

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2000)03-0347-03

基因 p16 及 Cyclin D₁ 在子宫内膜癌中的表达及意义

贺书云, 辛晓燕, 王 健, 郭惠玲 (第四军医大学西京医院妇产科, 陕西 西安 710033)

关键词: p16; Cyclin D₁; 子宫肿瘤; 免疫组织化学
中图分类号: R737.3 文献标识码: A

摘要: 目的 探讨抑癌基因 p16 及细胞周期素 D₁ (Cyclin D₁) 在子宫内膜癌、交界性子宫内膜组织及正常子宫内膜组织中的表达规律及其与子宫内膜癌的关系 方法 应用免疫组化 SABC 法检测 38 例子宫内膜癌, 19 例子宫内膜增生过长及不典型增生, 10 例正常子宫内膜组织中基因 p16, Cyclin D₁ 的表达 结果 p16 在子宫内膜癌组织中阳性率为 40%, 在交界性子宫内膜组织中表达阳性率为 68%, 在正常子宫内膜组织中无表达, 正常、交界性及恶性子宫内膜组织中表达阳性率有明显差异 ($P < 0.05$). 在子宫内膜癌组织中 p16 的表达与病理分级有关, 与临床分期无明显关联 Cyclin D₁ 在子宫内膜癌中呈明显阳性表达, 表达率 57%, 定位于细胞核, 在交界性子宫内膜病变中阳性率为 21%, 正常子宫内膜组织中无表达, 正常、交界性及恶性子宫内膜组织表达差异明显 ($P < 0.05$). 在子宫内膜癌组织中 Cyclin D₁ 的表达与临床分期及病理分级均无关, 但有随着分化程度的下降、临床期别的升高而升高的趋势 结论 p16, Cyclin D₁ 在子宫内膜癌的发生发展过程中具有协同作用

Expression of p16 and Cyclin D₁ in uterine endometrial carcinomas and its significance

HE Shu-Yun, XIN Xiao-Yan, WANG Jian, GUO Hui-Ling

Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

Keywords: p16; Cyclin D₁; uterine endometrial carcinomas; immunohistochemistry

Abstract: **AIM** To study the expression and significance of p16 and Cyclin D₁ in human uterine endometrial carcinomas

METHODS The expression of p16 and Cyclin D₁ was exam-

ined in malignant, borderline and benign uterine endometrial tissues by immunohistochemistry SABC methods Monoclonal antibodies against p16 and Cyclin D₁ were employed **RESULTS** The positive rates of p16 expression among the malignant, borderline and benign tumors were 40%, 68% and 0 respectively Significant difference was observed ($P < 0.05$) in malignant tumors The expression of p16 was associated with pathological grades and no association was found with clinical phases Cyclin D₁ expression was negative in benign tumors and the positive rates in malignant and borderline tumors were 53% and 21% respectively ($P < 0.05$). In uterine endometrial carcinomas, no association was found between clinical phases and pathological grades **CONCLUSION**

There is an overexpression of Cyclin D₁ and a lower expression of p16 in uterine endometrial carcinomas and the synergy of the expression of p16 and Cyclin D₁ may contribute to the development of uterine endometrial carcinomas

0 引言

子宫内膜癌是女性生殖道常见恶性肿瘤, 其发生率在世界范围内呈上升趋势 肿瘤分子生物学的研究表明, 子宫内膜癌的发生、发展与癌基因的激活及抑癌基因的失活有关^[1] p16 抑癌基因是多重抑癌基因, 在多种肿瘤组织中均有异常表达 p16 作为细胞周期素 (Cyclins) 依赖性激酶 CDK4 抑制子与 Cyclin D₁ 竞争 CDK4, 抑制 Cyclin D₁ 对细胞生长分裂的正向作用, 参与细胞周期正常调控, 控制细胞 G1/S 期的转化, Cyclin D₁ 则作为正性调控因子促进细胞的分裂 若调节细胞正常生长的正负调控因子表达失控, 将导致细胞异常增殖, 诱发肿瘤^[2] 我们对 p16, Cyclin D₁ 在子宫内膜癌、交界性子宫内膜病变及正常子宫内膜组织中的表达情况进行了检测, 以探索 p16, Cyclin D₁ 表达的相互关系及其与子宫内膜癌发生的关系

1 材料和方法

1.1 材料 标本取自 1994-01/1999-03 西京医院妇科手术切除及活检标本 经病理诊断证实为子宫内

收稿日期: 1999-09-23; 修回日期: 1999-12-15

作者简介: 贺书云(1973-), 女(汉族), 山东省夏津县人 第四军医大学 1997 级妇产科专业硕士生 Tel (029) 3375392



膜癌 38 例, 依据 FIGO 分期标准: I 期 27 例, II 期 9 例, III 期 2 例 组织学分级: G1 期 25 例, G2 期 9 例, G3 期 4 例 患者术前未经放射治疗及化学治疗 子宫内膜增生过长及不典型增生病例 19 例及正常增生期子宫内膜 10 例 p16 (F-12) mAb, Cyclin D₁ mAb, SABCD 免疫组化试剂盒, DAB 显色试剂盒均为武汉博士德公司产品

