

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2000)03-0343-04

卵巢上皮性肿瘤 Cyclin D₁ 及 pRb 的表达与其良恶性关系

辛晓燕, 王 健, 王德堂, 刘淑娟, 严瑞兰, 郑维国 (第四军医大学西京医院妇产科, 陕西 西安 710033)

关键词: Cyclin D₁; pRb; 卵巢肿瘤; 免疫组织化学; 表达
中图分类号: R737.31 文献标识码: A

摘要: 目的 探讨卵巢上皮性肿瘤 Cyclin D₁, pRb 的表达水平与其良恶性的关系。方法 卵巢上皮性肿瘤石蜡切片 Cyclin D₁, pRb 抗体免疫组化染色。结果 在 137 例组织切片中, Cyclin D₁ 的阳性表达率分别为: 原发性卵巢上皮性癌 58% (49/84); 交界性卵巢上皮性肿瘤 45% (9/20); 良性卵巢上皮性肿瘤 26% (6/23); 正常卵巢组织仅有 1 例呈弱阳性表达, 占 10% (1/10), 秩和检验 $P = 0.0016$; 恶性肿瘤组与良性肿瘤组及正常卵巢组织间存在显著性差异 ($P < 0.05$); 卵巢上皮性癌不同临床期别、不同病理分级比较, 随期别及分级的增高, Cyclin D₁ 的表达增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。84 例原发性卵巢上皮性癌 pRb 阳性表达率 40% (34/84); 交界性卵巢上皮性肿瘤为 65% (13/20); 良性卵巢上皮性肿瘤为 78% (18/23); 正常卵巢组织呈弱阳性表达 80% (8/10), 秩和检验 $P = 0.0933$; 各组间无显著性差异 ($P > 0.05$); 恶性肿瘤组内不同临床分期、不同病理分级的 pRb 表达有显著性差异 ($P = 0.0000$)。结论 Cyclin D₁ 及 pRb 表达水平的检测可作为判断卵巢恶性上皮性肿瘤恶性程度及病情的有价值的参考指标。

Expression of Cyclin D₁ and pRb in epithelial ovarian tumors and their relationships to malignant degree

XIN Xiaoyan, WANG Jian, WANG De-Tang, LIU Shu-Juan, YAN Rui-Lan, ZHENG Wei-Guo
Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

Keywords: Cyclin D₁; pRb; ovarian neoplasms; immunohistochemistry; expression

收稿日期: 1999-11-30; 修回日期: 2000-01-05

基金项目: 全军医药卫生科研基金面上项目资助(98M110)

作者简介: 辛晓燕(1952-), 女(汉族), 江苏省无锡市人。副教授, 主任医师, 硕士生导师。Tel (029) 3375388(H)

Abstract: **AIM** To investigate the expression of Cyclin D₁ and pRb in ovarian epithelial tumors and their relationship with the malignant degree of the tumors. **METHODS** Immunohistochemistry SABC method and monoclonal antibody of Cyclin D₁ and pRb were used in different ovarian tumors and normal ovarian tissues respectively. **RESULTS** The expression of Cyclin D₁ was positive in 49/84 primary ovarian epithelial malignant tumors, 9/20 borderline tumors, 6/23 benign ovarian tumors and 1/10 normal ovarian tissue. The statistic analysis showed that the expression level of Cyclin D₁ increased obviously in ovarian malignant tumors compared with that in the ovarian benign tumors ($P < 0.05$). The expression of pRb was positive in 34/84 primary ovarian epithelial malignant tumors, 13/20 borderline tumors, 18/23 benign ovarian tumors and 8/10 normal ovarian tissue. There was no obvious difference in the expression of pRb among the groups ($P > 0.05$). In the malignant tumor group, the positive efficiency of pRb was obviously different in the different clinical phases and pathological grades ($P = 0.0000$). **CONCLUSION** The expression of Cyclin D₁ and pRb may be helpful in predicting the malignant degree and prognosis of malignant ovarian tumors.

