



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.014
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.014
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(7):1017-1022.

· 基础研究 ·

细胞分裂周期蛋白 6 在肝细胞癌中的表达及其临床意义

吕波^{1,2}, 李明杰¹, 郑小林¹, 蔡常春¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院 肝胆胰外科, 湖北 武汉 430014; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院 普通外科, 上海 200025)

摘要

目的: 探讨细胞分裂周期蛋白 6 (CDC6) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达及其临床意义。

方法: 分别用 qRT-PCR、Western blot 和免疫组化法检测 85 例手术切除的 HCC 及对应癌旁组织标本中 CDC6 mRNA 及蛋白的表达, 分析 CDC6 的表达与 HCC 患者临床病理因素及预后关系。

结果: HCC 组织中 CDC6 的 mRNA 与蛋白表达水平均高于对应癌旁组织, qRT-PCR 结果定量分析显示差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CDC6 表达与肿瘤大小、临床分期、分化程度及卫星结节有关 (均 $P < 0.05$); CDC6 高表达的患者无瘤生存时间和总生存时间均低于 CDC6 低表达患者 (均 $P < 0.05$); 单因素与多因素分析显示, CDC6 是影响 HCC 患者无瘤生存率 ($HR=1.089$, $95\% CI=0.986\sim 1.186$, $P=0.033$) 及总生存率 ($HR=2.441$, $95\% CI=1.128\sim 3.652$, $P=0.012$) 的独立危险因素。

结论: CDC6 在 HCC 组织中高表达并与恶性临床病理特征及不良预后密切相关, CDC6 可能参与 HCC 发生及进展, 并可作为判断肿瘤复发及预后评价的重要指标。

关键词

癌, 肝细胞; 细胞分裂周期蛋白质类; 预后

中图分类号: R735.7

Expression of cell division cycle 6 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

LU Bo^{1,2}, LI Mingjie¹, ZHENG Xiaolin¹, CAI Changchun¹

(1. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Wuhan Central Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China; 2. Department of General Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University Shanghai 200025, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of cell division cycle 6 (CDC6) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its clinical significance.

Methods: The mRNA and protein expressions of CDC6 in 85 surgical specimens of HCC tissue and matched adjacent tissue were determined by qRT-PCR, Western blot analysis and immunohistochemical staining, respectively. The relations of CDC6 expression with clinicopathologic characteristics and prognosis of HCC patients were analyzed.

Results: Both mRNA and protein expression levels of CDC6 were increased in HCC tissue compared with adjacent tissue, and quantitative analysis of qRT-PCR results showed that the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The CDC6 expression was significantly related to tumor size, clinical stage, degree of differentiation and

收稿日期: 2016-01-31; 修订日期: 2016-06-06。

作者简介: 吕波, 华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院住院医师, 主要从事肝胆疾病基础与临床方面的研究。

通信作者: 吕波, Email: lubbo@hotmail.com

satellite lesions (all $P < 0.05$). Both tumor-free survival rate and overall survival rate in patients with high CDC6 expression were significantly lower than those in patients with low CDC6 expression (both $P < 0.05$), and both univariate and multivariate analyses showed that CDC6 was an independently risk factor for tumor-free survival rate ($HR = 1.089$, 95% $CI = 0.986 - 1.186$, $P = 0.033$) and overall survival rate ($HR = 2.441$, 95% $CI = 1.128 - 3.652$, $P = 0.012$) in HCC patients.

Conclusion: CDC6 is highly expressed in HCC tissue, and is closely related to malignant clinicopathologic features and poor prognosis. CDC6 may contribute to the occurrence and development of HCC, and may be used as an index for estimating tumor recurrence and outcomes.

