

胃肠道恶性肿瘤Cyclins表达分型与MDR1及TNM分期的关系

郭勇, 覃吉超, 周毅, 何小军, 李伟华, 谢大兴, 龚建平

■背景资料

Cyclins在细胞周期运行中是一种重要的“驱动”, 其表达情况的异常是导致肿瘤恶性转变并浸润生长转移的重要因素; 而MDR1(多药耐药基因1)编码的糖蛋白P-gp是导致化疗失败的主要原因之一。

郭勇, 覃吉超, 周毅, 何小军, 李伟华, 谢大兴, 龚建平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院分子医学中心 湖北省武汉市 430030
卫生部临床学科重点资助项目, No. 20012537
973肿瘤计划资助项目, 2004CB518705
通讯作者: 龚建平, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院分子医学中心. gongjianping11@hotmail.com
电话: 027-83663301
收稿日期: 2006-02-28 接受日期: 2006-03-28

Correlations of Cyclins expression types with multi-drug resistance-1 and TNM staging in gastrointestinal cancer

Yong Guo, Ji-Chao Qin, Yi Zhou, Xiao-Jun He, Wei-Hua Li, Da-Xing Xie, Jian-Ping Gong

Yong Guo, Ji-Chao Qin, Yi Zhou, Xiao-Jun He, Wei-Hua Li, Da-Xing Xie, Jian-Ping Gong, Center of Molecular Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by Emphasized Project from Clinical Department of Ministry of Health, No. 20012537, and the Tumor Project in 973 Plan, No. 2004CB518705

Correspondence to: Professor Jian-Ping Gong, Center of Molecular Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. gongjianping11@hotmail.com

Received: 2006-02-28 Accepted: 2006-03-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of four Cyclins in gastrointestinal cancers, and to explore their correlations with multi-drug resistance-1 (MDR1) and TNM staging.

METHODS: Sixty-two fresh samples (gastric cancer 32, colorectal cancer 30) from patients underwent operation were collected, and the expression of Cyclin (D1, E, A, B1) and MDR1 were detected by flow cytometry. In addition, pathological reports were analyzed for TNM staging.

RESULTS: According to the expression of four Cyclins, four cell cycle types were divided in

the gastrointestinal cancers. These four cell cycle types were in accordance with TNM staging ($\kappa = 0.599, P < 0.01$) and marked correlation with the level of MDR1 expression ($r_s = 0.495, P < 0.01$).

CONCLUSION: Cell cycle typing based on Cyclins expression has the same significance as TNM staging. MDR1 expression is correlated with the cell cycle typing, so it is possible to reverse MDR through interfering in cell cycle.

Key Words: Cyclins; Cell cycle; Multi-drug resistance-1; Gastrointestinal cancer; Flow cytometry; TNM staging

Guo Y, Qin JC, Zhou Y, He XJ, Li WH, Xie DX, Gong JP. Correlations of Cyclins expression types with multi-drug resistance-1 and TNM staging in gastrointestinal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(15):1512-1515

摘要

目的: 研究胃肠道恶性肿瘤的4种主要Cyclins (Cyclin D1, E, A, B1)的表达规律, 以此为依据对恶性肿瘤进行分型, 并结合肿瘤标本中MDR1(多药耐药基因1)的表达情况, 与肿瘤TNM分期进行相关性分析。

方法: 采用流式细胞术分析新鲜手术获取的62例肿瘤标本(胃癌32例, 结直肠癌30例)的Cyclin D1, E, A, B1及MDR1表达情况, 再记录术后病理报告进行TNM分期。

结果: 根据4种主要Cyclins的表达情况对恶性消化道肿瘤分为I-IV型Cyclin非时相性表达类型, 此I-IV型细胞周期类型与TNM分期具有一致性, Kappa系数等于0.599($P < 0.01$)。I-IV型细胞周期类型中MDR1的表达水平逐渐增高, 等级相关系数 r_s 为0.495($P < 0.01$)。

结论: 根据Cyclins的表达情况对消化道恶性肿瘤进行的分型具有与TNM分期相同的意义。在消化道肿瘤中, MDR1与肿瘤细胞周期素表达类型有关, 对治疗具有指导意义。

关键词: Cyclins; 细胞周期; 多药耐药基因1; 胃肠道恶性肿瘤; TNM分期; 流式细胞术

郭勇, 覃吉超, 周毅, 何小军, 李伟华, 谢大兴, 龚建平. 胃肠道恶性肿瘤Cyclins表达分型与MDR1及TNM分期的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1512-1515

