

文章编号:1005-6947(2006)01-0045-04

· 实验研究 ·

skp2, C-myc 在肝细胞肝癌中的表达及其意义

胡少辉, 张志伟, 陈孝平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝脏外科中心, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究 skp2 和 C-myc 在肝细胞肝癌组织中的表达及其与临床病理指标的关系。方法 用免疫组化 PV9000 二步法检测 skp2 和 C-myc 蛋白在 48 例肝细胞肝癌、20 例肝硬化患者和 16 例正常肝组织中的表达。结果 肝细胞肝癌组织中 skp2 的阳性表达率 (33.3%) 显著高于肝硬化组织 (均为阴性表达) ($P = 0.008$) 和正常肝组织 (均为阴性表达) ($P = 0.020$)。skp2 在肝细胞肝癌中的表达与组织分化程度及转移有关 ($P < 0.001$ 及 $P = 0.017$), 但与肿瘤大小无关 ($P = 0.058$), skp2 在高分化肝细胞肝癌中无表达。肝细胞癌组织中 C-myc 蛋白的阳性表达率为 58.3%, 显著高于肝硬化组织的 15% ($P = 0.001$) 和正常肝组织 (阴性表达) ($P < 0.001$)。C-myc 蛋白阳性表达与组织分化程度、转移及肿瘤大小有关, 组间差异依次为 $P < 0.001$, $= 0.023$ 及 $= 0.007$ 。肝细胞癌中 skp2 蛋白的表达与 C-myc 的表达呈正相关 ($r = 0.508$, $P < 0.001$)。结论 C-myc 可能与肝细胞肝癌的发生发展有关。Skp2 的表达提示预后不良。C-myc 可能对 skp2 的表达起正性调节作用。

关键词: 癌, 肝细胞; skp2 蛋白; C-myc 蛋白

中图分类号: R730.261 **文献标识码:** A

Expression and significance of skp2 and C-myc protein in hepatocellular carcinoma

HU Shao-hui, ZHANG Zhi-wei, CHEN Xiao-ping

(Center of Hepatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Skp2 and C-myc in hepatocellular carcinoma and its relationship with clinicopathologic characteristics. **Methods** The expression of skp2 and C-myc was evaluated in hepatocellular carcinoma tissues of 48 patients, liver cirrhosis tissues of 20 cases, and normal liver tissues of 16 patients by immunohistochemistry (PV9000 two steps methods). **Results** The expression rate of skp2 (33.3%) in hepatocellular carcinoma tissues was significantly higher than that in liver cirrhosis tissues (negative expression) ($P = 0.008$) and normal liver tissues (negative expression) ($P = 0.020$). The expression of skp2 was correlated with histological differentiation and metastasis ($P < 0.001$ and $P = 0.017$), but not with tumour size ($P = 0.058$), and it was not expressed in highly differentiated hepatocellular carcinomas. The expression rate of C-myc protein in hepatocellular carcinoma tissues (58.3%) was significantly higher than that in liver cirrhosis tissues (15%) ($P = 0.001$) and normal tissues (negative expression) ($P < 0.001$). The expression of C-myc was correlated with histological differentiation ($P < 0.001$), metastasis ($P = 0.023$), and tumour size ($P = 0.007$). The expression of skp2 in hepatocellular carcinoma was positively correlated with the expression of C-myc ($r = 0.508$, $P < 0.001$). **Conclusions** C-myc gene may be closely related to the occurrence and development of hepatocellular carcinoma. The expression of skp2 indicates a poor prognosis. The expression of skp2 in hepatocellular carcinoma may be positively modulated by the activation of C-myc gene.