Key words Carcinoma, Hepatocellular; Cell Cycle Proteins; Prognosis

CLC number: R735.7

肝癌是常见恶性肿瘤之一，其中肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）占有原发性肝癌数量的90%^[1-2]。每年大约有60万人死于HCC，使其成为世界范围内第三大致死性肿瘤^[3]。目前，导致HCC的具体分子机制仍不清楚，研究HCC发生发展机制及其探索新的诊断及预后评价指标对指导患者的治疗和改善生存状况具有重要意义。细胞分裂周期蛋白6（cell division cycle 6, CDC6）是一个细胞周期中启动DNA复制的重要调控因子，通过招募复制起始识别复合物（prereplication complexes, pre-RCs）参与调节细胞分裂^[4]。近年来有报道揭示，CDC6在人类多种恶性肿瘤中发挥重要作用，如脑肿瘤^[5]，肺癌^[6-7]，膀胱癌^[8]，卵巢癌^[9]和前列腺癌^[10]。提示CDC6参与肿瘤的发生发展，但CDC6在HCC中的表达情况及其临床意义尚未见报道。本研究检测了CDC6在HCC及对应癌旁组织中的表达情况，分析CDC6表达水平与HCC临床病理因素间的关系及其对HCC患者预后的影响。以期为HCC的发生机制及预后评估提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2007年1月—2012年12月期间于上海瑞金医院及武汉市中心医院手术切除的HCC及对应癌旁组织病理标本85例。入选标准：(1) 病理证实为HCC；(2) 随访资料齐全；(3) 临床病理资料齐全。剔除标准：(1) 随访资料不全者；(2) 临床病理资料不全者。所用病例随访至2015年6月，肝癌组织及对应癌旁组织标本手术切除后迅速进行多点取材，分别置于液氮或4%多聚甲醛固定并石蜡

包埋保存备用。85例样本采用qRT-PCR方法分别分析HCC组织与癌旁组织中CDC6 mRNA表达，行Western blot和免疫组化检测CDC6蛋白表达。

1.2 主要试剂

TRIzol总RNA提取试剂，cDNA反转录试剂盒，qRT-PCR试剂盒SYBR prime script均购自Takara公司；CDC6及 β -actin qPCR引物由深圳华大基因生物科技有限公司合成；鼠抗人CDC6单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记兔抗小鼠二抗均购自美国Abcam公司；免疫组化试剂盒购于上海泽迈生物技术有限公司。

1.3 qRT-PCR

取适量液氮冻存的组织标本于研钵中研磨后加入1 mL TRIzol提取试剂提取癌及癌旁组织总RNA，按cDNA反转录说明书分别将1 μ g总mRNA反转成cDNA。引物序列：CDC6上游引物5'-GGG AAT CAG AGG CTC AGA AG-3'，下游引物5'-CAC TGG ATG TTT GCA GGA GA-3'； β -actin上游引物5'-TCA TAC TCC TGC TTG CTG AT-3'，下游引物5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3'，按qRT-PCR说明书要求配制反应体系进行PCR扩增反应。以 β -actin基因为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算CDC6 mRNA在HCC及癌旁组织中的相对表达量。

1.4 Western blot

取冻存组织样本经液氮研磨后提取总蛋白并测定蛋白浓度，取相同质量的蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）后转印至PVDF膜，用5%脱脂奶粉封闭2 h，4 $^{\circ}$ C过夜孵育CDC6（1:500）一抗，0.5% TBST洗膜三次，室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗（1:1 000）1 h，0.5% TBST洗膜3次后用ECL化学发光法检测。

1.5 免疫组化

取石蜡组织标本制作成4 μm厚度组织切片,免疫组化具体步骤按试剂盒说明书进行,主要步骤包括如下:石蜡切片经脱蜡、水化、抗原修复、过氧化物酶阻断及动物血清封闭后,加入CDC6 (1:500) 抗体4 ℃孵育过夜。PBS洗涤后加入生物素标记的二抗室温孵育1 h, PBS洗涤后经DAB显色液显色,光镜下观察显色为棕色时停止显色,苏木素复染,中性树胶封片。每张切片于光学显微镜下观察并采集图像。

1.6 统计学处理

实验数据采用SPSS 13.0统计软件进行分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立t检验;计数资料采用 χ^2 检验;Kaplan-Meier

生存分析患者生存曲线,预后分析采用Cox回归模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 及 Western blot 检测 HCC 组织中 CDC6 的表达

qRT-PCR检测85例HCC组织及对应癌旁组织中CDC6 mRNA的表达结果发现,肝细胞癌组织中CDC6 mRNA表达量明显高于癌旁组织中CDC6的表达水平($P < 0.05$) (图1A)。Western blot检测CDC6蛋白表达水平也发现,HCC组织中CDC6蛋白表达量均高于对应癌旁组织(图1B),以上结果表明,CDC6在HCC中高表达。

