

# PTEN、NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 在胃腺 癌中的表达及其与 肿瘤临床病理间的 相关性

李 鹏<sup>1</sup>/杨桂芳<sup>2</sup>/陈建欧<sup>1</sup>/  
黄卡特<sup>1</sup>/赵 静<sup>1</sup>

(1. 温州医学院附属第一医院病理科, 浙江  
温州 325000 2. 武汉大学中南医院病理科, 湖北  
武汉 430071)

# Expressions of PTEN, NF- $\kappa$ Bp65 and CyclinD1 in Gastric Adeno- carcinoma and Their Correlations with Clinicopathologic of the Tumor

LI Peng<sup>1</sup>, YANG Gui-fang<sup>2</sup>, CHEN Jian-ou<sup>1</sup>,  
HUANG Ka-te<sup>1</sup>, ZHAO Jing<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of  
Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325000; 2. Department of  
Pathology, Zhongnan Hospital, Wuhan University,  
Wuhan 430071, China)

**【摘要】**背景与目的: 探讨 PTEN、NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 在胃腺癌组织中的表达及其与肿瘤临床病理特征之间的相关性。材料与方法: 用免疫组织化学 S-P 法检测 73 例胃腺癌及 20 例正常胃粘膜组织中 PTEN、NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 的表达情况。结果: ①PTEN 在胃腺癌组织中蛋白表达阳性率为 42.5% (31/73), 明显低于它在正常胃粘膜组织中的阳性表达率 90% (18/20) ( $P < 0.01$ ); NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 在胃腺癌组织中蛋白表达阳性率分别为 58.9% (43/73) 和 60.3% (44/73), 明显高于它们在正常胃粘膜组织中的阳性表达率 20% (4/20) 和 25% (5/20) ( $P < 0.01$ ); ②PTEN 与胃腺癌组织分化程度呈正相关 ( $P < 0.01$ ), 与胃腺癌浸润深度、淋巴结转移及临床分期呈负相关 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); NF- $\kappa$ Bp65 与胃腺癌组织分化程度呈负相关 ( $P < 0.05$ ), 与胃腺癌浸润深度、淋巴结转移及临床分期呈正相关 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); CyclinD1 与胃腺癌的浸润深度相关 ( $P < 0.05$ ), 与组织分化程度、淋巴结转移及临床分期无相关关系; ③胃腺癌中 PTEN 的阳性表达率与 NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 均呈负相关 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), NF- $\kappa$ Bp65 与 CyclinD1 的阳性表达率呈正相关 ( $P < 0.05$ )。结论: PTEN、NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 基因在胃腺癌的发生、发展中起着不同的作用; 联合检测 PTEN、NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1, 可能有助于对胃腺癌恶性程度的判定及侵袭转移能力的评估, 进而为胃腺癌的预后分析和进一步治疗提供依据。

**【关键词】**胃腺癌; PTEN; NF- $\kappa$ Bp65; CyclinD1; 免疫组织化学

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-414X(2007)05-0366-04

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: To investigate the protein expressions of PTEN, NF- $\kappa$ Bp65 and CyclinD1 in gastric adenocarcinoma and the relationship between their expressions and clinicopathological features. MATERIALS AND METHODS: Protein expressions of PTEN, NF- $\kappa$ Bp6 and CyclinD1 in paraffin embedded tissues from 73 cases of gastric adenocarcinoma and 20 normal gastric mucosa tissues were analyzed by immunohistochemical method. RESULTS: ①The positive rate of PTEN protein expression was 42.5% (31/73) in gastric adenocarcinoma, lower than that in normal gastric mucosa tissues 90% (18/20) ( $P < 0.01$ ); The positive rates of NF- $\kappa$ Bp65 and CyclinD1 protein expression were 58.9% (43/73) and 60.3% (44/73), respectively in gastric adenocarcinoma, higher than those in normal gastric mucosa tissues 20% (4/20) and 25% (5/20), respectively (both  $P < 0.01$ ); ②The expression of PTEN in well-differentiated adenocarcinoma was higher than that in poorly-differentiated adenocarcinoma ( $P < 0.01$ ). Also, the loss or decreased expression of PTEN significantly correlated with infiltrative depth, lymph node metastasis and clinicopathological stage ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Contrary to PTEN, the expression level of NF- $\kappa$ Bp65 in poorly-differentiated adenocarcinoma was higher than that in well-differentiated ones ( $P < 0.05$ ), and the increased expression of NF- $\kappa$ Bp65 significantly correlated with infiltrative depth, lymph node metastasis and clinicopathological stage ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The expression level of CyclinD1 only correlated with infiltrative depth of gastric adenocarcinoma ( $P < 0.05$ ); ③Significant

