

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.013

· 临床研究 ·

## 酪氨酸蛋白激酶在肝癌组织中的表达及其与肝癌患者预后的关系

赵军艳, 郑艳敏, 李根(武警后勤学院附属医院 消化内科, 天津 300162)

**[摘要]** **目的:**检测肝癌组织、癌旁组织中酪氨酸蛋白激酶 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 的表达,并探讨其临床病理意义。**方法:**收集武警后勤学院附属医院肝癌手术切除标本 60 例,采用免疫组化 SP 法检测 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织、癌旁组织中的表达;采用比例风险模型 Cox 进行多因素分析,探讨影响肝癌患者预后的因素。**结果:**肝癌组织中 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 平均 D 值为(0.23 ± 0.03)、(0.18 ± 0.06)、(0.19 ± 0.07),明显高于癌旁组织的[(0.16 ± 0.02)、(0.13 ± 0.02)、(0.14 ± 0.05), P < 0.01];Cox 单因素分析显示,C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 与肝癌患者预后密切相关(P < 0.05);Cox 多因素分析显示,JAK<sub>2</sub> 是影响肝癌患者预后的重要独立因素。**结论:**JAK<sub>2</sub> 是影响肝癌患者预后的重要因素,可能作为判断肝癌患者预后的独立指标。

**[关键词]** 肝癌;预后;Cox 分析;ERK;C-Jun;JAK<sub>2</sub>

**[中图分类号]** R735.7; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)05-0531-04

## Expression of tyrosine protein kinase in hepatic cancer tissues and its relationship with prognosis of hepatic cancer patients

ZHAO Jun-yan, ZHENG Yan-min, LI Gen (Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

**[Abstract]** **Objective:**To study the clinicopathological significance of the expressions of ERK, C-Jun and JAK<sub>2</sub> in hepatic cancer tissues and adjacent tumor tissues. **Methods:** The expressions of ERK, C-Jun and JAK<sub>2</sub> in 60 hepatic cancer specimens and adjacent tumor tissues (from Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces) were detected by immunohistochemical SP method. A Cox multivariate analysis was performed in those patients to study the factors that influence the prognosis of hepatic cancer. **Results:** The average values of ERK, C-Jun and JAK<sub>2</sub> in hepatic cancer tissues were significantly higher than that in the tumor-adjacent tissues ([0.23 ± 0.03], [0.18 ± 0.06], [0.19 ± 0.07] vs [0.16 ± 0.02], [0.13 ± 0.02], [0.14 ± 0.05], P < 0.01). The univariate analysis results showed that the major significant prognostic factors influencing survival was the expression of C-Jun and JAK<sub>2</sub>(P < 0.05), and multivariate analysis revealed that the expression of JAK<sub>2</sub> was the most important prognostic factor for hepatic cancer (P < 0.05). **Conclusion:** The expression of JAK<sub>2</sub> may be an prognostic factor for hepatic cancer patients.

**[Key words]** hepatic cancer; prognosis; Cox analysis; ERK; C-Jun; JAK<sub>2</sub>

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 531-534]

酪氨酸蛋白激酶信号转导系统是影响肿瘤发生发展的重要信号系统。在肝癌细胞信号转导链中起主要作用的有促进细胞增殖并调节基因转录的 Ras/Raf/MAPK 途径,以及调节效应基因转录的 JAK-STAT 途径,ERK、C-Jun 和 JAK 是其中的重要因子,这些蛋白激酶在癌组织中的表达不仅影响肿瘤的发生、发展,还可能与其预后有着密切的关系<sup>[1-3]</sup>。原发性肝癌发病率高,患者生存期短,目前治疗上尚无突破性进展,为此本研究应用 Cox 比例

风险模型探讨 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 对原发性肝癌预后的影响,旨在找出影响原发性肝癌术后生存的独

**[基金项目]** 武警后勤学院科研启动基金课题(No. WBS200814)。Project supported by the Start-up Foundation of Chinese People's Armed Police Forces (No. WBS200814)

