

p21^{WAF1}、cyclinD1 和 pRb 在膀胱移行细胞癌中的表达及其意义

米振国,马志方,王东文,刘红耀,杨晓峰

摘要:目的 探讨 p21^{WAF1}、细胞周期蛋白 D1 (cyclinD1) 和 pRb 在膀胱移行细胞癌 (BTCC) 中的表达及相互关系和其意义。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测 57 例 BTCC 患者癌组织中 p21^{WAF1}、CyclinD1 和 pRb 的蛋白表达。结果 p21^{WAF1}、cyclinD1 和 pRb 的阳性表达率分别为 36.8%、49.1% 和 45.6%, p21^{WAF1} 随病理分级升高阳性率显著下降, cyclinD1 和 pRb 的表达与 BTCC 的病理分级、临床分期和有无转移均相关, p21^{WAF1} 与 pRb 的表达呈负相关, cyclinD1 和 pRb 的表达呈正相关, 而 p21^{WAF1} 与 cyclinD1 的表达无关。结论 p21^{WAF1}/cyclinD1/pRb 通路异常与 BTCC 的发生发展密切相关, p21^{WAF1} 的改变可能为癌变的早期事件, 联合检测 p21^{WAF1}、cyclinD1 和 pRb 可较准确地评价 BTCC 的生物学特性, 估计预后, 指导治疗。

关键词:膀胱肿瘤;细胞周期蛋白;免疫组织化学

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2002) 04-0271-02

Expression of p21^{WAF1}, cyclinD1 and pRb in bladder transitional cell carcinoma

MIZhen-guo, MAZhi-fang, WANGDon-gwen, et al
Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To investigate the expression and their significance of p21^{WAF1}, cyclinD1 and pRb in human bladder transitional cell carcinoma (BTCC), and the relationship among the three proteins. **Methods** Immunohistochemistry was applied to detect the expression of p21^{WAF1}, cyclinD1 and pRb in 57 cases of BTCC. **Results** Positive rates of p21^{WAF1}, cyclinD1 and pRb in 57 cases of BTCC were 36.8%, 49.1%, 45.6%, respectively. p21^{WAF1} gene expression was related to the tumor grade ($P < 0.005$), cyclinD1 and pRb gene expressions were related to the tumor grade, clinic stage and metastasis ($P < 0.05$), p21^{WAF1} gene expression was negatively related to pRb gene expression ($P < 0.005$, $Kappa = -0.401$), and cyclinD1 gene expression was positively related to pRb gene expression ($P < 0.01$, $Kappa = 0.367$), while p21^{WAF1} gene expression was not related to cyclinD1 gene expression ($P > 0.05$). **Conclusion** Alteration in at least one of three genes might be required for most BTCC occurrence and development. Loss of the p21^{WAF1} protein may be an early event in tumorogenesis. The analysis of multiple genes is more valuable in evaluating the biological characteristics of BTCC.

Keywords: Bladder neoplasms; Cell cycle proteins; Immunohistochemistry

细胞的正常生长依赖于细胞周期中各种调节因子的平衡调控,任何一种调控因子的异常改变均可导致细胞异常增殖,诱发肿瘤。p21^{WAF1}/cyclinD1/pRb 通路异常在许多肿瘤癌变中起重要作用,但在 BTCC 中鲜有报道,为检测上述基因在 BTCC 中的表达及相互关系和意义,我们用免疫组织化学 SP 法对 57 例 BTCC 患者进行了研究。

1 材料和方法

本组 57 例 BTCC 取自我院 1998 年至 2000 年住院手术患者手术或活检石蜡包埋组织标本,其中男性 42 例,女性 15 例,年龄 29 ~ 82 岁,平均年龄 60.7 岁,原发 43 例,复发 14 例,病理分级按 WHO 标准, G112 例, G230 例, G315 例;临床分期按 UICC 的 TNM 标准,浅表性肿瘤 Tis ~ T1 期 30 例,浸润性肿瘤 T2 ~ T4 期 27 例;有淋巴结转移及远处转移者 11 例,无转移者 46 例,另取 10 例正常膀胱粘膜标本做对照。

收稿日期:2001-08-15;修回日期:2001-10-31

作者单位:030001 太原,山西医科大学第一医院泌尿外科

鼠抗人 p21^{WAF1} 蛋白单克隆抗体,鼠抗人 cyclinD1 蛋白单克隆抗体和鼠抗人 pRb 单克隆抗体浓

液均购自北京中山生物技术有限公司,工作浓度分别为 1:30、1:50、和 1:50 的 PBS 稀释液,SP-9002 试剂盒也购自北京中山公司。

采用免疫组化 SP 法,4 μ m 厚石蜡切片脱蜡至水,3% 过氧化氢孵育 10min 消除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5min,微波修复抗原,依次滴加羊血清封闭液、一抗、二抗、三抗,每步间 PBS 冲洗 5min \times 3 次,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。阴性对照 PBS 代替一抗,阳性对照北京中山公司提供。

