

文章编号:1005-6947(2007)03-0284-04

· 简要论著 ·

原发性肝细胞癌中 PTTG, p27 及 SKP 2 蛋白的表达及其临床意义

潘凯华, 王群伟

(中南大学湘雅二医院 普通外科, 湖南 长沙 410011)

摘要:采用免疫组化法检测 PTTG, p27 及 SKP 2 蛋白在 50 例 HCC 和 16 例正常肝组织中的表达。结果显示:(1)PTTG, p27 及 SKP 2 在 HCC 中的阳性表达率分别为 72.0%, 36% 和 56.0%, 在正常肝组织中阳性率分别为 6.3%, 93.8% 和 12.5%; 三者的表达在两种组织间差异有显著性 ($P < 0.01$)。(2)PTTG 表达与大体形态、有无转移有关 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。p27 表达与肿瘤病理分级、肿块大小、术前 SHCSP 阳性、肝内外转移、门静脉癌栓有关 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。SKP 2 表达与肿瘤病理分级、肿块大小、大体形态及肝内外转移有关 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。三者表达与年龄、肿瘤病理类型、AFP、有无乙肝或肝硬化无关 ($P > 0.05$)。(3)PTTG 及 SKP 2 与 p27 表达呈负相关 ($r = -0.218$ 和 $-0.659, P < 0.05$)。提示,(1)PTTG 蛋白在 HCC 中的高频率过度表达表明其基因激活可能是人肝组织癌变过程中的重要因素之一。(2)SKP 2 表达上调可促进 HCC 的发生发展。(3)PTTG 和 SKP 2 与 p27 的低表达有关;p27 的低表达可能与 HCC 的发生发展有关。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(3):284-287]

关键词: 癌, 肝细胞; 垂体肿瘤转化基因; 抑癌基因 p27; S 期激酶相关蛋白; 免疫组织化学

中图分类号: R735.7

文献标识码: B

近年来,发现几乎所有癌基因、抑癌基因都直接或间接地参与细胞周期调控。它们的异常表达可导致细胞周期调节失控,使细胞增殖过多,凋亡过少,甚至导致肿瘤发生^[1]。垂体肿瘤转化基因(PTTG), p27 和 S 期相关蛋白 2 (SKP 2) 在原发性肝细胞癌(HCC)中表达有单个因素的研究报道,对于三者共同在原发性 HCC 中的表达及其相关性尚未见报道。本研究旨在进一步探讨 p27, PTTG 和 SKP 2 在肝癌组织中的表达及其与临床病理参数之间的关系,并对三者之间的相关性作一研究。

1 资料与方法

1.1 标本及相关性资料

1.1.1 HCC 组 收集我院肝胆胰外科 2002 年 6 月—2004 年 12 月手术切除并经病理证实为

HCC 者。男 46 例,女 4 例;年龄 20 ~ 73 (平均 47.4 ± 14.0) 岁;病理学类型、组织学分化程度、是否有乙肝、术前血清肝癌特异性蛋白(SHCSP)、术前甲胎蛋白(AFP)定性定量测定、有无肝硬化^[2]、肝内外有无转移、大体形态及肿块主发部位等资料见表 1。本组病例术前未行放疗或化疗。所有癌肿均顺利切除,切除标本均取癌组织。

1.1.2 对照组 男 12 例,女 4 例;年龄 22 ~ 45 岁 (平均 33.2 ± 8.6) 岁。均为肝破裂患者经病理证实为正常肝组织。上述标本经 10% 福尔马林固定后常规制作石蜡包埋连续切片,切片厚 $4 \mu\text{m}$ 。

1.2 主要试剂

兔抗人 PTTG 多克隆抗体、鼠抗人 p27 单克隆抗体、鼠抗人 SKP 2 单克隆抗体、兔 SP Kit (SP-9001)、鼠 SP Kit (SP-9002)、DBA-HCl 显色试剂盒,以上试剂均购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 免疫组化

操作步骤按免疫组化试剂盒的说明进行。用试剂盒提供已知乳腺癌阳性切片作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作为阴性对照。

收稿日期:2006-06-15; 修订日期:2006-10-30。

作者简介:潘凯华,男,湖南长沙人,中南大学湘雅二医院普外科住院医师,主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通讯作者:潘凯华 E-mail:ligan_1218@163.com。

