

CyclinE 及相关基因在人原发性肝癌中的表达及其意义

邝少松,郑佳琳,杨林,钟海潮,张辰子,代路路,唐小江
(广东省医学实验动物中心,广东 佛山 528248)

摘要: [目的] 研究 *CyclinE*、*CDK4*、*VEGF*、*c-myc* 及 *p53* 基因在肝癌中的表达及其意义。[方法] 采用荧光实时定量 PCR 技术、免疫组织化学技术及蛋白免疫印迹技术对肝癌组织、自身癌旁组织的 *CyclinE*、*CDK4*、*VEGF*、*c-myc* 及 *p53* 基因的表达水平进行检测。[结果] 肝癌组织中的 *CyclinE*、*CDK4*、*VEGF*、*c-myc* 及 *p53* mRNA 的表达水平均高于自身癌旁组织 (P 均 < 0.05) ; *CyclinE* 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 59.52% ; *CDK4* 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 40.48% ; *VEGF* 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 35.71% ; *c-myc* 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 7.62% ; *p53* 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 52.38% ; 而在癌旁组织不表达或呈微弱表达。相比于中、高分化肝癌患者,低分化癌组织中的各蛋白的阳性表达率均显著升高 (*CyclinE*: 94.74% vs 30.43% ; *CDK4*: 47.37% vs 34.78% ; *VEGF*: 42.11% vs 30.43% ; *c-myc*: 57.89% vs 39.13% ; *p53*: 63.16% vs 43.48%), 且差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。相比于没有发生肝外转移的肝癌患者,有肝外转移的癌组织中的各蛋白的阳性表达率均显著升高 (*CyclinE*: 81.25% vs 46.15% ; *CDK4*: 68.75% vs 23.08% ; *VEGF*: 43.75% vs 30.77% ; *c-myc*: 62.50% vs 38.46% ; *p53*: 62.50% vs 46.15%), 且差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。[结论] *CyclinE*、*CDK4*、*VEGF*、*c-myc* 及 *p53* 基因在人肝细胞癌组织中的表达呈阳性, 且阳性表达程度与肿瘤分化程度和有无肝外转移相关。

关键词: 原发性肝癌; *CyclinE*; *CDK4*; *VEGF*; *c-myc*; *p53*

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)02-0143-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.02.A013

Expression and Significance of CyclinE and Related Genes in Hepatocellular Carcinoma

KUANG Shao-song, ZHENG Jia-lin, YANG Lin, et al.

(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression and medical significance of *CyclinE*, *CDK4*, *VEGF*, *c-myc* and *p53* gene in hepatocellular carcinoma (HCC). [Methods] Genetic levels of these genes in HCC and adjacent tissues were detected by quantitative real-time PCR (Q-PCR), and the protein expression levels were detected by Western Blot and immunohistochemistry. [Results] Each of those genes expression in HCC tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The positive expression rates of *CyclinE*, *CDK4*, *VEGF*, *c-myc* and *p53* were 59.52%, 40.48%, 35.71%, 7.62% and 52.3%, respectively. The positive expression rate of each gene in poorly differentiated hepatocellular carcinoma was significantly higher than that in moderately and well-differentiated carcinoma (*CyclinE*: 94.74% vs 30.43% ; *CDK4*: 47.37% vs 34.78% ; *VEGF*: 42.11% vs 30.43% ; *c-myc*: 57.89% vs 39.13% ; *p53*: 63.16% vs 43.48%, $P < 0.05$). And the positive expression of each gene was also significantly higher in the tissues of hepatocellular carcinoma metastasis than that in tissues without metastasis (*CyclinE*: 81.25% vs 46.15% ; *CDK4*: 68.75% vs 23.08% ; *VEGF*: 43.75% vs 30.77% ; *c-myc*: 62.50% vs 38.46% ; *p53*: 62.50% vs 46.15%, $P < 0.05$). [Conclusion] *CyclinE*, *CDK4*, *VEGF*, *c-myc* and *p53* genes are highly expressed in tissues of HCC both in genetic and protein level and correlated with tumor differentiation and metastasis.