收稿日期: 2006-12-15; 修订日期: 2007-03-09

作者简介: 李 鹏 (1982- ), 男, 医学硕士, 研究方向: 胃肠道肿瘤病理学。E-mail: lipengyinweihua@163.com

relationships were found between PTEN and NF- $\kappa$ Bp65 or CyclinD1 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while a positive correlation could also be found between NF- $\kappa$ Bp65 and CyclinD1 ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** This experiment suggested that PTEN, NF- $\kappa$ Bp65 and CyclinD1 may play certain roles in the oncogenesis and progression of gastric adenocarcinoma, but to different extents. Combined evaluation of PTEN, NF- $\kappa$ Bp65 and CyclinD1 may be helpful to assess the malignant degree, treatment and prognosis of gastric adenocarcinoma.

**【KEY WORDS】** gastric adenocarcinoma; PTEN; NF- $\kappa$ Bp65; cyclinD1; immunohistochemistry

肿瘤分子生物学研究表明,肿瘤的发生发展与癌基因和抑癌基因异常表达有关。与张力蛋白同源第 10 染色体丢失的磷酸酶基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosmeten 10,PTEN)是迄今发现的第 1 个具有双向特异性磷酸酶活性的抑癌基因,在细胞生长、增殖、分化、粘附、凋亡及细胞周期进展等过程中发挥着重要作用,与肿瘤的发生发展和临床预后等密切相关。核因子-kappaBp65(nuclear factor kappaBp65, NF- $\kappa$ Bp65)是一种重要的转录因子,通过调控与细胞分化和凋亡相关基因的表达,抑制肿瘤细胞的分化和凋亡。细胞周期素 D1(cyclin D1)是细胞周期素 D 的一个重要亚型,其过度表达可导致细胞增殖失控,与多种肿瘤的发生和预后有关。目前关于它们的异常表达与胃腺癌的关系尚不清楚,胃腺癌中 PTEN 与 NF- $\kappa$ B 的关系罕见报道。我们用免疫组织化学方法检测胃腺癌组织中上述 3 个基因蛋白的表达,并探讨这些蛋白表达与肿瘤临床病理特征之间的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取武汉大学中南医院病理科档案材料中 2001 ~ 2005 年间石蜡包埋胃腺癌标本 73 例,其中男性 52 例,女性 21 例,年龄 24 ~ 82 岁,平均年龄 56 岁。按其分化程度分为:高分化 17 例,中分化 27 例,低分化 29 例。按其浸润深度分为:粘膜及粘膜下层 15 例,肌层及浆膜层 58 例。区域淋巴结转移 38 例,无转移 35 例。按国际抗癌联盟(UICC)关于胃癌 TNM 分期分为 I 期 22 例,II 期 16 例,III 期 27 例和 IV 期 8 例。所有患者术前均未接受放疗和化疗,均有完整的临床资料。另选择正常胃黏膜 20 例作为对照。

**1.2 方法** 所有手术切除标本均经 10% 甲醛固

定,石蜡包埋后行 4  $\mu$ m 连续切片,每例均行苏木素-伊红(HE)染色和 S-P 法免疫组织化学染色,光镜观察。PTEN 和 CyclinD1 即用型小鼠抗人抗体、S-P 免疫组化试剂盒均购于福州迈新生物技术公司,NF- $\kappa$ Bp65 浓缩型抗体购自北京中山生物有限公司,S-P 免疫组化染色按试剂盒说明书进行。NF- $\kappa$ Bp65 工作浓度为 1 : 150。所有切片均采用微波修复抗原,一抗 4 $^{\circ}$ C 冰箱温盒内过夜,DAB 显色。用已知阳性胃癌切片作阳性对照,用 0.05% PBS 代替一抗作阴性对照。

**1.3 结果判断** 光镜下见 PTEN 阳性细胞以细胞质中出现棕黄色颗粒为主,极少部分见于细胞核;CyclinD1 阳性细胞以细胞核中出现棕黄色颗粒为主,少部分见于细胞浆;NF- $\kappa$ Bp65 阳性细胞为细胞质或细胞核中出现棕黄色颗粒。取 10 个高倍视野观察 1 000 个细胞,计数阳性细胞数。PTEN、CyclinD1 和 NF- $\kappa$ Bp65 均以阳性细胞  $< 10\%$  为阴性,  $\geq 10\%$  为阳性。