表 1 HCC 组织中 PTTG,p27 及 SKP 2 的表达与临床病理的关系

病理特征	分组	例数	PTTG(平均秩)	p27(平均秩)	SKP 2(平均秩)
病理分型	肝细胞癌	45	26.28	24.66	26.27
	混合型肝癌	5	18.50	33.10	18.60
分化程度	高分化	6	24.92	41.92 ²⁾	13.33
	中分化	22	24.50	24.27	24.45
	低分化	22	26.66	22.25	29.86
大体形态	巨块形	41	28.13 ¹⁾	23.68	27.89 ¹⁾
	结节形	9	13.50	33.78	17.17
肿块大小(cm)	≤5	6	18.33	37.92 ¹⁾	9.50 ²⁾
	>5	44	26.48	23.81	27.68
肝硬化	无-轻	22	25.25	28.75	26.83
	中-重	28	24.80	22.95	22.84
血清 SHCSP	阴性	31	24.83	29.85 ²⁾	28.36
	阳性	19	28.14	18.39	21.50
转移	无	17	18.65 ¹⁾	31.15 ¹⁾	19.211)
	有	33	29.03	22.59	28.74
癌栓	无	29	22.53	31.22 ²⁾	23.39
	有	21	29.60	17.60	27.45
年龄(岁)	≤45	22	26.18	23.73	22.52
	>45	28	24.96	26.89	26.17
AFP	阴性	8	24.50	31.75	15.63 ¹⁾
	阳性	42	24.98	23.83	26.27
乙肝	阴性	7	25.71	30.36	22.43
	阳性	43	25.47	24.71	24.85

注:同一病理特征的组间比较,1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

1.4 结果判断

双盲法阅片。凡细胞中出现明显的棕黄色颗粒为阳性细胞。评分方法:将染色强度评分(无为0分;弱为1分;中为2分;强为3分)和阳性细胞率评分(<5%为0分;5%~10%为1分;11~20%为2分;21%~50%为3分;>50%为4分)之和为该切片评分值。设定评分1~2为阴性,>2为阳性^[3]。

1.5 统计学处理

采用 χ^2 检验及 Spearman 等级相关分析。统计由 SPSS13.0 统计软件完成。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PTTG 蛋白在 HCC 和正常肝组织中的表达

PTTG 阳性反应物质为棕黄色颗粒,阳性主要分布于细胞浆,呈弥漫性全浆分布,有的呈包涵体状。PTTG 阳性细胞在癌组织中呈弥漫性、小巢

状或散在分布(图1-2)。PTTG 在 HCC 中阳性表达率显著高于正常肝组织,差异有显著性 ($P < 0.01$)(表2)。

表 2 PTTG 在两种组织中的表达情况

分组	例数	阳性数	阳性率(%)	评分($\bar{x} \pm s$)
癌组织	50	36	72.0	3.18 ± 1.89
正常组织	16	1	6.3	0.69 ± 1.08
P 值			<0.01	<0.01

2.2 p27 蛋白在 HCC 和正常肝组织中的表达

p27 阳性反应物质为棕黄色颗粒,分布于细胞质和细胞核中,主要定位于胞核(图3-4)。定位于胞核者主要见于正常肝组织;定位于胞浆者主要见于 HCC 组织。HCC 组织阳性率显著低于正常肝组织,差异有显著性 ($P < 0.01$)(表3)。

表 3 p27 在两种组织中的表达情况

分组	例数	阳性数	阳性率(%)	评分($\bar{x} \pm s$)
癌组织	50	18	36.0	2.02 ± 1.68
正常组织	16	15	93.8	4.44 ± 1.21
P 值			<0.01	<0.01

2.3 SKP 2 蛋白在 HCC 和正常肝组织中的表达

SKP 2 阳性反应物质为棕黄色颗粒,在细胞质和/或细胞核中均可见,而只在胞浆出现棕黄色颗粒为非特异性染色(图5-6)。肝癌组织 SKP 2 的阳性表达率显著高于正常肝组织,差异显著性 ($P < 0.01$)(表4)。

表 4 SKP 2 在两种组织中的表达情况

组织	例数	阳性数	阳性率(%)	评分($\bar{x} \pm s$)
癌组织	50	28	56.0	2.48 ± 2.16
正常组织	16	2	12.5	0.69 ± 1.45
P 值			<0.01	<0.01

