

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)17-1562-04

# p57<sup>kip2</sup> 在肝癌组织中的表达及其与临床病理因素、PCNA 和 p53 的关系

郭 卉<sup>1</sup>, 南克俊<sup>1</sup>, 阮之平<sup>1</sup>, 景 昭<sup>1</sup>, 刘陕西<sup>2</sup> (西安交通大学第一医院:<sup>1</sup>肿瘤内科,<sup>2</sup>血液科 陕西 西安 710061)

## Expression of p57<sup>kip2</sup> and its relationships with clinicopathology, PCNA and p53 in primary hepatocellular carcinoma

GUO Hui<sup>1</sup>, NAN Ke-Jun<sup>1</sup>, RUAN Zhi-Ping<sup>1</sup>, JING Zhao<sup>1</sup>, LIU Shaan-Xi<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Oncology, <sup>2</sup>Department of Hematology, First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the expression of p57<sup>kip2</sup> and its relationship with clinicopathology, PCNA and p53 in primary hepatocellular carcinoma (HCC). **METHODS:** Expression of p57<sup>kip2</sup>, PCNA and p53 in tumor tissues from 32 patients with HCC and 10 liver tissues of normal persons was detected with Elivision immunohistochemical technique. **RESULTS:** p57<sup>kip2</sup> protein positive-expression rate in HCC was 56.2%, which was lower than that in normal tissues (100%) ( $P=0.011$ ). The reduced expression of p57<sup>kip2</sup> protein correlated significantly with moderate or low-differentiation of tumor cells ( $P=0.007$ ), high clinical stage ( $P=0.041$ ) and poor prognosis ( $P=0.036$ ), but did not correlate significantly with metastasis, tumor size, level of AFP and age ( $P>0.05$ ). PCNA positive-expression rate was 56.2%, which was correlated significantly with the expression of p57<sup>kip2</sup> ( $P=0.036$ ) and p53 positive-expression rate was 46.9%, which was not correlated significantly with the expression of p57<sup>kip2</sup> ( $P>0.05$ ). **CONCLUSION:** There is a marked loss or absence of p57<sup>kip2</sup> expression and high expression of PCNA in HCC, which are involved in the carcinogenesis and development of HCC. p57<sup>kip2</sup> and p53 may induce apoptosis via different mechanisms.

**【Keywords】** p57<sup>kip2</sup> gene; HCC; PCNA; p53

**【摘要】**目的 检测细胞周期抑制因子 p57<sup>kip2</sup> 在肝癌中的表达水平, 探讨它与临床病理因素、增殖细胞核抗原(PCNA)、p53 的关系。方法 用免疫组织化学法检测 32 例肝癌组织和 10 例正常肝脏组织中 p57<sup>kip2</sup>, PCNA 和 p53 的表达水平。结果 p57<sup>kip2</sup> 在肝癌组织中的阳性率 56.2%, 显著低于正常肝

脏组织(100%) ( $P=0.011$ )。p57<sup>kip2</sup> 的缺失表达与肝癌细胞的分化较差( $P=0.007$ )、临床分期较晚( $P=0.041$ )及预后较差有关( $P=0.036$ )。与年龄、AFP、肿瘤大小及肿瘤侵犯转移无显著相关( $P>0.05$ )。PCNA 在肝癌组织中阳性率为 56.2%, 与 p57<sup>kip2</sup> 的表达有关( $P=0.036$ )。p53 在肝癌组织中的阳性率 46.9%, 与 p57<sup>kip2</sup> 表达在统计学上无相关性( $P>0.05$ )。结论 肝癌组织中存在 p57<sup>kip2</sup> 的表达缺失、PCNA 的高表达, 共同参与肝癌的发生、发展, 而 p57<sup>kip2</sup> 和 p53 可能通过不同途径来诱导细胞凋亡。