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1512.asp>

0 引言

细胞周期素Cyclins在细胞周期运行中是一种重要的“驱动”,其表达情况的异常是导致肿瘤恶性转变并浸润生长转移的重要因素^[1];而MDR1(多药耐药基因1)编码的糖蛋白P-gp是导致化疗失败的主要原因之一,研究其表达情况与肿瘤的某些生物学行为的关系,用于判断恶性程度及预后是研究热点之一^[2-4].我们通过流式细胞术研究胃肠道恶性肿瘤手术标本的4种主要Cyclins及MDR1的表达情况,根据Cyclins的表达情况对肿瘤进行分型,根据临床病理诊断进行TNM分期,研究彼此之间的相关性.旨在尝试用“分子指标”进行肿瘤分期,并探讨该分期与一些肿瘤标志物的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 在手术室获取新鲜肿瘤标本(共62例,其中胃癌32例,结肠癌11例,直肠癌19例),每次在不影响病检的前提下取组织2-6 g,放入冰PBS的小标本瓶中,带回实验室,所有肿瘤患者均未行术前化疗;2.5 g/L Triton X-100购自Sigma公司;鼠抗人Cyclins,MDR1,同质特异性对照抗体鼠抗人IgG单抗均购自BD公司;FITC标记的兔抗鼠IgG抗体购自Dako公司;FACSort流式细胞仪购自BD公司.

1.2 方法 机械法制备单细胞悬液,每个标本固定6管,1管用纯甲醇固定(用于Cyclin D1分析),其他5管用800 mL/L乙醇固定(分别用于其他3种Cyclins,IgG,MDR1分析).-20℃保存过夜.取固定的细胞,PBS洗涤后加2.5 g/L Triton X-100在冰上放置5 min.加入PBS溶液洗涤、离心、去上清吸干.将含有一抗(用10 g/L BSA稀释1:50-1:200)的BSA分别加入细胞管中,4℃孵育过夜.将孵育过夜的细胞加PBS洗涤倒干残液.加10 g/L BSA稀释(1:20)的FITC标记的兔抗鼠IgG抗体.室温避光放置30 min.PBS洗涤,离心弃上清.加入含10 mg/L的PI和1 g/L RNase的PBS液,室温避光放置20 min,待检测.使用FACSort流式细胞仪,经488 nm激光激发,被

表1 Cyclins非时相性表达分型

Cyclins非时相性 表达类型	Cyclin表达			
	Cyclin D1	Cyclin E	Cyclin A	Cyclin B1
I	+~++	+~++	+~++	+~++
II	+~++	+~++/-	+~++/-	+~++/-
III	—	+~++/-	+~++/-	+~++/-
	+	—	—	—
IV	—	—	—	—

标记细胞同时发射红色(PI)和绿色(FITC)荧光,经Cell Quest软件处理并对荧光强度进行分析,获得Cyclins/DNA双参数图像.以同型对照的Gate内的细胞百分比在5%以下的电压检测同一标本4种Cyclins和MDR1的间接荧光水平.每一个标本共6管,分别为IgG对照,Cyclin D1,E,A,B1,MDR1.阳性标准:10%以下为“-”,10%-25%为“+”,25%-100%为“++”.记录术后病检报告,进行TNM分期.

统计学处理 对Cyclins非时相性表达类型与TNM分期做一致性检验,计算κ系数并进行假设检验;对MDR1的表达水平与Cyclins非时相性表达类型做Spearman等级相关检验. $P<0.05$ 视为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胃肠肿瘤Cyclins非时相性表达分型 考虑到Cyclin D1为G₀/G₁期主要Cyclin,驱动细胞通过限制点进入细胞周期,继而Cyclin E,A,B1顺序驱动细胞周期运行完毕.同时根据Cyclins的表达情况(半定量分析结果)分为4种类型(表1).

2.2 细胞周期类型 I-IV型与TNM分期 I-IV期的关系 细胞周期类型 I-IV型与TNM分期 I-IV期进行一致性检验,计算κ值并进行显著性检验.其中TNM分期采用国际抗癌联盟(UICC)胃癌和结肠癌的TNM分期指标.计算κ系数等于0.599,对κ值进行z检验, $P<0.01$,认为有一致性(表2).

2.3 细胞周期类型 I-IV型与MDR1表达水平的关系 细胞周期类型 I-IV型与MDR1阳性细胞百分比的分布情况(表3和图1).可以发现MDR1的表达水平呈现从细胞周期 I-IV型逐渐升高的趋势,等级相关 $r=0.495$, $P<0.01$.

3 讨论

当生长信号传递到细胞周期调控机制时,首先是Cyclin D1的表达增加(Cyclin D1是G₀/G₁期主要Cyclin,起生长因子与细胞周期之间纽带的作用,

■ 研发前沿

研究MDR1表达情况与肿瘤的某些生物学行为的关系,用于判断恶性程度及预后是研究热点之一.如何逆转耐药是目前肿瘤治疗的难点.

