

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2000)03-0350-04

Cyclin D₁, p16 在卵巢上皮性癌发生过程中的表达及相关性

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

关键词: p16; Cyclin D₁; 表达; 卵巢肿瘤; 免疫组织化学; 癌变过程

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A

摘要: 目的 研究 Cyclin D₁, p16 在卵巢上皮性癌发生过程中的表达及相关性 方法 采用免疫组织化学 SABC 法检测卵巢上皮性癌, 交界性, 良性卵巢肿瘤及正常卵巢组织 Cyclin D₁, p16 的表达 结果 Cyclin D₁ 表达具有明显趋势性, 恶性肿瘤组最高 (49/84, 58.3%), 随病情进展 (正常卵巢组织-良性肿瘤-交界性肿瘤-上皮性癌), 表达呈上升趋势 (分别为 10.0%; 26.1%; 45.0%; 58.3%), 恶性肿瘤组与良性肿瘤组及正常卵巢组织间比较差异显著 ($P < 0.05$). p16 蛋白表达随病变发展表达率升高, 正常卵巢组织组 10.0% (1/10), 良性肿瘤组 17.4% (4/23), 交界性肿瘤组 45.0% (9/20) 及恶性肿瘤组 65.5% (55/84), 恶性肿瘤组与良性肿瘤组及正常卵巢组织组间比较有显著差异 ($P < 0.01$). Cyclin D₁ 与 p16 在卵巢上皮性肿瘤中的表达具有显著正相关关系 ($P < 0.01$, $r = 0.50031$). 结论 Cyclin D₁ 和 p16 在卵巢上皮性肿瘤癌变过程中, 两者表达水平的相关性反映了癌基因与抑癌基因相互拮抗、抑制的机制

Expression of Cyclin D₁ and p16 in the carcinogenesis of common epithelial ovarian tumors and their correlation

WANG Jian, XIN Xiao-Yan, CHEN Bi-Liang, WANG De-Tang, MU Run-Hua, LIU Shu-Juan, ZHENG Wei-Guo

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

Keywords: p16; Cyclin D₁; expression; ovarian neoplasms; immunohistochemistry; carcinogenesis

收稿日期: 1999-12-07; 修回日期: 2000-01-03

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: 王 健 (1962-), 男 (汉族), 安徽省庐江县人, 副教授, 副主任医师, 硕士 Tel (029) 3373861 Email wangjian@fmmu.edu.cn

Abstract: **AIM** To investigate the expression of Cyclin D₁ and p16 in the carcinogenesis of common epithelial ovarian tumors and to study the correlation of cell-cycle regulators between Cyclin D₁ and p16 **METHODS** By using immunohistochemical method SABC, Cyclin D₁ and p16 were examined in different ovarian tumors and normal ovarian tissues **RESULTS** The results showed that the positive immunostaining rate for Cyclin D₁ protein ranked the highest in common epithelial ovarian cancers and decreased with in the descending order from cancer's group to borderline's group, to benign's group and to normal ovary (58.3%, 45.0%, 26.1% and 10.0% respectively $P < 0.01$). The positive immunostaining of p16 increased in the ascending order from normal ovary to common epithelial ovarian cancers and the expression rates were 10.0%, 17.4%, 45.0% and 65.5% respectively. There was a significant difference between the malignant, benign and normal tissues. There was an obvious positive correlation between the expression level of Cyclin D₁ and p16 **CONCLUSION** The results suggest that Cyclin D₁ and p16 play an important role in the carcinogenesis of common epithelial ovarian cancers. The correlation between Cyclin D₁ and p16 expression shows the feedback mechanism of cell cycle regulation

0 引言

肿瘤的发生、发展机制错综复杂, 但无论何种原因造成的细胞恶性转化, 其最终表现均为细胞周期调控机制紊乱、分化受阻。与细胞周期调节有关的癌基因及抑癌基因表达异常见于人类多种恶性肿瘤^[1]。多种癌基因、抑癌基因表达异常或失衡导致细胞增殖周期调控障碍在肿瘤发生发展及转归上起关键性作用。我们用免疫组织化学方法检测卵巢上皮性肿瘤 Cyclin D₁ 和 p16 表达, 以探讨二者在卵巢上皮性癌发生发展中的作用及相关性。