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; skp2; C-myc

CLC number: R730.261 **Document code:** A

收稿日期:2005-04-30; 修订日期:2005-12-15。

作者简介:胡少辉,男,湖北孝感人,华中科技大学同济医学院附属同济医院主治医师,主要从事肝癌方面的研究。

通讯作者:胡少辉 电话:13114360189(手机); E-mail:hushaohu674@sina.com。

研究^[1]发现, *skp2* 在恶性淋巴瘤、口腔癌、直肠癌中的表达增高; *skp2* 表达增加提示肿瘤恶性程度高和预后不佳。C-myc 是一种核转录因子, 其突变常导致肿瘤的发生。大量研究表明, C-myc 可以直接激活 Cullin 基因, 导致 *skp2* 的表达增高^[2]。本研究旨在探讨 C-myc 和 *skp2* 的表达与肝细胞肝癌临床病理特征的关系及其相互作用机制。

1 材料与方法

1.1 标本分组及来源

(1) 肝癌组: 收集我院 2002 年 6 月—2004 年 6 月手术切除, 经病理证实的 48 例肝细胞肝癌标本。男 32 例, 女 16 例; 年龄 18 ~ 66 岁; 术前未行化疗和放疗。低分化 17 例, 中分化 16 例, 高分化 15 例; 有转移(包括淋巴结转移, 门静脉癌栓, 远处转移) 16 例, 无转移 32 例; 肿瘤直径 > 5 cm 者 30 例, ≤ 5 cm 者 18 例; 合并肝硬化 31 例; HBsAg 阳性 33 例。(2) 肝硬化组: 男 13 例, 女 7 例; 年龄 15 ~ 62 岁。(3) 正常肝组织组: 男 10 例, 女 6 例; 年龄 17 ~ 67 岁。为同期我院手术的标本, 均经甲醛固定, 常规石蜡包埋, 制备 4 μm 连续切片。

1.2 免疫组织化学检测

鼠抗人 *skp2* 单克隆抗体、鼠抗人 C-myc 单克隆抗体及 pv9000 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒均购自北京中山公司。操作步骤按 pv9000 免疫组化试剂盒说明进行。用已知的乳癌阳性片为阳性对照, 以 PBS 代替一抗为阴性对照。DAB 显色, 苏木

素复染, 甘油明胶封片。

1.3 结果判定标准

skp2 判定标准参考文献^[3], 以细胞核出现棕黄色颗粒沉淀为阳性细胞; 阳性细胞率 > 10% 为阳性。C-myc 判定标准同文献^[4], 以细胞核出现棕黄色颗粒沉淀为阳性。采用 HPIAS-100 彩色图像分析系统(华中科技大学同济医学院病理教研室提供), 在 400 倍光镜下随机扫描 10 个视野, 取其平均值。对阳性细胞进行定性定量测定。

1.4 统计学处理

显著性差异采用 χ^2 检验, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。所有资料均在 Spss11.0 软件下操作。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 *skp2* 和 C-myc 蛋白在肝细胞肝癌、肝硬化和正常肝组织中的表达

skp2 和 C-myc 蛋白在肝细胞肝癌中的表达均定位于细胞核, 染色呈棕黄色。C-myc 蛋白在肝硬化组织中胞核染色也呈棕黄色。肝细胞肝癌中 *skp2* 的表达率为 33.3% (图 1), 显著高于肝硬化组织(阴性染色) ($\chi^2 = 6.964, P = 0.008$) 和正常肝组织(阴性染色) ($\chi^2 = 5.444, P = 0.020$)。肝癌中 C-myc 的表达率为 58.3% (图 2), 显著高于肝硬化组织的 15% ($\chi^2 = 10.687, P = 0.001$), 和正常肝组织(阴性染色) ($\chi^2 = 16.593, P < 0.001$)。

图 1 肝细胞癌中 *skp2* 的表达 (× 200)

图 2 肝细胞癌中 C-myc 的的表达 (× 200)

