

# 肝细胞癌中全长型脾酪氨酸激酶的表达及其预后价值

洪 健<sup>1</sup>, 邹如海<sup>2</sup>, 杨龙君<sup>1</sup>, 李斌奎<sup>1</sup>, 黄品助<sup>1</sup>, 元云飞<sup>1\*</sup>

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 1.肝胆科; 2. 超声科, 广东 广州 510060)

**摘 要:**【目的】脾酪氨酸激酶(SYK)有两种蛋白异构体的存在,全长型 SYK(L)和缩短型 SYK(S),两者在恶性肿瘤中功能不同;肝癌中 SYK(L)功能未见报道。本研究通过定制的 SYK(L)特异性多克隆抗体,检测其在肝细胞癌组织中的表达,探讨 SYK(L)表达与肝癌患者临床病理因素及预后关系。【方法】定制 SYK(L)的特异性抗体,采用免疫组化方法检测 162 例肝癌患者的肿瘤组织及其癌旁肝组织 SYK(L)蛋白的表达情况,分析其与临床病理因素及患者术后生存的关系。【结果】定制 SYK(L)抗体的特异性良好;肝癌组织中 SYK(L)阳性率为 64.8% (105/162),低于癌旁肝组织 98.1% (159/162) ( $P < 0.001$ );SYK(L)表达与肿瘤大小、肿瘤分化程度、有无卫星结节和血管侵犯相关( $P < 0.05$ )。肿瘤中 SYK(L)蛋白阳性表达肝癌患者的术后无复发生存与总体生存明显长于阴性表达者( $P < 0.001$ )。多因素 Cox 回归模型显示,SYK(L)表达状态是肝癌患者无复发生存期与总体生存期的独立危险因素之一( $P < 0.001$ )。【结论】肝癌组织中 SYK(L)蛋白表达减低,与肿瘤分化、侵袭转移和预后相关;SYK(L)可作为判断肝癌患者预后的有效分子标志物。

**关键词:** 肝肿瘤; 肝切除术; 脾酪氨酸激酶(L); 多因素分析; 预后

**中图分类号:** R738.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2011)02-0213-07

## Prognostic Significance of Full-length SYK Expression in Human Hepatocellular Carcinoma

HONG Jian<sup>1</sup>, ZOU Ru-hai<sup>2</sup>, YANG Long-jun<sup>1</sup>, LI Bin-kui<sup>1</sup>, HUANG Pin-zhu<sup>1</sup>, YUAN Yun-fei<sup>1\*</sup>

(1.Department of Hepatobiliary Oncology, 2.Department of Ultrasound, Key Laboratory of Oncology in South China//Cancer Center of Sun Yat-sun University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】 Spleen tyrosine kinase (SYK) has two isoforms, full-length form SYK(L) and short form SYK(S), which has different roles in human malignant tumor. The reports of SYK(L) in HCC are few. This study was to generate SYK(L)-specific antibody, and investigate the correlation between the expression pattern of SYK (L) protein in HCC and clinicopathological characteristics and prognosis. 【Methods】 SYK(L)-specific antibody was generated by a biotech company. The expression of SYK(L) was detected in 162 cases of HCC tissues and adjacent non-tumor liver tissues by immunohistochemistry. The relationship between the expression statuses of SYK(L) and clinicopathological characteristics and prognosis was analyzed. 【Results】 The specificity of SYK(L)-specific antibody (SYK-23) was well. The positive rate of SYK(L) was significantly lower in HCC tissues [64.8% (105/162)] than that in adjacent non-tumor tissues [98.1% (159/162)] ( $P < 0.001$ ); moreover, SYK(L) expression was significantly associated with the tumor size, tumor differentiation, satellite nodule and vascular invasion (all  $P < 0.05$ ). After resection of primary HCC, the patients with SYK(L)-positive tumors had a significant longer recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS) than those with SYK(L)-negative tumors. The multivariate cox proportional hazards regression analysis of prognostic factors for RFS and OS showed that the expression of SYK(L) was an independent factor for prognosis of HCC. 【Conclusion】 Down-regulation of SYK(L) protein expression may be involved in the carcinogenesis and metastasis of HCC, and is a powerful molecular marker to predict the HCC prognosis.

