

# 死亡相关蛋白激酶在肝细胞癌中的表达及其临床意义

李孟英<sup>1</sup>, 张家越<sup>1</sup>, 李龙蔓<sup>2</sup>, 纪龙<sup>2</sup>, 范雪娇<sup>2</sup>, 余红平<sup>2</sup> (1. 南宁解放军第303医院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学公共卫生学院 流行病与卫生统计学系, 南宁 530021)

**摘要:** 目的 研究死亡相关蛋白激酶 (death associated protein kinase, DAPK) 在原发性肝细胞癌 (HCC) 组织中的表达及其与HCC临床病理特征的关系。方法 应用免疫组织化学SP法检测DAPK在50例HCC组织及其癌旁组织和5例正常肝组织中的表达。结果 DAPK在HCC组织中的阳性率为36%, 明显低于癌旁组织62%及正常肝组织100% ( $P < 0.05$ ); DAPK低表达与HCC组织分化程度、淋巴结转移有关 ( $P < 0.05$ )。结论 DAPK表达下调在HCC的发生发展中可能起重要作用。  
**关键词:** 死亡相关蛋白激酶; 原发性肝细胞癌

## Expression of DAPK in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

LI Meng-ying<sup>1</sup>, ZHANG Jia-yue<sup>1</sup>, LI Long-man<sup>2</sup>, JI Long<sup>2</sup>, FAN Xue-jiao<sup>2</sup>, YU Hong-ping<sup>2</sup> (1. Department of Infectious Diseases, the 303 Hospital of People's Liberation Army, Nanning 530021, China; 2. Department of Epidemiology, School of Public Health of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of death associated protein kinase (DAPK) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with clinicopathological characteristic. **Methods** SP immunohistochemistry method was applied to detect the expression of DAPK in 50 surgical liver tissue samples and its paracarcinoma tissue samples and 5 normal liver tissue samples. **Results** The expression of DAPK in HCC tissue, paracarcinoma tissue and normal liver tissue were 36%, 62% and 100%, respectively. The positive rate of DAPK was significantly lower than that of paracarcinoma tissue and normal liver tissue. The decreased expression of DAPK was correlated with HCC differentiation degree and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ) in HCC. **Conclusions** The decreased expression of DAPK may play an important role in hepatocarcinogenesis.

**Key words:** DAPK; Hepatocellular carcinoma

死亡相关蛋白激酶 (death associated protein kinase, DAPK) 是一种钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是凋亡的正性调节因子之一, 广泛参与多种途径介导的细胞凋亡, 可促进肿瘤细胞分化并抑制肿瘤转移, 被认为是肿瘤的抑制剂。研究发现DAPK在多种肿瘤细胞和组织中表达减少或丢失, 在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。近年来, DAPK与肿瘤发生发展的关系引起了

人们的广泛关注。本研究采用免疫组织化学法检测DAPK蛋白在HCC组织中的表达, 并探讨其与HCC临床病理特征的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 收集广西医科大学第一附属医院以及解放军第303医院自2007年1月~2007年12月手术切除的原发性肝细胞癌 (HCC) 病例50例, 切除的标本取癌组织和癌旁非癌组织 (距癌肿边缘2 cm以上组织)。正常肝组织5例, 取自同期切除之肝血管瘤周围正常肝组织, 其中男性4例, 女性1

通讯作者: 李孟英 Email: limengying230@sina.com

例, 年龄35~57岁, 平均43.3岁。所有标本均经病理学证实。所有患者术前均未进行化疗或放疗。50例病例中, 男性48例, 女性2例; 年龄26~65岁, 平均(48.2 ± 12.6)岁。所有患者血清HBsAg均呈阴性; HCC患者术前血清AFP测定, AFP阴性43例, AFP阳性7例。HCC组织依据Edmondson标准分级, I级7例, II级16例, III级21例, IV级6例; 按国际抗癌联盟的TNM分期法分期: I期6例, II期15例, III期23例, IV期6例; 33例有淋巴结转移, 17例无转移; HCC伴肝硬化32例。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色** 所有标本均经10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 4 μm连续切片。采用链菌素-过氧化物酶法(SP法)免疫组织化学染色法检测DAPK蛋白。兔抗人DAPK抗体、SP试剂盒、DAB显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。免疫组织化学染色操作程序严格按试剂盒说明书进行, 主要操作步骤简述如下: 二甲苯脱蜡, 经100%、95%、85%、75%酒精梯度脱水, 蒸馏水冲洗, 将切片浸入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中, 置于微波炉内抗原热修复15分钟, 室温自然冷却, 用PBS浸洗, 滴加一抗(1:200), 4℃过夜, PBS浸洗, 滴加试剂Polymer Helper, 37℃孵育30分钟, 滴加二抗, 37℃孵育30分钟, DAB显色剂显色, 苏木素复染, 自来水冲洗, 1%盐酸酒精速洗分化, 自来水冲洗, 返蓝, 依次经75%、85%、95%、100%酒精梯度脱水, 切片自然干燥后, 封片。以PBS代替一抗作阴性对照。