**[作者简介]** 赵军艳(1971-),女,河北省邢台市人,博士,主要从事消化道肿瘤、胃肠动力学的研究。E-mail: zjy327@126.com

**[通信作者]** 赵军艳(ZHAO Jun-yan, corresponding author), E-mail: zjy327@126.com

立预后指标,以期指导临床选择合理的治疗方案,提高术后患者的生存率。

### 1 材料与方法

#### 1.1 标本来源及主要试剂

收集武警后勤学院附属医院肿瘤外科 2004 年 4 月至 2008 年 4 月原发性肝癌手术切除标本 60 例(术前均未进行化疗和放疗)。其中男 42 例(70%)、女 18 例(30%)。年龄 33 ~ 74(44.8 ± 14.2)岁。病理学类型:肝细胞性肝癌 52 例(86.7%),混合型肝癌 8 例(13.3%)。组织学分化程度:高中分化 40 例(66.7%),低分化 20 例(33.3%)。所有病例癌肿均顺利切除,其中 44 例术中置门静脉和/或肝动脉化疗泵。本组 60 例原发性肝癌患者均进行了随访,术后 6 个月生存率为 83.3%(50/60),1 年生存率为 53.57%(32/60),最短生存期为 12 个月,截止研究时最长生存期为 38 个月。兔抗人 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,生物素标记羊抗兔 IgG、SP 试剂盒,以及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉生物试剂公司。

#### 1.2 组织切片的制备

手术切除标本常规石蜡包埋,首先在 H-E 染色切片上进行定位,选取癌组织、癌旁组织各 60 个位点,应用组织切片制作仪取样针(直径 2 mm),各制作 2 个切片蜡块,以 4 μm 厚度连续切片,敷贴于经 1% 多聚赖氨酸处理的载玻片,各取 1 张进行 H-E 染色供形态学观察,其余切片进行 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 免疫组化检测。

#### 1.3 免疫组化法检测

免疫组化 SP 法的具体步骤如下:(1)石蜡切片常规脱蜡;(2)0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇去内源性酶活性,置于 37 °C 10 min;(3)PBS 洗涤 5 min × 2 遍,加入 0.01 mol/L 的柠檬酸缓冲液(pH 6.0)加热至 92 ~ 96 °C 微波抗原修复 30 min,自然冷却至室温;(4)加正常第二抗体动物血清(1:20),置于 37 °C,20 min;(5)加一抗(兔抗人 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub>,比例 1:100)置于 37 °C,90 min,4 °C 过夜;(6)加二抗(置 37 °C,2 h)、三抗(置 37 °C,1 h);(7)0.05% DAB 显色;(8)风干,透明,中性树胶封固。以已知阳性乳腺癌切片作为阳性对照,以 PBS 替代一抗作为阴性对照。镜下观察染色结果,细胞质或细胞核含棕黄色颗粒者为 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 阳性细胞。用 Motic Med 6.0 医学图像彩色分析系统进行图像半定量分析,每张切片随机选取 5 个视野,测定组织

中 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 的棕黄色阳性表达颗粒的平均 D 值。

#### 1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行 t 检验、相关分析、Cox 比例风险模型单因素分析、多因素回归等分析,以 P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织及癌旁组织中的阳性表达率

ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织及癌旁组织中均有阳性表达(图 1),ERK 在肝癌组织及癌旁组织表达为细胞质含棕黄色颗粒;C-Jun 在肝癌组织及癌旁组织表达为细胞核或细胞质含棕黄色颗粒;JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织及癌旁组织表达为细胞质含棕黄色颗粒。ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在 60 例肝癌组织阳性病例分别为 60 例(100%)、56 例(93.3%)和 54 例(90%),癌旁组织阳性病例分别为 60 例(100%)、50 例(83.3%)和 50 例(83.3%)。

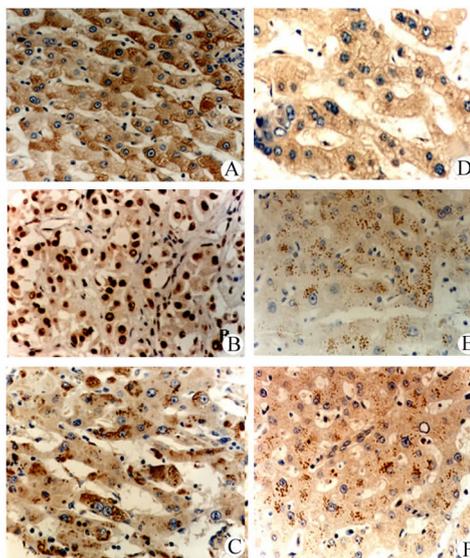


图 1 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织及癌旁组织中的表达(SP, ×400)