**Key words:** liver neoplasm; hepatectomy; SYK(L) protein; multivariate analysis; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2011, 32(2): 213-218, 225]

肝细胞癌(以下简称肝癌)的发生是一个多基因、多步骤的长期过程,原癌基因的激活和抑癌基

因的失活直接参与了肿瘤的发生。脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, SYK)是一种非受体型酪氨

收稿日期:2010-11-22

基金项目:国家自然科学基金(30872489;30972916)

作者简介:洪健,肿瘤外科学在读博士生,主治医师; \* 通信作者:元云飞,教授,博士生导师; E-mail: yuanyf@mail.sysu.edu.cn

酸激酶,在血液疾病、免疫性疾病以及肿瘤等中发挥重要作用<sup>[1-3]</sup>。SYK 基因由于在转录过程中选择性地拼接,可产生两种蛋白异构体(图 1),全长型的 SYK 蛋白称为 SYK(L),而 IDB 域缺失了 23 个氨基酸的蛋白称为 SYK(S)<sup>[4]</sup>。近年来研究发现,在多种恶性肿瘤中随着肿瘤的侵袭程度的升高,SYK(L)的表达呈下降趋势,认为 SYK(L)基因具有潜在的抑癌作用;而 SYK(S)不具备该功能<sup>[4-5]</sup>。我们既往通过定量 PCR 的方法发现,SYK(L)和 SYK(S)在肝癌中均有表达,且对肝癌的预后相反的预测价值(待发表)。目前市场上检测 SYK(L)蛋白的抗体,一般亦能同时检测 SYK(S),尚无特异性针对 SYK(L)蛋白的抗体。本研究通过定制的 SYK(L)特异性抗体检测肝癌组织中 SYK(L)蛋白的表达,并探讨 SYK(L)在肝癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

收集中山大学肿瘤防治中心肝胆科 2001 年 1 月至 2003 年 3 月行手术切除的肝细胞癌患者的石蜡标本 162 例,所有患者具有完整存档病历和随访资料。162 例肝癌患者中,男性 145 例,女性 17 例;年龄 26 ~ 78 岁,中位年龄 50 岁;所有患者术前均未接受放、化疗等抗肿瘤治疗,治疗方式均为根治性手术切除(R0)。所有符合入选标准的肝癌患者均为连续性选择。

### 1.2 定制 SYK(L)抗体特异性的检测

肝癌细胞系 SMMC7721 为本室保存。SMMC7721 细胞培养于含 100 mL/L 新生牛血清的 DMEM 培养基,并置于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。质粒 pcDNA 3.1 (+)-SYK(L)、pcDNA 3.1(+)-SYK(S)为美国 MD. Anderson 癌症中心 Jia Le Dai 教授馈赠。SYK(L)特异性抗体是针对 SYK(L)特有,而 SYK(S)缺失的 23 个氨基酸(图 1)合成多肽 TWSAGGIISRIKSYSPKPGHRKC, KLH 偶联后的多肽抗原免疫新西兰白兔,提取血清,利用抗原抗体特异性结合的原理,纯化后得到与抗原特异性结合的抗体,抗体制作由百奇生物科技有限公司完成(货号 SA090429AC),命名为 SYK-23。

将对数生长期的 SMMC7721 细胞用胰蛋白酶

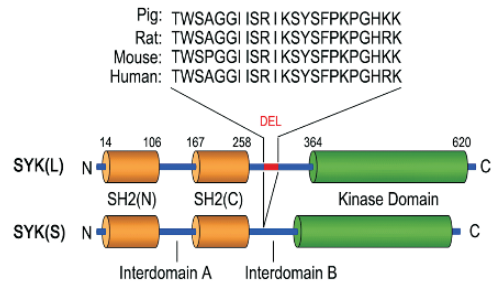


图 1 SYK 两种异构体的主要区域结构图

Fig.1 Domain structure of SYK(L) protein and its alternative splicing variant SYK(S')