**【关键词】** p57<sup>kip2</sup> 基因 原发性肝癌 增殖细胞核抗原 p53**【中图分类号】** R735.7 **【文献标识码】** A

## 0 引言

细胞周期机制破坏是导致肿瘤发生、发展的核心机制。p57<sup>kip2</sup> 基因最早由 Matsuoka 等<sup>[1]</sup>发现, 定位于染色体 11p11.5, 属于 CIP-KIP 基因家族。在结构上与 p21、p27 有部分同源性, 通过抑制多种 CDK 活性从而使细胞俘获在 G1 期。具有抑癌基因的活性<sup>[1]</sup>。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达与细胞增殖状态密切相关<sup>[2]</sup>。p53 是诱导细胞凋亡的重要基因, 可间接反映细胞的凋亡情况<sup>[3]</sup>。本试验旨在探讨 p57<sup>kip2</sup> 在肝癌组织中的表达缺失情况及它与临床病理因素、PCNA 和 p53 的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本 西安交通大学第一临床医院 2000/2002 手术切除的肝癌标本 32(男 26, 女 6)例。全组患者年龄 26~72(49.2±12.3)岁, 所有患者术前未经过化疗和放疗。组织学分级 32 例中 I 级 3 例, II 级 14 例, III 级 11 例, VI 级 4 例; TNM 分期, I 期 2 例, II 期 16 例, III 期 10 例, IV 期 4 例。AFP 阳性 15 例。所有病例均经病理学证实。所有标本经 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋 4 μm 切片, 应用多聚赖氨酸包被, 用作免疫组化研究。对所有蜡块 HE 染色观察, 选出组织学形态较好的切片进行研究。收集同时期意外死亡健康成年男性正常肝脏组织标本 10 例, 经 HE 染色诊断为正常肝组织, 作为对照组。

收稿日期 2004-02-16; 修回日期 2004-06-07

作者简介 郭 卉(1979-), 女(汉族) 陕西省西安市人。硕士生(导师南克俊)。Tel. (029) 85274647 Email. guoguo79\_79@163.com

1.1.2 试剂 抗鼠抗人 p57<sup>kip2</sup> mAb(57P06), 抗鼠抗人 PCNA mAb(PC10), 抗鼠抗人 p53 抗体(MAB-0226), Elivision 二步法检测试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。

## 1.2 方法

1.2.1 p57<sup>kip2</sup>, PCNA, p53 应用免疫组化(Elivision 法)染色 切片常规脱蜡至水, 30 mL/L 双氧水阻断内源性过氧化物酶 20 min, 将切片至于 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液行高温高压抗原热修复 7 min, 置冷, 羊血清封闭 37℃ 孵育 20 min. 加 p57<sup>kip2</sup>—抗(1:50), 置于湿盒 4℃ 冰箱过夜. PCNA 和 p53—抗均按 1:50 稀释, 置 37℃ 恒温箱孵育 1 h. 先后加 Elivision 二步法检测试剂盒中试剂 A、B 各 50 μL, 分别室温孵育 40 min. DAB 显色, 苏木素衬染, 盐酸乙醇分化, 脱水透明后中性树脂封固. 光学显微镜下观察结果. 以正常肝组织作 p57<sup>kip2</sup> 和 p53 的阳性对照, 以磷酸缓冲盐溶液(PBS)代替一抗作阴性对照. 以正常肝组织作 PCNA 的阴性对照。

1.2.2 结果判定 p57<sup>kip2</sup> 蛋白以胞核或胞质染色为棕黄色颗粒为阳性. 阳性细胞百分比为计 400 倍显微镜下 10 个视野阳性细胞的平均数: 0, <10%; 1, 10% ~ 25%; 2, 25% ~ 50%; 3, 50% ~ 75%; 4, >75%. 阳性强度以着色程度进行计分: 0, 不着色; 1, 淡黄; 2, 棕黄; 3, 棕褐. 两分相乘: 0~2 为阴性; 3~5 为弱阳性; 6~8 为阳性; 9~12 为强阳性. PCNA 及 p53 以胞核染色为棕黄色颗粒 >50% 为阳性细胞。

统计学处理: 所得数据应用 SPSS 11.0 统计软件包处理. 采用 Fisher 确切概率法及 Spearman 相关分析.  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 p57<sup>kip2</sup> 的表达 在 32 例原发性肝癌(HCC)组织中, p57<sup>kip2</sup> 阳性表达 18 例, 表达率 56.25%, 所有正常肝组织均为阳性表达(Fig 1), 表达率为 100%. 肝癌组织 p57<sup>kip2</sup> 的表达率显著低于正常组织( $P = 0.011$ ). 表达 p57<sup>kip2</sup> 的高分化肝癌组织中, 胞质和胞核呈棕黄色颗粒(Fig 2). p57<sup>kip2</sup> 在低分化肝癌组织中, 与周围阳性癌旁组织相比, 癌灶阳性细胞着色浅, 数量少, 细胞排列不一, 形态紊乱(Fig 3).