2.4 PTTG,p27 和 SKP 2 蛋白表达与 HCC 临床病理参数的关系

HCC 组织中 PTTG 蛋白阳性强度与 HCC 的年龄、病理类型、组织学分级、有无乙肝、术前血清 SHCSP 水平、AFP、有无肝硬化、肿块大小及有无门静脉癌栓无关 ($P > 0.05$),而与肿块大体形态、有无转移相关;巨块形、有肝内或肝外转移者 PTTG 表达增强。p27 蛋白在 HCC 中的表达与年龄、病理类型、有无乙肝、AFP、有无肝硬化、大体形态无关 ($P > 0.05$),而与组织学分级、术前血清 SHCSP、有无肝内或肝外转移、肿块大小及有无门静脉癌栓有关;高分化、SHCSP 阴性、无肝内或

肝外转移、肿块直径 ≤ 5 cm 和无门静脉癌栓的癌肿 p27 表达增强。SKP 2 蛋白在 HCC 的表达与患者年龄、病理类型、有无乙肝、术前血清 SHCSP、AFP、有无肝硬化及有无门静脉癌栓无关 ($P > 0.05$), 而与组织学分级、肝内或肝外有无转移、肿块大体形态和肿块大小有关; 中低分化、有肝内或肝外转移、肿块直径 > 5 cm 的巨块形肝癌

SKP 2 表达增强(表 1)。

2.5 PTTG, p27 和 SKP 2 三者之间蛋白表达相关性

结果显示, PTTG 与 p27 表达呈负相关 ($r = -0.218, P < 0.05$), SKP 2 与 p27 表达呈高度密切负相关 ($r = -0.659, P < 0.01$), PTTG 与 SKP 2 之间无明显相关性 ($r = 0.205, P > 0.05$)。

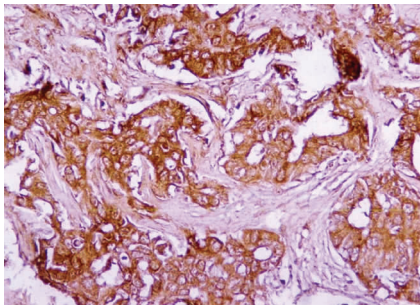


图1 高分化肝细胞癌, PTTG 阳性表达, 评分6分(S-P $\times 200$)

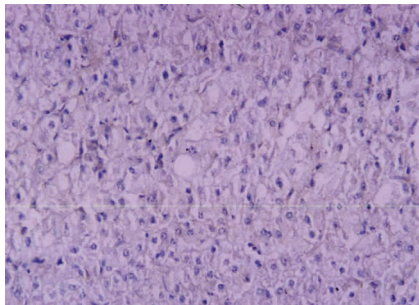


图2 正常肝组织, PTTG 阴性表达, 评分0分(S-P $\times 200$)

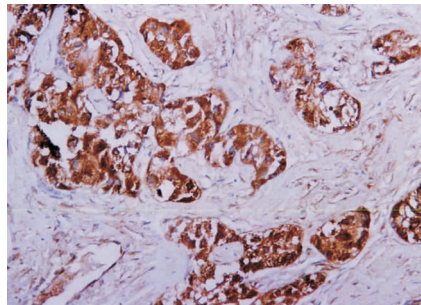


图3 高分化肝细胞癌, p27 阳性表达, 评分5分(S-P $\times 200$)

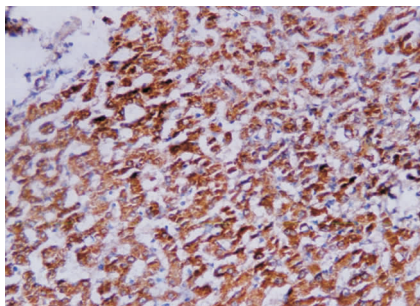


图4 正常肝组织, p27 阳性表达, 评分6分(S-P $\times 200$)

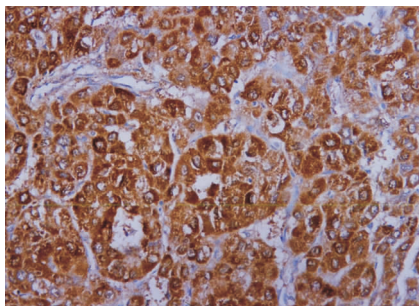


图5 低分化肝细胞癌, SKP 2 阳性表达, 评分6分(S-P $\times 200$)