0 引言

卵巢上皮性癌恶性程度高, 病情发展快, 预后差。其生物学行为与 Cyclin D₁, pRb 间的关系研究较少。我们用免疫组织化学方法检测 Cyclin D₁, pRb 在卵巢恶性上皮性肿瘤不同病情阶段的表达水平, 并与正常卵巢组织及良性、交界性卵巢上皮性肿瘤对照, 以了解 Cyclin D₁, pRb 表达水平与卵巢上皮性肿瘤良恶性间的关系。

1 对象和方法

1.1 对象 1988/1997 年在我院住院手术的原发性卵巢上皮性恶性肿瘤标本 84 例, 平均年龄 53.4 (21 ~ 76) 岁。其中浆液性癌 43 例, 粘液性癌 17 例, 宫内膜样癌 16 例, 其他上皮性癌 8 例。术前均未行化疗。根据术中探查结果, 按 FIGO 临床分期分 I, II, III 及 IV 期, 分别为 12, 15, 36 和 21 例。术中获取标本, 均

用 100mL · L⁻¹ 福尔马林液浸泡固定 6h, 石蜡包埋, 常规病理学检查证实诊断 按 Broder 病理分级法分级, I ~ IV 级分别为 15, 22, 31 和 16 例 同期设交界性卵巢上皮性肿瘤 20 例, 良性卵巢上皮性肿瘤 23 例, 正常卵巢组织对照 10 例; 标本处置相同

1.2 方法 石蜡组织连续切片 4 μm 厚, 常规脱蜡至水 采用 SABC 法测定 Cyclin D₁, pRb 的表达 抗 Cyclin D₁ 及 pRb mAb (美国 ZYM ED Laboratories, Inc) 的工作浓度 1 : 100, 生物素化单抗和 SABC 试剂 (武汉博士德公司) 的工作浓度均为 1 : 100. 石蜡切片经抗原修复后, 滴加 1 : 100 抗 Cyclin D₁ 或 pRb 抗体, 4 过夜, 次日滴加 1 : 100 生物素标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 及 HIGH-SABC, DAB 显色, 苏木精复染 以不加一抗的组织切片作阴性对照, 以已知阳性反应片作阳性对照 阳性结果判断: 组织切片细胞核内出现棕色颗粒时即为 Cyclin D₁ 或 pRb 阳性细胞 根据阳性细胞数的多少分为: < 25% 为 +; 25% ~ 50% 为 #; > 50% 为 ##; 不着色则为阴性

统计学处理: 各组间比较用秩和检验 不同临床分期、组织细胞分化程度 Cyclin D₁ 或 pRb 表达比较用 χ² (Chi-Square) 检验 统计学处理软件 SAS System 6.11 版

2 结果

2.1 Cyclin D₁ 在卵巢上皮性肿瘤及正常卵巢组织的表达 (Fig 1)

2.1.1 按不同组织类型分组 多均数秩和检验 (Kruskal Wallis 法) $H = 15.281, P = 0.0016$ Nemenyi 法组间两两比较, 恶性肿瘤组与良性肿瘤组 ($P = 0.0337$) 及正常卵巢组织 ($P = 0.0333$) 组间存在明显差异 其他组间差异不显著 (Tab 1).

2.1.2 按 FIGO 临床分期 I, II, III 及 IV 期卵巢恶性上皮肿瘤的 Cyclin D₁ 表达阳性率分别为 42%, 47%, 67% 和 71%. Kruskal Wallis 法秩和检验 $H = 11.467, P = 0.0168$, Nemenyi 法组间两两比较 I, II 期与 IV 期间 Cyclin D₁ 表达存在显著差异 ($P < 0.05$), 其他组间比较差异不显著 将 I 期与 II 期, III 期与 IV 期分别并组后, 用 Wilcoxon Mann Whitney 法进行两均数的秩和检验, $u = 427.00, P = 0.0058$, 差异十分显著 (Tab 2).