2.2 p57<sup>kip2</sup> 表达与肝癌的病理分级、临床分期、及生存期等的关系 p57<sup>kip2</sup> 表达与肝癌的病理分级、临床分期、及生存期有关, 与年龄、AFP, 最大瘤径及肝被膜转移和局部侵犯无关. 32 例分化程度不同的肝癌标本中, 癌细胞分化越差, p57<sup>kip2</sup> 蛋白的表达率越低. p57<sup>kip2</sup> 蛋白在 I ~ II 级的阳性率(88.2%)显著高于

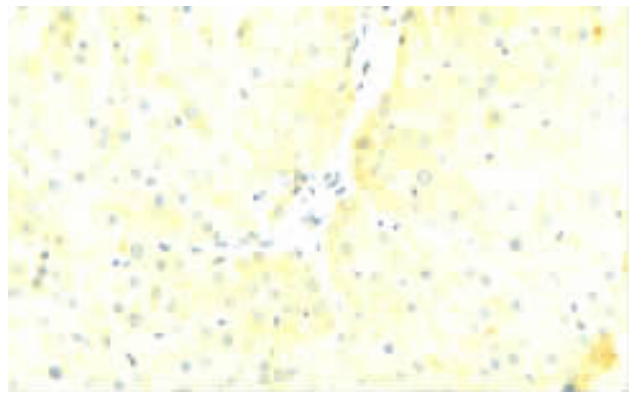


Fig 1 Positive p57<sup>kip2</sup> expression in normal hepatocytes Elivision ×40

图1 p57<sup>kip2</sup>在正常肝组织中的表达

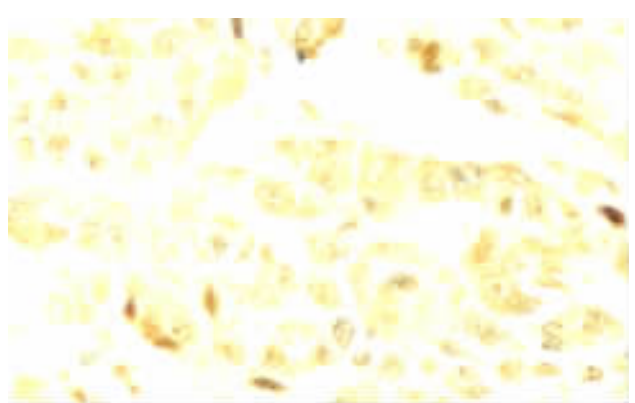


Fig 2 Positive p57<sup>kip2</sup> expression in well-differentiated carcinoma cells, with yellow granules in the nuclei and cytoplasm Elivision ×40

图2 p57<sup>kip2</sup>在高分化肝癌组织中的表达

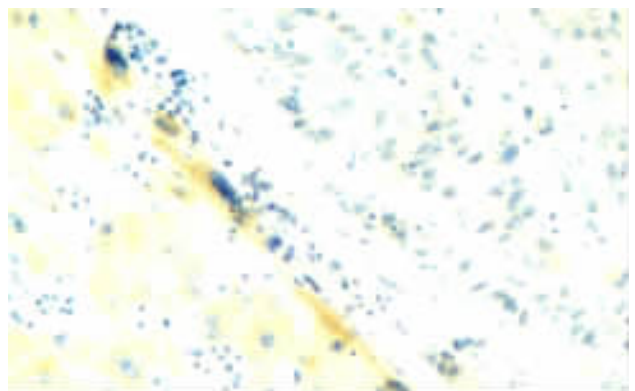


Fig 3 Negative p57<sup>kip2</sup> expression in moderate or low differentiated carcinoma cells surrounded with adjacent liver tissues that display positive expression of p57<sup>kip2</sup> Elivision ×20

图3 p57<sup>kip2</sup>在低分化肝癌组织中的表达

III ~ IV 级阳性率(20.0%,  $P = 0.007$ ). p57<sup>kip2</sup> 蛋白表达在早期 HCC 患者(72.2%)及生存期  $\geq 1$  a 的患者(78.6%)显著高于晚期 HCC 患者(35.7%,  $P =$

0.041)及生存期 <1 a 患者(27.8%,  $P=0.036$ ). 以血清甲胎蛋白(AFP)  $\geq 400 \mu\text{g/L}$  为阳性标准, p57<sup>kip2</sup> 蛋白在 AFP 阳性的 HCC 患者中表达率(36.4%)低于 AFP 阴性的 HCC 患者(66.7%),但统计学分析无显著性差异( $P=0.142$ ). p57<sup>kip2</sup> 蛋白与肿瘤大小、年龄、肝被膜转移和局部侵犯无统计学相关( $P>0.05$ , Tab 1).