Key words: hepatocellular carcinoma; *CyclinE*; *CDK4*; *VEGF*; *c-myc*; *p53*

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是目前常见的恶性肿瘤之一, 居全世界肿瘤发病率

的第 6 位^[1], 其致死率在恶性肿瘤中排第 2 位^[2]。肝癌的发生是一个多基因参与, 通过不同基因在不同时相的差异表达进行调控的复杂过程。细胞周期调控的紊乱是正常细胞癌变的重要机制, 研究表明, 细

收稿日期: 2015-08-13; 修回日期: 2015-10-29

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2012B05050006)

通讯作者: 唐小红, E-mail: kuangss@126.com

胞周期调节因子 *c-myc*、*p21*、*CyclinD1*、*CyclinE* 和 *CyclinD2* 上调可促进肿瘤细胞的增殖^[3]。*CyclinE* 也称为细胞周期素 E,是细胞周期 G_1 期核蛋白,其过度表达能加速肝细胞周期从 G_1 期至 S 期转化,影响 DNA 与中心体的复制及分裂,致使基因不稳定表达,从而使肝细胞转化并形成肿瘤,促进肝癌的发生^[4];*CDK4*(cyclin-dependent kinases-4)也称为细胞周期蛋白依赖性激酶-4,同样是属于细胞周期的核心调控因子之一,通过与细胞周期蛋白依赖性激酶-1 相结合形成一种复合体,从而启动 E2F 下游的信号系统,使得细胞周期异常缩短,促进细胞的增殖从而促进肿瘤的发生^[5];*c-myc* 是一个转录因子,位于基因组的 8q24,可促进细胞的增殖、分化,尤其是肿瘤细胞的恶性转化^[6];*p53* 是经典的抑癌基因,分为野生型和突变型,突变型 *p53* 可诱导一些异常基因的表达,导致其本身抑癌功能的丧失^[7,8];血管内皮生长因子(vascular endothelial growth,VEGF)促进血管内皮细胞的增殖、分化与迁移,是目前研究发现的由肿瘤细胞分泌的最重要的血管生成因子,与肿瘤的生长、浸润以及转移密切相关^[9]。因此,本研究拟通过荧光实时定量 PCR(Q-PCR)技术、免疫组织化学技术及蛋白免疫印迹(Western Blot)技术检测 HCC 中 *CyclinE* 表达及其相关基因 *CDK4*、*VEGF*、*c-myc* 及 *p53* 的表达,进一步探讨原发性肝癌发生发展的机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2010 年 10 月至 2014 年 10 月间在广州医学院附属肿瘤医院,经化验、彩超、CT 诊断,行肝癌切除术,术后病理证实为肝癌的患者 42 例,其中男性 32 例,女性 10 例,年龄 26~74 岁,平均年龄 49 岁。新鲜肝癌术后组织包括癌组织、癌旁组织(距癌组织旁 ≥ 1 cm)。所有患者术前均未接受放疗和化疗,肿瘤部位、大小、大体类型等情况按手术时记录。

1.2 标本及试剂

所有组织标本必须在离体 30min 之内取材并保存完毕。首先采用预冷生理盐水洗去血渍,然后将所取的癌组织和癌旁组织切成 2mm $\times$ 2mm 大小,并分成 3 份。将 2 份不少于 100mg 的癌组织和癌旁组织分别置于冻存管中,然后投入液氮速冻,1~2h 后转

入-80℃冰箱冻存备用。剩余的 1 份置于 4%多聚甲醛溶液中固定,组织与固定液的比例不小于 1:10。

VEGF 兔抗人多克隆抗体为美国 millipore 公司生产;*CDK14* 兔抗人多克隆抗体为美国 millipore 公司生产;*c-myc* 兔抗人多克隆抗体为美国 millipore 公司生产;*p53* 兔抗人多克隆抗体为美国 millipore 公司生产;*cyclinE* 兔抗人多克隆抗体为美国 millipore 公司生产;*GAPDH* 兔抗人多克隆抗体为美国 millipore 公司生产;免疫组化染色所用得二抗 ChemMate™ DAKO Envision™ Detection Kit (含 DAB 显色液)来自于 DAKO 公司;Western Blot 所用的羊抗兔二抗购自 southern biotech 公司;Trizol 和 SYBR Green qPCRSuperMix 购自 Invitrogen 公司;ImProm- II™ Reverse Transcription System 购自 promega 公司;BCA 法蛋白含量检测试剂盒购自南京凯基生物发展有限公司;其他试剂和缓冲液均购自北京中杉金桥生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 荧光实时定量 PCR(Q-PCR)

将收集的组织标本放在装有液氮的研钵中充分研磨至粉末状态,加入 1ml Trizol 溶液,吹打混匀,使组织充分裂解,静置 5min;按照 Trizol 试剂盒说明书依次加入氯仿、异丙醇、乙醇等抽提组织的总 RNA。然后对总 RNA 的浓度、纯度和完整性进行检测;以提取出来的总 RNA 为模板,根据 ImProm- II™ Reverse Transcription System 逆转录试剂盒的说明书进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。

