

引用本文:宋应周,孟松峰.肝细胞癌的细胞分裂周期基因20表达与临床病理特征关系及对预后的影响[J].安徽医药,2022,26(6):1222-1225.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.039.

◇临床医学◇



肝细胞癌的细胞分裂周期基因20表达与临床病理特征关系及对预后的影响

宋应周¹,孟松峰²

作者单位:¹商丘市第三人民医院普外科,河南 商丘 476000;

²商丘市第一人民医院普外科,河南 商丘 476000

通信作者:宋应周,男,副主任医师,研究方向为肝胆、胃肠、甲乳,Email: songyingzhou123@163.com

摘要: **目的** 分析肝细胞癌病人细胞分裂周期基因20(CDC20)表达与临床病理特征的关系及对预后的影响。**方法** 收集2016年5月至2017年12月在商丘市第三人民医院行手术治疗的肝细胞癌病人146例,实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)、蛋白质印迹法和免疫组织化学检测肝细胞癌及癌旁组织中CDC20的表达情况。将免疫组织化学评分0~7分和8~12分的病人分别设为CDC20低水平组($n=86$)和CDC20高水平组($n=60$),分析两组间的临床病理特征和生存率。**结果** CDC20 mRNA在肝细胞癌组织中相对表达水平为(2.33 ± 0.67),高于癌旁组织(0.97 ± 0.29)($P<0.001$)。CDC20在肝细胞癌组织中蛋白表达水平为(0.91 ± 0.05),高于癌旁组织(0.14 ± 0.05)($P<0.001$)。CDC20在肝细胞癌组织中阳性表达率为77.4%(113/146),高于癌旁组织8.2%(12/146)($P<0.001$)。CDC20的表达与病人的肿瘤长径、被膜侵犯、脉管侵犯、肿瘤多发、分化程度和TNM分期有关(均 $P<0.05$)。CDC20高水平组术后3年总生存率(61.7%)和疾病无进展生存率(50.0%),均低于CDC20低水平组(87.2%、69.8%)(均 $P<0.05$)。**结论** 肝细胞癌中CDC20的水平增加,可能参与肿瘤的增殖和侵袭。CDC20高水平提示病人的不良预后,可能成为肝细胞癌预后判断的标志物。

关键词: 癌,肝细胞; 细胞分裂周期基因20; 病理学,临床; 预后

The relationship between the expression of cell division cycle gene 20 in hepatocellular carcinoma and the clinicopathological characteristics of patients and its influence on prognosis

SONG Yingzhou¹, MENG Songfeng²

Author Affiliations:¹General Surgery, Third People's Hospital of Shangqiu City, Shangqiu, Henan 476000, China;

²General Surgery, The First People's Hospital of Shangqiu City, Shangqiu, Henan 476000, China

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between the expression of hepatocellular carcinoma cell division cycle gene 20 (CDC20) and clinicopathological characteristics of patients and its impact on prognosis. **Methods** A total of 146 hepatocellular carcinoma patients who underwent surgical treatment in Shangqiu Third People's Hospital from May 2016 to December 2017 were collected. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), Western blotting and immunohistochemistry were used to detect the expression of CDC20 in hepatocellular carcinoma and adjacent tissues. The patients with immunohistochemical score of 8-12 points were enrolled in CDC20 high leave group ($n=60$), and the patients with immunohistochemical score of 0-7 points were enrolled in CDC20 low leave group ($n=86$). The clinicopathological features and survival rates of the two groups were analyzed. **Results** The relative expression level of CDC20 mRNA in hepatocellular carcinoma tissues was (2.33 ± 0.67), which was higher than that of adjacent tissues (0.97 ± 0.29), ($P<0.001$). The protein expression level of CDC20 in hepatocellular carcinoma tissue was (0.91 ± 0.05), which was higher than that of adjacent tissues (0.14 ± 0.05) ($P<0.001$). The positive expression rate of CDC20 in hepatocellular carcinoma tissues was 77.4% (113/146), which was higher than that in adjacent tissues 8.2% (12/146) ($P<0.001$). The high expression of CDC20 was related to the patient's maximum tumor diameter, capsule invasion, vascular invasion, tumor frequency, degree of differentiation and TNM stage (all $P<0.05$). The 3-year overall survival rate (61.7%) and disease progression-free survival rate (50.0%) in the CDC20 high leave group were lower than those in the CDC20 low leave group (87.2%, 69.8%) (All $P<0.05$). **Conclusions** The expression level of CDC20 in hepatocellular carcinoma is increased, which may be involved in tumor proliferation and invasion. The high expression of CDC20 indicates poor prognosis of patients, and it is expected to become a tumor marker for judging the prognosis of hepatocellular carcinoma.