2.1.3 按 Border 病理分级 I, II, III 和 IV 级卵巢恶性上皮性肿瘤的 Cyclin D₁ 蛋白阳性表达率分别为 40%, 40.9%, 74.2% 和 68.8%. Kruskal Wallis 法秩和检验 $H = 19.876, P < 0.05$. Nemenyi 法组间比

较, I, II 与 III 及 IV 级间 Cyclin D₁ 表达差异显著 ($P < 0.05$, Tab 3). 将 I 级与 II 级, III 级与 IV 级并组后, 经 Wilcoxon Mann Whitney 法秩和检验, $u = 429.00, P = 0 < 0.01$, 差异显著

表 1 Cyclin D₁ 在正常卵巢组织和卵巢上皮性肿瘤中的表达
Tab 1 Comparison of Cyclin D₁ expression among different kinds of common epithelial ovarian tumors

Group	n	Immunostaining for Cyclin D ₁				Positive rate (%) (+ ~ #)
		-	+	#	##	
Malignant	84	35	21	19	9	58.3 ^a
Borderline	20	11	5	3	1	45.0
Benign	23	17	4	2	0	26.1
Normal	10	9	1	0	0	10.0

^a $P < 0.05$ vs normal and benign.

表 2 不同临床分期卵巢上皮性癌 Cyclin D₁ 的表达
Tab 2 Comparison of Cyclin D₁ expression among different phase of common epithelial ovarian cancers

Grade	n	Immunostaining for Cyclin D ₁				Positive rate (%) (+ ~ #)
		-	+	#	##	
I	12	7	2	3	0	42 ^a
II	15	8	3	2	2	47 ^a
III	36	14	12	7	3	67
IV	21	6	4	7	4	71

^a $P < 0.05$ vs IV grade.

表 3 卵巢上皮性癌不同病理分级水平的 Cyclin D₁ 表达
Tab 3 Comparison of Cyclin D₁ expression among different pathological grade of common epithelial ovarian cancers

Grade	n	Immunostaining for Cyclin D ₁				Positive rate (%) (+ ~ #)
		-	+	#	##	
I	15	9	3	2	1	40.0 ^a
II	22	13	3	4	2	40.9 ^a
III	31	8	12	9	2	74.2
IV	16	5	3	4	4	68.8

^a $P < 0.05$ vs III, IV (Nemenyi method).

2.2 pRb 在卵巢上皮性肿瘤中的表达 (Fig 2)

2.2.1 按不同组织类型分组 各组间 pRb 表达无显著性差异 ($P > 0.05$).

2.2.2 按 FIGO 临床分期分组 多均数秩和检验 (Kruskal Wallis) $H = 21.645, P = 0.0302$ Nemenyi 法组间两两比较, I, II 期分别与 III, IV 期间存在显著性差异, P 值分别为 0.0127 (I vs III),

Q 0452 (I vs IV), Q 0351 (II vs III)和Q 0432 (II vs IV), 其余组间两两比较差异不显著(Tab 4).

