Chk1 在原发性肝癌和肝非肿瘤组织中的表达*

马瑞波，杨大刚**，孙诚谊，王 众
（贵阳医学院附院 肝胆外科，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：探讨细胞周期检测点启动 DNA 损伤修复的主要激酶 Chk1 蛋白在肝非肿瘤组织和原发性肝癌组织中的表达差异、以及与临床病理特征之间的关系。**方法**：应用免疫组织化学法检测 15 例肝非肿瘤组织（其中正常肝组织 7 例、肝硬化组织 8 例）和 41 例原发性肝癌组织 Chk1 蛋白的表达。**结果**：Chk1 蛋白在原发性肝癌组织中表达阳性率为 73.2%，在肝非肿瘤组织中表达阳性率为 26.7% 差异有统计学意义（$P<0.05$）；Chk1 蛋白在不同分化程度的原发性肝癌患者中的表达有差异，有统计学意义（$P<0.05$）。**结论**：Chk1 在原发性肝癌中高表达可能与原发性肝癌的发生、发展有关。

［关键词］肝肿瘤；癌；细胞周期；免疫组织化学
［中图分类号］R735.7 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2012）05-0483-03

Expression of Chk1 in Primary Liver Cancer and Liver Non-tumor Tissue

MA Ruibo, YANG Dagang, SUN Chengyi, WANG Zong
（*Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China*）

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the expression difference of Chk1 protien in primary liver cancer and non-tumor liver tissue, and to explore the probable relationship between its expression and clinicopathologic features of liver cancer. **Methods**: Immunohistochemistry was applied to detect the expressions of Chk1 in 15 cases with liver non-tumor tissue (7 cases with normal liver tissue, 8 cases with cirrhosis tissue) and 41 cases with primary liver cancer with various differentiation degrees. **Results**: The positive expression rate of Chk1 in primary liver cancer (73.2%) was higher than that of non-tumor liver tissue (26.7%) ($P<0.05$). Significant differences were found in Chk1 expressions among primary liver cancer with various differentiation degrees ($P<0.05$). **Conclusions**: The high expression level of Chk1 in primary liver cancer indicates that Chk1 may be related to genesis and progression of primary liver cancer.

［**Key words**］liver neoplasms; carcinoma; cell cycle; immnohistochemistry

细胞周期调控是一个精密复杂的生物学过程，而整个细胞周期是由许多细胞周期检查点及相关蛋白质控制的。细胞周期紊乱是基因组不稳定的一个中心环节，这种紊乱会参与肿瘤的发生、发展[1,2]。细胞周期检测点激酶 Chk1（checkpoint kinase 1）是在细胞周期检测点 G1/S、S 和 G2/M 发挥作用的主要激酶，可以对各种因素导致的 DNA 损伤进行修复[3]。Chk1 起着抑癌基因的作用，它的异常会导致细胞周期检测点对 DNA 损伤修复或复制阻滞不能发挥正常功能，从而引起肿瘤易感性增加，最终导致肿瘤的发生或发展。本实验目的是应用免疫组织化学方法检测 Chk1 蛋白在原发性肝癌和肝非肿瘤组织中的表达情况，探讨它与原发性肝癌临床病理特征之间可能存在的关系。

*［基金项目］贵州省科技厅基金资助项目（E2008－21）。
**通讯作者 E-mail：gygd_yangdg@sina.com

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集病理科保存的资料完整的原发性肝癌石蜡标本 41 例(剔除术前接受放、化疗病例),其中高、中分化的原发性肝癌标本 17 例,低分化原发性肝癌标本 24 例;年龄为 34 ~ 71 岁,中位年龄 48 岁。同时随机选取经病理确诊的正常肝细胞组织 7 例及肝硬化组织标本 8 例作为肝非肿瘤组织,均排除了肿瘤病变。