步骤:在 RNase-free 的 PCR 管中将 1 μ g 总 RNA 用 DEPC 水配至 12 μ l,吹打均匀,置 85℃保温 5min,使 RNA 变性。随后立即冰上致冷,防止 RNA 复性;然后在 PCR 管中按说明书依次加入试剂,使得反应体积为 20 μ l,反应时间分别为 30℃10min、42℃60min、85℃10min。将逆转录合成的 cDNA 作为模板,按照 SYBR Green qPCRSuperMix 试剂盒的说明书进行标准曲线的制备和 Q-PCR 的扩增。其中,*CyclinE*、*CDK4*、*VEGF*、*c-myc*、*p53* 基因及内参基因 *GAPDH* 的上下游引物及产物片段长度见 Table 1。Q-PCR 扩增实验步骤如下:反应体积为 20 μ l,50℃ 2min、95℃ 2min、95℃ 15s、60℃ 32s,一共 40 个循环,读板;融解曲线分析:温度 60℃~95℃。每个样重复 3 次。根据扩增曲线和标准曲线计算出每一待测样本的目的基因的 copy 数,然后除以内参基因

GAPDH 的 copy 数来进行标准化(Table 1)。

Table 1 The primer sequences and the fragment size of genes

Gene	Primer sequence	Fragment size
CDK4-F1	5'-ATTGCCTGCCCCCTTATACAT-3'	190bp
CDK4-R1	5'- ATATGCTGCTGTGGGAAAAG-3'	
CyclinE-F1	5'- CCTGGATGTTGACTGCCTTGA-3'	110bp
CyclinE-R1	5'- CGCACCCTGATACCCTGAA-3'	
VEGF-F1	5'- AGACAGATCACAGGTACAGG-3'	175bp
VEGF-R1	5'- AGCAGGTGAGAGTAAGCGA-3'	
c-myc-F1	5'- ACACATCAGCACAACCTACGC-3'	159bp
c-myc-R1	5'- CCTCTTGACATTCTCCTCGGT-3'	
p53-F1	5'- TTCTACAGTTGGGCAGCT -3'	295bp
p53-R1	5'- GCAGTAAGCCAAGATCAC-3'	
GAPDH-F	5'- GGGAAACTGTGGCGTGAT-3'	299bp
GAPDH-R	5'- GAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3'	

1.3.2 蛋白免疫印迹(Western Blot)

按 1ml 蛋白裂解液加 10 μ l PMSF (100mM) 和 10 μ l Cocktail, 摇匀置于冰上 (PMSF 要摇匀至无结晶时才可与裂解液混合)。取 50~100mg 组织样本, 加入 1ml 裂解液, 在低温下快速匀浆。将裂解完成的匀浆液于 4℃ 下 14 000r/min 离心 5min, 将离心后的上清分装转移至干净的离心管中, 取少量上清液采用 BCA 蛋白质定量检测, 然后调节所有蛋白样品至相同浓度, 与 5 $\times$ 上样缓冲液 (loading buffer) 按 5:1 混合, 煮沸 5min。在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后 (80V 恒压 50min, 120V 恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止), 在低温条件下, 100V 恒压 60~120min 电转移至 PVDF 膜。取出杂交膜, TBST 漂洗 5min $\times$ 3 次。然后在 5% 脱脂奶粉溶液室温 1h 以封闭膜上的非特异结合。封闭过的膜加入合适的一抗稀释浓度 4℃ 过夜 (CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 抗体的工作浓度均为 1:1000)。根据一抗的来源选择相应的二抗, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗稀释液 37℃ 孵育 1h; 同样方法标记 GAPDH 内参抗体作为对照 (GAPDH 抗体的工作浓度为 1:10000)。采用 HRP-ECL 发光法进行发光、显影、定影, 将胶片进行扫描并分析其灰度值。

1.3.3 免疫组化染色

癌组织与癌旁组织样本经 4% 多聚甲醛溶液固定后, 石蜡包埋, 并将蜡块制成 5 μ m 厚的连续切片。二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 3% 过氧化氢室温湿盒孵育 10min 以灭活内源性过氧化物酶, 于微波炉中中高火加热至沸腾, 低火维持沸腾继续加热 8min