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 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 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 术中获取原发性卵巢上皮性癌新鲜标本, 当即用 100 mL · L⁻¹ 福尔马林液浸泡固定 6 h, 石蜡包埋, 常规病理学检查证实诊断 按 Broder 病理分级法分级, 其中 I 级 15 例, II 级 22 例, III 级 31 例, IV 级 16 例 标本取材前患者均未经过化疗 同期设正常卵巢组织对照 10 例, 良性卵巢上皮性肿瘤 23 例, 交界性卵巢上皮性肿瘤 20 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, p16 的表达 抗 Cyclin D₁ mAb (美国 ZYMED Laboratories, Inc) 的工作浓度 1:100, 兔抗 p16 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc) 的工作浓度 1:50, 生物素化 mAb 和 SABC 试剂 (武汉博士德公司) 的工作浓度均为 1:100 和 1:100 方法如下: 石蜡切片经抗原修复后, 在两套切片上分别滴加 1:100 抗 Cyclin D₁ 或 1:50 抗 p16 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 HIGHS-ABC, 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: Cyclin D₁ 组织切片细胞核内出现棕色颗粒时即为阳性细胞, p16 主要在胞膜、胞质, 甚或在细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性 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 记录统计观察结果

统计学处理: 各组间比较用 Kruskal Wallis 秩和检验 不同临床分期、组织细胞分化程度、组织类型 Cyclin D₁, p16 表达比较用 χ² (Chi-Square) 检验 Spearman 等级相关检验 统计学处理软件 SAS System 6.11 版

2 结果

2.1 Cyclin D₁ 在正常卵巢组织和卵巢上皮性肿瘤中的表达 多均数 Kruskal Wallis 秩和检验 $H = 15.281, P = 0.0016$ 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 ($P < 0.05$, Tab 1). 其他组间差异不显著 ($P > 0.05$).

2.2 p16 在正常卵巢组织和卵巢上皮性肿瘤中的表达 多均数秩和检验 (Kruskal Wallis 法) $H = 26.389, P = 0.0000$ Nemenyi 法组间两两比较恶性肿瘤组与良性肿瘤组及正常卵巢组织存在显著差异 ($P < 0.01$, Tab 2), 而交界性肿瘤与其他组间比较, p16 表达无显著性差异

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 ovarian tissue and different kinds of common epithelial ovarian tumors

Group	n	Immunostaining for Cyclin D ₁				Positive rate (%) (+ ~ ##)
		-	+	#	##	
Normal	10	9	1	0	0	10.1
Benign	23	17	4	2	0	26.1
Borderline	20	11	5	3	1	45.0
Malignant	84	35	21	19	9	58.3 ^a

^a $P < 0.05$ vs normal and benign

表 2 p16 在正常卵巢组织和卵巢上皮性肿瘤中的表达
Tab 2 Comparison of p16 expression among ovarian tissue and different kinds of common epithelial ovarian tumors

Group	n	Immunostaining for p16				Positive rate (%) (+ ~ ##)
		-	+	#	##	
Normal	10	9	1	0	0	10.0
Benign	23	19	3	1	0	17.4
Borderline	20	11	5	3	1	45.0
Malignant	84	29	20	19	16	65.5 ^b

^b $P < 0.01$ vs normal and benign

2.3 卵巢上皮性癌 Cyclin D₁ 与 p16 表达的相关性分析 在卵巢上皮性癌中 Cyclin D₁, p16 表达具有明显的趋势性和一致性 从正常卵巢组织、良性肿瘤、交界性肿瘤至恶性肿瘤依次上升, 恶性肿瘤与正常卵巢组织、良性肿瘤的表达率间均存在显著差异 ($P < 0.01$). 交界性肿瘤阳性表达率介于良恶性之间, 但统计处理差异不显著 经 Spearman 等级相处理, Cyclin D₁ 与 p16 表达间呈显著正相关关系 $r = 0.50031$, Dunn 法校正后 $P = 0.0011$.