1.2 材料 小鼠抗人 Chk1 单抗(稀释度 1∶50)为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.3 Chk1 蛋白检测方法 应用免疫组织化学二步法。采用双盲法阅片,以细胞核和细胞浆含黄色或者棕黄、褐黄颗粒者为阳性细胞,表达的强弱主要根据着色程度,蓝染色记 0 分、浅黄色记 1 分、黄色记 2 分、褐(棕)黄色记 3 分。高倍镜(×400)下计数 5 个视野内 100 个细胞中阳性细胞率,其均值为该病例阳性细胞率;5 个视野内 100 个细胞中,如阳性细胞 < 10% 记 0 分,10% ~ 24% 记 1 分,25% ~ 49% 记 2 分,50% ~ 74% 记 3 分,≥75% 记 4 分。综合判定:取着色强度和阳性细胞百分数分值之积:0 分记为(-),1 ~ 2 分记为(+),3 ~ 4 分记为(++),6 ~ 8 分记为(+++),9 ~ 12 分记为(++++);(-)和(+)定义为表达阴性,(++) ~ (++++)定义为阳性表达。

1.4 统计处理 采用 SPSS 17.00 软件进行 χ^2 检验,取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

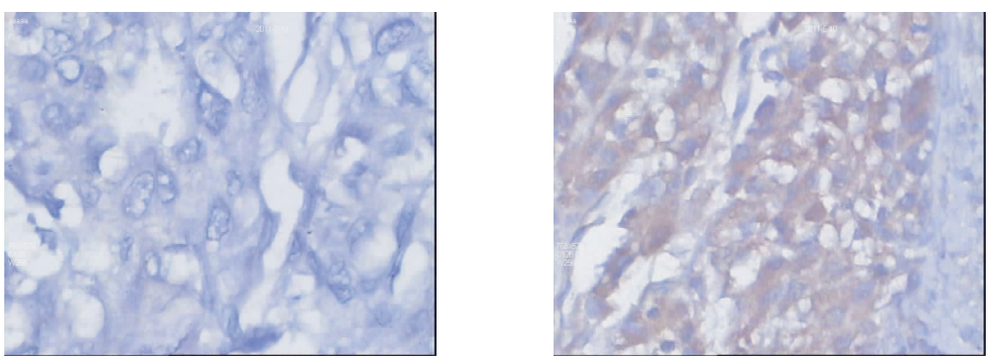
2.1 Chk1 蛋白的表达 如表 1 及图 1 所示,41 例原发性肝癌组织中 Chk1 的阳性表达率为 73.2%,15 例肝非肿瘤组织中 Chk1 的阳性占 26.7%,Chk1 在原发性肝癌组织中表达的阳性率显著高于肝非肿瘤组织 ($P < 0.01$)。

表 1 Chk1 蛋白在原发性肝癌和肝非肿瘤组织中的表达

Tab. 1 The expression of Chk1 in primary liver cancer (plc) and liver non-tumor tissue

组别	阳性	阴性	总计
原发性肝癌组织[(1)]	30	11	41
肝非肿瘤组织[(1)]	4	11	15
总计	34	22	56

注:[(1)]两组比较,$\chi^2 = 9.96$,$P < 0.01$。



Chk1 阴性 Chk1 阳性

图 1 Chk1 蛋白在原发性肝癌组织中表达(SP, ×400)

Fig. 1 The expression of Chk1 protein in the primary liver cancer tissue

2.2 Chk1 蛋白在原发性肝癌中的表达 如表 2 所示,Chk1 蛋白在不同分化程度的原发性肝癌中表达的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 Chk1 蛋白在不同分化程度原发性肝癌组织中的表达

Tab. 2 The expression of Chk1 in primary liver cancer with different differentiation degrees

肝癌分化程度	阳性	阴性	总计
低分化肝癌[(1)]	19	5	24
高分化肝癌[(1)]	11	6	17
总计	30	11	41

注:[(1)]两组比较,$\chi^2 = 0.07$,$P < 0.05$。

3 讨论

原发性肝癌的发生、发展是一个多基因、多因素参与的复杂过程,这些因素的协同或拮抗最终影

响原发性肝癌生物学进程及结局。细胞周期检测点蛋白的表达缺失或功能失效是引起细胞周期调控异常的主要原因,这也是恶性肿瘤发生、发展的一个重要原因。研究调控蛋白的功能及其生物学作用,可为研究恶性肿瘤的形成、发展提供帮助,并指导探索预防、治疗恶性肿瘤的途径。