SYK(S') has 23 amino acid residues (DEL) missing in the IDB region, and the sequence homology of 23-residue DEL across species is shown

消化后,接种于 6 孔板中,次日待汇合率达 90% ~ 95%时采用脂质体 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司) 转染携带野生型 SYK(L)或 SYK(S)的质粒,以及空载体对照质粒,步骤按操作说明进行,36 小时后提取蛋白用于 Western blot 分析。用 10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量(50 μg)的蛋白并转移至 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h 后,定制 SYK-23 抗体 4℃孵育过夜,以 GAPDH 蛋白作为内对照。TBST 漂洗 3 次后加入羊抗兔二抗(1:3 000 稀释),室温反应 1 h,漂洗后按 ECL 试剂盒(Pierce)说明书进行检测显影。将含有 SYK 蛋白条带的 PVDF 膜重新用 TBST 漂洗后封闭,用能同时检测 SYK(L)与 SYK(S)的抗体 SYK(N-19)(sc-1077, Santa Cruz, 1:1 000 稀释) 4℃孵育过夜,其余步骤同上。

### 1.3 免疫组化染色

所有肝癌组织标本经 40 g/L 多聚甲醛溶液固定,常规脱水、包埋,连续 5 μm 切片,分别作 HE 和免疫组化染色。组织玻片脱蜡后浸泡于梯度乙醇水化;30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育,以阻断内源性过氧化物酶;微波抗原修复;滴加非免疫性山羊血清,室温封闭 30 min;滴加兔抗人 SYK(L)特异性抗体 SYK-23 (1:100),4℃过夜,PBS 冲洗;滴加 EnVision 二抗(GK500710, Gene Tech),37℃孵育 30 min,PBS 冲洗;DAB 显色,苏木精复染;二甲苯透明,中性树脂封片。以已知染色强阳性的组织切片作为阳性对照;以山羊血清代替一抗作为阴性对照,0.01 mol/L PBS 代替一抗作为空白对照。

### 1.4 结果判断

参照文献[6]制定本实验的染色判断标准:在

组织切片中胞核或胞质染为淡黄至棕黄色者为阳性细胞;每张切片随机选择5个视野,每个视野计数100个细胞,得出阳性细胞百分比,根据阳性细胞所占比例和染色深度进行综合评分。阳性细胞<10%为0分,10%~30%为1分,31%~50%为2分,>50%为3分。细胞无显色为0分;淡黄色为1分;棕黄色为2分;黄褐色为3分;每例积分为前述两个评分的乘积。按积分高低分级:2分或2分以下为阴性,2分以上为阳性。以上结果由两位病理医师独立阅片并记录。

### 1.5 无复发生存期及总体生存期评定

本研究中共入组162例接受肝癌根治性切除患者,术后定期随访(采用病历跟踪、电话随访及信件随访的方式),综合临床体征、影像学检查(B超、CT或MRI等)以及AFP结果,提示肝脏或远处器官出现新病灶,即诊断为肿瘤复发。生存时间按月计算,自手术切除肿瘤日至诊断肿瘤复发或患者死亡为无复发生存期(recurrence-free survival, RFS),总生存期(overall survival, OS)为手术当日至死亡日(或最近一次随访)。

### 1.6 随访及统计学处理

随访截止日期为2010年10月31日,中位随访时间48个月(4~106个月),无失访。截至末次随访日期,出现复发或其它器官转移占72.2%(117/162);死亡占58.6%(95/162),死因主要由肿瘤本身所致。运用SPSS 13.0软件进行统计分析。SYK(L)蛋白表达与临床病理因素的关系采用 $\chi^2$ 或Fisher确切概率法检验;生存率采用Kaplan-Meier法计算,单因素分析采用Kaplan-Meier log-rank检验,多因素分析采用Cox回归模型,以 $P < 0.05$ 为显著性检验的标准。