2.4 卵巢上皮性癌 Cyclin D₁ 与 p16 表达 见 Fig 1, 2

3 讨论

Cyclin D₁ 是细胞周期蛋白家族中的重要成员, 与肿瘤间的关系较明确, 已被称为原癌基因 在细胞增殖周期中, Cyclin D₁ 作为 G₁ / S 期时相转变调控点 (R point) 的重要调控因子, 对决定细胞进入 S 期或是进入终末分化起着重要作用 抑制 Cyclin D₁ 表达或功能可以阻碍细胞进入 S 期 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^[2]。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、食管癌及子宫肿瘤等^[3- 5]。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。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^[3, 6, 7]。本实验研

究中, 卵巢上皮性肿瘤 Cyclin D₁ 的表达表现出明显的趋势性, 即恶性组最高 (58.3%), 交界性组 (45.0%)、良性组 (26.1%), 正常卵巢组织 (10.0%) 依次减低。多均数秩和检验 $P = 0.0016$ 。Nemenyi 法组间比较恶性组与良性组及正常卵巢组织组 Cyclin D₁ 表达存在显著差异 ($P < 0.05$)。交界性肿瘤细胞分化程度介于恶性与良性之间, Cyclin D₁ 表达水平亦是如此, 从另一侧面证明 Cyclin D₁ 的表达水平与肿瘤的恶性分化程度相关。以上结果支持 Cyclin D₁ 作为原癌基因参与细胞周期代谢及调控的理论

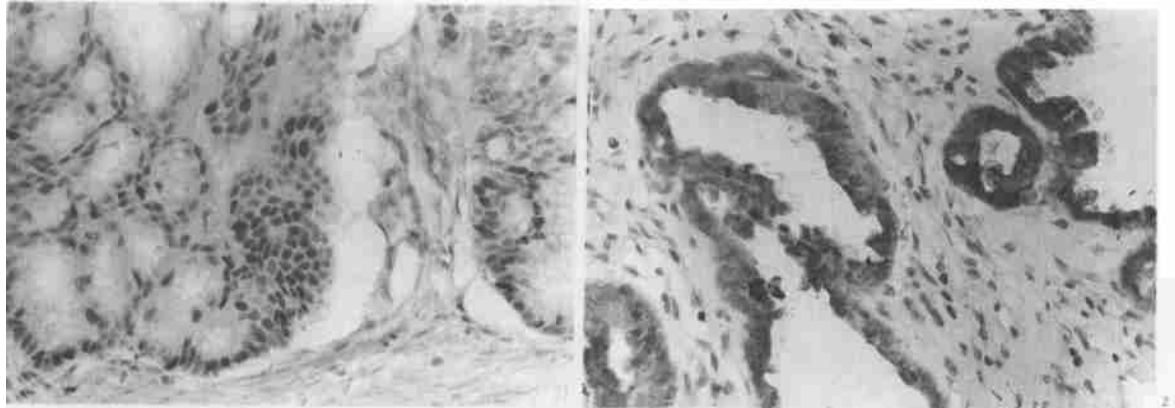


图 1 浆液性卵巢上皮性癌 p16 表达

Fig 1 Expression of p16 in ovarian serous cystadenocarcinoma SABC × 400

图 2 粘液性卵巢上皮性癌 cyclin D₁ 表达

Fig 2 Expression of cyclin D₁ in ovarian mucinous cystadenocarcinoma SABC × 400

卵巢癌 p16 基因及蛋白的研究各家报道结果不一, 甚至截然相反。认为 p16 基因及蛋白具有抑癌作用, 其异常与肿瘤发生发展有关: Ichikawa 等^[8] 研究不同分期和不同组织类型原发性卵巢癌中 p16 基因失活情况, 发现在晚期卵巢癌中 p16 基因失活明显高于早期卵巢癌, 因此推测 p16 失活可能与晚期肿瘤的进展有关。Fujita 等^[9] 用 RT-PCR 和免疫组化的方法检测卵巢上皮性癌冰冻组织 p16, 其中 p16 mRNA 与 p16 蛋白的低阳性率与肿瘤期别早晚相关。Milde 等^[10] 用免疫组化检测不同病理类型的 94 例原发性卵巢癌 p16 蛋白的表达, 认为 p16 异常与肿瘤组织类型有关。认为 p16 在卵巢癌中的基因异常罕见, 或少数异常不能反映 p16 与卵巢癌的关系, 或是对基因改变类型产生争论: Shih 等^[11] 及 Schuyer 等^[12] 的研究表明在卵巢上皮性肿瘤中 p16 基因突变罕见, 认为 p16 在该类肿瘤中的作用甚微或意义不清, 不能作为判断预后的指标。Marchini 等^[13] 在 42 例原发性卵巢癌中用 PCR 方法扩增 p16 exon 1 和 2, 未发现缺失和重排。用 PCR-SSCP 对半数以上的