Key words: Carcinoma, hepatocellular; Cell division cycle gene 20; Pathology, clinical; Prognosis

肝细胞癌在全球肝脏恶性肿瘤中发病率呈上升趋势,已成为癌症死亡的第二大诱因^[1]。乙型肝炎病毒或丙型肝炎病毒慢性感染、肝硬化、酒精性肝病和黄曲霉毒素等造成了肝细胞癌的高发病率^[2-4]。然而,促进肝癌发病机制仍不清楚。在肝细胞癌发生过程中,细胞周期检查点的改变可能与癌症形成密切相关^[5]。细胞分裂周期基因20(CDC20)是细胞周期检查点的调节剂,与细胞周期后期中复合物/环体相互作用的调节蛋白和有丝分裂相关^[6]。CDC20可与APC结合并在有丝分裂和G1期激活细胞周期蛋白的泛素化活性,促进细胞增殖^[7]。CDC20可通过调节细胞周期、促进细胞凋亡,抑制恶性转化^[8]。研究表明,多种癌症中CDC20的高表达,与肿瘤的增殖、侵袭及不良预后有关^[9-12]。然而,CDC20在肝细胞癌中的研究较少,该研究通过检测肝细胞癌组织中CDC20的水平,分析CDC20的表达与病人临床病理特征的关系及对预后的影响,为肝细胞癌的预后判断提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2016年5月至2017年12月在商丘市第三人民医院行手术治疗的肝细胞癌病人146例,男115例,女31例,年龄范围为38~62岁,收集病人的临床资料。收集手术切除的肝细胞癌组织及对应的癌旁组织,放置于-80℃超低温冰箱中。术后采用电话的方式定期随访,最短随访时间5个月,最长随访时间36个月,随访截止日期为2020年12月1日,146例的临床资料及随访资料完整。该研究经商丘市第三人民医院伦理委员会批准(20160412),病人或其近亲属同意并签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR) qRT-PCR检测肝细胞癌组织中CDC20 mRNA的表达。组织中的总RNA根据Trizol试剂盒进行提取。提取的RNA逆转录为互补DNA(cDNA),进行实时荧光定量PCR。CDC20正向引物序列5'-TCGAAGTCACTCGGTAGCGT-3',反向引物序列5'-GATCCTGCATACTGCTTGCA-3';U6正向引物序列5'-GGCCTCATCCTCATCATGGCAGUAG-3',反向引物序列5'-AGCCAGATGCCTAGCGACGTGC-3'。总反应体系为20 μL,反应条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环。以管家基因U6 mRNA水平作为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算CDC20 mRNA的相对表达

水平。

1.2.2 蛋白质印迹法 蛋白质印迹法检测肝细胞癌组织中CDC20的表达。取组织中的总蛋白,根据BCA蛋白定量试剂盒取30 μg的蛋白,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将电泳凝胶上的蛋白湿转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,PVDF膜放置含有1% BSA的盒子中,孵育2 h,之后经过一抗孵育(1:1 000稀释,4℃过夜)、TBST洗涤3次、二抗孵育(1:4 000稀释,室温1 h)、TBST洗涤3次后,在PVDF膜上滴加适量化学发光显色液,在凝胶成像系统中拍照,根据灰度值估测CDC20蛋白表达水平。