**1.4 统计学方法** 数据经 SPSS 11.5 统计软件处理,采用  $\chi^2$  检验、Fisher 确切概率检验。双侧  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

**2.1 PTEN、NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 在胃腺癌及正常胃粘膜组织中的表达** PTEN 在胃腺癌组织中蛋白表达阳性率为 42.5% (31/73),明显低于它在正常胃黏膜组织中的表达率 90% (18/20) ( $P < 0.01$ );NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 在胃腺癌组织中蛋白表达阳性率分别为 58.9% (43/73) 和 60.3% (44/73),明显高于它们在正常胃黏膜组织中的阳性表达率 20% (4/20) 和 25% (5/20) ( $P$  均  $< 0.01$ ) (图 1 表 1)。

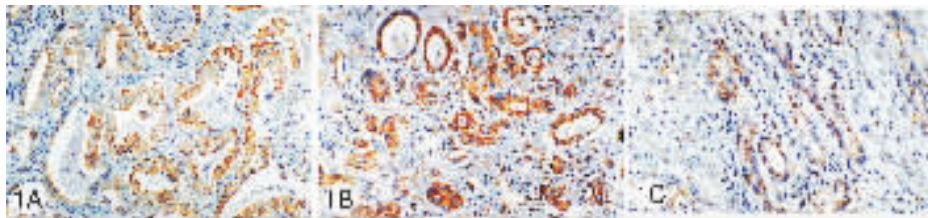


图 1A PTEN 在高分化胃腺癌组织肿瘤细胞浆中的表达 (SP  $\times$  100) 图 1B NF- $\kappa$ Bp65 在中分化胃腺癌组织肿瘤细胞浆中的表达 (SP  $\times$  200)  
图 1C CyclinD1 在中分化胃腺癌组织肿瘤细胞核中的表达 (SP  $\times$  200)

Figure 1A Expression of PTEN in cytoplasm of cancer cells in well-differentiated gastric adenocarcinoma (SP  $\times$  100) Figure 1B Expression of NF- $\kappa$ Bp65 in cytoplasm of cancer cells in moderately-differentiated gastric adenocarcinoma (SP  $\times$  200) Figure 1C Expression of CyclinD1 in nucleus of cancer cells in moderately-differentiated gastric adenocarcinoma (SP  $\times$  200)

表 1 PTEN、NF-κBp65和CyclinD1在胃腺癌及正常胃黏膜组织中的表达  
Figure 1 Expression of PTEN, NF-κBp65 and CyclinD1 protein in gastric adenocarcinoma(GAC)and normal gastric mucosae(NGM)

Groups	n	PTEN			NF-κBp65			CyclinD1		
		n(+)	%	P	n(+)	%	P	n(+)	%	P
GAC	73	31	42.5	0.000	43	58.9	0.002	44	60.3	0.005
NGM	20	18	90		4	20.0		5	25	

## 2.2 PTEN、NF-κBp65 和 CyclinD1 与胃腺癌临床病理特征的关系

结果见表 2, PTEN、NF-κBp65 和

表 2 73例胃腺癌中PTEN、NF-κBp65和CyclinD1蛋白表达与临床病理特征的关系

Table 2 Correlation between clinicopathologic characteristics and expression of PTEN, NF-κBp65and CyclinD1 protein in 73 gastric adenocarcinoma specimens

Groups	n	PTEN		P	NF-κBp65		P	CyclinD1		P
		n(+)	%		n(+)	%		n(+)	%	
Age < 55 years	34	11	32.4	0.103	23	67.6	0.156	22	64.7	0.470
≥ 55 years	39	20	51.3		20	51.3		22	56.4	
Gender Male	52	22	42.3	0.996	32	61.5	0.472	32	61.5	0.728
Female	21	9	42.9		11	52.4		12	57.1	
Differentiated degree Well	17	13	76.5	0.004	7	41.2	0.045	8	47.1	0.419
Moderately	27	10	37.0		14	51.9		18	66.7	
Poorly	29	8	27.6		22	75.9		18	62.1	
Infiltrative depth Mucosa and submucous	15	10	66.7	0.033	5	33.3	0.024	5	33.3	0.017
Muscular layer and serosa	58	21	36.2		38	65.5		39	67.2	
Lymph node metastasis Yes	38	9	23.7	0.001	30	78.9	0.001	25	65.8	0.316
No	35	22	62.9		13	37.1		19	54.3	
TNM stage I	22	13	59.1	0.021	8	36.4	0.031	9	40.9	0.085
II	16	9	56.3		10	62.5		11	68.8	
III-IV	35	9	25.7		25	71.4		24	68.6	