## 2 结果

### 2.1 定制 SYK(L) 抗体的特异性

经 Western blotting 检测,定制 SYK(L) 抗体(SYK-23)能特异性检测出 SYK 两种异构体中 SYK(L),而不能检测出 SYK(S),结合该抗体在肝癌组织中免疫组化结果,充分表明该抗体特异性良好(图2)。

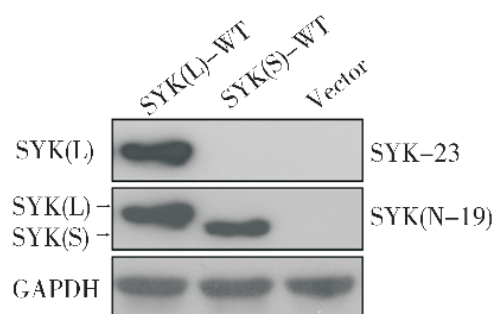


图2 自制 SYK(L) 抗体的特异性检测  
Fig.2 The specificity of SYK(L)-specific antibody (SYK-23) was tested in HCC cells

SYK (N-19) which could detect both SYK(L) and SYK(S), was used as a positive control

### 2.2 SYK(L) 蛋白在肝癌及癌旁肝组织中的表达

免疫组化检测的结果显示,癌旁肝组织中 SYK(L) 蛋白表达主要定位于细胞核与细胞浆中,表现为细胞核和(或)细胞浆中存在不同染色程度的棕黄色颗粒;肝癌组织中 SYK(L) 蛋白染色深度较癌旁肝组织低,其表达主要位于细胞浆中,呈淡黄色,仅部分病例入核(图3)。SYK(L) 在癌旁肝组织阳性率为 98.1% (159/162),而肝癌组织阳性

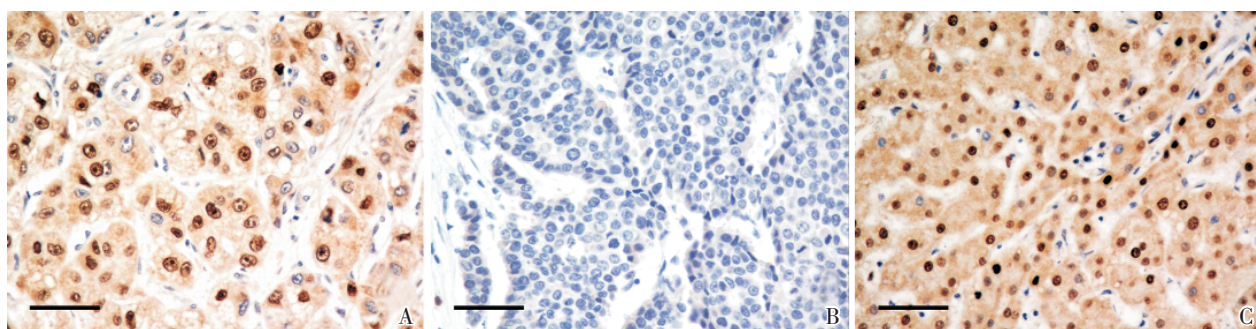


图3 SYK(L)在肝癌及癌旁肝组织中的表达

Fig.3 Representatives of SYK(L) expression in HCC

A, positive expression; B, negative expression and matched non-tumor tissues detected by immunohistochemistry; C, matched non-tumor tissues; The scale bar is 50  $\mu$ m

率为 64.8% (105/162), 肝癌组织中 SYK(L) 蛋白表达明显低于癌旁肝组织 ( $P < 0.001$ )。

### 2.3 SYK(L) 蛋白表达与肝癌患者各临床病理因素间的关系

由表 1 可见: SYK(L) 蛋白在肿瘤直径 ( $\leq 5$  cm)、无卫星结节、无血管侵犯或肿瘤分化程度 (I/II 级) 的肝癌患者中阳性表达比例增高 ( $P < 0.05$ ); 但与肝癌患者的性别、年龄、乙肝的感染状态、术前 Child-Pugh 分级、肿瘤包膜和肝硬化程度等临床病理因素无明显关系 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 生存分析