(1L, pH 6.0, 0.4g 柠檬酸/3g 柠檬酸钠混合溶液) 进行抗原修复, 10% 正常山羊血清室温湿盒封闭 30min, 分别滴加 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 一抗稀释液 4℃ 过夜 (CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 抗体的工作浓度分别为 1:100、1:100、1:200、1:100 及 1:160), 二抗室温湿盒 30min, DAB 显色约 2min。苏木素复染 3min, 水洗, 返蓝, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明 2 次, 中性树胶封片, 镜检, 拍照; 选用已知阳性肝癌组织切片作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照, 染色步骤严格按照产品说明书进行。

1.4 判断标准

免疫组化结果由 3 位病理专业医师盲法判读, 并在高倍光学显微镜 (40 $\times$) 下随机选取 5 个视野进行拍照。CyclinE 蛋白阳性表达主要定位于细胞核, CDK4 蛋白阳性表达主要定位于细胞核, VEGF 蛋白阳性表达主要定位于细胞质, c-myc 蛋白阳性表达定位于细胞质和细胞核, p53 蛋白阳性表达主要定位于细胞核, 阳性信号成棕黄色颗粒样物质。

根据阳性细胞百分比和染色强度分别进行阳性程度的评分^[10]。阳性细胞百分比判断标准为同一视野下阳性细胞数占同类细胞数的百分比: 未见细胞染色记为 0 分, 1%~10% 染色为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 75% 以上为 4 分。染色强度判读标准: 无染色或基本不着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 中等黄色或棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。各蛋白表达程度根据阳性细胞百分比 $\times$ 染色强度分别评分, 乘积 $\geq$ 3 分为阳性 (+)。

1.5 统计学处理

使用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 方差齐性的多组样本间比较用方差分析, 方差分析两两差异比较用 SNK 检验, 方差不齐和非正态分布的数据采用非参数秩和检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 mRNA 在肝癌组织与癌旁组织中 Q-PCR 检测结果

42 例原发性肝癌患者中癌组织 CyclinE 的表达量为 22.07 $\pm$ 2.98 (癌旁组织 2.51 $\pm$ 0.71, P<0.001); 癌

组织 CDK4 的表达量为 4.93 ± 0.98 (癌旁组织 3.23 ± 0.68 , $P < 0.05$)、癌组织 VEGF 的表达量为 3.13 ± 0.35 (癌旁组织 1.17 ± 0.07 , $P < 0.05$)、癌组织 c-myc 的表达量为 236.02 ± 9.75 (癌旁组织 21.71 ± 2.02 , $P < 0.001$) 及癌组织 p53 的表达量为 24.91 ± 4.43 (癌旁组织 4.83 ± 0.25 , $P < 0.001$) (Table 2)。

2.2 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 蛋白在肝癌组织与癌旁组织中 Western Blot 检测结果

在 42 例癌组织中 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 蛋白均呈阳性表达,而在自身癌旁组织中,部分呈阳性表达,但大部分表达强度明显低于癌组织。

2.3 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 蛋白在肝癌组织与癌旁组织中免疫组化检测结果

CyclinE 蛋白阳性表达主要定位于细胞核,在肝癌组织中呈阳性表达的共有 25 例,阳性表达率为 59.52%,在癌旁组织不表达或呈微弱表达。CDK4 蛋白阳性信号主要定位于细胞核,在肝癌组织中呈阳性表达的共有 17 例,阳性表达率为 40.48%,在癌旁组织不表达或呈微弱表达。VEGF 蛋白阳性表达主要定位于细胞质,在肝癌组织中呈阳性表达的共有 15 例,阳性表达率为 35.71%,在癌旁组织不表达或呈微弱表达。c-myc 蛋白阳性表达定位于细胞质和细胞核,在肝癌组织中呈阳性表达的共有 20 例,阳性表达率为 47.62%,在癌旁组织不表达或呈微弱表达。p53 蛋白阳性表达主要定位于细胞核,在肝癌组织中呈阳性表达的共有 22 例,阳性表达率为 52.38%,在癌旁组织不表达或呈微弱表达。

2.4 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 蛋白表达与肝癌分化程度及淋巴结肝内转移的关系

相比于中、高分化肝癌患者,低分化癌组织中的 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 蛋白的阳性表达率均显著性升高 (CyclinE: 94.74% vs 30.43%; CDK4: 47.37% vs 34.78%; VEGF: 42.11% vs 30.43%;

Table 2 CyclinE, CDK4, VEGF, c-myc and p53 mRNA expression in HCC tissues and adjacent tissues

Group	N	CyclinE	CDK4	VEGF	c-myc	p53
Adjacent tissue	42	2.51 ± 0.71	3.23 ± 0.68	1.17 ± 0.07	21.71 ± 2.02	4.83 ± 0.25
HCC tissue	42	$22.07 \pm 2.98^{**}$	$4.93 \pm 0.98^*$	$3.13 \pm 0.35^*$	$236.02 \pm 9.75^{**}$	$24.91 \pm 4.43^{**}$

Note: *Compared with adjacent tissues, $P < 0.05$; **Compared with adjacent tissues, $P < 0.001$.

