

-Catenin, cyclinD1 及 c-myc 在肝细胞癌中的表达

姚忠强¹, 欧超², 朱波³, 曹骥², 焦扬², 李瑗², 苏建家²

Expression of Beta-catenin, cyclinD1 and C-myc Genes in Hepatocellular Carcinoma

YAO Zhong-qiang¹, OU Chao², ZHU Bo³, CAO Ji², JIAO Yang², LI Yuan², SU Jian-jia²

1. Department of Clinical Pathology, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi 530021, China, 2. Department of Experiment Pathology, 3. Department of Laboratory

Abstract :Objective To investigate the correlation between the clinic pathologic parameters of hepatocellular carcinoma (HCC) and the expression of beta-catenin, cyclinD1 and c-myc genes. **Methods** Immunohistochemical technique (EnVision™ plus) was applied to detect the expression of beta-catenin, cyclinD1 and c-myc proteins in 52 HCC tissues and surrounding tissues. **Results** The rates of positive immunostaining of beta-catenin, cyclinD1 and c-myc in the HCC tissues were 55.8%, 48.1% and 53.8%. The rates of positive in the surrounding tissues were 36.5%, 25.0% and 32.7%. The positive rate of beta-catenin, cyclinD1 and c-myc was significantly higher in the HCC tissue than in the surrounding tissues ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the beta-catenin expression and cyclinD1 and c-myc in the HCC tissue ($P = 0.0108$, $r = 0.3920$; $P = 0.0295$, $r = 0.3406$). The positive rate of beta-catenin, cyclinD1 and c-myc in the HCC tissue was significantly correlated with the presence of extrahepatic metastasis, the recurrence of tumor and the differentiation of tumor ($P < 0.05$). The positive rate of cyclinD1 was significantly correlated with the portal vein tumor thrombus ($P < 0.05$). The positive rate of beta-catenin was significantly correlated with the portal vein tumor thrombus and the clinical stage ($P < 0.05$). **Conclusion** The over-expression of beta-catenin, cyclinD1 and c-myc proteins may contribute to the proliferation of hepatocellular carcinoma, making them more aggressive and relates to the initiation and progression of HCC.

Key words: Hepatocellular carcinoma (HCC); Beta-catenin; cyclinD1; c-myc; Immunohistochemistry (IHC)

摘要:目的 探讨 -Catenin、cyclinD1 及 c-myc 蛋白的表达与肝癌临床病理参数的关系。方法 采用 EnVision™ plus 免疫组织化学方法研究 -Catenin、cyclinD1 及 c-myc 蛋白在 52 例 HCC 及癌旁肝组织中的表达情况。结果 52 例 HCC 中 -Catenin、cyclinD1 及 c-myc 蛋白染色阳性率分别为 55.8%、48.1% 及 53.8%，癌旁肝组织的阳性率为 36.5%、25.0% 及 32.7%，-Catenin、cyclinD1 及 c-myc 在 HCC 及癌旁肝组织两者间有显著性差异 ($P < 0.05$)。在 HCC 中 -Catenin 的阳性表达与 cyclinD1、c-myc 的阳性表达密切相关 ($P = 0.0108$, $r = 0.3920$; $P = 0.0295$, $r = 0.3406$) 且呈正相关；-Catenin、cyclinD1 及 c-myc 在人肝癌组织中的检出率与肝外转移、术后复发及肿瘤分化程度明显有关 ($P < 0.05$)，cyclinD1 的检出率与门静脉癌栓也明显有关 ($P < 0.05$)，-Catenin 的检出率与临床分期和门静脉癌栓也有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 -Catenin、cyclinD1 及 c-myc 蛋白的过表达可促使肝癌细胞增殖，使肝癌细胞具有更强的侵袭力，与肝癌的发生发展关系密切。

关键词: 肝细胞癌；-Catenin；cyclinD1；c-myc；免疫组织化学

中图分类号：R735.7 文献标识码：A 文章编号：1000-8578(2006)12-0849-04

0 引言

-连环蛋白 (-Catenin) 是一种重要的胞内蛋

白，是 Wnt 信号转导通路中致癌的关键分子，其降解障碍致使胞质内游离的 -Catenin 积累，通过与 Tcf/lef 结合进入胞核，激活下游靶基因 c-myc 和 cyclinD1 等的转录，引起细胞增殖和分化失控，导致肿瘤发生^[1]。-Catenin 也是构成粘附连接的 E-cad/catenin 复合体的胞内重要成分。其异常改变可导致的整个复合体结构破坏与功能障碍，在肿瘤