Chk1 是细胞周期检测中最关键的效应蛋白激酶,它是共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM)及共济失调毛细血管扩张 Rad3 相关蛋白(ATR)的下游效应基因,当细胞 DNA 受到损伤时,被 ATM 和 ATR 活化的 Chk1 是通过调控其下游的底物磷酸酶 CDC25 和 14-3-3 蛋白,来激活细胞检验点关卡,使细胞周期阻滞于 G1/S 转折处、S 期和 G2 /M 转折处,阻止受损 DNA 的修复[4]。这与部分文献中提及的当肿瘤细胞被放化疗致伤时,Chk1 可以帮助其修复从而逃避凋亡相符[5~7]。Chk1 在细胞间期中所发挥的作用对细胞的生长发展具有决定性意义,它是细胞间期最重要的蛋白之一,它的生物学特性也为肿瘤细胞的分裂增殖提供了生物学保证。Chk1 在如食管癌、胃癌、结肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌等中均有显著表达,但在肿瘤的发生、发展的关系方面存在争议[8~10]。本实验发现,Chk1 在肝非肿瘤组织中有表达,在原发性肝癌组织中高表达,且这种表达差异有统计学意义。可以推断,Chk1 与原发性肝癌之间有重要关系,其作为治疗原发性肝癌的特异性靶点值得进一步研究。

Chk1 的表达在不同分化程度的原发性肝癌中差异有统计学意义($P<0.05$),原发性肝癌细胞分化程度越低,Chkl 表达越高,提示 Chk1 可能在原发性肝肿瘤的发生、发展中发挥了某些重要作用。Chk1 在原发性肝癌组织中的表达与其为 ATM/ATR 的下游效应基因这一事实相符,同时也与多位学者的报道一致[11],在原发性肝癌中的具体机制,还有待进一步的研究。

4　参考文献

[1] Studach L, Wang WH, Weber G, et al. Polo-like kinase 1 activated by the hepatitis B virus X protein attenuates both the DNA damage checkpoint and DNA repair resulting in partial polyploidy [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010(39):30282 - 30293.

[2] Gina Chun, Dongsoon Bae, Kristen Nickens, et al. Polo-like kinase 1 enhances survival and mutagenesis after genotoxic stress in normal cells through cell cycle checkpoint bypass [J]. Carcinogenesis, 2010(5): 785 - 793.

[3] Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer [J]. Cancer Cell, 2003(5):421 - 429.

[4] Wong CF, Guminski A, Ssunders NA, et al. Exploiting novel cell cycle targets in the development of anticancer agent[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005(2):85 - 102.

[5] 高庆蕾,叶飞,谢大兴,等. 灭活细胞周期检测点激酶增强乳腺癌细胞放疗敏感性[J]. 中国妇幼保健,2008(23): 4026 - 4028.

[6] Matsumoto K, Nagahara T, Okano J, et al. The growth inhibition of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma cells by gemcitabine and the roles of extracellular signal-regulated and checkpoint kinases [J]. Oncol Rep, 2008(4): 863 - 872.

[7] Bartek J , Lukas J . Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer [J] . Cancer Cell, 2003(5): 421 - 429.

[8] 马全富,黄晓园,高庆蕾,等. Chk1/2 和 Plk1 蛋白在子宫内膜癌中的表达 [J]. 肿瘤防治研究,2008(6):424 - 426.

[9] Tort F, Hernandez S, Bea S, et al. CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas [J]. Blood, 2002(13):4602 - 4608.

[10] 王玉祥,祝淑钗,王鑫,等. CHK1 和 CHK2 在食管癌组织中的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2006(3):171 - 174.

[11] Frederick A Derheimer, Heather M O'Hagan, Heather M. Krueger, et al. RPA and ATR link transcriptional stress to p53 [J]. Cell Biology, 2007(31): 12778 - 12783.

(2012 - 06 - 23 收稿,2012 - 08 - 07 修回)
编辑:周　凌