本研究共引入 12 项可能影响肝癌患者术后生存的临床病理因素, 包括患者性别、年龄、乙肝感染状态、术前 Child-Pugh 分级、术前 AFP 水平、肿瘤大小、卫星结节、肿瘤包膜、血管侵犯、手术切缘、肿瘤分化程度和肝硬化程度。单因素预后分析结果显示: 肿瘤大小、卫星结节、血管侵犯、手术切缘、肿瘤分化程度影响患者术后无复发生存与总体生存期 ( $P < 0.05$ ), 肿瘤有无包膜 ( $P = 0.032$ ) 亦可影响患者的术后的无复发生存期 (表 2)。SYK(L) 蛋白的表达状态作为一项分子指标引入单因素预后分析, 发现 SYK(L) 蛋白阳性患者比其阴性患者具有更好的无复发生存期与总体生存期 (log-rank test,  $P < 0.001$ ; 表 2); SYK(L) 蛋白阳性患者中位生存期为 ( $68.4 \pm 3.8$ ) 个月, 而 SYK(L) 蛋白阴性患者中位生存期仅为 ( $42.3 \pm 4.8$ ) 个月。SYK(L) 蛋白表达和肝癌的预后相关, 肝癌中 SYK(L) 蛋白表达水平高的患者 RFS 与 OS 均较长 (图 4)。

将上述单因素分析得出的影响肝癌患者预后的因素引入 Cox 回归模型, 进行多因素分析, 提示肿瘤大小 ( $P = 0.002$ )、有无卫星结节 ( $P = 0.021$ ) 和 SYK(L) 蛋白表达状态 ( $P < 0.001$ ) 是影响肝癌患者无复发生存期的独立预后因素; 影响患者术后总体生存期的因素有肿瘤大小 ( $P = 0.005$ )、有无卫星结节 ( $P = 0.045$ )、手术切缘 ( $P = 0.004$ ) 和 SYK(L) 蛋白表达状态 ( $P < 0.001$ , 表 3)。以上结果显示: SYK(L) 蛋白表达状态是影响肝癌患者 RFS 和 OS 的独立危险因素, 且具有较高的预测价值。

## 3 讨 论

SYK 是一种非受体型蛋白酪氨酸激酶, 在乳

表 1 SYK(L) 蛋白表达状态与肝癌患者临床病理因素间的关系

Table 1 Correlation of SYK(L) protein expression with clinicopathologic features in 162 HCC patients

Characteristics	Cases	% of patients with SYK(L) expression		P
		Negative	Positive	
Gender				
Female	17	23.5(4/17)	76.5(13/17)	
Male	145	37.9(55/145)	62.1(90/145)	0.296
Age (years)				
$\leq 50$	87	33.3(29/87)	66.7(58/87)	
$> 50$	75	37.3(28/75)	62.7(47/75)	0.624
HBsAg				
Negative	25	36.0(9/25)	64.0(16/25)	
Positive	137	35.0(48/137)	65.0(89/137)	0.926
Child-Pugh classification <sup>1)</sup>				
A	154	34.4(53/154)	65.6(101/154)	
B	8	50.0(4/8)	50.0(4/8)	0.454
AFP ( $\mu\text{g/L}$ )				
$< 20$	51	31.4(16/51)	68.6(35/51)	
20-400	47	34.0(16/47)	66.0(31/47)	
$> 400$	64	39.1(25/64)	60.9(39/64)	0.679
Tumor size (cm)				
$\leq 5$	67	25.4(17/67)	74.6(50/67)	
$> 5$	95	42.1(40/95)	57.9(55/95)	0.031
Satellite nodule				
No	140	31.4(44/140)	68.6(96/140)	
Yes	22	59.1(13/22)	40.9(9/22)	0.016
Tumor capsule				
No/incomplete	69	40.6(28/69)	59.4(41/69)	
Yes	93	31.2(29/93)	68.8(46/93)	0.246
Vascular invasion				
No	143	30.1(43/143)	69.9(100/143)	
Yes	19	73.7(14/19)	26.3(5/19)	$< 0.001$
Tumor differentiation				
I/II	84	23.8(20/84)	76.2(64/84)	
III/IV	78	47.4(37/78)	52.6(41/78)	0.002
Cirrhosis				
No	24	33.3(8/24)	66.7(16/24)	
Mild	72	33.3(24/72)	66.7(48/72)	
Moderate	53	35.8(19/53)	64.2(34/53)	
Severe	13	46.2(6/13)	53.8(7/13)	0.840