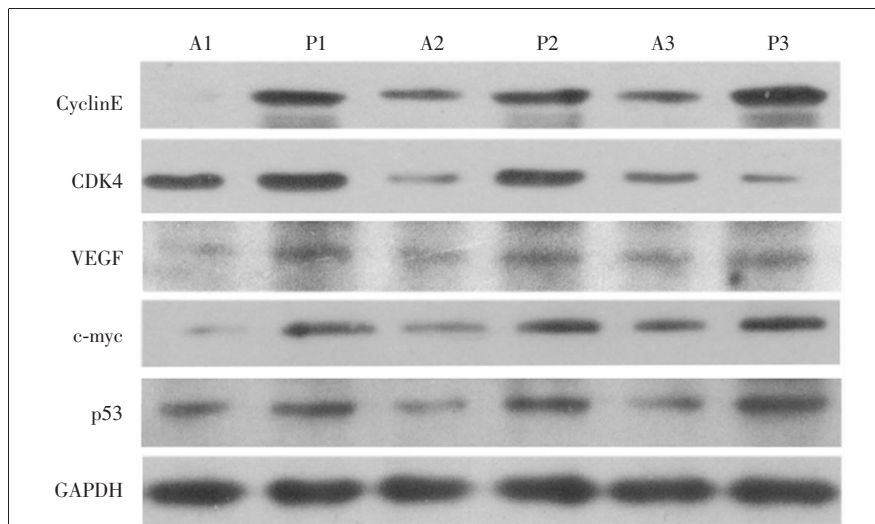
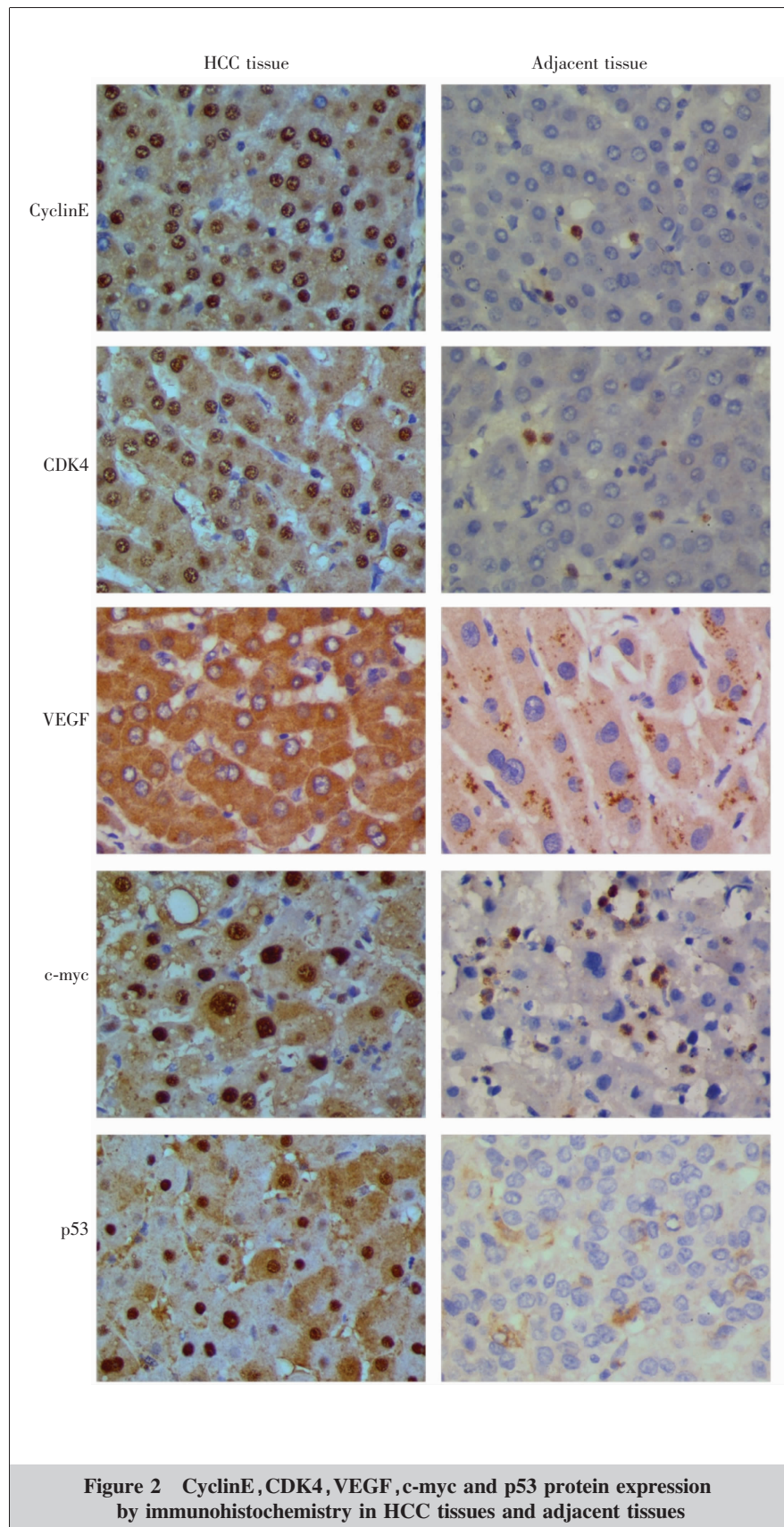