1.2.3 免疫组织化学实验 免疫组织化学检测肝细胞癌组织中CDC20的表达。切制冷冻切片,经过脱蜡和梯度乙醇水化处理,利用PV6000法染色,加入3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶。置于修复液中,加热行抗原进行修复,然后放置室温自然冷却。经封闭后,滴加一抗(1:200),置于4℃冰箱孵育过夜。利用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗,滴加相应种属二抗(1:400),室温下孵育60 min,并用PBS进行3遍冲洗。滴加新鲜配制的显色液,利用苏木素染料复染,中性树胶封固,最后置于显微镜下观察。染色强度评分:强阳性、中等阳性、弱阳性和阴性评分分别为3分、2分、1分和0分,阳性细胞数的评分:>75%~100%、>50%~75%、>25%~50%、5%~25%和<5%评分分别为4分、3分、2分、1分和0分,染色强度评分和阳性细胞数的评分的乘积即为总分,0~7分为低水平,8~12分为高水平。

1.3 统计学方法 应用SPSS 21.0软件行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对t检验;计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,多组间的两两比较检验水准 $\alpha=0.016$;采用Kaplan-Meier法绘制疾病无进展生存率和总生存率曲线,log-rank检验比较不同组间的生存率。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR检测肝细胞癌组织中CDC20 mRNA的表达 CDC20 mRNA在肝细胞癌组织表达水平(2.33 ± 0.67)高于对应的癌旁组织(0.97 ± 0.29)($t=5.95, P<0.001$)。

2.2 蛋白质印迹法检测肝细胞癌组织中CDC20的表达 CDC20蛋白在肝细胞癌组织中相对表达水平(0.91 ± 0.05)高于对应的癌旁组织(0.14 ± 0.05)($t=34.30, P<0.001$)。

2.3 免疫组织化学检测肝细胞癌组织中CDC20的表达 CDC20在肝细胞癌阳性表达率(77.4%, 113/146)高于对应癌旁组织(8.2%, 12/146), 差异有统计学意义($\chi^2=142.69, P<0.001$)。见图1(仅展示3例病人的结果)。

2.4 CDC20表达与病人临床病理特征的关系 CDC20的表达与病人的肿瘤长径、被膜侵犯、脉管侵犯、肿瘤多发、分化程度和TNM分期有关($P<0.05$), 见表1。

表1 细胞分裂周期基因20(CDC20)表达水平与肝细胞癌病人临床病理特征的关系/例(%)

病理特征	例数	CDC20		χ^2 值	P值
		高水平 (n=60)	低水平 (n=86)		
年龄				0.13	0.716
<60岁	85	36(42.4)	49(57.6)		
≥60岁	61	24(39.4)	37(60.6)		
性别				0.09	0.761
男	115	48(41.7)	67(58.3)		
女	31	12(38.7)	19(61.3)		
乙型肝炎表面抗原				1.01	0.316
阳性	108	47(43.5)	61(56.5)		
阴性	38	13(34.2)	25(65.8)		
甲胎蛋白				1.87	0.172
<20 g/L	68	32(47.1)	36(52.9)		
≥20 g/L	78	28(35.9)	50(64.1)		
肿瘤长径				8.05	0.005
<5 cm	95	31(32.6)	64(67.4)		
≥5 cm	51	29(56.9)	22(43.1)		
合并肝硬化				0.04	0.843
有	89	36(40.4)	53(59.6)		
无	57	24(42.1)	33(57.9)		
被膜侵犯				4.58	0.032
有	87	42(48.3)	45(51.7)		
无	59	18(30.5)	41(69.5)		
脉管侵犯				14.31	<0.001
有	70	40(57.1)	30(42.9)		
无	76	20(26.3)	56(73.7)		
肿瘤多发性				9.32	0.002
单发	125	45(36.0)	80(64.0)		
多发	21	15(71.4)	6(28.6)		
分化程度				24.64	<0.001
低分化	35	26(74.3)	9(25.7)		
中分化	84	30(35.7)	54(64.3)	14.75 ^①	<0.001
高分化	27	4(14.8)	23(85.2)	21.59 ^②	<0.001
TNM分期				14.66	<0.001
I~II	117	39(33.3)	78(66.7)		
III~IV	29	21(72.4)	8(27.6)		