<sup>1)</sup>No patient with Child-Pugh class C was found

腺上皮细胞、黑色素细胞和肝细胞等多种实体瘤中, SYK 具有抑制肿瘤细胞分裂、增殖、迁徙和成

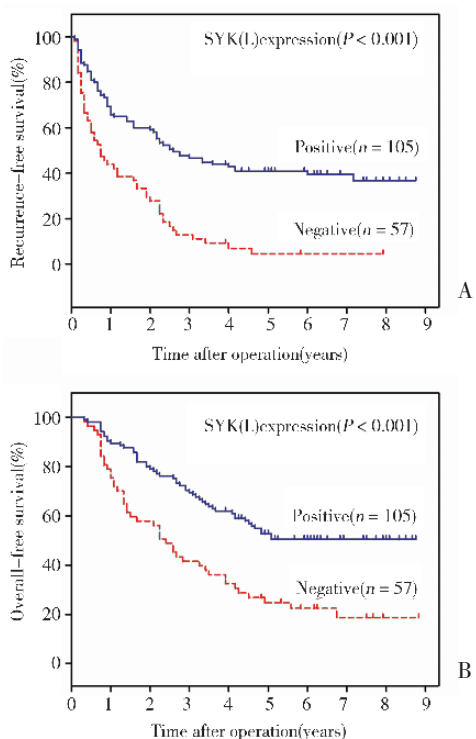


图 4 肝癌组织中 SYK(L) 阳性与阴性患者的生存曲线

Fig.4 Recurrence-free survival (A) and overall survival (B) curves is based on SYK(L) protein expression status

Actuarial probabilities were calculated by the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. After resection of primary tumors, patients with SYK (L)-positive expression in primary tumors had better RFS and OS rates than those with SYK (L)-negative expression (both  $P < 0.001$ )

瘤等功能,被认为是一种候选抑癌基因<sup>[3,7]</sup>。研究发现:SYK 在正常乳腺上皮中高度表达、在原位导管癌中的表达降低、在浸润性导管癌中的表达丢失<sup>[8]</sup>;乳腺癌与肝癌中,启动子甲基化可导致 SYK 基因表达缺失<sup>[6,9]</sup>。SYK 蛋白两种异构体 SYK(L) 与 SYK(S)在 IDB 域相差 23 个氨基酸,该 23 个氨基酸序列在猪、鼠和人等多种种属中高度保守(图 1),并且在信号转导中有其独特的作用,甚至对 SYK 整体功能都有影响<sup>[4]</sup>。SYK(S)在正常组织中的表达量较少,有关 SYK(S)的功能报道甚少。近年来,通过对 SYK 两种异构体深入研究,发现在乳腺癌、胃癌等实体肿瘤中,SYK 的抑癌基因功能实际上是由 SYK(L)发挥作用的,而 SYK(S)可能具有潜在的癌基因功能<sup>[4-5]</sup>。SYK(L)具有核定位信号,在特定的情况下能够从细胞浆进入细胞核发挥转录抑制因子功能,胞浆和核内均可表达;而 SYK(S)仅存在于细胞浆中<sup>[10]</sup>。

表 2 影响 162 例肝癌患者肝切除术后无复发生存期与总体生存期的单因素分析

Table 2 Univariate prognostic analyses of recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS) rates for 162 HCC patients after hepatectomy