1.2 方法 标本经常规步骤石蜡包埋, 进行 5 μm 连续切片 免疫组化染色: 石蜡切片常规脱蜡至水; 30 mL · L⁻¹ H₂O₂, 20 min, 灭活内源性过氧化物酶; PBS 洗片, 微波修复抗原; 正常山羊血清封闭组织内非特异性抗原, 30 min, 弃去上清, 加入 p16 抗体及 Cyclin D₁ 抗体, 室温孵育 2 h; PBS 振洗, 滴加生物素化二抗 37 °C, 30 min; PBS 振洗, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水透明封片 将 p16 (F-12) 及 Cyclin D₁ 染色阳性的子宫内膜癌组织作为阳性对照, 阴性对照选择 PBS 代替一抗 以细胞核呈清晰棕黄色为阳性, 根据显色强度及范围分为: 阴性(-): 无阳性细胞染色, 弱

阳性(+): 阳性细胞 < 50%, 强阳性(++) : 阳性细胞 > 50%.

2 结果

2.1 p16 在不同分化程度子宫内膜组织中的表达 在 38 例子官内膜癌组织中, p16 总阳性率为 40% (Fig 1). 其中 2 例: 强阳性; 13 例: 弱阳性; 23 例: 阴性 正常子宫内膜组织中未见 p16 的阳性表达, 在增生过长及不典型增生病例中 p16 强阳性表达为 68%.

2.2 Cyclin D₁ 在不同分化程度子宫内膜组织中的表达 38 例子官内膜癌组织中, 20 例可见不同程度的 Cyclin D₁ 的阳性染色, 其中 8 例: 弱阳性, 12 例: 强阳性, 阳性率为 57% (Fig 2). 增生过长及不典型增生子宫内膜组织中有 1 例呈强阳性表达, 3 例呈弱阳性核染色, 总阳性率为 21%. 在正常增殖期子宫内膜未见 Cyclin D₁ 的阳性表达

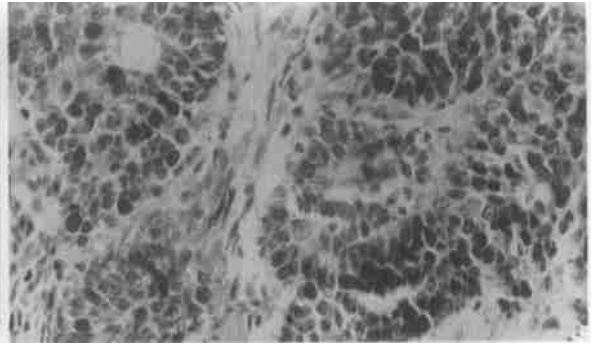
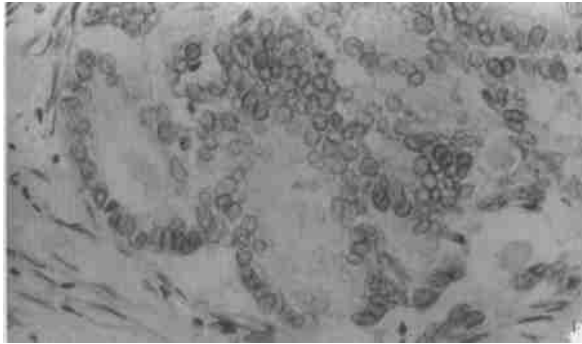


图 1 p16 在子宫内膜癌中的表达

Fig 1 p16 expression in uterine endometrial carcinoma × 400

图 2 Cyclin D₁ 在子宫内膜癌中的表达

Fig 2 Cyclin D₁ expression in uterine endometrial carcinoma × 400

2.3 p16 和 Cyclin D₁ 的相关性 子宫内膜癌中 p16 和 Cyclin D₁ 的表达呈负相关, 多同时表达, 但 p16 表达强度低于 Cyclin D₁ (P < 0.05).

2.4 p16, Cyclin D₁ 表达与子宫内膜癌分化的关系

在子宫内膜癌组织中 p16 的表达与分化程度有关, 高分化组表达阳性率明显高于低、中分化组 (P < 0.05), 与子宫内膜癌的临床分期关系不大 交界性子宫内膜组织中 p16 的阳性表达率明显高于子宫内膜癌组织 (P < 0.05). Cyclin D₁ 在子宫内膜癌组织中的表达阳性率随着分化程度的下降、临床期别的升高而升高, 但无统计学意义, 可能与分化差, 临床期别晚的病例数过少有关 (Tab 1).

表 1 p16 及 Cyclin D₁ 在不同临床分期及病理分化的子宫内膜癌组织中的表达

Tab 1 Positive expression rate (%) of p16 and Cyclin D₁ in uterine endometrial carcinoma with different pathological grade and clinical stage

Group	n	p16	Cyclin D ₁
Pathological grade			
I	25	52	44
II~ III	13	15 ^a	70
Clinical stage			
I	27	44	44
II	9	44	67
III	2	50	100

^aP < 0.05 vs pathological grade I.

