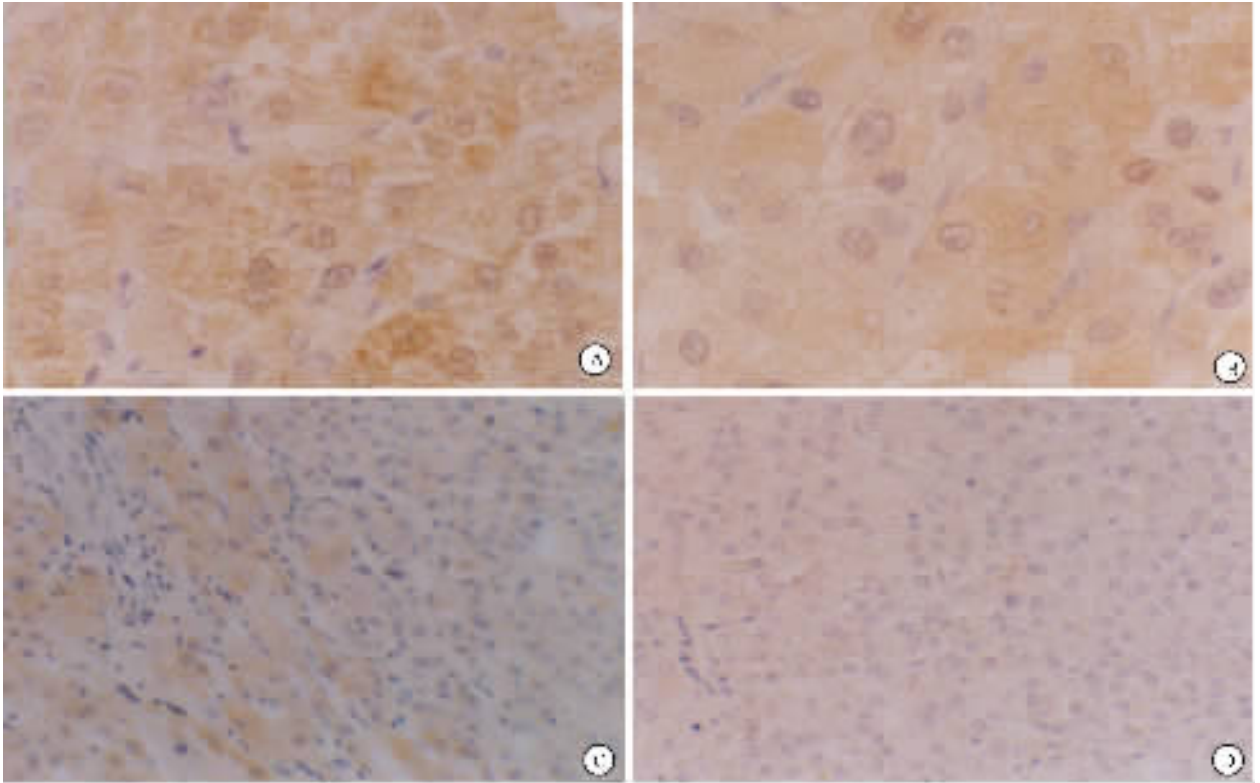
1分,阳性细胞数26%~50%为2分,阳性细胞数51%~75%为3分,阳性细胞数>75%为4分。其次按染色强度计分,无染色0分,弱染色1分,强染色2分。最后将两项合并,得0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为阳性(++),5~6分为强阳性(+++)。

统计学处理:使用SPSS 10统计软件,Tab 1资料应用kruskal wallis秩和检验进行分析,Tab 2资料

应用 χ^2 检验、四格表确切概率法进行分析。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 p34^{cdc2}定位 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(Fig 1)。癌旁组织中均可见肝硬化结节。



A: HCC(+++); B: HCC(++); C: HCC(++) vs neighbor(-); D: Normal(-). A, B: SP $\times 400$; C, D: SP $\times 200$.

Fig 1 p34^{cdc2} expression in nuclear and plasma of HCC cells, peri-cancerous hepatocyte and normal hepatocyte

图1 肝细胞肝癌、癌旁组织及正常肝组织p34^{cdc2}表达于胞质/胞核

2.2 p34^{cdc2}表达的测定结果 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%和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显著差异($\chi^2 = 22.47, P = 0.000$)。与正常肝组织比较p34^{cdc2}在癌组织中有过表达现象,而在癌旁组织中表达无显著差异($\chi^2 = 2.748, P = 0.097$, Tab 1)。

2.3 HCC中p34^{cdc2}表达与临床病理的关系

p34^{cdc2}在I+II期阳性表达率为80.0%, III+IV期则为42.8%, III+IV期明显低于I+II期组($P = 0.026$)。但与肿瘤大小、分化程度、有无淋巴结转移等无统计学意义($P > 0.05$, Tab 2)。Child-Pugh A+B级37例,p34^{cdc2}阳性表达24例,占37.8%;C级6

例5例表达阴性,弱阳性表达仅1例,应用四格表确切概率法示 $P = 0.004$ 。即在Child A+B级组p34^{cdc2}阳性表达率明显高于Child C级组。

表1 p34^{cdc2}在不同肝组织的表达

Tab 1 p34^{cdc2} expression in different liver tissues

| Group | n | p34 ^{cdc2} expression(n) | | | | Positivity rate(%) |
|--------------------------|----|-------------------------------------|----|----|-----|----------------------|
| | | - | + | ++ | +++ | |
| Hepatocellular carcinoma | 43 | 8 | 11 | 19 | 5 | 81.4 |
| Peri-cancerous | 43 | 14 | 27 | 2 | 0 | 67.4 |
| Normal hepatocyte | 10 | 6 | 4 | 0 | 0 | 40.0 |