Variables	Cases	RFS rate (%)		P	OS rate (%)		P
		3 y	5 y		3 y	5 y	
Gender							
Female	17	47.1	23.5		64.7	44.1	
Male	145	33.6	29.2	0.888	59.2	42.0	0.944
Age (years)							
≤50	87	37.7	31.8		57.3	45.5	
>50	75	32.0	22.6	0.563	62.7	40.1	0.854
HBsAg							
Negative	25	52.0	39.6		64.0	50.9	
Positive	137	31.9	26.6	0.200	59.0	38.9	0.498
Child-Pugh classification							
A	154	36.2	29.4		60.9	44.0	
B	8	12.5	12.5	0.278	37.5	25.0	0.286
AFP (μg/L)							
<20	51	41.2	31.0		60.8	44.4	
20-400	47	26.7	17.6		54.7	32.4	
>400	64	35.9	32.1	0.426	62.5	47.6	0.288
Tumor size (cm)							
≤5	67	55.0	40.8		75.9	58.6	
>5	95	22.1	20.0	<0.001	48.4	32.0	0.001
Satellite nodule							
No	140	37.6	32.4		64.2	46.2	
Yes	22	18.2	4.5	0.001	31.8	22.7	0.006
Tumor capsule							
No/incomplete	69	29.0	2.12		52.2	33.9	
Yes	93	39.4	31.5	0.032	65.4	49.7	0.063
Vascular invasion							
No	144	37.8	30.5		62.9	46.2	
Yes	18	14.0	14.0	0.004	36.1	18.0	0.001
Resection margin(cm)							
≤1	89	30.0	23.7		51.5	34.7	
>1	73	47.9	32.8	0.046	68.5	53.1	0.009
Tumor differentiation							
I/II	84	42.5	36.4		70.0	50.3	
III/IV	78	26.9	20.1	0.002	47.4	33.6	0.005
Cirrhosis							
No	24	33.3	29.2		54.2	40.0	
Mild	72	34.7	30.3		62.5	43.4	
Moderate	53	35.8	28.3		54.7	41.2	
Severe	13	36.9	18.5	0.911	67.7	25.4	0.954
SYK(L) protein expression							
Negative	57	13.0	4.6		41.6	24.8	
Positive	105	46.7	40.9	<0.001	69.5	52.7	<0.001

表 3 影响 162 例肝癌患者肝切除术后无复发生存期与总体生存期的 Cox 模型多因素分析

Table 3 Cox multivariate analysis of contributory factors to RFS and OS among 162 HCC patients after hepatectomy<sup>1)</sup>

Variables	$\beta$	SE	Hazard ratio (95% CI)	P
RFS				
Tumor size	0.647	0.198	1.910 (1.297 ~ 2.814)	0.002
Satellite nodule	0.575	0.250	1.777 (1.089 ~ 2.901)	0.021
SYK(L) expression	-0.857	0.198	0.424 (0.288 ~ 0.626)	< 0.001
OS				
Tumor size	0.653	0.227	1.922 (1.232 ~ 2.998)	0.005
Satellite nodule	0.557	0.276	1.745 (1.016 ~ 2.997)	0.045
Resection margin	-0.627	0.219	0.534 (0.348 ~ 0.820)	0.004
SYK(L) expression	-0.756	0.217	0.469 (0.307 ~ 0.718)	< 0.001

1) Only the factors that were found to affect RFS or OS are listed in this table. 95% CI, 95% confidence interval