收稿日期：2005-11-25；修回日期：2006-06-12

基金项目：国家人事部基金资助项目(桂人发 200437 号)

作者单位：1. 530021 南宁，广西医科大学附属肿瘤医院
临床病理科，2. 实验病理研究室，3. 检验科

作者简介：姚忠强(1972-)，男，本科，主管技师，主要从事肝癌化学预防实验研究

浸润、转移过程中发挥重要作用^[2]。我们用免疫组织化学方法检测 β -Catenin、cyclinD1 及 c -myc 基因在 HCC 及癌旁肝组织中的表达,探讨三者表达与其他临床病理参数之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 1999 年 6 月~2003 年 2 月广西医科大学附属肿瘤医院手术切除的肝癌及癌旁肝组织标本 52 例,患者男性 35 例,女性 17 例;年龄 20~67 岁,中位年龄 46.5 岁。患者术前均未进行任何抗癌治疗,每例均在术中取肝癌及癌旁肝组织。所有病例均经 HE 染色证实为 HCC。病理分级为 I 级 19 例、II 级 17 例、III 级 15 例、IV 级 1 例。术前检测 AFP(+)29 例(注:AFP 400ng/ml 为阳性)、AFP(-)23 例,HBsAg(+)50 例、HBsAg(-)2 例;TSGF(+)40 例(注:TSGF 64 U/L 为阳性)、TSGF(-)12 例,临床分期 I、II 期者 34 例,III 期 18 例。cyclinD1 及 c -myc 单克隆抗体购自美国 Zymed 公司, β -Catenin 单克隆抗体购自美国 Lab Vision-Neo Markers 公司;即用型非生物素免疫组化 EliVision™ plus 检测试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 β -Catenin、cyclinD1 及 c -myc 的免疫组化检测

标本常规用 10% 甲醛固定、石蜡包埋,制成 4 μ m 连续切片后,进行免疫组化 EliVision™ plus 法染色,主要步骤如下:切片脱蜡至水,高压修复 1.5 min,阻断内源性过氧化物酶 20min,正常非免疫血清封闭 30min,滴加 抗在室温孵育 1h,滴加 50 μ l 聚合物增强剂 A,室温孵育 20min;滴加 50 μ l 酶标抗鼠/兔聚合物 B,室温孵育 30min;新鲜 DAB-H₂O₂ 溶液显色,苏木精复染。以已知阳性反应片作阳性对照,阴性对照采用 PBS 替代 抗进行同步染色。

1.2.2 临床随访观察

所有病例术后进行常规的放疗和(或)化疗,并进行追踪随访 1 年。每个月电话或信访,每月定期复查肝功能及 AFP、TSGF,术后每隔 3 个月复查 CT,了解有无复发,术后 1 年了解生存情况。52 例患者中 50 例有随访资料,其中 14 例在随访半年出现复发,12 例在随访 1 年死亡。

1.2.3 结果判定

染色结果观察采用双盲法,由两位病理科医生在不知病理分级与临床资料的情况下读片,每个切

片察五个视野(400 倍)计算阳性细胞数,计算总细胞数不少于 1 000 个,按阳性细胞所占百分数分为:阳性细胞率 < 5% 为阴性(-);5%~24% 为弱阳性(+);25%~50% 为阳性(++);> 50% 为强阳性(+++)。

1.3 统计学分析

用 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验;相关分析采用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 β -Catenin、cyclinD1 及 c -myc 蛋白的表达情况

β -Catenin 蛋白表达在癌组织中表现为细胞质或核内沉积,而在癌旁组织主要表现为均匀分布于细胞膜,仅极个别标本中有胞质极弱着色,细胞核无染色。肝癌标本 β -Catenin 蛋白阳性染色占 55.8% (29/52),而癌旁肝组织阳性率为 36.5% (20/52),组间有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 1。

cyclinD1 阳性染色定位于细胞核中,阳性细胞染色呈散在或片状分布。HCC 中 48.1% (25/52) 呈阳性表达,而癌旁组织中明显低,仅 25.0% (13/52),组间有明显差异($P < 0.05$),见表 1、图 2。

c -myc 蛋白定位于细胞浆内,呈弥漫性分布。在 HCC 中 53.8% (28/52) 为阳性表达,癌旁组织中阳性为 32.7% (17/52),组间有显著性差异($P < 0.05$),见表 1、图 3。