Figure 1 CyclinE, CDK4, VEGF, c-myc and p53 protein expression by Western Blot in HCC tissues and adjacent tissues

c-myc: 57.89% vs 39.13%; p53: 63.16% vs 43.48%), 且差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。相比于没有发生肝内转移的肝癌患者,肝内转移癌组织中的 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 蛋白的阳性表达率均显著性升高 (CyclinE: 81.25% vs 46.15%; CDK4: 68.75% vs 23.08%; VEGF: 43.75% vs 30.77%; c-myc: 62.50% vs 38.46%; p53: 62.50% vs 46.15%), 且差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05) (Table 3)。

3 讨论

在过去几十年中,原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全世界范围内的一个重大的公共卫生问题。肝癌的发生、发展有着非常复杂的生物学机制,与许多环境风险因素及遗传因子密切相关,包括细胞和分子信号通路,如 Wnt/ β -catenin、hedgehog、MAPK、AKT 和 ERK 等的异常活化,以及原癌基因和抑癌基因间表达的平衡等。因此,深入探讨原发性肝癌的发生、发展中关键的分子机制具有



重要的意义。

细胞周期调控的紊乱是正常细胞癌变的重要机制,一个典型的细胞周期主要由 G_1 -S- G_2 -M 四个时相组成,正常情况下,人体细胞这四个时相有序进行,正确执行其生理功能是在一系列调控因素的作用下完成的,其中细胞周期素(Cyclins)起重要作用。在目前发现的 15 种细胞周期素中,CyclinE 作为细胞周期的限速调节因子越来越受到学者的广泛关注。CyclinE 首次在 1991 年被发现,其在细胞周期、发育和肿瘤生物学领域是一个令人瞩目的焦点^[11-13]。它在细胞周期 G_1 晚期对细胞的增殖、分化起着正性调控的作用。大量肿瘤相关研究表明^[14],CyclinE 在肿瘤的发生和发展的过程中起着关键性的作用。CyclinE 的失调将导致细胞中心体的过度扩增、DNA 复制中间体的不稳定,以及在有丝分裂过程中染色体分离异常,进而使得基因组的稳定性发生改变。然而,除了细胞周期蛋白之外,细胞周期的内源性调控核心还包括细胞周期蛋白依赖蛋白激酶(Cyclin-dependent kinase,CDK),CDK4 是细胞周期的正性调控因子,它的异常高表达将导致 DNA 合成异常增加,进而促进细胞加速增殖。有研究表明^[15],在肝癌组织中,CDK4 mRNA 表达水平普遍升高,是癌旁正常组织的 2 倍以上。在我们的研究中,肝癌组织中的 CyclinE、CDK4 mRNA 的表达水平高于自身癌旁组织 ($P<0.05$);CyclinE 蛋白在肝癌

Table 3 Relationship between CyclinE,CDK4,VEGF,c-myc and p53 protein expression by immunohistochemistry and the clinicopathologic features of liver cancer