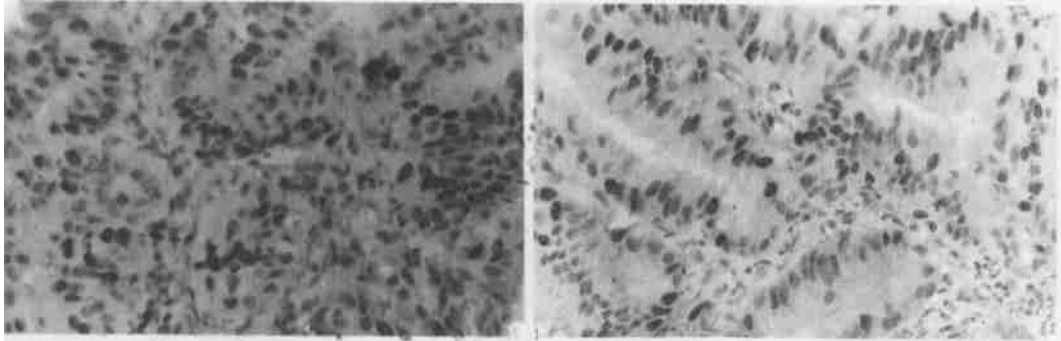


图1 卵巢上皮性癌 Cyclin D₁ 表达

Fig 1 Expression of Cyclin D₁ in ovarian cystadenocarcinoma SABC × 400

图2 卵巢上皮性癌 pRb 表达

Fig 2 Expression of pRb in ovarian cystadenocarcinoma SABC × 400

表4 不同临床分期卵巢上皮性癌 pRb 的表达

Tab 4 Comparison of pRb expression among different phase of common ovarian epithelial cancer

Grade	n	Immunostaining for Cyclin D ₁				Positive rate (%) (+ ~ #)
		-	+	##	###	
I	12	6	1	3	2	50.0 ^{a1}
II	15	7	3	2	3	53.3 ^{a2}
III	36	23	6	5	2	36.1
IV	21	14	3	2	2	33.3

^{a1}P < 0.05 vs III and IV grade; ^{a2}P < 0.05 vs III and IV grade

2.2.3 按Brodner病理分级分组 KruskalWallis秩和检验 $H = 23.422, P = 0.0000$ Nemenyi法组间两两配对比较, I级与III, IV级组间存在十分显著的差异, P值分别为0.0061, 0.0037 (Tab 5). II级与III级组间比较有显著性差异. I级与II级, III级与IV级并组后, 用Wilcoxon Mann Whitney法进行秩和检验 $u = 434.000, P = 0.0000$, 差异显著

3 讨论

Cyclin D₁ 是细胞周期蛋白家族中的重要成员, 现已将Cyclin D₁ 定为原癌基因. 其在细胞增殖周期中, 作为G₁ S期时相转变调控点(R point)的重要调控因子, 对决定细胞分化起着重要作用. 现已证明Cyclin D₁ 的细胞周期调节作用是与Rb蛋白密切相关, Cyclin D₁ 可以直接与Rb结合并使之灭活, pRb失活或Cyclin D₁ 的高表达可促使细胞生长调控失控, Cyclin D₁ 起到pRb灭活生理性中介作用. Cyclin D₁ 的过量还可导致细胞对生长因子依赖性下降, 以致发生肿瘤^[1]. 许多人类肿瘤组织均发现有Cyclin D₁ 染色体11q¹³区域的基因扩增和Cyclin D₁ 基因的

过表达, 如乳腺癌、子宫肿瘤等^[2-4]. 并且与肿瘤的浸润、淋巴结转移、肿瘤分期及预后等临床病理参数显著相关

表5 不同病理分级卵巢上皮性癌 pRb 的表达

Tab 5 Comparison of pRb expression among different pathological grade of common ovarian epithelial cancer

Grade	n	Immunostaining for Cyclin D ₁				Positive rate (%) (+ ~ #)
		-	+	##	###	
I	15	6	4	2	3	60.0 ^b
II	22	13	3	4	2	40.9
III	31	21	3	4	3	32.3
IV	16	10	3	2	1	37.5

^bP < 0.01 vs III and IV grade

现有的研究表明, Cyclin D₁ 的过表达在肿瘤发生发展上具有重要意义: Cyclin D₁ 的过表达与肿瘤的组织学类型有关; 与肿瘤的分化程度有关; 与肿瘤患者的预后有关, 所以可作为病理学诊断的佐证以及判断病情、预后的指标^[4, 5]. 但Gillett等^[6]报道Cyclin D₁ 在乳腺癌中过表达与患者预后呈正相关, 似于Cyclin D₁ 作为原癌基因的观点相悖, 然而Gillett认为除Cyclin D₁ 外, 可能还存在与肿瘤病发生发展相关的更为重要的基因, 如Rb基因的突变等