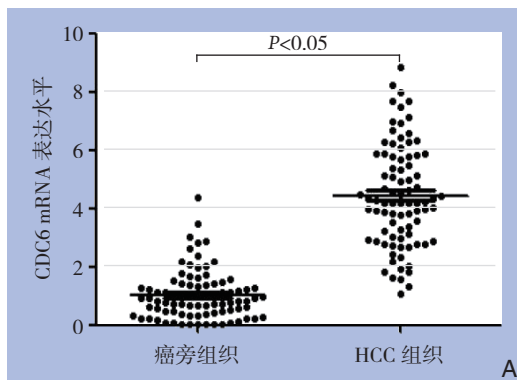
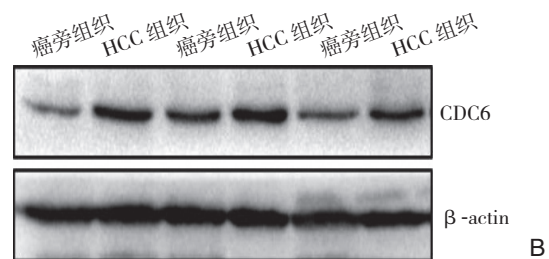


图1 CDC6 mRNA与蛋白表达检测



A: qRT-PCR 结果; B: Western blot 结果

Figure 1 Measurement of mRNA and protein expressions of CDC6

A: Results of qRT-PCR; B: Results of Western blot analysis

2.2 免疫组化检测 HCC 组织中 CDC6 的表达

HCC组织中CDC6染色强度明显高于对应癌旁正常肝组织。正常肝组织中CDC6主要分布于在细

胞质,极少数可在细胞核内观察到有表达,而在HCC组织中可观察到CDC6在胞浆与胞核强阳性表达(图2)。

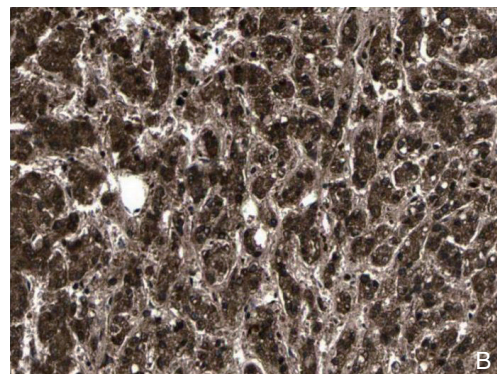
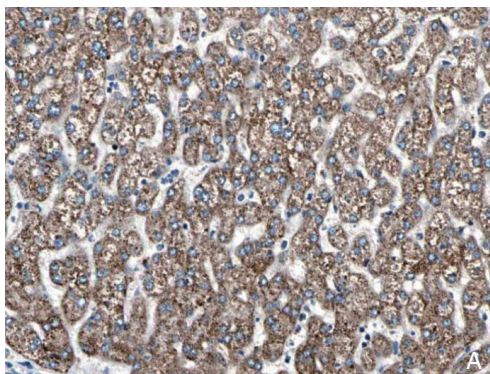


图2 免疫组化检测 CDC6 表达 (×200)

A: 癌旁组织; B: HCC 组织

Figure 2 Immunohistochemical staining for CDC6 expression (×200)

A: Tumor adjacent tissue; B: HCC tissue

2.3 CDC6 的表达水平与 HCC 患者临床病理因素的关系

通过计算HCC组织标本中的CDC6表达量的平均值，高于平均值的为CDC6高表达组（47例），低于平均值的为CDC6低表达组（38例），统计分析其与患者临床病理参数及预后间的关系。单因

素分析结果显示，HCC组织中CDC6基因表达水平与患者肿瘤大小、临床分期、分化程度及卫星结节等明显有关（均 $P<0.05$ ），而与患者性别、年龄、AFP、HbsAg、肝硬化程度及肿瘤胞膜完整性无关（均 $P>0.05$ ）（表1）。

表 1 CDC6 表达与 HCC 患者临床病理参数间关系 [n (%)]

Table 1 Relations of CDC6 expression with clinicopathologic factors of HCC patients [n (%)]