表 1 β -Catenin、cyclinD1 及 c -myc 蛋白在肝癌组织及其癌旁肝组织中的表达

组别	例数	β -Catenin		cyclinD1		c -myc	
		+	%	+	%	+	%
肝癌组	52	29	(55.8)*	25	(48.1)*	28	(53.8)*
癌旁组	52	20	(36.5)	13	(25.0)	17	(32.7)*

* $P < 0.05$

2.2 β -Catenin、cyclinD1 及 c -myc 在 HCC 表达间的相关性

在肝癌组织中 β -Catenin 的阳性表达与 cyclinD1 的阳性表达密切相关($P = 0.0108$, $r = 0.3920$),与 c -myc 的阳性表达也密切相关($P = 0.0295$, $r = 0.3406$),呈正相关,见表 2。

2.3 β -Catenin、cyclinD1 及 c -myc 的表达及与其他临床病理参数关系

52 例肝细胞癌病人按临床分期、有无门静脉癌栓及肝外转移、有无术后复发、肿瘤直径、血清 AFP 水平、血清 TSGF 水平、HBsAg 状况以及肿瘤分化程度(按照 Edmondson 法分级)等进行分组。由表 3 可见, β -Catenin、cyclinD1 及 c -myc 在人肝癌组织

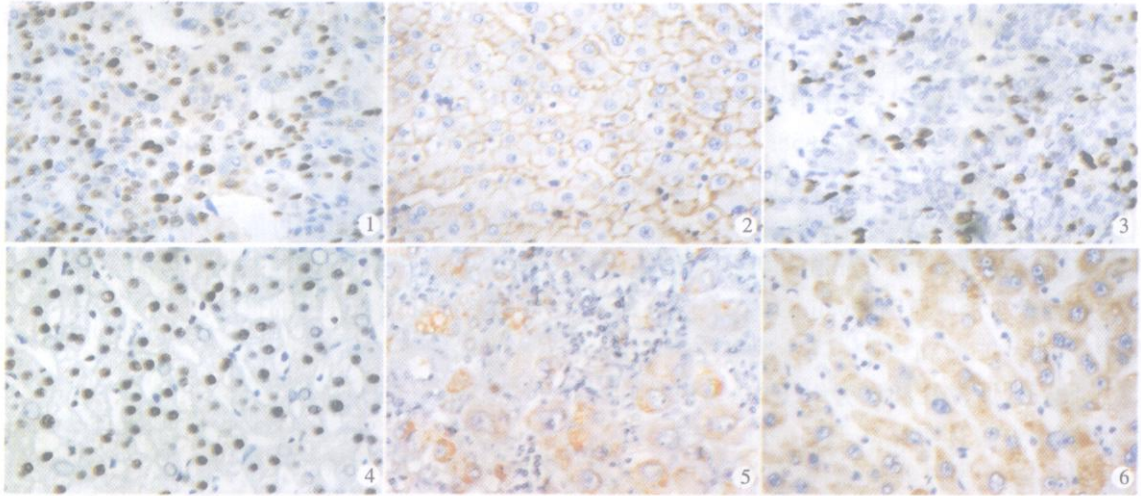


图 1 -Catenin 在 HCC 中的阳性表达 (En Vision ×400) 图 2 -Catenin 在癌旁肝组织的表达 (En Vision ×400)
 图 3 cyclin D1 在 HCC 中的阳性表达 (En Vision ×400) 图 4 cyclin D1 在癌旁肝组织的表达 (En Vision ×400)
 图 5 c-myc 在 HCC 中的阳性表达 (En Vision ×400) 图 6 c-myc 在癌旁肝组织的表达 (En Vision ×400)

表 2 -Catenin 与 cyclinD1、c-myc 在 HCC 表达间的相关性

-Catenin	例数	cyclinD1		c-myc	
		阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	29	19*	10	20*	9
阴性	23	6	17	8	15
合计	52	25	27	28	24*

* P < 0.05

中的检出率都与肝外转移、术后复发及肿瘤分化程度明显有关 (P < 0.05), -Catenin 和 cyclinD1 的检出率与门静脉癌栓也明显相关 (P < 0.05), -Catenin、cyclinD1 及 c-myc 的检出率与肿瘤大小、肿瘤个数、血清 AFP 水平、血清 TSGF 水平、HBsAg 状况都无明显关系。