3 讨论

抑癌基因 p16 是 1994 年美国 Kamb 等^[3]首次报道的一种新型抑癌基因。定位于人染色体 9q21~22 区, 它的完整编码序列包括 2 个内含子和 3 个外显子, 编码一相对分子质量为 16 000 的蛋白质。在细胞周期中 p16 暨是固有的调节者, 又是抑制肿瘤生长的关键成分, 当 p16 缺失或突变时, 一方面不能与 Cyclin D₁ 竞争同 CDK4 结合, 阻止细胞分裂, 另一方面增加 Cyclin D₁ 同 CDK4 结合进一步刺激细胞分裂, 从而使细胞生长失控向癌变发展^[4]。有研究报道, p16 基因缺失与肿瘤的转移和病程进展有密切关系, 它在不类型肿瘤的发生发展中可能起着不同作用^[5]。我们的研究结果表明子宫内膜癌中存在 p16 基因的缺失和突变, 且在不同分化程度的肿瘤组织中存在明显不同。

正常哺乳动物细胞在 G1-S 期交界处有一监控点, 以修复错配的 DNA, 阻止突变的积累, 若细胞周期调控缺陷则可提高基因的不稳定性。Cyclin D₁ 作为 PRAD1 基因从组织中分离, 在细胞分裂周期的 G1 期合成, 控制细胞由 G1 期进入 S 期, 是 G1 期细胞增殖信号的关键蛋白, 过度表达使 G1 期缩短。Cyclin D₁ 在正常增殖细胞中表达处于极低水平, 主要局限于上皮组织的增殖带^[6]。许多作者将此蛋白视为一种癌基因, 认为其过度表达最终形成肿瘤^[7]。在乳腺癌中 Cyclin D₁ mRNA 的过度表达是早期事件且存在于肿瘤进展的整个过程中直到形成浸润转移癌, 至于在子宫膜癌中内的情况尚需进一步研究, 但在子宫内膜癌中已检测到含有 Cyclin D₁ 的染色体 11q13 的异常。本实验 Cyclin D₁ 在子宫内膜癌中的阳性率为 57%, 交界性子宫内膜组织阳性率为 21%, 正常子宫内膜组织中无阳性表达, 差异有显著性。Cyclin D₁ 在子宫内膜癌中的过表达显示其在肿瘤发生中起着重要作用。其过表达的原因有多种机制参与, 除了 DNA 增殖或错意突变外是否是由于起始区的突变或调节转录因子的突变尚不清楚, 另外转录后调控对于 Cyclin D₁ 的过表达亦有重要作用, 不管机制如何 Cyclin D₁ 过表达在肿瘤发生中具有重要意

义

Cyclin D₁ 单独作用不足以引起细胞发生转化, 需与其他癌基因或抑癌基因的改变协同。据报道恶性肿瘤组织中常同时存在有 p16 的缺失和 Cyclin D₁ 的过量表达, 二者作用相互联合从而使肿瘤细胞获得更大生长趋势^[8]。在子宫内膜癌 Cyclin D₁ 的过表达与 p16 的低表达同时存在, 相关性分析 ($P < 0.05$), 显示二者呈负相关, 表明子宫内膜癌中 p16 和 Cyclin D₁ 异常同时存在并呈反馈调节参与肿瘤的发生。另外有报道表明 Cyclin D₁ 过度表达也与子宫内膜癌的不良预后有关^[9], 故 Cyclin D₁ 的过表达有可能成为评价子宫内膜癌, 子宫内膜癌前病变的一个预后检测指标。

参考文献:

- [1] Fujino A, Risinger JL, Collins NK *et al*. Allelotype of endometrial carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1994; 54(21): 4294.
- [2] Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II. Cyclin D and CDK inhibitors come of age [J]. *Cell*, 1994; 79(4): 573-582.
- [3] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types [J]. *Science*, 1994; 264(1): 436-437.
- [4] Marx J. New tumor suppresser may rival p53 [J]. *Science*, 1994; 264(1): 344-345.
- [5] 周春晓, 孙建衡, 陆士新 *et al*. 子宫内膜癌中 MTS1/p16 基因缺失的研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1997; 19(6): 404.
- [6] Ajchenbaum F, Ando K, Decaprio Jaa *et al*. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes [J]. *J Biol Chem*, 1993; 268(7): 4113-4119.
- [7] Gillet C, Fantl V, Smith R *et al*. Amplification and overexpression of cyclin D₁ in breast cancer detected by immunohistochemical staining [J]. *Cancer Res*, 1994; 54(6): 1812-1817.
- [8] Tsubari M, Tiihonen E, Marikki L. Cloning and characterization of p16 and alternatively spliced form of p15 cyclin-dependent kinase inhibitor [J]. *Cancer Res*, 1997; 57(8): 2966-2977.
- [9] N ikaido T, Li SF, Tanri S *et al*. Coabnormal expression of cyclin D₁ and P53 protein in human uterine endometrial carcinomas [J]. *Cancer*, 1996; 78(6): 1248-1253.

编辑 王 睿