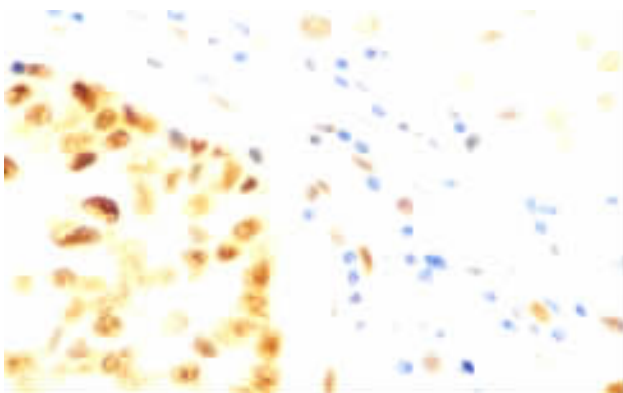
表 1 p57<sup>kip2</sup> 与肝癌各项病理指标之间的关系

Tab 1 Relationship between p57<sup>kip2</sup> and pathological indexes

Item	p57 <sup>kip2</sup> protein expression		Positivity rate/%	
	-	+		
Histological grade	I - II	2	15	88.2*
	III - IV	12	3	20.0
Clinical stage	I - II	5	13	72.2°
	III - IV	9	5	35.7
Age/yr	<45	2	10	83.3
	$\geq 45$	12	8	40.0
AFP( $\mu\text{g/L}$ )	<400	7	14	66.7
	$\geq 400$	7	4	36.4
Tumor size	<5 cm	4	9	69.2
	$\geq 5$ cm	10	9	47.4
Local metastasis	-	7	10	58.8
	+	7	8	53.3
Survival time	<1 a	11	7	38.9°
	$\geq 1$ a	3	11	78.6

\* $P<0.05$  vs histological grade III - IV; ° $P<0.05$  vs clinical stage III - IV; ° $P<0.05$  vs  $\geq 1$  a.

2.3 PCNA 和 p53 在肝癌组织中的表达 癌巢中绝大多数癌细胞 PCNA 阳性,而癌旁组织阳性细胞数量很少(Fig 4). p53 在肝癌组织中的表达,阳性细胞核圆形,成棕黄色颗粒,大小不一(Fig 5).



Almost all cancer cells positively express PCNA in carcinoma, but there is scarce of PCNA expression in perineoplasm.

Fig 4 Positive expression of PCNA in tumor tissue of HCC Elivision  $\times 40$

图 4 PCNA 在原发性肝癌组织中的表达

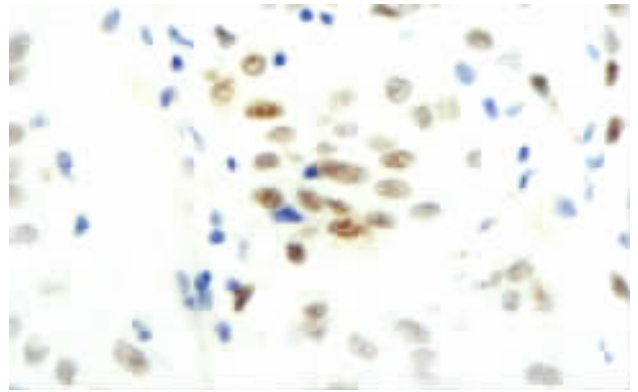


Fig 5 Positive expression of p53 in tumor tissue of HCC Elivision  $\times 40$

图 5 p53 在原发性肝癌组织中的表达情况

2.4 肝癌组织中 p57<sup>kip2</sup> 和 PCNA 及与 p53 的表达的相关性 PCNA 与 p57<sup>kip2</sup> 的表达程度之间有显著负相关性( $r_s = -0.397$ ,  $P=0.025$ , Tab 2),而 p53 与 p57<sup>kip2</sup> 的表达程度之间无显著性相关( $r_s = 0.197$ ,  $P=0.279$ , Tab 2).

表 2 p57<sup>kip2</sup> 与 PCNA, p53 在原发性肝癌组织表达中的相关性

Tab 2 Relationship of p57<sup>kip2</sup> with PCNA and p53 in HCC

Factor	p57 <sup>kip2</sup> protein expression		
	-	+	
PCNA	-	3	11
	+	11	7
p53	-	9	8
	+	5	10

PCNA: proliferating cell nuclear antigen.