本实验研究中, 卵巢上皮性肿瘤 Cyclin D₁ 的表达结果支持Cyclin D₁ 作为原癌基因参与细胞周期代谢及调控的理论, 并且Cyclin D₁ 的过表达与肿瘤的组织学类型、分化程度、临床分期明显相关. 有望成为肿瘤病理学诊断的论据和判断病情、预后的指标

Rb基因(retinoblastoma gene)是1971年Knud-

son 在研究遗传性成视网膜细胞瘤中发现的抑癌基因,也是最早被发现的抑癌基因。其基因定位于 13q¹⁴, cDNA 长 4.7 kb, 所编码蛋白 Mr 110 × 10³。pRb 作为 G₁ 期 Cyclin-CDK 复合物介导的磷酸化作用的共同的限速底物,是 G₁ S 期调控点的中心成分^[7]。多种 Cyclin-CDK 复合物和 CDKI 通过对 pRb 这一中心环节的调控,达到调控细胞增殖周期的目的。pRb 在细胞内有磷酸化和去磷酸化两种状态,去磷酸化状态下,pRb 结合 E₂F_{1/2/3},从而抑制 E₁F 转录因子进入细胞核启动相关基因表达,达到控制细胞由 G₁ S 期的目的,当 pRb 被 Cyclin-CDK 复合物磷酸化后,便释放出 E₂F,细胞增殖则可进行。

Rb 基因的失活与人类多种肿瘤的发生有关,其表达产物的缺失可以造成某些细胞过度增殖形成肿瘤。某些 DNA 病毒基因产物,如人乳头状瘤病毒 HPV 的 E₇ 蛋白,可结合去磷酸化状态的 pRb,另一些物质可促进 pRb 的磷酸化,均可使 pRb 无法与 E₂F 结合,导致细胞过度增殖。除视网膜母细胞瘤外,乳腺癌、膀胱癌、骨肉瘤、子宫内膜癌、卵巢癌等^[8-12]也曾有 Rb 基因异常的报道, Toguchida 等^[8]报道骨肉瘤中 Rb 基因结构异常的检出率达 35%~43%,并存在“二次突变”现象,而正常组织中未见 PB 突变。李杨等^[9]报道:Rb 基因纯合性缺失者,pRb 检测结果均为阴性,Rb 基因杂合缺失者,pRb 为阳性表达,这与肿瘤细胞的一个正常的 Rb 基因有关,同进还发现 Rb 基因突变和蛋白表达异常,与恶性肿瘤发生、恶性进展、转移有关,并认为 Rb 蛋白表达可作为判断预后的重要指标。

有关卵巢癌的 Rb 基因及蛋白表达研究报道较少。Dong 等^[13]对 125 例卵巢恶性肿瘤、16 例交界性肿瘤(LMP)和 27 例良性肿瘤进行 pRb 的免疫组化研究,发现 41% 的良性肿瘤、51% LMP 和 71% 的恶性肿瘤有 pRb 的高水平表达,pRb 阳性细胞数 > 50% 的高表达病例与非粘液性肿瘤类型表现出明显的相关性,而临床 I 期病例的不良预后与 pRb 低表达、肿瘤类型及残存病灶等因素有关。Fang 等^[14]在研究卵巢癌细胞系的 p16 与 pRb 相关性发现,p16 缺失的细胞系 pRb 表达和 mRNA 水平明显高于 p16 正常表达的细胞系,p16 表达阴性的细胞系转入 p16 基因后,pRb 蛋白、Rb mRNA 水平明显下降,从而推断出 p16 基因表达对 Rb 有下调作用。Kim 和 Taylor^[15]的研究表明在卵巢的进展期(III~IV 期),可发现有高频率的 Rb 基因缺失(50%),而在初期癌(I~II 期),其缺失频率较低(7%)。在本实验研究中,