因素	CDC6 低表达 (n=38)	CDC6 高表达 (n=47)	P	因素	CDC6 低表达 (n=38)	CDC6 高表达 (n=47)	P
性别				临床分期			
男	15 (39.47)	26 (55.31)	0.535	I 期	28 (73.68)	15 (31.91)	0.037
女	23 (60.53)	21 (44.69)		II/III 期	10 (26.32)	32 (68.09)	
年龄 (岁)				分化程度			
≤ 50	16 (42.10)	20 (42.55)	0.966	高分化	25 (65.78)	14 (29.78)	0.023
> 50	22 (57.90)	27 (57.45)		中低分化	13 (34.22)	33 (70.22)	
血清 AFP (μg/L)				肿瘤大小 (cm)			
≤ 25	15 (39.47)	24 (51.06)	0.286	≤ 5	18 (47.36)	12 (25.53)	0.036
> 25	23 (60.53)	23 (48.94)		> 5	20 (52.64)	35 (74.47)	
肝硬化				肿瘤胞膜			
无或轻度	13 (34.21)	17 (36.17)	0.850	完整	17 (44.73)	14 (29.78)	0.154
中度或重度	25 (65.79)	30 (63.83)		不完整	21 (55.27)	33 (70.22)	
HbsAg				卫星结节			
阴性	8 (21.05)	16 (34.04)	0.185	有	10 (26.31)	34 (72.34)	<0.01
阳性	30 (78.95)	31 (65.96)		无	28 (73.69)	13 (27.66)	

2.4 CDC6 表达水平与 HCC 预后的关系

高表达CDC6患者的无瘤生存时间和总生存时间明显低于CDC6低表达组患者，低表达CDC6的患者获得更长的无瘤生存期和更长的生存时间（均 $P<0.05$ ）（图3）。影响肝细胞肝癌患者术后预后的单因素分析结果如表2所示。Cox多

因素风险回归模型分析发现，CDC6的表达可以作为判断HCC患者无瘤生存率（ $HR=1.089$ ， $95\% CI=0.986\sim 1.186$ ， $P=0.033$ ）以及总生存率（ $HR=2.441$ ， $95\% CI=1.128\sim 3.652$ ， $P=0.012$ ）的独立危险因素（表3）。

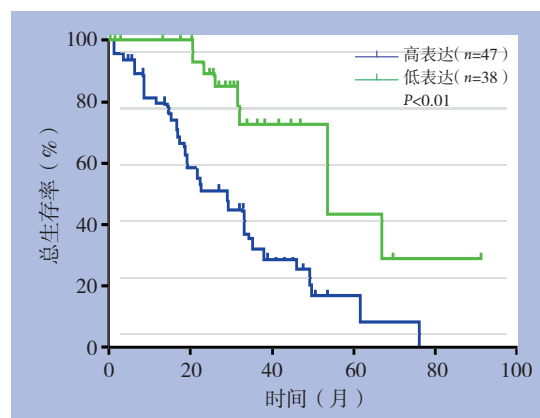
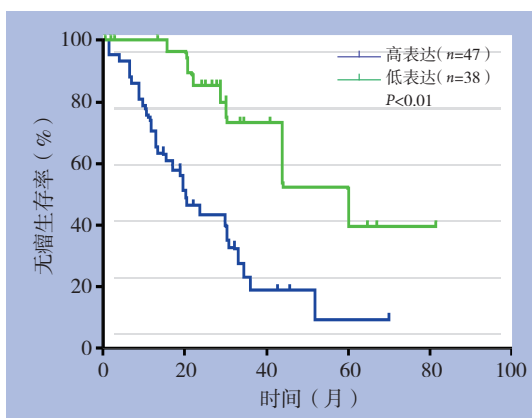


图 3 不同 CDC6 表达量 HCC 患者无瘤生存率及总生存率比较

Figure 3 Comparison of tumor-free survival rate and overall survival rate between HCC patients with different CDC6 expression levels

