

P27kip1 和 cyclinE 在 子宫内膜癌中的表达及其意义

余远萍, 史玉霞, 吕忠士

摘要:目的 探讨 P27kip1、cyclinE 的表达与子宫内膜癌发生发展的关系。方法 用免疫组化方法检测 P27kip1 和 cyclinE 在 40 例子官内膜癌、10 例子官内膜不典型增生、20 例正常子宫内组织中的表达。结果 P27kip1 在正常子宫内、内膜不典型增生、子宫内膜癌中的表达率分别为 90%、70%、62.5%，其中子宫内膜癌与正常子宫内差异有显著性 ($P < 0.05$)。cyclinE 表达阳性率子宫内膜癌组显著高于内膜不典型增生组和正常子宫内组 ($P < 0.05$)。P27kip1 表达与子宫内膜癌的组织学分级、手术分期有关 ($P < 0.05$)。P27kip1 与 cyclinE 表达呈负相关。结论 P27kip1、cyclinE 在子宫内膜癌发生中可能起一定作用，P27kip1 还与子宫内膜癌的进展有关，并可能成为判断预后的有用指标。

关键词: P27kip1; 细胞周期蛋白 E; 子宫内膜肿瘤; 免疫组织化学

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2002) 03-0170-03

Expression of p27kip1 and cyclinE in human endometrial carcinoma and its significance

SHEYuan -ping, SHIYu -xia, LUZhong -shi

Department of Obstetrics and Gynecology,

Renmin hospital, Wuhan university, Wuhan 430060, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the expression of p27kip1 and cyclinE and carcinogenesis and development of endometrial carcinoma. **Methods** The expression of p27kip1 and cyclinE in the specimens of 40 cases with endometrial carcinoma, 10 cases with atypical hyperplasia and 20 cases with normal endometrium were determined by immunohistochemistry. **Results** The positive expression rate of p27kip1 in cases with endometrial carcinoma, atypical hyperplasia and normal endometrium were 90%, 70% and 62.5% respectively. There was a significant difference between carcinoma and normal endometrium ($P < 0.05$). The positive expression rate of cyclinE in endometrial carcinoma was significantly higher than in atypical hyperplasia and normal endometrium ($P < 0.05$). The expression of p27kip1 correlated with histological grade and surgical stage ($P < 0.05$). There was an inverse relationship between p27kip1 and cyclinE expression. **Conclusions** The expression of p27kip1 and cyclinE may play a role in the endometrial carcinoma genesis, p27kip1 expression is associated with progression of endometrial carcinoma and might be a useful prognostic marker in endometrial carcinoma.

Keywords: P27kip1; CyclinE; Endometrial neoplasms; Immunohistochemistry

细胞周期的调控异常导致细胞增殖失控,是肿瘤发生发展的内在原因。G₁期的调控点是细胞周期的关键性调控点。P27kip1、cyclinE 均为细胞周期 G₁期重要调控因子,二者异常在多种肿瘤中存在^[1,2],但有关 P27kip1、cyclinE 在子宫内膜癌中的表达尚

不清楚。我们采用免疫组化方法对子宫内膜癌中 P27kip1、cyclinE 的表达进行研究,探讨二者与子宫内膜癌发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1994 年至 2000 年我院手术存档的病理标本 70 例,分为 3 组:(1)子宫内膜癌 40 例,其中子宫内膜腺癌 33 例,浆液性乳头状腺癌 4 例,透明细胞癌 3 例。年龄 33 ~ 77 岁,平均 57.15 岁。根据 1988 年

收稿日期:2001-07-05; 修回日期:2001-09-18

作者单位:430060 武汉大学人民医院妇产科

FIGO 进行病理分级和手术病理分期:G₁ 14 例,G₂ 18 例,G₃ 8 例; 期 21 例, 期 10 例, 期 6 例, 期 3 例。术前均未接受过放疗或化疗。(2)子宫内膜不典型增生 10 例。(3)正常子宫内膜 20 例。