结果判断以细胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性,采用双盲法计数 10 个高倍视野,据阳性细胞所占比例分四个等级:阴性为阳性细胞数 <10%,弱阳

性为阳性细胞数 10% ~ 25%,中等阳性为阳性细胞数 26% ~ 50%,强阳性为阳性细胞数 >50%。

统计方法采用 χ^2 检验(SAS 统计软件)。

2 结果

本组 57 例 BTCC 中,p21^{WAF1}、cyclinD1 和 pRb 表达的总阳性率分别为 36.8%、49.1% 和 45.6%,与正常膀胱粘膜相比均有显著差异($P < 0.05$)。p21^{WAF1}、cyclinD1 和 pRb 的表达与 BTCC 的病理分级、临床分期和有无转移的关系见表 1。由表 2 可见:p21^{WAF1}与 pRb 的表达呈负相关($P < 0.005$,Kappa = -0.401),cyclinD1 与 pRb 的表达呈正相关($P < 0.01$,Kappa = 0.367),而 p21^{WAF1}与 cyclinD1 的表达无关($P > 0.05$)。

表 1 p21^{WAF1}、cyclinD1、pRb 的表达与 BTCC 生物学特性的关系

项目	总例数	p21 ^{WAF1} 阳性		cyclinD1 阳性		pRb 阳性		
		例数	(%)	例数	(%)	例数	(%)	
病理分级								
G1	12	8	(66.7)	2	(16.7)	3	(25.0)	
G2	30	11	(36.7)	17	(56.7)	13	(43.3)	8.09
G3	15	2	(13.3)	9	(60.0)	10	(66.7)	
临床分期								
Tis ~ T1	30	13	(43.3)	11	(36.7)	10	(33.3)	1.15
T2 ~ T4	27	8	(29.9)	17	(63.0)	16	(59.3)	3.93
转移								
有	11	3	(27.3)	9	(81.8)	8	(72.7)	0.54
无	46	18	(39.1)	19	(41.3)	18	(39.1)	5.83

表 2 BTCC 中 p21^{WAF1}、cyclinD1、pRb 表达之间的关系

指标组合	表达相同(例)		表达不同(例)		χ^2	P	Kappa
	+/+	-/-	+/-	-/+			
p21 ^{WAF1} /cyclinD1	12	20	9	16	0.86	>0.05	0.119
cyclinD1/pRb	18	21	10	8	7.73	<0.01	0.367
p21 ^{WAF1} /pRb	4	14	17	22	9.46	<0.005	-0.401

3 讨论

G1 期到 S 期的调控是细胞周期的关键调控点,pRb 是核心。p21^{WAF1} 属细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CKI)家族,能与细胞周期蛋白-细胞周期蛋白依赖性激酶复合物(cyclins-CDKs)结合,抑制其活性,阻止 pRb 磷酸化,使细胞周期停止于 G1 期,利于细胞损伤的修复^[1]。本研究证实 BTCC 中 p21^{WAF1}、cyclinD1 和 pRb 均有表达异常。p21^{WAF1} 表达缺失多见于低分化肿瘤,随着病理分级的升高阳性率明显下降($P < 0.005$),且与临床分期、有无转移无关,提示 p21^{WAF1} 的改变可能为肿瘤发生的早期事件,这与

Korkolopoulou 等的研究结果不完全一致^[2]。

Ioachim 等^[3]发现 pRb 在 BTCC 中的阳性率达 55.2%,与其进展有关。Osman 等^[4]研究发现 cyclinD1 与膀胱癌的分化和浸润密切相关。我们发现 cyclinD1 和 pRb 的表达与 BTCC 的病理分级、临床分期和转移均相关,并且证实 cyclinD1 和 pRb 的表达呈正相关($P < 0.01$),cyclinD1 和 pRb 表达均阳性的患者(18/57)肿瘤分化差,浸润性强,转移的多,预后差。

实验研究表明 Rb 基因转录可导致 p16 表达缺

(下转第 277 页)

表 1 不同条件下 TUNEL 法检测大肠癌细胞凋亡结果

	细胞凋亡阳性率					背景着色				
	++++	+++	++	+	-	(++++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
A 组	8 例	2 例	0	0	0	2 例	7 例	1 例	0	0
B 组	1 例	9 例	0	0	0	0	0	0	1 例	9 例