表2 影响HCC患者预后的单因素分析

Table 2 Univariate analysis of prognostic factors for HCC patients

因素	无瘤生存		总生存		因素	无瘤生存		总生存	
	中位生存期 (月)	P	中位生存期 (月)	P		中位生存期 (月)	P	中位生存期 (月)	P
性别					分化程度				
男	20.9	0.86	32.8	0.760	高	26.8	0.016	34.2	0.024
女	21.8		33.6		中低	10.6		12.1	
年龄(岁)					肿瘤大小(cm)				
≤50	22.8	0.64	31.8	0.550	≤5	24.6	0.168	32.5	0.231
>50	21.9		30.6		>5	22.4		31.6	
血清AFP(μg/L)					肿瘤胞膜				
≤25	21.6	0.68	32.1	0.960	完整	20.6	0.096	33.5	0.126
>25	18.3		26.7		不完整	19.9		32.4	
肝硬化					卫星结节				
无	21.8	0.046	36.4	0.043	有	11.6	0.039	16.3	0.046
有	17.3		22.9		无	26.3		38.9	
HbsAg					CDC6表达				
阴性	22.8	0.067	33.6	0.290	低表达	50.8	0.011	59.4	0.020
阳性	19.6		30.9		高表达	19.7		25.2	
临床分期									
I期	24.6	0.019	35.1	0.026					
II/III期	11.3		12.6						

表3 影响HCC患者预后的多因素分析

Table 3 Multivariate analysis of prognostic factors for HCC patients

因素	无瘤生存率		总生存率	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
临床分期(I vs. II/III)	1.023 (0.998~1.112)	0.031	2.13 (0.978~3.132)	0.095
分化程度(高 vs. 中低)	1.143 (1.027~1.281)	0.021	3.071 (0.981~4.189)	0.038
CDC6表达(高 vs. 低)	1.089 (0.986~1.186)	0.033	2.441 (1.128~3.652)	0.012

3 讨论

CDC6基因属于AAA+家族成员,在真核生物中高度保守,具有ATP酶活性,最初是在酿酒酵母突变筛选中被发现,温度敏感的CDC6突变酿酒酵母能阻止细胞G₁-S的转换^[11]。人的CDC6基因定位于17q21.3染色体,其表达受到S期转录因子E2F家族调控,在起始DNA复制中发挥重要作用^[12-13]。已有的研究^[5-7,10]发现CDC6在人恶性肿瘤广泛异常表达,如胶质瘤、肺癌、卵巢癌和前列腺癌。在胶质瘤中CDC6显著高表达,并可以作为判断脑肿瘤生长的重要指标^[5]。Allera-Moreau等^[7]在肺癌中发现,CDC6高表达于肺癌组织中,并与肺癌患者的无瘤生存期和总生存期均显著相关性,可以作为判断患者预后的重要指标。本研究首次报道了CDC6蛋白在HCC中的表达及其临床意义。本研究发现,与正常癌旁组织相比,HCC组织中CDC6显著升高,这与在其它肿瘤中的发现一致。发现

CDC6的表达与HCC的恶性病理特征如患者肿瘤大小、临床分期、分化程度及卫星结节、肿瘤包膜均显著相关,并且高表达CDC6的患者其无瘤生存时间和总生存时间均显著缩短,以上结果提示CDC6在HCC的发生发展中具有重要作用,其表达水平可以作为判断患者复发及预后的重要指标。

本研究发现,CDC6在HCC中高表达,并与恶性病理参数相关,表明CDC6在HCC发生过程中起着重要作用。CDC6在细胞周期中能够促进细胞由G₁期进入S期,促进细胞增殖。本研究结果显示:高表达CDC6与肿瘤大小显著相关,提示CDC6可能促进HCC细胞增殖。目前CDC6在肿瘤中的高表达的具体机制已有相关研究,有研究^[14-16]报道指出E2F, GATA1及PTEN可调控CDC6启动子活性及CDC6蛋白的表达。CDK的活性能够通过将CDC6结合到C1b2从而影响CDC6的转录、降解及入核过程^[17]。已有文献^[18]报道关于CDC6影响癌细胞增殖的文献,如在人神经细胞瘤细胞中敲

低CDC6的表达能够导致重要抑癌基因p53的表达从而影响细胞增殖。敲低CDC6的表达能够抑制Tca8113舌鳞状细胞癌细胞的增殖^[19]。Gonzalez等^[20]通过过表达CDC6发现能够直接抑制重要抑癌基因INK4/ARF的表达影响癌细胞的致瘤性。在本研究中有趣的发现是，CDC6在正常的组织标本中弱表达于细胞浆，极少数存在于细胞核，而在HCC组织标本中发现，CDC6不仅高表达于细胞浆，而且存在入核现象。CDC6在HCC中的具体功能及其机制有待进一步研究。