Fig. 1 Expressions of ERK, C-Jun and JAK<sub>2</sub> in hepatic cancer and adjacent tumor tissues (SP, ×400)

A: ERK, hepatic cancer tissues; B: C-Jun, hepatic cancer tissues; C: JAK<sub>2</sub>, hepatic cancer tissues; D: ERK, adjacent tumor tissues; E: C-Jun, adjacent tumor tissues; F: JAK<sub>2</sub>, adjacent tumor tissues

#### 2.2 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织中表达强度及其相关关系

肝癌组织中 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 的平均光密度

值为(0.23 ± 0.03), (0.18 ± 0.06), (0.19 ± 0.07) 明显高于癌旁组织的[(0.16 ± 0.02), (0.13 ± 0.02), (0.14 ± 0.05),  $P < 0.01$  ]。ERK 与 C-Jun 表达无明显相关性( $r = 0.124$ ), ERK 与 JAK<sub>2</sub> 表达无明显相关性( $r = 0.228$ ), C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织表达强度呈显著正相关性( $r = 0.572$ )。

### 2.3 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织中表达与肝癌预后的关系

Cox 比例风险模型单因素分析结果显示, ERK 与原发肝癌术后患者预后关系无统计学意义( $P > 0.05$ )。而 C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 与原发肝癌术后患者预后密切相关(表 1,  $P < 0.05$ )。C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 这 2 个指标再进入 Cox 比例风险模型进行多因素回归分析, 按  $\alpha = 0.05$  的标准将各变量进行 Cox 比例风险模型多因素回归分析, 得出和预后有关的重要独立因素为 JAK<sub>2</sub> 的表达(表 2)。

表 1 COX 单因素分析 ERK、C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 表达与肝癌预后的关系

Tab. 1 Cox univariate analysis on the expression of ERK, C-Jun, JAK<sub>2</sub> and prognosis of hepatic cancer

Factor	B	SE	Wald	D/F	Sig	EXP ( B )	95% CI for EXP( B )
ERK	5.863	7.625	0.591	1	0.442	1.867	0.000 ~ 5.247
C-Jun	-9.728	4.024	5.846	1	0.016*	0.000	0.000 ~ 0.158
JAK <sub>2</sub>	-9.851	3.806	6.701	1	0.010*	0.000	0.000 ~ 0.091

\*  $P < 0.05$  vs ERK

表 3 COX 多因素分析 JAK<sub>2</sub> 表达与肝癌预后的关系

Tab. 3 Cox multivariate analysis on the expression of JAK<sub>2</sub> and prognosis of hepatic cancer

Factor	B	SE	Wald	D/F	Sig	EXP ( B )	95% CI for EXP( B )
JAK <sub>2</sub>	-9.851	3.806	6.701	1	0.010	0.000	0.000 ~ 0.091

## 3 讨论

酪氨酸蛋白激酶( tyrosine protein kinase, TPK ) 是一类催化蛋白酪氨酸残基磷酸化的激酶, 可启动多个下游信号通路<sup>[4]</sup>。肝癌细胞信号转导链中起主要作用的有促进细胞增殖并调节基因转录的 Ras/Raf/MAPK 途径和调节效应基因转录的 JAK-STAT 途径, 其中 MAPK 级联反应是这两条信号转导途径最后的共同通路, 它处于关键位置, 是肝癌发病的主要原因<sup>[3]</sup>。

ERK/MAPK 信号转导通路中有 3 个重要靶分子: Ras、Raf 和 MEK<sup>[5]</sup>, Ras/Raf/ERK 信号级联通路能将多种细胞外信号通过磷酸化的活化方式逐级传递至细胞核, 激活多种转录因子, 参与细胞生长、分裂及分化等多种生理过程<sup>[6-7]</sup>。ERK 即是此通路中极为关键的一环, 负责将胞质内的活化信号传递入胞核内。原癌基因 *C-Fos*、*C-Jun* 是活化后转入核内的 ERK 作用的下游基因, 在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。Ras/Raf/ERK 信号转导通路持续异常激活可诱导癌基因的表达, 参与细胞的恶性转