## 2.3 PTEN、NF-κBp65 及 CyclinD1 在胃腺癌中的相关性分析

胃腺癌中 PTEN 的阳性表达率与 NF-κBp65 和 CyclinD1 的表达均呈负相关 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); NF-κBp65 与 CyclinD1 的阳性表达率呈正相关 ( $P < 0.05$ ) (表 3、4)。

表 3 73例胃腺癌中PTEN与NF-κBp65 和CyclinD1蛋白表达之间的关系  
Table 3 Correlation of expression of PTEN to those of NF-κBp65 and CyclinD1 protein in 73 gastric adenocarcinoma specimens

Groups	PTEN		$\chi^2$	P	
	+	-			
NF-κBp65	+	14	29	4.204	0.040
	-	17	13		
CyclinD1	+	13	31	7.568	0.006
	-	18	11		

表 4 73例胃腺癌中NF-κBp65 与CyclinD1蛋白表达之间的关系  
Table 4 Correlation between expression of NF-κBp65 and CyclinD1 protein in 73 gastric adenocarcinoma specimens

CyclinD1	NF-κBp65		$\chi^2$	P
	+	-		
+	30	14	3.938	0.047
-	13	16		

## 3 讨论

PTEN 基因编码的蛋白可通过拮抗酪氨酸磷酸酶

CyclinD1 三者的表达率均与患者的年龄和性别无关; PTEN 与胃腺癌组织分化程度呈正相关 ( $P < 0.01$ ), 与胃腺癌浸润深度、淋巴结转移及临床分期呈负相关 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); NF-κBp65 与胃腺癌组织分化程度呈负相关 ( $P < 0.05$ ), 与胃腺癌浸润深度、淋巴结转移及临床分期呈正相关 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); CyclinD1 与胃腺癌的浸润深度相关 ( $P < 0.05$ ), 与组织分化程度、淋巴结转移及临床分期无关。

等磷酸化酶活性而抑制肿瘤的发生发展。既往研究表明, PTEN 缺失或突变与人类的许多恶性肿瘤有关<sup>[1-3]</sup>。然而, 对 PTEN 异常表达与胃癌的关系研究尚不清楚。Sato 等<sup>[4]</sup>认为 PTEN 不参与胃癌的发生过程。而 Yang 等<sup>[5]</sup>的研究表明 PTEN 蛋白表达的检测可作为监测胃癌发生的辅助手段。本研究结果显示 PTEN 在胃腺癌中的阳性表达率为 42.5%, 明显低于在正常胃黏膜组织中的阳性率 90% ( $P < 0.01$ ), 表明 PTEN 低表达与胃腺癌的发生有关。我们的研究与 Yang 等<sup>[5]</sup>的研究一致。而且, 本研究还表明 PTEN 的表达与胃腺癌患者的年龄和性别无明显的关系, 但与胃腺癌组织分化程度、浸润深度、有无淋巴结转移及临床分期相关, PTEN 低表达多见于组织分化程度低、浸润深度深、有淋巴结转移及 TNM III/IV 期的胃腺癌组织 (见表 2), 与李锦毅等<sup>[6]</sup>的研究基本一致, 提示 PTEN 基因失活与胃腺癌的发展和浸润转移有关。检测 PTEN 蛋白的表达可能对判断胃癌的恶性程度和预后有一定的意义。

NF-κB 是一种广泛存在于细胞中的具有多向性调节作用的蛋白质分子, 由一系列不同的蛋白二聚体组成, p50p65 二聚体是 NF-κB 激活最常见的形式, 具有和某些基因启动子区特定核苷酸序列结合而启动基因转

录的功能。Wang 等<sup>[7]</sup>首次采用免疫组化法测得人胰腺癌组织中存在 NF- $\kappa$ Bp65 的激活。本研究显示 NF- $\kappa$ Bp65 在胃腺癌中高表达,且与胃腺癌浸润深度、淋巴结转移及临床分期密切相关,此与 Sasaki 等<sup>[8]</sup>研究一致,分化越差、浸润越深、临床分期越高、有淋巴结转移, NF- $\kappa$ Bp65 蛋白的表达越高,说明 NF- $\kappa$ Bp6 可能在肿瘤的发生、浸润转移过程中起重要作用。