注: ①与低分化组比较, $P<0.001$ 。②与中分化组比较, $P<0.001$ 。

2.5 CDC20表达对病人术后生存率的影响 CDC20高水平组总生存率为(61.7%)和疾病无进展生存率(50.0%)均低于CDC20低水平组(87.2%、69.8%) ($\log\text{-rank } \chi^2=14.19, P<0.001$; $\log\text{-rank } \chi^2=9.61, P=0.005$)。

3 讨论

肝细胞癌是常见的恶性肿瘤, 在过去的20年中, 观察到与肝细胞癌相关的年死亡率显著增加^[13-14]。此外, 根据美国国立癌症研究所“监测、流行病学和结果数据库”SEER注册机构项目研究, 到2030年肝细胞癌的发病率将继续上升^[15]。准确估计预后, 在肝细胞癌治疗中起着至关重要的作用。寻找预测肝细胞癌预后的生物标志物具有重要的临床价值。许多CDC20底物都参与有丝分裂过程, 包括细胞周期蛋白B1、细胞周期蛋白A、分离酶抑制蛋白(Securin)、双能蛋白(Geminin)和周期素依赖激酶抑制剂p21(P21)^[16]。最近, 越来越多的研究显示CDC20在人类癌症中起致癌作用, 在多种人类肿瘤中观察到CDC20的过度表达, 与生存率降低有关^[17]。

CDC20在结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌和胃癌中的表达均增加^[9-12], 在该研究中, 肝细胞癌组织中CDC20 mRNA和蛋白质水平均高于癌旁组织, 提示CDC20促进肝细胞癌的发生发展。目前多项研究显示, CDC20高水平参与多种肿瘤的进展, 例如Kim等^[12]研究显示, CDC20在肠化生、低度不典型增生、高度不典型增生和早期胃癌中的表达明显高于正常黏膜, 且在高度不典型增生中的表达水平最高, 且CDC20过表达与胃癌病人的年龄、肠道组织学、较低的肿瘤-淋巴结-转移阶段以及较长的无复发生存期和癌症特异性生存期相关。CDC20与前列腺癌的恶性进展相关, CDC20高水平病人更具侵略性的临床病理特征和不良预后^[11]。Li等^[18]证明了膀胱尿路上皮癌病例中CDC20升高, 而CDC20高水平与病人的无复发生存期较短和总体生存期较差相关。该研究中, CDC20在肝细胞癌中的表达水平与肿瘤长径、被膜侵犯、脉管侵犯、肿瘤多发、分化程度和TNM分期有关, 说明在肿瘤长径、被膜侵犯、脉管侵犯、肿瘤多发分化程度低和TNM晚期的病人中CDC20的表达水平更高。提示CDC20可能与肝细胞癌的增殖与侵袭有关, CDC20高水平的肝细胞癌病人具有较强的增殖活性和更强的侵袭能力, 与肝细胞癌的发展密切相关。在该研究中, CDC20高水平病人的术后3年总生存率和疾病无进展生存率均较低, 提示CDC20有可能成为评价肝细胞癌预后的有效标志物。CDC20促进肝细胞癌的进展, 其失活

可能治疗肝细胞癌有一定疗效。目前已发现几种 CDC20 抑制剂,例如类毒素-抗毒素混合物酯酶、pro-TAME 和 2-[苄基-(2-硝基-苯磺酰基)-氨基]-N-羟基-3-甲基-N-丙基-丁酰胺^[19-20]。对 CDC20 抑制剂的研究可能有助于阐明 CDC20 在人类癌症中的作用机制,这也是后期该研究的方向之一。

综上所述, CDC20 在肝细胞癌中的表达水平增加,可能参与肿瘤的增殖和侵袭。CDC20 高水平预示病人的预后不良,有望成为判断肝细胞癌预后的肿瘤标志物。

(本文图 1 见插图 6-封三)