### 3 讨论

细胞周期 G1 期的调控是有多种细胞周期调控因子参与的复杂过程,细胞周期 G1 期调控异常与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[4]</sup>.

p57<sup>kip2</sup> 基因定位于染色体 11P11.5,编码 316 个氨基酸残基的多肽,  $M_r 57\ 000$ . p57<sup>kip2</sup> 基因的表达产物属于 CIP/KIP 家族,与 p21, p27 部分同源,包含三个结构域:一个与 CDK 抑制物 p21 及 p27 同源的 N 末端区域;一个中央脯氨酸富集域及一个与 p27 相同的 C 末端区(QT 域). 脯氨酸富集域含有一些 PAPA 重复序列(脯氨酸-丙氨酸残基组成),它们被认为可以介导特异的蛋白-蛋白相互作用,从而实现 p57<sup>kip2</sup> 功能<sup>[5,6]</sup>. 其抑癌机制是通过 p57<sup>kip2</sup> 蛋白与 Cyclin-CDK 复合物(E-CDK2, D2-CDK2 和 A-CDK2)结合,阻滞细胞增生,从而使细胞周期停滞在 G1 期而实现的<sup>[7]</sup>. 在众多 CDKIs 中,只有 p57<sup>kip2</sup> 是胚胎形成所必需的,在增殖、运动、变形、分化等一系列复杂过程中

都起重要作用<sup>[8]</sup>。p57<sup>kip2</sup>基因敲除的小鼠常出现脐疝、软骨软化缺陷、肾髓质发育不良、肾上腺皮质增生异常,肿瘤发生率增高,同时该类小鼠大多数在24 h死亡,仅有10%的小鼠存活,却呈现严重的生长迟缓,提示p57<sup>kip2</sup>可能参与了细胞增殖和启动细胞分化的作用<sup>[9]</sup>。

p57<sup>kip2</sup>基因在正常人类是被印记的,这是第一个用该机制调控的细胞周期调控蛋白。在正常情况下,p57<sup>kip2</sup>基因的父亲基因被印记,母亲基因表达。在一些肿瘤中存在p57<sup>kip2</sup>基因印记缺失(Lose of Imprint)或印记错误,导致基因表达下降,导致肿瘤的发生发展<sup>[10]</sup>。p57<sup>kip2</sup>作为肿瘤抑制因子和生长调控因子,它这种单个等位基因的表达方式增加了畸形和癌变的危险<sup>[11]</sup>。现已证实p57<sup>kip2</sup>在食管癌、胃癌、大肠癌、卵巢癌、乳腺癌、甲状腺癌、胰腺癌等肿瘤组织均有表达<sup>[12-14]</sup>,但p57<sup>kip2</sup>表达与肝癌的关系报道较少。本试验结果表明,p57<sup>kip2</sup>在肝癌组织中的表达率明显低于正常肝组织,并与组织分级、临床分期及预后有关,提示p57<sup>kip2</sup>表达阴性者细胞增殖活性高,发展较快,预后较差。证明了p57<sup>kip2</sup>有抑制肿瘤细胞增殖的作用。

PCNA是DNA聚合酶 $\delta$ 的辅助因子,不仅参与DNA的生物合成,而且与Cyclin,CDK,p21形成四聚体,调控细胞周期和细胞增殖。其表达与细胞的增殖情况有关,因此可作为评价细胞增殖的指标<sup>[15]</sup>,且PCNA的过度表达与消化系统肿瘤有关。本结果表明,PCNA在肝癌组织中的表达(56.2%)明显高于正常组织(30.0%),且p57<sup>kip2</sup>在PCNA阳性的组织中表达明显低于PCNA阴性者。PCNA与p57<sup>kip2</sup>的表达程度之间有显著相关性( $P < 0.05$ )。说明p57<sup>kip2</sup>和PCNA可能存在协同作用,通过对PCNA的抑制,阻滞正在进行DNA复制的细胞进行进一步的DNA复制,从而实现抑癌作用。

p53是重要的凋亡活化基因。p53基因的突变,导致细胞周期监控机制的破坏,人类50%的肿瘤都是由于p53基因突变,使DNA监测点异常,导致肿瘤的发生发展<sup>[16]</sup>。但DNA损伤的监测还存在非p53依赖机制<sup>[17]</sup>。本结果表明,p53在肝癌组织中的表达率(46.9%)明显低于正常组织(80%)。p57<sup>kip2</sup>阳性的肝癌组织中,p53的阳性率也高,但p53与p57<sup>kip2</sup>的表达程度之间无显著性相关( $P > 0.05$ )。这恰恰说明p57可能是通过p53非依赖性机制,直接与CDK-Cyclins复合物结合,抑制它们激活参与细胞的增殖和凋亡调控,而不是像p21那样通过p53-p21-CDKs-Cyclins途径阻滞细胞周期。