**1.2.2 免疫组织化学染色结果判断** 以细胞浆出现棕黄色染色为阳性, 以阳性染色细胞数多于5%判定为阳性<sup>[1,2]</sup>。

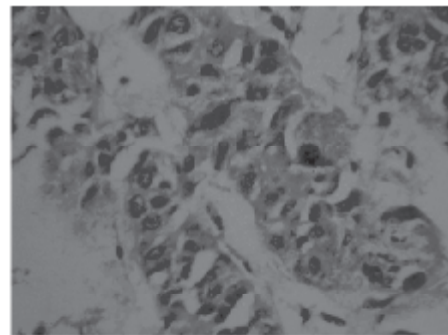
**1.3 统计学方法** 采用 $\chi^2$ 检验、Fisher's卡方检验分析数据。以P值小于0.05作为统计学有意义的判定标准。

## 2 结果

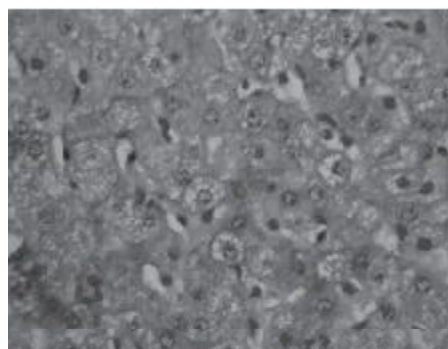
**2.1 DAPK在HCC中的表达** DAPK阳性物质主要出现在细胞浆, 呈棕黄色颗粒状或斑片状染色, 阳性细胞的分布呈弥漫性、小巢状或散在分

布。50例HCC组织中有18例DAPK蛋白表达呈阳性(36.0%) (图1), 癌旁组织阳性率为62.0% (31/50) (图2), 而5例正常肝组织检测均呈阴性表达(图3)。DAPK在HCC组织中的阳性表达率明显低于癌旁组织( $\chi^2 = 6.763$ ,  $P = 0.009$ )和正常组织( $P = 0.01$ , Fisher卡方检验), 而癌旁组织DAPK蛋白表达与肝脏正常组织无显著差异( $P = 0.151$ , Fisher卡方检验)。

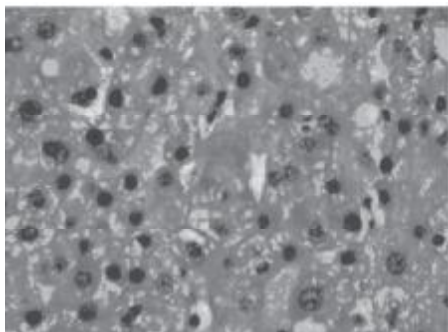
**2.2 DAPK在HCC癌组织中的表达与主要临床病理指标的关系** DAPK低表达与肿瘤分级、淋巴结转



■ 1 DAPK在HCC组织中的表达 (DAB染色, 400 ×)



■ 2 DAPK在HCC癌旁组织中的表达 (DAB染色, 400 ×)



■ 3 DAPK在正常肝脏组织中的表达 (DAB染色, 400 ×)