CyclinD 是一组控制真核细胞周期进展的重要蛋白质, cyclin D1 是其一个重要亚型。CyclinD1 可结合细胞周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)形成复合物 CyclinD1-CDK4,使 Rb 蛋白磷酸化,解除 Rb 基因调控 G 期停滞的作用,使细胞周期从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期。CyclinD1 过表达可加速细胞周期进展,甚至使细胞向恶性转化。本研究显示 CyclinD1 在胃腺癌中的表达率明显高于在正常胃组织中的表达率 ( $P < 0.01$ ),提示 CyclinD1 基因在胃癌发生过程中起促进作用。我们的研究还显示浸润深度深的胃腺癌组织 CyclinD1 蛋白表达高,提示 CyclinD1 过表达也可能参与了胃腺癌的发展过程。

癌基因以及抑癌基因的作用不仅仅是某个基因的行为,而是多个基因表达共同协作的结果。Gustin 等<sup>[9]</sup>研究发现, PTEN 可抑制磷脂酰肌醇-3-羟基激酶 (PI-3K) 的功能,减少肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 对丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 和 I $\kappa$ B 激酶复合物 (IkappaB kinase complex, IKK) 的激活,进而抑制 NF- $\kappa$ B DNA 结合和转录。Weng 等<sup>[10]</sup>研究表明 PTEN 可通过影响胰岛素受体底物-1(insulin receptor sub-stiate 1, IRS-1) 的磷酸化水平和 IRS-1/ Grb2/ Sos(growth-factor receptor binding protein 2, Grb2; Son of sevenless, Sos) 复合物的形成来下调 MAP 激酶 (mitogen-activated protein kinase) 的磷酸化作用,从而下调 CyclinD1,使细胞生长周期阻滞和细胞生长抑制。我们的研究结果显示胃腺癌组织中 PTEN 表达异常与 NF- $\kappa$ Bp65 及 CyclinD1 蛋白的高表达密切相关 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) 随着 PTEN 表达的降低, NF- $\kappa$ Bp65 及 CyclinD1 的表达相应上调,提示 PTEN 基因失活或缺失导致 NF- $\kappa$ Bp65 及 CyclinD1 基因的激活可能是促进胃腺癌发生发展的重要途径。此外,我们的研究还显示 NF- $\kappa$ Bp65 与 CyclinD1 之间呈正相关关系 ( $P < 0.05$ )。CyclinD1 基因启动子上存在与 NF- $\kappa$ B 结合的位点<sup>[11]</sup>, NF- $\kappa$ B 与其启动子  $\kappa$ B 位点结合后,可启动 CyclinD1 基因的转录表达,进而促进胃腺癌的发生。

综上所述, PTEN、NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1 在胃腺癌的发生、发展过程中起着不同的作用。联合检测 PTEN、

NF- $\kappa$ Bp65 和 CyclinD1,可能有助于对胃腺癌恶性程度的判定及侵袭转移能力的评估,进而为胃腺癌的预后分析和进一步治疗提供依据。

## 参考文献:

- [1] Cheney IW, Neuteboom ST, Vaillancourt MT, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of MMAC1/ PTEN to glioblastoma cells inhibits S phase entry by the recruitment of p27Kip1 into cyclin E/ CDK2 complexes[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(10): 2318 - 2323.
- [2] Boni R, Vortmeyer AO, Burg G, et al. The PTEN tumour suppressor gene and malignant melanoma[J]. *Melanoma Res*, 1998, 8(4): 300 - 302.
- [3] Kurose K, Zhou XP, Araki T, et al. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(6): 2097 - 2106.
- [4] Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, et al. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer [J]. *Virchows Arch*, 2002, 440(2): 160 - 165.
- [5] Yang L, Kuang LG, Zheng HC, et al. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(1): 35 - 39.
- [6] 李锦毅, 郑华川, 杨琳, 等. 胃癌中 PTEN 异常表达与围基因微卫星的杂合性缺失 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(27): 389 - 392.
- [7] Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, et al. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(1): 119 - 127.
- [8] Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, et al. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12): 4136 - 4142.
- [9] Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, et al. The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activity[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(29): 27740 - 27744.
- [10] Weng LP, Smith WM, Brown JL, et al. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/ MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/ Grb-2/ Sos complex formation in a breast cancer model[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(6): 605 - 616.
- [11] Karin M, Cao Y, Greten FR, et al. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(4): 301 - 310.