Clinicopathologic features	N	Positive(%)				
		CyclinE	CDK4	VEGF	c-myc	p53
Histological grade						
Low	19	18(94.74%)*	9(42.37%)*	8(42.11%)*	11(57.89%)*	12(63.16%)*
Middle-high	23	7(30.43%)	8(34.78%)	7(30.43%)	9(39.13%)	10(43.48%)
Metastasis out of liver						
Yes	16	13(81.25%) ^{△△}	11(43.75%) [△]	7(43.75%) [△]	10(62.5%) ^{△△}	10(62.5%) [△]
No	26	12(46.15%)	6(30.77%)	8(30.77%)	10(38.46%)	12(46.15%)

Note: *Compared with Middle-high group, $P<0.05$; **Compared with Middle-high group, $P<0.01$;

[△]Compared with no metastasis out of liver group, $P<0.05$; ^{△△} Compared with no metastasis out of liver group, $P<0.01$.

组织中的阳性表达率为 59.52%;CDK4 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 40.48%。相比于中、高分化肝癌患者,低分化癌组织中的 CyclinE、CDK4 蛋白的阳性表达率均显著性升高 ($P<0.05$);相比于没有发生肝外转移的肝癌患者,有肝外转移的癌组织中的 CyclinE、CDK4 蛋白的阳性表达率均显著性升高 ($P<0.05$)。

c-myc 基因是 myc 基因家族成员之一,它是细胞中一种重要的原癌基因,其编码的蛋白质属于转录因子,介导细胞核内生物信号的转导,调控细胞的增殖与凋亡^[16]。黄文峰等^[17]采用免疫组织化学染色对原发性肝癌组织,以及正常肝组织中的 c-myc 蛋白的表达水平进行检测,发现癌组织中 c-myc 表达的阳性率明显高于正常肝组织,且与肝癌的体积、分化程度、肝内转移、脉管浸润等临床病理特征密切相关。p53 是经典的抑癌基因,其突变型的异常高表达在多种恶性肿瘤的发生发展中起到非常重要的作用^[18]。王贲士等^[19]研究接受手术治疗的 28 例肝癌患者,采用 PCR 法扩增 p53 基因全长并测序,发现肝癌组织 p53 的突变率达到了 28.6%,而当 p53 突变后,将会丧失原本作为抑癌基因的对别的基因的保护作用,加快肝癌的发展进程。在本研究中,我们发现肝癌组织中的 c-myc 及 p53 mRNA 的表达水平高于自身癌旁组织 ($P<0.05$)。c-myc 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 7.62%;p53 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 52.38%;而在癌旁组织不表达或呈微弱表达。相比于中、高分化的肝癌患者,低分化癌组织中的各蛋白的阳性表达率均显著升高 (c-myc:57.89% vs 39.13%;p53:63.16% vs 43.48%)。相比于没有发生肝外转移的肝癌患者,肝外转移的癌组织中的各蛋白的阳性表达率均显著性升高 (c-myc:62.50% vs

38.46%;p53:62.50% vs 46.15%),且差异有统计学意义 (P 均 <0.05),我们的研究与刘欢等^[20]的研究结果是一致的,这表明了肝癌的发生发展与癌基因和抑癌基因的失调是相关的。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth, VEGF) 又称为血管通透因子,因其在肿瘤血管形成过程中有着不可替代的重要功能,故在各种恶性肿瘤中均有较高的表达,对肿瘤发生发展、浸润转移过程都起着重要作用^[9]。有研究发现^[21],原发性肝癌患者肝组织中 VEGF 的表达水平显著性高于对照组肝硬化者肝组织的表达水平,且在原发性肝癌 CT 征象中,VEGF 的表达水平与癌组织包膜的完整程度、强化类型,以及侵袭性密切相关。在本研究中,我们发现,VEGF mRNA 的表达水平高于自身癌旁组织,且 VEGF 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 35.71%;相比于中、高分化的肝癌患者,低分化癌组织中的 VEGF 蛋白的阳性表达率均显著升高 (42.11% vs 30.43%);相比于没有发生肝外转移的肝癌患者,肝外转移的癌组织中的 VEGF 蛋白的阳性表达率均显著性升高 (43.75% vs 30.77%),且差异有统计学意义 (P 均 <0.05)。

综上所述,本研究发现 CyclinE、CDK4、VEGF、c-myc 及 p53 基因在肝癌组织中呈阳性表达,且阳性表达程与肿瘤分化程度和有无肝内转移相关。我们推测这 5 个基因可能协同参与肝癌的发生发展,但这几个基因之间的关系及相关机制还有待进一步的探究。

参考文献:

- [1] Forner A, Lovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1245-1255.