表 2 不同条件下 TUNEL 法检测鼠脑组织凋亡结果

	细胞凋亡阳性率					背景着色				
	++++	+++	++	+	-	(++++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
A 组	9 例	1 例	0	0	0	1 例	9 例	0	0	0
B 组	2 例	8 例	0	0	0	0	0	0	1 例	9 例

3 讨论

原位凋亡辣根过氧化物酶法(TUNEL)检测细胞凋亡,容易出现假阳性,其原因复杂^[3],可能是标本中有处于分裂期细胞,出现 DNA 自然断裂,也可能是坏死细胞 DNA 断裂,或是 TUNEL 法实验操作过程中试剂浓度选择不当造成。前两者造成的假阳性,显色程度较浅,可与真正细胞凋亡区别,并可通过选择标本而得以排除,后者造成假阳性特别强,且背景深,不易排除,我们采用不同的实验条件,取得满意效果。

我们将实验分成 A 组和 B 组,A 组按照宝灵曼

公司提供的试剂说明书实验操作步骤及试剂浓度操作,B 组按照我们摸索的条件操作。结果表明,A 组假阳性高,且背景着色深,B 组阳性率高,无背景着色。较准确的检测出凋亡细胞,需选择合适的 TdT 及 POD 浓度,不同的组织需要的浓度,一般情况下 TdT 为 1:10 ~ 1:15 稀释,POD 为 1:2 ~ 1:4 稀释。

在鼠脑和大肠癌组织中 TdT 为 1:15 稀释,POD 为 1:4 稀释。宝灵曼公司推荐使用蛋白酶 K 消化,结果则假阳性率高,背景深。我们采用柠檬酸缓冲液 75 微波处理,效果好。在实验操作中必须充分洗涤组织切片,防止非特异性结合,这也是实验成功的重要因素^[4]。

参考文献:

[1] 洪涛,张雷,折小宁,等.培养细胞及石蜡切片中凋亡细胞的检测[J].中华病理学杂志,1997,25(4):124-125.
 [2] Leveland JL, Ihle JN. Contenders in Fas/TNF death signaling[J]. Cell, 1995, 81(4):479-482.
 [3] 彭黎明,江虹.细胞凋亡的检测[A].见:彭黎明,王曾礼主编.细胞凋亡的基础与临床[M].北京:人民卫生出版社,2000.153-218.
 [4] Ummings MC, Winterford CM, Walker N. Apoptosis[J]. Am J Pathol, 1997, 21(1):88-91.

(刘红武校对)

(上接第 272 页)

失^[5],而 p16 的表达能诱导 Rb 基因转录下调^[6],说明 p16 与 Rb 在 G1-S 期构成一个反馈调节环。我们发现 p21^{WAF1}与 pRb 的表达显著相关(P<0.005),而 p21^{WAF1}与 p16 同属 CKI 家族,是否与 pRb 也存在反馈调节机制,尚待进一步证实。

我们的研究显示 p21^{WAF1}与 cyclinD1 无相关性,但 Liukkonen 等^[7]对 207 例浅表性 BTCC 的研究表明两者的表达相关,可能与样本较小有关。

本研究表明,p21^{WAF1}/cyclinD1/pRb 通路异常与 BTCC 的发生、发展密切相关,联合检测它们对于准确评价 BTCC 的生物学特性,估计预后,指导治疗具有重要意义。

参考文献:

[1] Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266:1821-1828.
 [2] Korkolopoulou P, Konstantinidou AE, Thomas - Tsagli E, et al. WAF1/P21 protein expression is an independent prognostic indicator

in superficial and invasive bladder cancer[J]. J. Appl. Immunohistochem Molec Morphol, 2000, 8(4):285-292.
 [3] Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, et al. Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM-2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma[J]. Histol Histopathol, 2000, 15(3):721-727.
 [4] Osman I, Scher H, Zhang ZF, et al. Expression of cyclin D1, but not cyclin E and A, is related to progression in bladder cancer[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3:2247-2253.
 [5] Li Y, Nichols MA, Shady JW, et al. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by retinoblastoma susceptibility gene product pRb[J]. Cancer Res, 1994, 54:6078-6082.
 [6] Fang X, Jin X, Xu HJ, et al. Expression of p16 induces transcriptional downregulation of Rb gene[J]. Oncogene, 1998, 16:1-8.
 [7] Liukkonen T, Liippo P, Raitanen M, et al. Evaluation of p21^{WAF1}/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer[J]. Urol Res, 2000, 28(5):285-292.

(刘红武校对)