3 讨论

肝细胞癌的发病机制是目前人们研究的重点之一。术后转移复发是原发性肝癌手术治疗的难点(术后复发率高达 60.8%), 严重影响临床疗效^[3,4]。

在许多肿瘤中可以检测到 -Catenin 基因第 3 外显子突变及其蛋白在胞质的异常表达。-Catenin 在细胞粘附和 WNT 信号传导两个过程发挥作用, 无功能的 -Catenin 在细胞过度沉积导致细胞内游离 -Catenin 水平升高, 细胞过度增生^[5]。我们发现 -Catenin 表达在原发灶中表达明显高于癌旁肝组织。原发灶中 -Catenin 表达与门静脉癌栓、肝外转移、术后复发和临床分期明显有关, 提示 -Catenin 在原发灶形成和肿瘤细胞转移到门脉内继续增生都有促进作用。转移灶中有 -Catenin 异常表达, 参与癌栓形成过程中多个环节: 粘附松散, 脱离复发

表 3 -Catenin cyclinD1 及 c-myc 在肝癌组织中表达与临床病理参数关系

临床参数	例数	-Catenin	cyclinD1	c-myc
		阳性例数 (%)	阳性例数 (%)	阳性例数 (%)
临床分期				
~	34	15(14.4)*	14(41.5)	16(47.1)
	18	14(77.8)	11(61.1)	12(66.7)
肿瘤大小				
5 cm	28	16(57.1)	16(57.1)	19(67.9)
<5 cm	24	13(54.2)	9(37.5)	9(37.5)
肿瘤个数				
1	39	20(51.3)	17(43.6)	20(51.3)
2	13	9(69.2)	8(61.5)	8(61.5)
门静脉癌栓				
有	11	10(90.9)*	9(81.8)*	8(72.7)
无	41	19(46.3)	16(40.0)	18(45.0)
肝外转移				
有	12	10(83.3)*	9(75.0)*	10(83.3)*
无	40	19(47.5)	16(40.0)	18(45.0)
复发				
有	14	11(78.6)*	10(71.4)*	11(78.6)*
无	38	18(47.4)	15(39.4)	17(44.7)
分化程度(级)				
~	36	16(44.4)*	14(38.9)*	16(44.4)*
~	16	13(81.3)	11(68.8)	12(75.0)
AFP 水平 ng/ml				
400	29	19(65.5)	18(62.1)	19(65.5)
<400	23	10(43.5)	17(73.9)	9(39.1)
TSGF 水平 U/L				
64	40	25(62.5)	19(47.5)	21(52.5)
<64	12	3(33.3)	6(50.0)	7(58.2)
HBsAg 状态				
+	50	27(54.0)	23(46.0)	27(54.0)
-	2	2(100)	2(100)	1(50.0)

* P < 0.05

灶,到达转移部位的增生和粘附两方面发挥作用,通过两个途径促进肝内播散。

Qiao 等^[6]研究胰腺导管癌中 β -Catenin 的表达状态,发现胞膜染色减少者 25 例(58.1%),28 例呈胞质染色(65.1%),二者均与 cyclin D1 高表达明显相关,提示 β -Catenin 基因主要通过激活 cyclin D1 转录而参与胰腺癌的发生。cyclinD1 基因扩增是多种肿瘤中过表达的常见原因,cyclinD1 在大肠癌、肝细胞癌中的基因扩增和(或)高表达已有一些报道^[7,8]。我们发现原发灶和癌旁组织中 cyclinD1 表达不同,原发灶中表达明显高于癌旁肝组织。原发灶中 cyclinD1 表达与门静脉癌栓、肝外转移、术后复发及肿瘤分化程度明显相关,提示 cyclinD1 对原发灶形成和肿瘤细胞转移到门脉内继续增生都有促进作用。这与文献^[9]报导一致。在低分化的 HCC 中 cyclinD1 蛋白表达升高,表明 cyclinD1 阳性表达率越高,组织学分化越差,cyclinD1 与 HCC 进展有关系。