移相关 ( $P < 0.05$ ), 而与AFP、肝硬化、肿块大小、TNM分期无关 ( $P > 0.05$ ), 见表1。

### 3 讨论

DAPK基因定位于人9q34.1, 转录成熟的mRNA为5.9 kb, 编码的蛋白质分子量为160 kD, 具有一个氨基端激酶区(定位于氨基末端, 其后紧随一个包含钙调素结合区片段), 紧邻的是钙调蛋白结合域, 8个错蛋白重复序列区, 2个P-Loops环, 1个细胞骨架结合域和1个C端死亡域。目前研究显示, DAPK参与包括p53、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、Fas、干扰素 $\gamma$ 、转化生长因子 $\beta$ 等诱导的细胞凋亡过程, 具有促进凋亡的功能<sup>[3]</sup>。DAPK的正常表达可抑制肿瘤的发生、发展和转移, 其表达缺失与肿瘤的形成和侵袭转移有关<sup>[4]</sup>。研究发现DAPK在多种肿瘤细胞株和组织中缺失或极少表达<sup>[5]</sup>。如Kissil等<sup>[6]</sup>用各种人类肿瘤的细胞株研究DAPK的表达, 结果发现10例B细胞株衍生的肿瘤中有8例mRNA和蛋白表达都低于检测下限, 同样14例被检查的膀胱癌中有6例、5例肾细胞癌有3例、10例肺癌有4例DAPK蛋白表达水平低于检测下限或低于正常细胞表达的1%。Narayan等<sup>[7]</sup>和Leung等<sup>[8]</sup>检

测正常宫颈鳞状上皮细胞组织标本、8例不同种类宫颈癌细胞株以及宫颈癌组织标本DAPK表达情况, 结果发现正常宫颈组织中DAPK表达正常, 在宫颈癌组织中DAPK基因表达减少甚至缺失; 在8种宫颈癌细胞株中有5例完全不表达DAPK, 1例DAPK表达减少。Matsumoto等<sup>[9]</sup>用免疫组织化学法检测了DAPK蛋白在43例HCC中的表达, 发现有16例DAPK蛋白表达呈阴性(37.2%), 与DAPK表达阴性的肝细胞癌相比, DAPK阴性病例的血清AFP值更低、肿瘤分化更高、组织浸润和转移较少、肿瘤细胞凋亡数更多、生存率更高。他们认为DAPK表达减少或缺失可使肝癌细胞逃脱凋亡而与HCC发生发展有关。本研究中, 笔者用免疫组织化学SP法对HCC中DAPK蛋白进行检测, 发现50例HCC组织中有18例DAPK蛋白表达呈阴性(36.0%), 癌旁组织阴性率则为62.0%(31/50), 而5例正常肝组织检测均呈阴性表达。DAPK在HCC组织中的阴性表达率明显低于癌旁组织和正常组织; 同时, 低分化HCC的DAPK蛋白表达(22.2%)明显低于高分化的HCC(52.2%)。

表1 DAPK表达与HCC临床病理指标的关系

临床病理指标	例数 (n)	DAPK表达			$\chi^2$	P
		阳性 (n)	阴性 (n)	阳性率 (%)		
分化程度	I 和 II	23	12	52.2	4.836	0.028
	III 和 IV	27	6	22.2		
临床分期	I 和 II	21	8	38.1	0.155	0.461
	III IV	29	10	34.5		
伴肝硬化	有	32	11	34.4	0.102	0.492
	无	18	7	38.9		
AFP	阳性	43	16	37.2	0.195	0.505
	阴性	7	2	28.6		
肿瘤直径 (cm)	$\geq 5$	34	13	38.2	0.230	0.439
	$< 5$	16	5	31.3		
假包膜	有	19	8	42.1	0.496	0.343
	无	31	10	32.3		
转移	有	33	5	15.2	18.310	0.000
	无	17	13	76.5		
门脉癌栓	有	27	10	37.0	0.027	0.552
	无	23	8	34.8		