综上所述，CDC6在HCC组织中呈高表达状态，高表达CDC6与HCC恶性临床病理特征及不良预后密切相关。CDC6的表达可以作为判断HCC患者术后复发和不良预后的重要指标，其在HCC的发生发展过程的作用及具体机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, et al. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(8):436.
- [2] De Minicis S, Marco M, Benedetti A, 等. 肝细胞癌的新见解: 从实验到临床[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):1-9.
De Minicis S, Marco M, Benedetti A, et al. New insights in hepatocellular carcinoma: from bench to bedside[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(1):1-9.
- [3] Villanueva A, Minguez B, Forner A, et al. Hepatocellular carcinoma: novel molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2010, 61:317-328. doi: 10.1146/annurev.med.080608.100623.
- [4] Liu J, Smith CL, DeRyckere D, et al. Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(3):637-648.
- [5] Ohta S, Koide M, Tokuyama T, et al. Cdc6 expression as a marker of proliferative activity in brain tumors[J]. *Oncol Rep*, 2001, 8(5):1063-1066.
- [6] Zhang X, Xiao D, Wang Z, et al. MicroRNA-26a/b regulate DNA replication licensing, tumorigenesis, and prognosis by targeting CDC6 in lung cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(11):1535-1546.
- [7] Allera-Moreau C, Rouquette I, Lepage B, et al. DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients[J]. *Oncogenesis*, 2012, 1:e30. doi: 10.1038/oncsis.2012.29.
- [8] Chen S, Chen X, Xie G, et al. Cdc6 contributes to cisplatin-resistance by activation of ATR-Chk1 pathway in bladder cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016. [Epub ahead of print]
- [9] Sun TY, Xie HJ, He H, et al. miR-26a inhibits the proliferation of ovarian cancer cells via regulating CDC6 expression[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(2):1037-1046.
- [10] Liu Y, Gong Z, Sun L, et al. FOXM1 and androgen receptor co-regulate CDC6 gene transcription and DNA replication in prostate cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(4):297-305.
- [11] Gilquin B, Cannon BR, Hubstenberger A, et al. The calcium-dependent interaction between S100B and the mitochondrial AAA ATPase ATAD3A and the role of this complex in the cytoplasmic processing of ATAD3A[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(11):2724-2736.
- [12] Petrakis TG, Vougas K, Gorgoulis VG. Cdc6: a multi-functional molecular switch with critical role in carcinogenesis[J]. *Transcription*, 2012, 3(3):124-129.
- [13] Okayama H. Cdc6: a trifunctional AAA+ ATPase that plays a central role in controlling the G(1)-S transition and cell survival[J]. *J Biochem*, 2012, 152(4):297-303.
- [14] Williams RS, Shohet RV, Stillman B. A human protein related to yeast Cdc6p[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(1):142-147.
- [15] Fernández-Morales B, Pavón L, Calés C. CDC6 expression is regulated by lineage-specific transcription factor GATA1[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(16):3055-3066.
- [16] Wu Z, Cho H, Hampton GM, et al. Cdc6 and cyclin E2 are PTEN-regulated genes associated with human prostate cancer metastasis[J]. *Neoplasia*, 2009, 11(1):66-76.
- [17] Hall JR, Kow E, Nevis KR, et al. Cdc6 stability is regulated by the Huwe1 ubiquitin ligase after DNA damage[J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(9):3340-3350.
- [18] Feng L, Barnhart JR, Seeger RC, et al. Cdc6 knockdown inhibits human neuroblastoma cell proliferation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 311(1/2):189-197.
- [19] Feng CJ, Lu XW, Luo DY, et al. Knockdown of Cdc6 inhibits proliferation of tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2013, 12(2):173-181.
- [20] Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, et al. Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus[J]. *Nature*, 2006, 440(7084):702-706.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 吕波, 李明杰, 郑小林, 等. 细胞分裂周期蛋白6在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(7):1017-1022. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.014

Cite this article as: Lu B, Li MJ, Zheng XL, et al. Expression of cell division cycle 6 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(7):1017-1022. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.014