肿瘤进行分析, 未发现突变基因。认为 p16 在恶性肿瘤中的表达反较交界性、良性及正常组织增高: Dong 等^[14] 研究了 159 例恶性、31 例良性卵巢肿瘤 p16 蛋白表达发现, FIGO 分期越高分化越差的肿瘤 p16 蛋白呈高表达, 且与肿瘤病程进展及不良预后有关。本实验结果与 Dong 的报道相似。卵巢上皮性肿瘤 p16 蛋白表达: 恶性组 (65.5%) 明显高于交界性组 (45.0%), 良性组 (17.4%) 及正常卵巢组织 (10.0%), 秩和检验 $P = 0.0000$; 随临床分期、病理分级的增加, p16 蛋白阳性表达率增高。

卵巢上皮性癌 p16 蛋白高表达可通过细胞周期调控来加以解释。从细胞周期调控角度来讲, 肿瘤细胞的恶性增殖实际上是一系列癌基因、抑癌基因共同作用的结果。p16 作为第一个最直接抑制肿瘤发生的细胞固有成分, 其主要功能是与 Cyclin D₁ 竞争, 特异性地与 CDK4, Cyclin D₁-CDK4 复合物结合, 直接抑制 CDK4 活性, 阻止细胞 G₁ S 期的转变和 DNA 合成启动, 从而发挥对细胞周期的负性作用。我们认为卵巢上皮性癌 p16 蛋白高表达可能是细胞周期调

控反馈作用的结果,在肿瘤发生上可能属晚发事件。已有实验证明当肿瘤组织中 Rb 基因缺失或突变导致 Rb 失活,可使 p16 表达水平上升,其作用是抑制因反馈作用而升高的 CDK4。而 p16 与 Cyclin D₁ 在细胞周期 G₁/S 调控点调控中也存在某种量的平衡关系。当 Cyclin D₁ 表达水平增高时,为了抑制 Cyclin D₁ 与 CDK4 结合对细胞增殖的正性作用,p16 蛋白表达代偿性增加。p16 在卵巢上皮性癌中高表达的发生机制尚需结合细胞周期调控理论与其他癌基因、抑癌基因的表达改变综合分析,可能会得出更为科学的结论。

Cyclin D₁ 和 p16 在 Rb 上游分别对其磷酸化起正、负调控作用,竞争性地与 CDK 结合,激活或抑制 CDK 激酶活性。近期有学者认为,只有癌基因产物过量 and 肿瘤抑制基因产物缺失或失活同时发生,细胞才能发生转化,导致肿瘤^[15]。有研究表明,p16 的缺失与 Cyclin D₁ 的过量在多种肿瘤细胞中共同存在,提示这两种异常相联合使肿瘤细胞获得更大的生长优势。

本实验中发现,p16 与 Cyclin D₁ 的表达呈明显的正相关关系,即随 Cyclin D₁ 表达水平的增高,p16 的表达水平也相应上升。其结果似与上述观点矛盾。但是有研究表明,当向 Cyclin D₁ 过表达的 NIH3T3 或胶质瘤细胞导入 p16 表达载体使 p16 蛋白过表达,却不能造成细胞的生长抑制^[16],而将抗 Cyclin D₁ 抗体和 p16 蛋白共同注射至正常的成纤维细胞比单独注射上述两种蛋白造成的生长抑制更明显^[17]。说明 Cyclin D₁ 和 p16 在细胞周期调控中需要有一个量的平衡,如果 Cyclin D₁ 在与 p16 竞争与 CDK4 结合中占优势,则细胞增殖加速,反之,细胞增殖受抑制。