本研究还发现有淋巴结转移的HCC,其DA PK阴性表达率明显低于无转移组,提示DA PK的表达缺失与HCC转移有关,DA PK可能有抑制肿瘤转移的功能。Inbal等<sup>[4]</sup>在肺肿瘤的鼠动物模型中发现来源于鼠的具有高转移性的肺癌细胞克隆缺乏DA PK基因表达,而低转移性瘤细胞克隆DA PK基因表达正常,将DA PK基因转染至高转移性肿瘤细胞中,使DA PK基因表达恢复生理水平的瘤细胞克隆在体外表现出正常的细胞生长模式,在体内局部肿瘤形成延缓,静脉注射到鼠体内后瘤细胞形成肺转移的能力也被抑制。DA PK参与抑制肿瘤转移的机制可能通过以下途径:①肿瘤转移时,DA PK抑制细胞从细胞外基质脱离,使瘤细胞对各种凋亡刺激因子更敏感;②DA PK细胞骨架功能如支持功能和细胞的收缩,可能影响转移。但本研究发现DA PK表达与HCC的TNM分期无关,提示DA PK主要在HCC早期就发挥了作用。目前研究认为肿瘤发生发展与DA PK表达低下或缺失有关,而DA PK CpG岛的甲基化导致了DA PK表达低下或失活<sup>[10]</sup>。DA PK基因5'-非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)的CpG岛是一个甲基化的潜在靶点,DNA甲基化的最终结果是使内源性DA PK基因转录沉默而失去基因的功能。近年研究显示,DA PK启动子CpG岛高频率的甲基化在食管癌、胃癌、肺癌、膀胱癌、头颈肿瘤等多种肿瘤中被发现<sup>[11-15]</sup>。钱波等<sup>[16]</sup>发现在HCC组织中DA PK CpG岛甲基化率达到77.5%,而在正常肝组织中无甲基化。

本研究结果提示在HCC发生发展中,DA PK可能发挥重要抑制作用,其表达减少或缺失可能是肝细胞癌的主要机制之一。由于DA PK基因CpG岛甲基化是DA PK表达低下或缺失的重要原因,而用去甲基化药物如5-氮-2'-脱氧胞苷处理DA PK阴性细胞,这些细胞中的DA PK重新获得表达,可使DA PK蛋白表达恢复到正常水平,并恢复对肿瘤细胞生长的控制作用<sup>[17-19]</sup>。HCC现已成为我国最常见恶性程度最高的肿瘤之一,近年来以手术为主的综合治疗虽然使HCC的疗效有了较大提高,但其总体疗效和长期生存率远远未令人满意。目前

前关于DA PK在HCC中的相关研究相对欠缺,但DA PK作为一种重要的诱导凋亡作用的蛋白激酶及其在人类肿瘤细胞中表达的高频率丢失,同时又能通过去甲基化重新获得表达,使DA PK在癌症治疗中有望作为一种潜在的基因或药物作用靶点。因此,有必要对DA PK如何在HCC组织中被激活及其在HCC发生、发展过程中的分子生物学机制进一步研究阐明,为HCC治疗和药物开发提供新的思路。

#### 参考文献

- [1] Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, et al. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers[J]. *Am J Pathol*,2004,164:689-699.
- [2] Lin Z, Gao M, Zhang X, et al. The hypermethylation and protein expression of p16INK4A and DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2005,131:364-370.
- [3] Cohen O, Inbal B, Kissil JL, et al. DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain[J]. *J Cell Biol*, 1999,146:141-148.
- [4] Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis[J]. *Nature*,1997,390:180-184.
- [5] Uehara E, Takeuchi S, Tasaka T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in therapy-related leukemia[J]. *Int J Oncol*,2003,23:693-696.
- [6] Kissil JL, Feinstein E, Cohen O. DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: Possible implications for role as tumor suppressor[J]. *Oncogene*,1997,15:403-407.
- [7] Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, et al. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome[J]. *Mol Cancer*,2003,2:24.
- [8] Leung RC, Liu SS, Chan KY, et al. Promoter methylation of death-associated protein kinase and its role in irradiation response in cervical cancer[J]. *Oncol Rep*,2008,19:1339-1345.
- [9] Matsumoto H, Nagao M, Ogawa S, et al. Prognostic significance of death associated protein kinase expression in hepatocellular carcinomas[J]. *Anticancer Res*, 2003,23:1333-1342.
- [10] Gozuacik D, Kimchi A. DAPK protein family and cancer[J]. *Autophagy*,2006,2:74-79.
- [11] Kuester D, Dar AA, Moskaluk CC, et al. Early involvement of death-associated protein kinase promoter hypermethylation in the carcinogenesis of Barrett's esophageal adenocarcinoma and its association with clinical progression[J]. *Neoplasia*,2007,9:236-245.
- [12] Bernal C, Aguayo F, Villarroel C, et al. Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer[J]. *Clin Cancer*