c -myc 和 cyclinD1 是 WNT 通路中的核心环节^[10,11],共同影响肝癌的发展。具有转录因子活性的 c -myc 蛋白在 G₁S 期表达最明显,活化后具有促进增殖和凋亡的双向作用。较多的研究表明 c -myc 的持续刺激可引起肝细胞的增殖和选择性转化导致肝癌发生^[12]。本研究结果显示肝癌的阳性表达明显高于癌旁肝组织,尤其在巢周癌细胞和癌旁肝硬化细胞中,这类细胞正是增殖活跃的细胞群体;这种表达特性可能提示在该类细胞中存在某种相同的刺激因素,致使 c -myc 原癌基因活化并持续表达,有利于细胞增生与癌变,特别是癌旁肝硬化结节中的细胞是具有高度癌变倾向的癌巢周细胞,同时具有浸润转移能力,与肝细胞的恶性转化密切相关。

我们在研究 β -Catenin 表达、cyclinD1 基因扩增和 c -myc 表达的相关性时发现, β -Catenin 的阳性表达与 cyclinD1、 c -myc 的阳性表达密切相关($P = 0.0108$, $r = 0.3920$; $P = 0.0295$, $r = 0.3406$),呈正相关。 β -Catenin 作为 WNT 通路中的关键环节,并非单一上下游的线性运行^[13],与其他信号信道可能相互影响,从而形成复杂的网络效应,提示 β -Catenin 异常表达在肿瘤发展过程中有多重效应^[14]。本研究提示在肝外转移、术后复发及肿瘤分化程度都与 β -Catenin、cyclinD1 与 c -myc 的异常表达有关,可能是 β -Catenin 与其他癌基因协同作用的结果,因而 β -Catenin 异常表达进一步影响肿瘤临床病理参数。

对上述环节的分子生物学治疗可能会阻止门脉癌栓的形成,可以作为开展分子生物学治疗的靶点。但体内 WNT 信号传递网络的复杂性和细胞周期调控的精确机制不是 β -Catenin、cyclinD1 和 c -myc 能完全解释的,在 HCC 发病的多个步骤中发挥作用,而作用的途径与机制可能有所不同。进一步研究信号传递和细胞周期调控的机制可能会给肝癌转移复发的治疗带来突破性的进展。

参考文献:

- [1] Kikuchi A. Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268(2): 243-248.
- [2] Jawhari AU, Faahing MJ, Piguatelli M. The E-cadherin/epidermal growth factor receptor interaction: a hypothesis of reciprocal and reversible control of intercellular adhesion and cell proliferation[J]. J Pathol, 1999, 187(2): 155-157.
- [3] Belghiti J, Regimbeau JM, Durand F, et al. Resection of hepatocellular carcinoma: a European experience on 328 cases[J]. Hepatogastroenterology, 2002, 49(43): 41-46.
- [4] Kew MC. Epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. Toxicology, 2002, 181-182: 35-38.
- [5] Cui J, Zhou XD, Liu YK, et al. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(4): 542-546.
- [6] Qiao Q, Ramadani M, Gansauge S, et al. Reduced membranous and ectopic cytoplasmic expression of beta-catenin correlate with cyclinD1 overexpression and poor prognosis in pancreatic cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 95(3): 194-197.
- [7] 郭新珍,李怀斌,杨玉秀,等. TGF- β 1、T β R 及 cyclinD1 在大肠癌的表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(8): 33-39.
- [8] Zhang YJ, Chen SY, Chen CJ, et al. Polymorphisms in cyclinD1 gene and hepatocellular carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2002, 33(2): 125-129.
- [9] Ueta T, Ikeguchi M, Hirooka Y, et al. Beta-catenin and cyclin D1 expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2002, 9(6): 1197-1203.
- [10] Monga SP, Monga HK, Tan XF, et al. Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in Proliferation, apoptosis, and lineage specification[J]. Gastroenterology, 2003, 124(1): 202-216.
- [11] Cui J, Zhou X, Liu YK, et al. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(3): 280-287.
- [12] Santori E, Jensen MR, Thorgeirsson SS. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c -myc and transforming growth factor alpha[J]. Cancer Res, 1998, 58(1): 123-134.
- [13] Miyoshi K, Hennighausen L. beta-catenin: a transforming actor on many stages[J]. Breast Cancer Res, 2003, 5(2): 63-68.
- [14] Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, et al. Wnt signaling B-cell neoplasia[J]. Oncogene, 2003, 22(10): 1536-1545.

[编辑:刘红武]