综上所述,p57<sup>kip2</sup>蛋白的缺失及PCNA的高表达有助于肝癌的发生、发展,而p57<sup>kip2</sup>与p53可能通过不同的途径发挥细胞周期调控作用。

## 【参考文献】

- [1] Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the P21/cipl CDK inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene [J]. *Gene Dev*, 1995; 9(6): 650.
- [2] Yue H, Na YL, Feng XL, et al. Expression of p57kip2, Rb protein and PCNA and their relationships with clinicopathology in human pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2003; 9(2): 377-380.
- [3] 朱明华, 倪灿荣, 祝峙等. 应用组织芯片检测肝细胞肝癌组织中8种p53相关基因的表达 [J]. *癌症*, 2003; 22(7): 680-685.
- [4] Zhu MH, Ni CR, Zhu Z, et al. Determination of expression of eight p53-related genes in hepatocellular carcinoma with tissue microarrays [J]. *Chin J Cancer*, 2003; 22(7): 680-685.
- [5] Lee MH, Yang HY. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001; 58: 1907-1922.
- [6] Li Y, Millikan RC, Newman B, et al. P57 (KIP2) polymorphisms and breast cancer risk [J]. *Hum Genet*, 1999; 104(1): 83-88.
- [7] Lee M, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57-KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution [J]. *Genes*, 1995; 9(6): 639-649.
- [8] Marie-Pierre L, Caroline K, Serge AL. Signal-induced ubiquitination of p57Kip2 is independent of the C-terminal consensus CDK phosphorylation site [J]. *FEBS Lett*, 2003; 543(1-3): 125-128.
- [9] Hatada I, Inazawa J, Abe T, et al. Genomic imprinting of human 2001 and its reduced expression in Wilms' tumors [J]. *Hum Mol Genet*, 1996; 5(6): 783-788.
- [10] Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, et al. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57Kip2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann Syndrome [J]. *Nature*, 1997; 387(6629): 151-158.
- [11] Yokoo T, Toyoshima H, Miura M, et al. p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus [J]. *J Biol Chem*, 2003; 278(52): 52919-52923.
- [12] Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, et al. Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57kip2, on chromosome 11p15 [J]. *Genetics*, 1996; 93: 3026-3030.
- [13] 张增锋. 抑癌基因p14<sup>ARF</sup>, p57<sup>KIP2</sup>与肿瘤关系研究进展 [综述] [J]. *广西医学*, 2003; 25(9): 1674-1676.
- [14] Zhang ZF. Evolution of relationship between oncogene p14<sup>ARF</sup>, p57<sup>KIP2</sup> and tumors [review] [J]. *Guangxi Med J*, 2003; 25(9): 1674-1676.
- [15] Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, et al. Expression of p57/Kip2 protein in extrahepatic bile duct carcinoma and intrahepatic cholangiocellular carcinoma [J]. *Liver*, 2002; 22: 145-149.
- [16] Lee MH, Yang HY. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001; 58(12-13): 1907-1922.
- [17] 郑建勇, 李开宗, 王为忠. p27<sup>kip2</sup>与肝癌细胞增殖和凋亡的关系 [J]. *第四军医大学学报*, 2003; 24(15): 1359-1361.
- [18] Zheng JY, Li KZ, Wang WZ. Relationship between p27<sup>kip2</sup> and cellular proliferation and apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24(15): 1359-1361.
- [19] 刘富荣, 邵国兴, 扬力军等. 基因p21、p53在前列腺癌中的表达及相互关系 [J]. *第四军医大学学报*, 1999; 20(10): 68-69.
- [20] Liu FR, Shao GX, Yang LJ, et al. Expression and relationship of p21 and p53 in prostatic carcinoma [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 1999; 20(10): 68-69.
- [21] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. *Nature*, 2001; 411(6835): 342-348.