所以我们认为从细胞周期调控角度可以解释为什么卵巢恶性上皮性肿瘤 Cyclin D₁ 和 p16 表达同时增高,并呈正相关关系,其可能的解释: Cyclin D₁ 的基因扩增或过度表达是细胞转化和维持细胞转化表型所必需的,并且与其他基因或基因产物异常相配合,是癌变早期的分子事件之一^[18]。p16 基因过表达是较晚的分子事件,是在 Cyclin D₁ 过表达的基础上的一种代偿性行为,也是细胞周期调控正、负因子协同、平衡的结果。p16 基因过表达在卵巢上皮性肿瘤的发生发展可能不是重要角色。

参考文献:

[1] Geradts Y, Brobert AK, Gloria AN *et al*. Immunohistochemical detection of the cycle-dependent kinase inhibitor 2/multiple tu-

- mor suppressor gene 1 (CDKN2A/MTA1) product p16^{INK4A} in archival human solid tumors: Correlation with retinoblastoma protein expression [J]. *Cancer Res*, 1995; 55(24): 6006- 6011.
- [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] Nakagawa H, Zukerberg L, Togawa K *et al*. Human cyclin D₁ oncogene and esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 1995; 76(4): 541- 549.
- [4] Musgrove EA, Lee CS, Buckley MF *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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91(17): 8022- 8026.
- [5] Kurzrock RMD, Ku SM S, Talpaz MMD. Abnormalities in the PRAD₁(cyclin D₁/BCL-1) oncogene are frequent in cervical and vulvar squamous cell lines [J]. *Cancer*, 1995; 75(2): 584- 590.
- [6] 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.
- [7] His ED, Zukerberg LR, Yang W I *et al*. Cyclin D₁/PRAD₁ expression in parathyroid adenomas: An immunohistochemical study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81(5): 1736- 1739.
- [8] Ichikawa Y, Yoshida S, Koyama Y *et al*. Inactivation of p16/CDKN2 and p15/MTS2 genes in different histological types and clinical stages of primary ovarian tumors [J]. *Int J Cancer*, 1996; 69(6): 466- 470.
- [9] Fujita M, Enomoto T, Haba T *et al*. A alteration of p16 and p15 genes in common epithelial ovarian tumors [J]. *Int J Cancer*, 1997; 74(2): 148- 155.
- [10] Milde-Langosch K, Ocon E, Becker G *et al*. p16(MTS1) inactivation in ovarian carcinoma: High frequency of reduced protein expression associated with hypermethylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors [J]. *Int J Cancer*, 1998; 79(1): 61- 65.
- [11] Shih YC, Kert J, Liu J *et al*. Rare mutation and no hypemethylation at the CDKN2A locus in epithelial ovarian tumor [J]. *Int J Cancer*, 1997; 70(5): 508- 511.
- [12] Schayer M, van'taverne L, Klijn JG *et al*. Sporadic CDKN2 (MTS1/p16NK4) gene alterations in common ovarian tumors [J]. *Br J Cancer*, 1996; 74(7): 1069- 1073.
- [13] Marchini S, Codegoni AM, Bonazzi C *et al*. Absence of deletion but frequent loss of expression of p16 NK4 in human ovarian tumors [J]. *Br J Cancer*, 1997; 76(2): 146- 149.
- [14] Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA *et al*. Increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product p16NK4A in ovarian cancer is associated with progression and unfavourable prognosis [J]. *Int J Cancer*, 1997; 74(1): 57- 63.
- [15] Weinberg RA. The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play [J]. *Cell*, 1997; 88(5): 573- 575.
- [16] Li Y, Nichols MA, Shay JW *et al*. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb [J]. *Cancer Res*, 1994; 54(23): 6078- 6082.
- [17] Lukas J, Aagaard L, Strauss M *et al*. Oncogenic aberrations of p16NK4/CDKN2 and cyclin D₁ cooperate to deregulate G₁ control [J]. *Cancer Res*, 1995; 55(21): 4818- 4823.
- [18] Califano J, Van der Riet P, Westra W *et al*. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization [J]. *Cancer Res*, 1996; 56(11): 2488- 2492.

编辑 王睿