- [2] Li MX, Cai JQ. The amplification of VEGF-A and related genes is the effective molecular signal to predict the treating effect of Sorafenib on hepatocellular carcinoma [J]. *Electronic J Hepatocellular Carcinoma*, 2014, 1(2):58–59. [李慕行, 蔡建强. VEGF-A 相关基因扩增是预测索拉非尼对肝细胞肝癌治疗有效的分子标志 [J]. *肝癌电子杂志*, 2014, 1(2):58–59.]
- [3] Masuda M, SuZui M, Yasumatu R, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclinD1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12):3351–3355.
- [4] Pok S, Wen V, Shackel N, et al. Cyclin E facilitates dysplastic hepatocytes to bypass G1/S checkpoint in hepatocarcinogenesis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(9):1545–1554.
- [5] Padmakumar VC, Aleem E, Berthet C, et al. Cdk2 and Cdk4 activities are dispensable for tumorigenesis caused by the loss of p53 [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(10):2582–2593.
- [6] Lin CY, Lovén J, Rahl PB, et al. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-myc [J]. *Cell*, 2012, 151(1):56–67.
- [7] Viadiu H, Fronza G, Inga A. Structural studies on mechanisms to activate mutant p53 [J]. *Subcell Biochem*, 2014, 85:119–132.
- [8] Merino D, Malkin D. p53 and hereditary cancer [J]. *Subcell Biochem*, 2014, 85(85):1–16.
- [9] Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(12):871–882.
- [10] Merritt WM, Kamat AA, Hwang JY, et al. Clinical and biological impact of EphA2 overexpression and angiogenesis in endometrial cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(12):1306–1314.
- [11] Lew DJ, Dulić V, Reed SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast [J]. *Cell*, 1991, 66(6):1197–1206.
- [12] Léopold P, O'Farrell PH. An evolutionarily conserved cyclin homolog from *Drosophila* rescues yeast deficient in G1 cyclins [J]. *Cell*, 1991, 66(6):1207–1216.
- [13] Koff A, Cross F, Fisher A, et al. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family [J]. *Cell*, 1991, 66(6):1217–1228.
- [14] Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles [J]. *Oncogene*, 2005, 24(17):2776–2786.
- [15] Hu HP, Man XB, Wang J, et al. Real-time fluorescence quantitative PCR in detecting CDK4 gene expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2004, 24(7):773–775. [胡和平, 满晓波, 王健, 等. 实时荧光定量 PCR 检测原发性肝癌中 CDK4 基因的表达 [J]. *第二军医大学学报*, 2004, 24(7):773–775.]
- [16] Chen YJ, Luo XH, Cheng ML. Clinical feature analysis of AEG-1, β -catenin and c-myc expression in primary hepatocellular carcinoma [J]. *Labeled Immunoassays & Clin Med*, 2015, 22(7):633–636. [程云娟, 罗新华, 程明亮. AEG-1、 β -catenin 和 C-myc 在原发性肝细胞癌中的临床特性与分析 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2015, 22(7):633–636.]
- [17] Huang WF, Zhang XL, Xie ZJ, et al. The expression and medical significance of PTEN, Kiss-1 and c-myc gene in primary hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2013, 33(3):563–564. [黄文峰, 张小玲, 谢志军, 等. 原发性肝癌中 PTEN、Kiss-1 和 c-myc 的表达及意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(3):563–564.]
- [18] Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(1):2–8.
- [19] Wang FS, Qiao LX, Zhang YL, et al. Relationships of mitochondrial tRNA^{Leu} mutations with tumor genesis and p53 mutation [J]. *Shandong Medical Journal*, 2015, 20(20):7–9. [王贲士, 乔录新, 张玉林, 等. 线粒体 tRNA^{Leu} 区突变与肿瘤的发生及 p53 突变的关系 [J]. *山东医药*, 2015, 20(20):7–9.]
- [20] Liu H, Yang GF. Expression of p16, p21, p53 and NF- κ B P50 in hepatocellular carcinoma and their clinical significance [J]. *Journal of New Medicine*, 2015, (3):171–173. [刘欢, 杨桂芳. 肝癌组织中 p16、p21、p53 及 NF- κ B P50 的表达及其临床意义 [J]. *医学新知杂志*, 2015, (3):171–173.]
- [21] Qiu JR. The relationship between CT features of primary liver cancer and the expression of VEGF in liver tissue [J]. *Chin J Integr Trad West Med Dig*, 2015, 23(5):339–341. [裘加人. 原发性肝癌 CT 征象与 VEGF 表达的关系分析 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2015, 23(5):339–341.]