化, 导致肿瘤发生<sup>[10-11]</sup>。Lu 等<sup>[12]</sup>研究发现, 癌基因 *C-Jun* 的异常表达与肝癌的发生密切相关。JAK/STAT 信号途径是继 Ras 途径之后被发现的又一重要的细胞因子信号转导通路。JAK 是在细胞因子信号传递过程中起重要作用的酪氨酸蛋白激酶, 它可在细胞因子受体与相应配基结合后活化, 进而通过激活另一种信号蛋白分子 STAT 诱导目的基因表达。研究发现 JAK/STAT 与多种肿瘤发生有关, 尤其与白血病、淋巴瘤发生、发展关系密切, 在其他实体瘤如肝癌、甲状腺癌、结肠癌、乳腺癌等中也有相关研究<sup>[13-19]</sup>。JAK<sub>2</sub> 为 JAK 家族成员之一, 在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。Calvisi 等<sup>[20]</sup>研究发现, 在人肝细胞癌中存在 JAK/STAT 和 Ras 信号转导通路的激活, 用 JAK/STAT 和 Ras 抑制剂处理肝癌细胞株可诱导强烈的细胞凋亡效应。JAK 抑制剂已用于骨髓增殖性肿瘤临床治疗, 其应用有望使患者中位寿命延长 5 ~ 7 年<sup>[21]</sup>。这些研究结果证明, JAK/STAT 信号转导通路确实与恶性肿瘤的发生发展有密切关系, JAK/STAT 信号通路的过度激活或突变激活可影响细胞的正常增殖分化, 这也许是其

致癌作用的主要方式。

本研究采用免疫组化法检测 ERK、C-Jun、JAK<sub>2</sub> 在原发性肝癌中的表达, 并进行 Cox 比例风险模型多因素回归分析, 期望能发现影响原发性肝癌术后患者生存期的重要因素。结果表明, 肝癌组织中 ERK、C-Jun、JAK<sub>2</sub> 平均 D 值显著高于癌旁组织, C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织表达强度呈显著正相关, 表明 ERK、C-Jun、JAK<sub>2</sub> 均与肝癌发生发展有关。肝癌组织高表达 ERK、C-Jun、JAK<sub>2</sub>, 提示这些蛋白激酶对肝癌细胞增殖可能有重要影响。单因素分析显示, C-Jun 和 JAK<sub>2</sub> 与原发性肝癌术后患者预后密切相关, 但经多因素回归分析发现, C-Jun 在肝癌组织的表达与原发性肝癌患者术后患者预后无显著关系, 表明 C-Jun 不能作为影响肝癌患者预后的独立因素。而 JAK<sub>2</sub> 在肝癌组织的表达与原发性肝癌术后患者预后具有显著相关关系, JAK<sub>2</sub> 的表达越强, 患者预后越差, 生存期越短, 表明其可以作为影响肝癌患者预后的独立因素。本研究发现, JAK<sub>2</sub> 与 C-Jun 在肝癌组织的表达呈密切相关性, 可能是 JAK<sub>2</sub> 通过某些途径影响癌基因 *C-Jun* 的活化, 从而促进细胞过度增殖并向恶性转化。这些研究结果从另一个侧面证明, JAK/STAT 信号转导通路确实与肝癌的发生发展有密切关系。