卵巢上皮性肿瘤恶性组、交界性组、良性组及正常卵巢组织 pRb 表达实验结果说明 pRb 表达水平与肿瘤的分化程度、临床分期呈现负相关关系,这与 Kim 和 Taylor 的报道一致^[10, 11],即 pRb 的表达减少与卵巢癌的临床期别及病理分级间存在一定关系,特别在晚期卵巢癌中所起的作用似乎更为关键。夏炳森等的研究还表明 pRb 低表达患者按常规方案化疗疗效差,如按 pRb 表达水平可为制定个性化化疗方案提供参考^[15]。

参考文献:

- [1] Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age [J]. *Cell*, 1994; 79(4): 573- 582.
- [2] Elizabeth A, Musgrove C, Christine S *et al*. Cyclin D₁ induction in breast cancer cells shortens G₁ and is sufficient for cells arrested in G₁ to complete the cell cycle [J]. *Cell Biol*, 1994; 91(1): 8022- 8026.
- [3] Bringuier PP, Tamini Y, Schuurin E *et al*. Expression of cyclin D₁ and EM S1 in bladder tumors; relationship with chromosome 16q13 amplification [J]. *Oncogene*, 1996; 12(8): 1747- 1753.
- [4] Barbieri F, Cagnoli M, Ragni N *et al*. Expression of cyclin D₁ correlates with malignancy in human ovarian tumors [J]. *Br J Cancer*, 1997; 75(9): 1263- 1268.
- [5] His ED, Zukerberg LR, Yang W *et al*. Cyclin D₁/PRAD1 expression in parathyroid adenomas: An immunohistochemical study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81(5): 1736- 1739.
- [6] Gillett C, Smith P, Gregory W *et al*. Cyclin D₁ and prognosis in human breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 1996; 69(2): 92- 99.
- [7] Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control [J]. *Cell*, 1995; 81(3): 323- 330.
- [8] Toguchida J, Ishizaki K, Sasaki M *et al*. Chromosomal reorganization for the expression of recessive mutation of retinoblastoma susceptibility gene in the development of osteosarcoma [J]. *Cancer Res*, 1998; 48(1): 3939.
- [9] 李杨, 丘钜世, 宋时世. 侵袭性骨肿瘤中 RB 基因及其蛋白产物表达的研究[J]. *中华病理学杂志*, 1997; 26(6): 262- 265.
- [10] Kim TM, Benedict WF, Xu HJ *et al*. Loss of heterozygosity on chromosome 13 is common only in the biologically more aggressive subtypes of ovarian epithelial tumors and is associated with normal retinoblastoma gene expression [J]. *Cancer Res*, 1994; 54(3): 605- 609.
- [11] Taylor RR, Linnola RI, Gerards J *et al*. Abnormal expression of the retinoblastoma gene in ovarian neoplasms and correlation to p53 k-ras mutation [J]. *Gynecol Oncol*, 1995; 58(3): 307- 311.
- [12] Li SF, Shiozawa T, Nakayama K *et al*. Stepwise abnormality of sex steroid hormone receptors, tumor suppressor gene products (p53 and Rb), and Cyclin E in uterine endometrial carcinoma [J]. *Cancer*, 1996; 77(2): 321- 329.
- [13] Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA *et al*. Reduced expression of retinoblastoma gene product (pRb) and high expression of p53 are associated with poor prognosis in ovarian cancer [J]. *Int J Cancer*, 1997; 74(4): 407- 415.
- [14] Fang X, Jin X, Xu HJ *et al*. Expression of p16 induces transcriptional downregulation of the RB gene [J]. *Oncogene*, 1998; 16(1): 1- 8.
- [15] 夏炳森, 冉学红, 梅家琦 *et al*. Rb 蛋白在非霍杰金淋巴瘤细胞中的表达及其临床意义[J]. *Chin J Oncol*, 1999; 21(1): 28.

编辑 王睿