2.2 *skp2* 和 C-myc 蛋白表达与肝细胞肝癌各临床病理特征的关系

skp2 在高分化的肝细胞肝癌中无表达, 在中低分化肝细胞肝癌中表达增高 ($\chi^2 = 18.618, P < 0.001$); 且其表达水平与转移 ($\chi^2 = 5.672, P = 0.017$) 有关, 与性别、年龄、肿瘤直径、HBsAg、AFP 水平及是否合并肝硬化无关。C-myc 在各种分化的肝细胞肝癌中均表达, 且随组织分化程度的降低而显著增高 ($\chi^2 = 21.568, P < 0.001$)。在有转移的, 大肝癌(直径 > 5 cm) 的肝细胞中显著高于小肝

癌 ($\chi^2 = 7.406, P = 0.007$) 及无转移的肝癌 ($\chi^2 = 5.186, P = 0.023$); 其与性别、年龄、HBsAg、AFP 水平及是否合并肝硬化无关(表 1)。

2.3 *skp2* 蛋白表达与 C-myc 蛋白表达的关系

28 例 C-myc 阳性表达的肝细胞肝癌标本中, *skp2* 有 15 例高表达, 20 例 C-myc 阴性表达的标本中, *skp2* 有 19 例阴性表达, 经相关分析表明 C-myc 与 *skp2* 的表达呈显著正相关 ($r = 0.508, P < 0.001$) (表 2)。

表1 skp2, C-myc 蛋白表达与肝细胞肝癌各项临床病理特征的关系

临床参数	skp2 表达		P 值	C-myc 表达		P 值
	(-)	(+)		(-)	(+)	
总病例	32	16		20	28	
性别			0.829			0.408
男	21	11		12	20	
女	11	5	8	8		
年龄(岁)			0.322			0.678
>45	18	10		10	18	
≤45	14	6	10	10		
分化程度			<0.001			<0.001
高	15	0		13	2	
中	12	4		6	10	
低	5	12	1	16		
转移			0.017			0.023
有	7	9		3	13	
无	25	7	17	15		
直径(cm)			0.058			0.007
≤5	15	3		12	6	
>5	17	13	8	22		
HBsAg			1.000			0.875
(+)	22	11		14	19	
(-)	10	5	6	9		
肝硬化			0.831			0.959
有	21	10		13	18	
无	11	6	7	10		
AFP 水平			0.509			0.636
(-)	11	4		7	8	
(+)	21	12	13	20		

表2 肝癌组织中 skp2 与 C-myc 的表达的关系

C-myc	skp2 表达		总计	P 值
	(-)	(+)		
阴性	19	1	20	<0.001
阳性	13	15	28	
总计	32	16	48	

3 讨论

泛素-蛋白酶体途径控制着细胞中大量细胞周期相关蛋白,通过对这些关键点调节蛋白的控制来监控细胞周期的稳定性。大量证据表明,泛素-蛋白酶体途径的异常在肿瘤的形成过程中起着关键作用。该途径的酶由 E1(泛素蛋白激活酶),E2(泛素蛋白结合酶),E3(泛素蛋白连接酶)组成,其中 E3 起底物接触连接功能,决定着泛素-蛋白酶体途径结合底物的特异性。Cullin 依赖性泛素连接酶是 E3 中的一个大家族,其中 Cullin1 是哺乳动物 Cullin 家族中的最有代表性的一员,是通常称为 SCF 复合物(skp1-cullin-F box 蛋白)的多蛋白泛素连接酶。其中 F-box 蛋白是

蛋白质间特异性相互作用的位点。

skp2 是新发现的 SCF 复合物中的一种 F-box 蛋白,它因能特异性地和 p27^{kip} 连接而使之发生泛素依赖性降解^[5],而 p27^{kip} 蛋白是作为公认的细胞周期负性调节蛋白,对 G1~S 期转换具有显著的抑制作用。由于 p27^{kip} 的降解而导致细胞周期紊乱,恶性增殖。