■ 相关报道

胃肠肿瘤中MDR1的高表达与肿瘤的进展有关.同时,肿瘤是一类渐进性细胞周期调控机制破坏的疾病.

■创新盘点

本文的创新之处在于探讨了肿瘤耐药的重要分子基础MDR1和细胞周期调控破坏的关系,试图从细胞周期运行的角度来解释和预测原发耐药。

表 2 细胞周期分型与TNM分期

Cyclins非时相性 表达类型	TNM分期				合计
	I	II	III	IV	
I	10	2	0	0	12
II	0	7	6	0	13
III	0	5	16	2	23
IV	0	0	3	11	14
合计	10	14	25	13	62

表 3 细胞周期类型与MDR1表达水平

Cyclins非时相性 表达类型	MDR1阳性表达水平			合计
	0%-10%	10%-25%	25%-100%	
I	9	2	1	12
II	2	8	3	13
III	4	5	14	23
IV	2	2	10	14
合计	17	17	28	62

可被称为细胞周期外Cyclin),与Cdk4/6形成复合物,此时在Cdk4, pRB, E2F等参与瀑布式激动下,使细胞通过Restriction Point(限制点)以便进入S期^[5-7]。通过限制点后即无需生长因子刺激,此时进入细胞周期。CyclinE进一步升高,形成越来越多的CyclinE-Cdk2复合物,启动通过G₁期检测点,并最终进入S期,此后CyclinA、B1水平的依次升高和Cdk2, Cdk1的依次激活,细胞通过G₂, M期及其中相应的检测点完成细胞增殖^[8]。所以CyclinE, A, B1可被称为细胞周期内Cyclin。几乎所有的肿瘤都有一个根本的共同特征:细胞周期调控机制的破坏,导致细胞的失控性生长^[9]。已经有研究正常肠道上皮的Cyclin表达规律^[10]的报道,本课题中我们揭示消化道肿瘤的Cyclin表达规律,发现不同TNM期有不同的Cyclin表达情况,进而我们将Cyclins表达分为I-IV型(表1): I型细胞周期内外Cyclin均有表达,可能“生长信号”过强,腺体结构增生旺盛,符合“High cyclin, high speed”这一观点。II型细胞周期外Cyclin有表达,细胞周期内Cyclin一种或两种表达。III型仅有细胞周期内Cyclin或仅有细胞周期外Cyclin表达。IV型细胞周期内外Cyclin均无表达,可能拥有不依赖于Cyclin/Cdk的细胞周期机制,使肿瘤细胞逃避了限制点和检测点的调控。多种癌基因、抑癌基因改变的累积是导致不同表型的肿瘤获得多样的生物学行为的主要原因,而几乎所有的癌基因、抑癌基因的功能效应,

■应用要点

本文揭示了决定肿瘤原发性多药耐药的重要分子基础MDR1与细胞周期调控破坏的关键即Cyclins表达之间的关系。可从细胞周期运行的角度预测耐药,并能进一步研究探索肿瘤的细胞周期与原发耐药之间的关系,最终通过干预肿瘤的细胞周期逆转耐药。

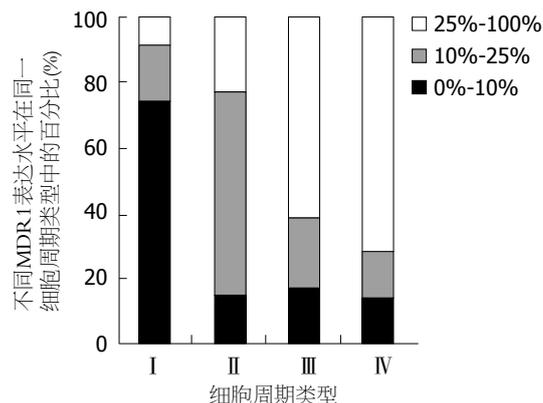


图 1 MDR1的表达情况从细胞周期I-IV型变化趋势。

最终都是从不同的途径汇聚到细胞周期机制上来或者本身直接就是细胞周期的重要调控成分^[11-12]。I-IV型中Cyclin D1表达下降提示肿瘤生长不再依赖外界生长刺激, Cyclin D1在肿瘤恶性转变中具有重要意义^[13-14]。而I-IV型中不同的细胞周期内Cyclin的表达逐渐下降或不表达提示不同的检测点效应的丧失。所以, Cyclin表达情况的分型所反映出的不同的细胞周期机制的破坏情况可以与肿瘤的生物行为联系起来。统计结果也显示I-IV型与TNM分期有一致性。