综上所述, JAK/STAT 途径可能是原发性肝癌发生发展过程中异常活跃的信号传导途径, JAK<sub>2</sub> 蛋白激酶在肝癌组织中的过表达与肝癌的发生、发展、预后有密切联系。进一步研究寻找阻断 JAK<sub>2</sub> 信号传递的特异性抑制剂, 将为开发治疗原发性肝癌、提高患者术后生存率和延长生存期的新药提供理论基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Schmitz KJ, Lang H, Wohlschlaeger J, et al. AKT and ERK1/2 signaling in intrahepatic cholangiocarcinoma [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13( 48 ): 6470-6477.
- [ 2 ] Mangiola A, Lama G, Giannitelli C, et al. Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: Possible prognostic implications [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13( 23 ): 6970-6977.
- [ 3 ] 罗雪莹, 王占平. 子宫内黏膜组织中酪氨酸蛋白激酶的活性研究 [ J ]. *中国医药导报*, 2008, 5( 14 ): 23-24.
- [ 4 ] Al-Rawi MA, Rmali K, Watkins G, et al. Aberrant expression of interleukin-7 ( IL-7 ) and its signalling complex in human breast cancer [ J ]. *Eur J Cancer*, 2004, 40( 4 ): 494-502.
- [ 5 ] 张丰, 李杨. ERK/MAPK 信号转导途径在乳腺肿瘤治疗中的意义 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14( 5 ): 497-500.
- [ 6 ] Röttinger E, Besnardeau L, Lepage T. A Raf/MEK/ERK signaling pathway is required for development of the sea urchin embryo micromere lineage through phosphorylation of the transcription factor Ets [ J ]. *Development*, 2004, 131( 5 ): 1075-1087.
- [ 7 ] 白晶, 刘先胜, 徐永健, 等. ERK 信号通道调控大鼠气道平滑肌细胞的增殖与凋亡 [ J ]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23( 1 ): 38-44.
- [ 8 ] 侯建峰, 冯笑山, 杨晓鹤, 等. 大豆异黄酮干预对乳腺癌中 ERK1、ERK2 和 c-Fos 表达的影响及意义 [ J ]. *肿瘤*, 2010, 30( 9 ): 744-747.
- [ 9 ] 叶劲松, 王志明. CD95、JNK1、JNK2 和 c-Jun 在肝细胞癌中的表达及意义 [ J ]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19( 10 ): 1118-1122.
- [ 10 ] Lim JH, Lee ES, You HJ, et al. Ras-dependent induction of HIF-1 alpha785 via the Raf/MEK/ERK pathway: A novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion [ J ]. *Oncogene*, 2004, 23( 58 ): 9427-9431.
- [ 11 ] 蒋成英, 戴广海. Ras Raf Mek Erk 信号传导通路在肝细胞癌发生中的作用机制及在靶向治疗中的应用 [ J ]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35( 23 ): 1377-1380.
- [ 12 ] Lu GD, Shen HM, Chung MC, et al. Critical role of oxidative stress and sustained JNK activation in aloe-emodin-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells [ J ]. *Carcinogenesis*, 2007, 28( 9 ): 1937-1945.
- [ 13 ] 张书萍, 马静, 李晓江. JAK-STAT 信号通路及 survivin 基因在甲状腺癌中的研究进展 [ J ]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20( 2 ): 416-418.
- [ 14 ] 王伟章, 张碧鱼, 袁健, 等. 姜黄素对肝癌细胞 JAK-STAT 信号通路的影响 [ J ]. *药理学报*, 2009, 44( 12 ): 1434-1439.
- [ 15 ] 陈红芳, 邓华瑜. JAK/STAT3 和 MAPK/ERK 在乳腺癌细胞侵袭转移中的交互作用及意义 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36( 4 ): 293-297.
- [ 16 ] 李文英, 陈紫暄, 房静远. JAK-STAT 信号通路及结直肠癌 [ J ]. *国际消化病杂志*, 2009, 29( 1 ): 33-35.
- [ 17 ] 乔燕燕, 贾颍泽, 马秀梅. JAK1、p-STAT3 和 Bcl-2 在胃癌中的表达及意义 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36( 8 ): 657-661.
- [ 18 ] 胡碧丹, 何凤莲, 方明. JAK/STAT3 通路在瘦素促进肺癌细胞增殖机制中的作用 [ J ]. *实用医学杂志*, 2009, 25( 19 ): 3184-3187.
- [ 19 ] 王鸣明, 邹丽芳, 窦红菊, 等. 三氧化二砷诱导骨髓瘤细胞 JAK/STAT3 通路抑制作用的研究 [ J ]. *上海交通大学学报*, 2009, 29( 10 ): 1187-1190.
- [ 20 ] Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC [ J ]. *Gastroenterology*, 2006, 130( 4 ): 1117-1128.
- [ 21 ] Kralovics R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms [ J ]. *Leukemia*, 2008, 22( 10 ): 1841-1848.

[ 收稿日期 ] 2012 - 07 - 11

[ 修回日期 ] 2012 - 08 - 22

[ 本文编辑 ] 韩丹, 周玲琳