本研究表明,skp2 在肝细胞肝癌中的表达率为 33.3%(16/48),远远高于肝硬化组织(阴性表达)和正常肝组织(阴性表达)。skp2 在高分化的肝细胞肝癌中亦未见表达,在中、低分化的肝细胞肝癌中表达明显增高,有转移的肝细胞肝癌中的表达率也显著增加。这提示 skp2 主要与生物恶性行为较高的肝细胞肝癌的发生发展有密切关系。本研究与 Koga 等^[6]的研究基本吻合。由于 skp2 的表达特异性,故对于 skp2 的检测可能成为判断肝细胞肝癌预后的一个指标,也是中低度分化肝细胞肝癌的一个治疗靶位点。

C-myc 是一种核蛋白转录因子,能与特异性 DNA 结合,并对一系列基因启动子序列的活性具有调节作用。这种核蛋白在细胞周期、细胞分化、细胞程序化死亡以及细胞的恶性化过程中都有十分重要的调节作用。C-myc 的激活可能使血管平滑肌细胞过度增殖,导致自体移植静脉术后再狭窄^[7]。此外,其表达增高常与肿瘤的恶性程度相关。李华等^[8]研究表明,C-myc 是肝癌根治性切除术后的主要预后影响因素之一。本研究显示,C-myc 在正常肝组织中无表达,在肝硬化组织中的表达率为 15%(3/20),肝细胞肝癌中的表达率为 58.3%(28/48),而且在细胞分化差、有转移、肿瘤直径 >5 cm 的肝细胞肝癌中增高明显。这提示 C-myc 基因突变与肝细胞肝癌的发生发展有密切关系。C-myc 基因的异常表达可能与肝细胞肝癌的预后有直接的关系。

研究表明,C-myc 可能直接激活泛素连接酶 SCF-skp2 的 Cullin 基因的表达,而导致 skp2 的表达增高^[2]。迄今在肝癌的研究中尚未见报道。本研究发现在 28 例 C-myc 阳性表达的标本中,skp2 有 15 例高表达,20 例 C-myc 阴性表达的标本中,skp2 有 19 例阴性表达,经相关分析表明 C-myc 与 skp2 的表达呈显著正相关。此结果证实在肝细胞肝癌中也存在这种机制。此外,可能是 C-myc 的突变导致了 skp2 的高表达,从而对 p27^{kip1} 过度降解,导致细胞周期失控,发生恶性增殖。

本文提示, C-myc 可能对 *skp2* 的表达起正性调节作用, C-myc 可能与肝细胞肝癌的发生发展有关。 *skp2* 的表达提示预后不良, 它可能成为一个治疗中、低分化肝细胞肝癌的一个靶位点。

参考文献:

- [1] Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, *et al.* Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit *skp2* in human breast cancer [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(5):633-641.
- [2] O'Hagan RC, Ohh M, David G, *et al.* Myc-enhanced expression of Cull1 in promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression [J]. *Genes*, 2000, 14(17):2185-2197.
- [3] Oliveira AM, Okuno SH, Nascimento AG, *et al.* Skp2 protein expression in soft tissue sarcomas [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(4):722-727.

- [4] Korshunov A, SavostiRova M, Ozerov S. Immunohistochemical markers for prognosis of average risk pediatric medulloblastomas. The effect of apoptotic index, TrkC, and C-myc expression [J]. *J Neurooncol*, 2002, 58(3):271-279.
- [5] Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, *et al.* The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF (*skp2*)-mediated ubiquitinylation of p27 [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(3):321-324.
- [6] Koga H, Harada M, Ohtsubo M, *et al.* Troglitazone induces p27^{kip1}-associated cell-cycle arrest through down-regulating *skp2* in human hepatoma cells [J]. *Hepatology*, 2003, 37(5):1086-96.
- [7] 刘喜才, 宋清斌, 张灿刚, 等. ET-1, C-myc 在自体静脉移植血管内膜增殖表达意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(7):542-543.
- [8] 李华, 潘承恩, 刘青光, 等. 肝细胞癌根治性切除术后预后影响因素分析 [J]. *中国普通外科杂志*, 2000, 9(1):55-58.