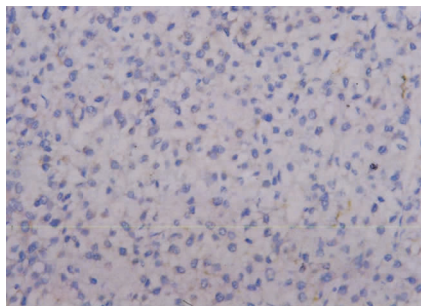


图6 正常肝组织, SKP 2 阴性表达, 评分0分(S-P $\times 200$)

3 讨论

肿瘤组织的一个显著特征是细胞失控性生长, 其发生、发展与肿瘤细胞有丝分裂的分子调控密切相关。而细胞周期的调控是一个极其复杂的过程, 涉及到多因子多层次上的作用, 其中有两个主要调控点: 一个处于 G_1/S 转折点, 另一个处于 G_2/M 转折点。

PTTG 是 Pei 等^[4] 在 1997 年发现的垂体瘤转化基因, 该基因位于 5 号染色体长臂 5q33, 基因全长超过 10kb, 含有 5 个外显子和 4 个内含子。PTTG 作为一种强有力的肿瘤转化基因, 可通过多种机制参与肿瘤的形成与发展: 阻止姐妹染色体分离; 诱导细胞转化; 促进其他原癌基因及促癌因子的表达; 促进 b-FGF 参与的肿瘤血管生成^[5]。p27 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中重要的一员。该基因定位于染色体 12p12

及 12p13.1 交界的 12p13 处, 至少有 2 个外显子和 1 个内含子, p27 编码的是一种分子量为 27kD 的热稳定蛋白, 这种蛋白质在体外以化学剂量方式与细胞周期蛋白复合物结合, 抑制其激酶活性, 使细胞停滞于 G_1 期。p27 表达调节主要在翻译水平后, 即泛素-蛋白水解酶途径介导的 p27 蛋白降解^[6]。此外磷酸化也是 p27 降解的机制。SKP 2 基因是 1995 年由 Demetrick 等^[7] 发现, 其与细胞周期调控密切相关。定位于 5p13, 编码的蛋白质由 436 个氨基酸组成, 分子质量约 47kD。目前认为 SKP 2 表达受转录及转录后水平双重调节, 它通过对 CDKI 的泛素化及降解而促进细胞周期 G_1/S 期转换及 S 期的发展。

本实验中 PTTG 蛋白在 HCC 中阳性表达率为 72.0%, 显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)。高频率过度表达表明 PTTG 蛋白在人肝组织癌变过程中可能起重要作用, 这与金中元等研究结果相

符^[8]。笔者还发现,PTTG 蛋白阳性表达的强度与肿瘤大体形态、是否有肝内外转移相关($P < 0.05$),而与 HCC 患者的年龄、病理类型、组织学分级、有无乙肝、术前血清 SHCSP 水平、AFP、有无肝硬化、肿块大小、有无门静脉癌栓与 PTTG 表达无关($P > 0.05$);巨块形、有肝内或肝外转移者 PTTG 表达较强,这与 Shibata 等^[9]的研究结果基本相符。因此,PTTG 不仅在 HCC 中高表达,而且与 HCC 的发展有着密切的关系。

本实验中 HCC 组 p27 蛋白阳性表达率显著低于正常对照组($P < 0.01$),这与 Ito 等^[10]的研究结果一致。实验中 p27 蛋白在 HCC 组的表达与年龄、病理类型、有无乙肝、AFP、有无肝硬化、大体形态无关($P > 0.05$),而与组织学分级、术前血清 SHCSP、有无肝内或肝外转移、肿块大小、有无门静脉癌栓有关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);高分化、SHCSP 阴性、无肝内外转移、肿块直径 $\leq 5\text{cm}$ 和无门静脉癌栓的癌肿 p27 表达较强,提示 p27 与肝癌的发生、发展关系密切。