乳腺癌中 SYK(S) 不具备 SYK(L) 抑制肿瘤细胞侵袭的能力<sup>[4]</sup>, 表明 SYK(S) 自身或许有癌基因功能, 或者可能通过干扰 SYK(L) 抑癌功能而导致肿瘤的发生, 肝癌中也存在类似现象。我们应用定量 PCR 和 Western Blot [同时检测 SYK(L) 与 SYK(S) 蛋白的抗体] 研究发现(待发表资料): 肝癌组织及细胞系中均存在 SYK(L) 和 SYK(S) 两种异构体; 132 例肝癌患者的预后生存分析提示肝癌中 SYK(L) 阳性表达是术后无瘤生存和总体生存佳的独立预后因素, 而 SYK(S) 阳性表达是术后无瘤生存和总体生存差的独立预后因素, 两者趋势相反; 且 SYK(S) 仅在具有转移潜能的肝癌细胞(如 MHCC-97H 和 MHCC-97L) 中表达, 而在无转移潜能或正常肝细胞中未检测到 SYK(S) 表达。以上结果提示在探讨肝癌 SYK 的功能时, 应当注意由于基因转录出现的异构体转换现象。该现象被发现存在于多种肿瘤中, 并且被认为是与肿瘤恶性特征相关的常见的分子生物学现象<sup>[11]</sup>。例如: 在胶质神经瘤中存在 FGFR1 蛋白异构体, 失去单一外显子后使得受体亲活力增强<sup>[12]</sup>, 在肿瘤进展过程中, FGFR1 逐渐从长异构体变成短异构体, 这些改变增强生长刺激信号。异构体转换产物也可干扰野生型蛋白功能, 如肺癌中 MDM2 基因异构体具有显性抑制功能, 通过抑制野生型 MDM2 与 p53 结合而增强 p53 的活性<sup>[13]</sup>。因此, 在探讨肝癌中 SYK 基因的抑癌功能时, 不能单纯检测 SYK 的表达水

平, 而应针对 SYK(L) 蛋白进行特异性检测。

本研究中针对 SYK(L) 特有, 而 SYK(S) 缺失的 23 个氨基酸, 定制了 SYK(L) 特异性抗体 SYK-23。该抗体特异性良好, 仅能检测出 SYK 蛋白中的 SYK(L), 而不能检测出 SYK(S)。运用 SYK(L) 特异性抗体检测肝癌组织标本中 SYK(L) 的表达情况, 我们发现肿瘤中 SYK(L) 蛋白表达较癌旁肝组织降低, 该现象与乳腺癌的研究报道一致<sup>[4]</sup>; 并且该抗体较以往使用的 SYK 抗体 [可同时检测 SYK(L) 与 SYK(S)] 有更多的核阳性率<sup>[6]</sup>, 从另一个侧面反映了 SYK(L) 具备核定位信号, 能够在细胞核与胞浆同时表达<sup>[4]</sup>。SYK(L) 与肝癌患者的临床病理因素的相关性分析发现: SYK(L) 与肝癌患者的肿瘤直径、卫星结节、血管侵犯或肿瘤分化程度相关, 提示肝癌中 SYK(L) 蛋白具有潜在抑癌功能, 与以往的研究报道一致<sup>[6]</sup>。更为重要的是: 162 例肝癌患者的预后分析提示, SYK(L) 蛋白作为一项分子指标, 较 SYK [包括 SYK(L) 与 SYK(S)] 有更好的预测价值 ( $P < 0.001$  vs.  $P = 0.0405$ )<sup>[6]</sup>。在肝癌中, 究竟是细胞浆中还是细胞核中的 SYK(L) 蛋白发挥作用, 抑或是二者共同作用的结果, 目前尚无文献报道, 有待进一步研究。

综上所述, SYK(L) 在肝癌中的表达量显著下降, 而且与肿瘤分化程度、侵袭转移和预后有关, 可能成为判断肝癌预后的一个有价值的分子标志。但 SYK(L) 基因在肝癌中如何发挥抑癌作用的机制研究仍有待进一步深入。

#### 参考文献

- [1] Young RM, Hardy IR, Clarke RL, et al. Mouse models of non-Hodgkin lymphoma reveal Syk as an important therapeutic target [J]. *Blood*, 2009, 113 (11): 2508-2516.
- [2] Mocsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(6): 387-402.
- [3] Coopman PJ, Mueller SC. The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression [J]. *Cancer Lett*, 2006, 241(2): 159-173.
- [4] Wang L, Duke L, Zhang PS, et al. Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15): 4724-4730.
- [5] Nakashima H, Natsugoe S, Ishigami S, et al. Clinical

(下转第 225 页 to page 225)