文章编号:1005-6947(2006)01-0048-01

· 病例报告 ·

Castleman 病 2 例

孙华君, 王云慧

(山东省烟台市毓璜顶医院 普通外科, 山东 烟台 264000)

关键词:淋巴瘤,滤泡型; 病例报告

中图分类号:R733.4

文献标识码:D

1 病例报告

例1 女, 14岁。发现左颈部无痛性肿块2个月入院。肿块位于左侧胸锁乳突肌中段深层, 约6cm×5cm×3cm大, 边界清, 不活动, 质地中等, 无压痛, B超示左颈内静脉外侧可见6cm×5cm×3cm大小的肿物, 界限清楚, 考虑肿大淋巴结。手术切除肿块, 切面呈灰红色, 包膜完整, 病理报告为Castleman病, 随访3年无复发。

例2 女, 28岁。产后180d腹胀发现腹部包块1个月入院。患者腹胀呈渐进性加重, 腹部包块亦逐渐增大, 延及全腹, 腹腔内未发现游离液体。CT示肝脾增大, 腹膜后多发肿大淋巴结并融合, 考虑淋巴瘤, 增强CT仍提示淋巴瘤的可能。因患者全身浅表淋巴结未

见肿大, 行剖腹探查。术中发现肝脾增大, 质地软, 第一肝门处见2枚5cm×2cm×2cm肿块, 边界清, 整个小肠系膜呈肿瘤样表现。切除肝门处2枚肿物, 切取小肠系膜3cm×2cm×2cm大的组织送检, 切面均呈灰红色, 病理报告为Castleman病。经肾上腺皮质激素治疗后腹部包块明显缩小, 腹胀消失。随访半年至今上述症状未见反复。

2 讨论

Castleman病首先由Castleman于1954年报告, 1956年命名。又称血管滤泡性淋巴结组织增生症或巨大淋巴结病、血管瘤样淋巴错构瘤等, 是罕见的淋巴组织极度增生性疾病, 临床分为局灶型(LCD)和多中心型(MCD), 组织学分为透明血管(HV)型、浆细胞(PC)型、混合(Mixed)型。局灶型好发于青少年, 病理学以透明血管型多见, 占约90%, 多以无痛性淋巴结肿大就诊。肿大的淋巴可发生于任何部位, 以纵隔、颈部、腋下、腹

部等处好发, 结外组织病变较少, 可单发或多个聚发, 部分融合, 淋巴结肿大明显时可出现局部压迫症状。多中心型发病高峰50~60岁, 女性多见, 病理学主要为浆细胞型和混合型, 少于10%。临床表现为分散的肿大淋巴结, 常伴全身症状如发热、贫血、消瘦等。体格检查多有肝脾肿大。实验室检查可有贫血、血沉加快, γ-球蛋白增高、高免疫球蛋白血症、血小板减少、肝功能异常等, 常被误诊。本组病例中例1为局灶型, 例2为多中心型。LCD的首选治疗是手术切除, 有手术禁忌证的可选用局部小剂量放射治疗。MCD需行全身化疗, 可单用皮质激素或小剂量美法仑合用, 也可试用COP方案, 但疗效不肯定。对激素治疗无效者应用干扰素或大剂量丙种球蛋白可取得良好疗效。LCD预后较好。MCD预后一般不良, 特别是PC型, 大多在数月或数年内合并感染、肾衰竭或转化为恶性淋巴瘤、Kaposi肉瘤或其他癌肿而死亡。

收稿日期:2005-09-17。

作者简介:孙华君(1961-), 男, 山东烟台人, 山东省烟台市毓璜顶医院副主任医师, 主要从事消化道肿瘤方面的研究。

通讯作者:王云慧 电话:1358352533 (手机); E-mail:Yunhui68@sinacom。