本实验 HCC 组 SKP 2 蛋白阳性表达率显著高于正常肝组织组,差异显著性($P < 0.01$)。表明 SKP 2 参与了肝组织的恶性转化过程。SKP 2 蛋白在 HCC 的表达与患者年龄、病理类型、有无乙肝、术前血清 SHCSP、AFP、有无肝硬化、有无门静脉癌栓无关($P > 0.05$),而与组织学分级、肝内外有无转移、肿块大体形态和肿块大小有关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);中低分化、有肝内外转移、肿块直径 $> 5\text{cm}$ 的巨块形肝癌 SKP 2 表达较强。提示该基因表达上调可能与 HCC 的恶性程度和侵袭转移能力密切相关。此结果与 Koga 等^[11]的研究基本吻合。由于 SKP 2 表达的特异性,故对于 SKP 2 的检测可望作为中、低分化 HCC 的一个治疗靶点。

经相关性分析表明,HCC 中 PTTG 与 p27 呈负相关($r = -0.289$, $P = 0.042$)。c-myc 癌基因是 PTTG 主要靶基因,PTTG 激活 c-myc 基因,过度表达的 c-myc 蛋白刺激细胞周期进程、引起细胞转化、阻碍分化和诱导有丝分裂。在 p27 高水平表达时 c-myc 又能转录表达,促使 cyclinE-CDK2 起作用而对抗 p27 诱导的生长阻断^[12]。形成 PTTG 激活 c-myc,对抗 p27 负性调节细胞增生的作用,导致肿瘤细胞过度增殖。SKP 2 与 p27 呈明显负相关($r = -0.659$, $P = 0.000$)。SKP 2 通过作用靶蛋白 cyclin 和 CDKs 等泛素化调节细胞周期。目前较公认的靶物质是 p27 蛋白;p27 是细胞周期负性调节因子,细胞由静止状态进入

增殖状态需 p27 的降解。而 SKP 2 在 p27 降解过程中发挥了重要作用。Carrano 等^[13]认为 SKP 2 是泛素介导 p27 降解所必需,泛素连接酶复合体通过 SKP 2 的 F-box 特异识别结合 cyclin-CDK2 复合体,后者使 p27 的 187 位苏氨酸磷酸化;SKP 2 特异识别磷酸化的 p27,使其通过泛素蛋白酶体途径降解。至于 PTTG 与 SKP 2 之间关系,本资料表明无明显相关性($r = 0.205$, $P > 0.05$)。这可能与两者作用机制不同有关。

迄今,HCC 的治疗仍面临许多困难,而基因治疗提供了一个很有前景的方向。因此,研究如何改良 PTTG 和 SKP 2 的作用,激活 p27 等抑癌基因的功能,将为 HCC 的基因治疗提供一条有效的途径。

参考文献:

- [1] Jacks T, Weinberg RA. Cell cycle control and its watchman [J]. *Nature*, 1996, 381(6584):643-644.
- [2] 武忠弼,杨光华. 中华外科病理学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2002. 816-859.
- [3] Williams RJ, Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, inhibits hypoxia-induced angiogenesis [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001, 10(8):1571-1573.
- [4] Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG) [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11(9):433-441.
- [5] Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, et al. Human pituitary tumor transforming gene induces angiogenesis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(14):867-874.
- [6] Nakayama Kei-Ichi, Hatakeyama S, Nakayama K, et al. Regulation of the cell cyclin at the G1-S transition by proteolysis of cyclinE and p27kip1 [J]. *Biochem Biophys*, 2001, 282(4):853-860.
- [7] Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH, et al. Chromosomal mapping of the genes for the human CDK2/cyclinA-associated proteins p19(SKP1A and SKP1B) and p45(SKP2) [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 73(1-2):104-107.
- [8] 金中元,郑长黎,郑晖. PTTG 蛋白和 c-myc 蛋白在原发性肝细胞癌中的表达 [J]. *中国现代医学杂志*, 2002, 17(12):11-13.
- [9] Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, et al. Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2002, 32(21):233-237.
- [10] Ito Y, Matsuura N, Sakon M, et al. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predict the recurrence [J]. *Hepatology*, 1999, 30(1):90-99.
- [11] Koga H, Harada M, Ohtsubo M, et al. Troglitazone induces p27kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulating SKP 2 in human hepatoma cells [J]. *Hepatology*, 2003, 37(5):1086-1092.
- [12] Yatabe Y, Masuda A, Koshikawa T, et al. p27kip1 in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(5):1042-1047.
- [13] Carrano AC, Eytan E, Hershko A, et al. SKP 2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27 [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(4)193-199.