参考文献

- [1] BRY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] CHEN Y, TIAN Z. HBV-induced immune imbalance in the development of HCC[J]. Front Immunol, 2019, 10:2048.
- [3] KANDA T, GOTO T, HIROTSU Y, et al. Molecular mechanisms driving progression of liver cirrhosis towards hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C infections: a review[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6):1358.
- [4] LLOVET JM, ZUZCMAN-ROSSI J, PIKARSKY E, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2:16018.
- [5] TUO L, XIANG J, PAN X, et al. PCK1 negatively regulates cell cycle progression and hepatoma cell proliferation via the AMPK/p27Kip1 axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):50.
- [6] UJIMITSU K, YAMANO H. PP2A-B56 binds to Apc1 and promotes Cdc20 association with the APC/C ubiquitin ligase in mitosis[J/OL]. EMBO Rep, 2020, 21(1): e48503. DOI: 10.15252/embr.201948503.
- [7] CHI JJ, LI H, ZHOU Z, et al. A novel strategy to block mitotic progression for targeted therapy[J]. EBioMedicine, 2019, 49: 40-54.
- [8] GAO Y, WEN P, CHEN B, et al. Downregulation of CDC20 increases radiosensitivity through Mcl-1/p-Chk1-Mediated DNA damage and apoptosis in tumor cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18):6692.
- [9] LIJ, WANG Y, WANG X, et al. CDK1 and CDC20 overexpression in patients with colorectal cancer are associated with poor prognosis: evidence from integrated bioinformatics analysis[J]. World J Surg Oncol, 2020, 18(1):50.
- [10] ALFARSI LH, ANSARI RE, CRAZE ML, et al. CDC20 expression in oestrogen receptor positive breast cancer predicts poor prognosis and lack of response to endocrine therapy[J]. Breast Cancer Res Treat, 2019, 178(3):535-544.
- [11] ZHANG Q, HUANG H, LIU A, et al. Cell division cycle 20 (CDC20) drives prostate cancer progression via stabilization of β -catenin in cancer stem-like cells[J]. EBioMedicine, 2019, 42: 397-407.
- [12] KIM Y, CHOI JW, LEE JH, et al. Spindle assembly checkpoint MAD2 and CDC20 overexpressions and cell-in-cell formation in gastric cancer and its precursor lesions[J]. Hum Pathol, 2019, 85:174-183.
- [13] OMATA M, CHENG AL, KOKUDO N, et al. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update[J]. Hepatol Int, 2017, 11(4):317-370.
- [14] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [15] PETRICK JL, KELLY SP, ALTEKRUSE SF, et al. Future of hepatocellular carcinoma incidence in the united states forecast through 2030[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(15):1787-1794.
- [16] YAZDINA S, KASAJIMA A, ONODERA Y, et al. Progesterone arrested cell cycle progression through progesterone receptor isoform A in pancreatic neuroendocrine neoplasm[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018, 178:243-253.
- [17] DING Y, YU S, BAO Z, et al. CDC20 with malignant progression and poor prognosis of astrocytoma revealed by analysis on gene expression[J]. J Neurooncol, 2017, 133(1):87-95.
- [18] LI J, GAO JZ, DU JL, et al. Increased CDC20 expression is associated with development and progression of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2014, 45(4):1547-1555.
- [19] MAES A, MAES K, DE RAEVE H, et al. The anaphase-promoting complex/cyclosome: a new promising target in diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma[J]. Br J Cancer, 2019, 120(12):1137-1146.
- [20] JIANG J, THYAGARAJAN-SAHU A, KRCHNAK V, et al. NAHA, a novel hydroxamic acid-derivative, inhibits growth and angiogenesis of breast cancer in vitro and in vivo[J/OL]. PLoS One, 2012, 7:e34283. DOI: 10.1371/journal.pone.0034283.

(收稿日期:2021-03-14,修回日期:2021-04-25)

◇ 编读往来 ◇

《安徽医药》杂志有关文稿中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位具体使用参照 1991 年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时,应采用负数幂的形式表示,如 ng/kg/min 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式;组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不宜采用 $\text{ng/kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。