- Res,2008,14:6264-6269.
- [13] Liu Y, Gao W, Siegfried, et al. Promoter methylation of RASSF1A and DAPK and mutations of K-ras, p53, and EGFR in lung tumors from smokers and never-smokers[J]. BMC Cancer,2007,7:74.
- [14] Christoph F, Hinz S, Kempkensteffen C, et al. A gene expression profile of tumor suppressor genes commonly methylated in bladder cancer[J]. J Cancer Clin Oncol, 2007,133:343-349.
- [15] Nayak CS, Carvalho AL, Jeronimo C, et al. Positive correlation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and death-associated protein kinase hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Larngoscope, 2007,117:1376-1380.
- [16] 钱波, 朱立新, 耿小平, 等. 肝细胞癌MGMT、DAPK、THBS1和RIZ1基因甲基化研究[J]. 中华普通外科杂志,2005,20:291-294.
- [17] 张松, 孔继佳, 王彦君, 等. 5-杂氮-2'-脱氧胞苷对人鼻咽癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 癌症,2005,24:1201-1205.
- [18] 胡礼纳, 王国民, 张利能, 等. 膀胱癌细胞中DAPK基因启动子甲基化状态分析[J]. 中华实验外科杂志,2007,24:489-491.
- [19] Tang X, Wu W, Sun SY, et al. Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter attenuates the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Cancer Res,2004,2:685-691.

收稿日期: 2008-10-23

## • 会议报道 •

## 人民卫生出版社系列电子期刊管理委员会第2次会议圆满结束

2009年9月12~14日, 人民卫生出版社系列电子期刊管理委员会第2次会议暨医药电子期刊出版趋势高峰论坛在广州珠江宾馆圆满举行。新闻出版总署报刊司朱伟峰副司长、科技部信息情报研究所张玉华研究员、人民卫生出版社胡国臣社长兼总编辑、杜贤副总编辑、报刊出版中心范存斌主任、张凤新副主任、电子音像出版中心周永迷副主任、社系列电子期刊管理委员会全体委员, 第1批已获批准、第2批已经申报和第3批准备申报的20种电子期刊的主编、编委、编辑部主任, 以及第4批积极申请加入申报队伍的院校领导、专家共70余人参加了会议。

杜贤副总编辑主持会议。中山大学附属第一医院院长王深明教授代表东道主致词, 对各方代表的参会表示热烈的欢迎, 并预祝会议取得圆满成功。同时他以《中国血管外科杂志(电子版)》主编的身份介绍和汇报了杂志的顺利申办、成功承办和正式发刊的工作, 高度评价了人民卫生出版社系列电子期刊管理委员会的历史作用和卓越功绩。

胡国臣社长兼总编辑、新闻出版总署报刊司朱伟峰副司长、科技部科技信息情报研究所张玉华研究员在会上分别作了讲话。此外, 哈尔滨医科大学副校长曹德鼎教授代表第4批积极申请加入申报队伍的院校领导在会上做了精彩演讲。

胡国臣社长兼总编辑、朱伟峰副司长等领导向《中国肝脏病杂志(电子版)》、《中国血管外科杂志(电子版)》、《消化肿瘤杂志(电子版)》、《泌尿外科杂志(电子版)》、《中国产前诊断杂志(电子版)》、《中国医学前沿杂志(电子版)》等6本电子期刊的主编颁发了新闻出版总署关于人民卫生出版社首批6本电子期刊刊号的正式批复证书。

会议进行了热烈而广泛深入的讨论, 与会代表畅所欲言, 探讨交流电子期刊的办刊经验、存在问题及解决之道。很多没有申办电子期刊的代表也纷纷表示要尽快加入到人民卫生出版社系列电子期刊的队伍中来。

杜贤副总编辑做总结发言, 认为此次大会是人民卫生出版社发展历史上一次具有里程碑意义的重要会议, 标志着人民卫生出版社已由传统的纸质出版传媒向数字出版传媒的成功转型。为进一步做好电子期刊今后的办刊工作, 杜贤副总编辑对承办单位提出了具体建议和要求。

本次会议进一步明确了人民卫生出版社系列电子期刊的办刊思想、创新理念、发展目标、管理要求、质量标准、国际战略, 标志着人民卫生出版社期刊事业发展再创新的高度、迈上了新的平台, 人民卫生出版社强社强刊工程翻开了历史崭新的一页。会议取得了圆满成功。