表2 肝细胞肝癌组织中 p34^{cdc2} 的表达与临床病理特征的关系Tab 2 Relationship between p34^{cdc2} expression and clinical pathologic parameter

| Parameter | n | p34 ^{cdc2} expression(n) | | P |
|-------------------|----|-------------------------------------|----|-------|
| | | - | + | |
| Tumor size | | | | |
| <5 cm | 17 | 6 | 11 | 0.369 |
| >5 cm | 26 | 13 | 13 | |
| Lymph node status | | | | |
| N(+) | 28 | 11 | 17 | 0.527 |
| N(-) | 15 | 8 | 7 | |
| Clinical stage | | | | |
| I + II | 15 | 3 | 12 | 0.026 |
| III + IV | 28 | 16 | 12 | |
| Histologic grade | | | | |
| I | 5 | 1 | 4 | 0.055 |
| II | 21 | 11 | 10 | |
| III | 17 | 7 | 10 | |
| Child-Pugh grade | | | | |
| A + B | 37 | 13 | 24 | 0.004 |
| C | 6 | 5 | 1 | |

3 讨论

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,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/Mik1, 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。而且 p34^{cdc2} 激酶触发的泛素依赖性 CyclinB 降解和自身的失活亦发生异常,而促进恶性细胞的发展^[2]。此外, p34^{cdc2} 亦可激活 P105-Rb 和 PP60c-srcC-abI 等,促与细胞增殖有关的早期基因如 *c-fos*, *c-myc* 等过量表达而致癌。

我们发现, p34^{cdc2} 可定位于细胞质,也可定位于胞核中^[3,4]。p34^{cdc2} 在多种实体瘤中均有表达,鼻咽癌中 73.3%^[5],舌磷状细胞癌中 66.0%^[4],结直肠癌中 28.9%^[6],而在小鼠肝移植癌中高达 88.9%^[7]。我们发现 HCC 中 p34^{cdc2} 阳性表达率为 81.4%。p34^{cdc2} 在癌组织过表达,在癌旁组织中增强表达不明显。本组 43 例 HCC 患者血清 HBSAg 均阳性,癌旁组织中可见假小叶,推测肝硬化时肝细胞分裂能力无明显增强。李国生等^[8]发现在非小细胞肺癌(NSCLC)中亦存在 p34^{cdc2} 在肺癌组织中过表达。进一步证实

p34^{cdc2} 参与了肿瘤的发生发展。我们发现 p34^{cdc2} 阳性表达与临床分期有关,晚期 HCC 阳性表达率降低。李国生等^[8]在 NSCLC 中也有相同发现。说明晚期肿瘤细胞分裂能力下降。Yang 等^[9]报道乳腺癌中 p34^{cdc2} 阳性表达率与肿瘤大小及有无淋巴结转移无统计学相关性,与我们的结果相同。Child-Pugh 分级是对肝硬化预后评定的可靠指标。本组 6 例 Child C 级 HCC 中 5 例 p34^{cdc2} 阴性,1 例弱阳性。该 6 例患者中除 1 例生存期超过 6 mo 外,余均小于 6 mo。说明肝硬化程度严重时,肝癌细胞分裂能力明显下降,是否 Child 分级 C 级 HCC 患者 p34^{cdc2} 阴性时提示生存期短,预后极差,值得进一步观察研究。

【参考文献】

- [1] 杨连君,王文亮,司晓辉. 细胞周期相关蛋白在肝癌细胞系 HCC-9204 表达的免疫细胞化学定位[J]. 第四军医大学学报, 2001 22(3): 282.
Yang LJ, Wang WL, Si XH. The immunocytochemistry position of cell cycle proteins in hepatocellular carcinoma cytogeny HCC-9204 [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2001; 22(3): 282.
- [2] O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, et al. A p34^{cdc2} survival checkpoint in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2002 2(1): 43-54.
- [3] 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]. *Prog Cell Cycle Res*, 2003 5(2): 335-347.
- [4] Wada S, Yea L, Farata I. Prognostic significance of p34^{cdc2} expression in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2004; 40: 164-169.
- [5] 刘标, 陈小毅, 苟新敏. 鼻咽良恶性病变中 EBV-LMP1, CyclinB, p34^{cdc2} 和 Survivin 的表达和意义 [J]. 广东医学院学报, 2004 22(1): 10-12.
Liu B, Chen XY, Gou XM. Expression of EBV-LMP1, cyclinB, p34^{cdc2} and survivin in patients with nasopharyngeal diseases [J]. *J Guangdong Med Coll*, 2004 22(1): 10-12.
- [6] Nozoe T, Honda M, Inutsuka S, et al. p34^{cdc2} expression is an independent indicator for lymph node metastasis in colorectal carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003 129(9): 498-502.
- [7] 于良, 孙中杰, 吴胜利, 等. 白黎芦醇对小鼠移植性肝癌组织中细胞周期蛋白的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2002 23(23): 204-207.
Yu L, Sun ZJ, Wu SL, et al. Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002; 23(23): 204-207.
- [8] 李国生, 乐道双, 张道荣, 等. Survivin, p34^{cdc2} 在非小细胞肺癌中的表达及意义 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2003; 12(2): 147-152.
Li GS, Le DS, Zhang DR, et al. Expression and significance of surviving and p34^{cdc2} in human NSCLC [J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2003 12(2): 147-152.
- [9] Yang WT, Klos KS, Zhou XY, et al. ErbB2 over expression in human breast carcinoma is correlated with P21cip1 upregulation and tyrosine 15 hyperphosphorylation of p34^{cdc2} [J]. *Cancer*, 2003 98: 1123-1131.