我们发现MDR1的表达水平呈现从细胞周期I-IV型逐渐升高的趋势。诚然,实验标本选取的均为术前未行化疗的患者,所以排除了获得性耐药的可能。而且,先前已有的报道认为MDR1与肿瘤的进展和预后有一定的关系。Fujii *et al*^[15]通过单抗C219,运用流式细胞仪分析24例胃癌患者中P-gp的表达,其中8例P-gp阳性,阳性发生率在进展期患者中较高。另在89例行手术治疗的胃癌患者中,研究体外化学敏感性测试(TIA)和胃癌患者的临床病理特征及生存期的关系,其中31例TIA测试显示MDR阳性(34.8%),多药耐药组的术后5 a生存率16%显著低于非多药耐药组的38%($P < 0.05$)。多药耐药基因MDR1编码的P-gp高表达是耐药的主要机制。而在我们的研究中将MDR1与细胞周期类型联系起来,是对该分型的一项评价,同时又将肿瘤原发耐药的生物学属性和细胞周期联系起来。

至于MDR1(多药耐药基因1)编码的糖蛋白即P-gp的表达与细胞周期运行调控机制的联系的具体分子基础还不明了。但是已有诸多研究发现细胞周期与多药耐药有可能的潜在联系。Wong *et al*^[16]认为在结直肠癌中 β -catenin(作为癌发生的关键)与T细胞因子协同促进几种在肿瘤

进展中具有重要作用的复合物的表达: C-myc, Cyclin D1, Cyclooxygenase (COX)-2, MMP-7, CD44 proteins和P-glycoprotein, 这一观点可以看出Cyclin D1和MDR1的表达有相同的上游驱动. Patel *et al*^[17]研究发现在肿瘤生长转移中起促进作用的COX-2对MDR1的表达有上调的作用. Kornmann *et al*^[18]在胰腺癌细胞系中发现通过稳定转染Cyclin D1反义片段抑制Cyclin D1的表达可以下调MDR1的mRNA水平. 综合这些研究成果来看, 推动细胞周期运行的Cyclin与MDR1及其他肿瘤相关基因组成了一个复杂的网络, 细胞周期和多药耐药必有直接或间接的联系, 未来在彻底研究了两者之间关系的分子基础之后, 通过干预肿瘤的细胞周期是有可能逆转耐药的.

4 参考文献

- 1 Pines J. Cyclins, CDKs and cancer. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 63-72
- 2 Meijer GA, Schroeijs AB, Flens MJ, Meuwissen SG, van der Valk P, Baak JP, Scheper RJ. Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J Clin Pathol* 1999; 52: 450-454
- 3 Wang Q, Beck WT. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res* 1998; 58: 5762-5769
- 4 张威, 邹寿椿, 赵仲生, 徐文娟. P-糖蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义. *中国胃肠外科杂志* 2000; 3: 163-165
- 5 Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. *Cell* 1991; 66: 1071-1074
- 6 Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573-582
- 7 Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689-3695
- 8 Pines J. Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 921-925
- 9 Marx J. How cells cycle toward cancer. *Science* 1994; 263: 319-321
- 10 李伟华, 吴剑宏, 高纯, 钟以胜, 龚建平. 空、结肠黏膜细胞增殖过程中主要细胞周期蛋白表达规律的研究. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 603-605
- 11 Brechot C. Cyclins and carcinogenesis. *Pathol Biol (Paris)* 1993; 41: 17
- 12 Zucca E, Nigg EA. Cell cycle regulation and the function of cancer genes. *Ann Oncol* 1995; 6: 975-978
- 13 刘红, 刘倩, 王文奇. CyclinD1和VEGF在胃癌组织中的表达及其临床意义. *实用癌症杂志* 2004; 19: 27-29
- 14 Schwandner O, Bruch HP, Broll R. p21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 11-19
- 15 Fujii H, Tanigawa N, Muraoka R, Shimomatsuya T, Tanaka T. Clinical significance of multidrug resistance and P-glycoprotein expression in patients with gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 1995; 58: 63-69
- 16 Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin-a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002; 160: 389-401
- 17 Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 38915-38920
- 18 Kornmann M, Danenberg KD, Arber N, Beger HG, Danenberg PV, Korc M. Inhibition of cyclin D1 expression in human pancreatic cancer cells is associated with increased chemosensitivity and decreased expression of multiple chemoresistance genes. *Cancer Res* 1999; 59: 3505-3511

■同行评价

本文研究了胃肠道肿瘤不同细胞周期蛋白表达的分型, 并探讨其与TNM分期的相关性, 以提出“肿瘤分子分期”的可行性, 有一定新意.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第八届中西医结合实验医学研讨会

本刊讯 第八届中西医结合实验医学研讨会将于2006-10在南京举行, 现将征文通知如下:

1 截稿日期

2006-08-31截稿.

2 联系方式

南京中山东路305号南京军区总医院 齐名; 邮编: 210002; 电话: 025-52926620.

www.wjgnet.com