1.2 免疫组化染色

鼠抗 P27kip1 单克隆抗体、鼠抗 cyclinE 单克隆抗体和 SP 试剂盒购自福州迈新公司。SP 免疫组化染色按试剂盒说明操作。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性片作阳性对照。

1.3 结果判定^[2]

P27kip1 阳性反应定位于细胞核和/或细胞浆,随机选择 10 个高倍视野,计数 1000 个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分率:<10% 为阴性, 10% 为阳性。cyclinE 阳性反应定位于细胞核,<5% 为阴性, 5% 为阳性。

1.4 统计学方法

采用²检验和精确概率法。

2 结果

2.1 正常子宫内膜、内膜不典型增生和子宫内膜癌中 P27kip1 及 cyclinE 蛋白的表达

P27kip1 蛋白在正常子宫内膜中阳性表达 18 例,占 90%, 内膜不典型增生阳性表达 7 例,占 70%, 内膜癌中阳性表达 25 例,占 62.5%, 正常子宫内膜组织与内膜癌相比较,差异有显著性(P<0.05)。cyclinE 蛋白在正常子宫内膜中呈阴性表达,在内膜不典型增生中,cyclinE 阳性表达 2 例,占 20%, 在子宫内膜癌中,cyclinE 阳性表达 28 例,占 70%, 统计学分析显示:正常子宫内膜与子宫内膜癌、内膜不典型增生与子宫内膜癌间相比较,差异均有显著性(P<0.05)。

2.2 P27kip1、cyclinE 蛋白表达与临床病理参数的关系

P27kip1 在子宫内膜癌 G₁~G₂级显著高于 G₃级, ~ 期中的表达显著高于 ~ 期(P<0.05)。cyclinE 在子宫内膜癌 G₁~G₂级低于 G₃级, ~ 期中的表达低于 ~ 期,但无显著性差异。P27kip1 及 cyclinE 表达与子宫内膜癌组织学类型及子宫肌层浸润程度无关,见表 1。

2.3 P27kip1 与 cyclinE 蛋白表达的相关性

40 例子宫内膜癌中,P27kip1 (+)/cyclinE (-) 与 P27kip1 (-)/cyclinE (+) 共 25 例,P27kip1 (+)/cyclinE (+) 与 P27kip1 (-)/cyclinE (-) 共 15 例,前组高于后组,差异有显著性(P<0.05),即 P27kip1 与 cyclinE 呈反向表达。

3 讨论

3.1 P27kip1 表达在子宫内膜癌中的意义

P27kip1 是细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制因子的家族成员之一,在细胞增殖和分化调控中起非常重要作用。P27kip1 参与细胞周期的调节,它能抑制 cyclinE 与 CDK2 结合,从而阻止细胞由 G₁期进入 S 期,抑制细胞增殖^[3]。当 P27kip1 失活时,细胞增殖失控,向癌变发展。本实验结果表明,P27kip1 蛋白阳性率在内膜癌与正常子宫内膜组织之间差异有显著性,与文献报道^[4]一致,内膜不典型增生与正常子宫内膜相比,亦有下降的趋势,说明其对子宫内膜癌发生过程具有一定作用。目前已有研究证明,在乳腺癌^[1]、胃癌^[2]、食管癌^[5]中 P27kip1 蛋白表达不仅与分级分期有关,而且还是一个预后指标。本研究还显示,随着癌细胞肌层浸润深度的增加,P27kip1 蛋白的表达率下降,且与分级分期有显著相关性,提示 P27kip1 蛋白与子宫内膜癌进展有关,估计在预后上可能有重要意义。

表 1 P27kip1、cyclinE 表达与子宫内膜癌临床病理参数的关系

临床病理参数	n	P27kip1		CyclinE	
		-	+	-	+
组织学类型	40				
子宫内膜样腺癌	33	12	21	11	22
其他类型 [#]	7	3	4	1	6
病理分级					
G ₁ 级	14	2	12*	6	8
G ₂ 级	18	6	12	5	13
G ₃ 级	8	7	1	1	7
手术分期					
~ 期	31	7	24*	11	19
~ 期	9	8	1	1	8
肌层浸润					
1/2	24	6	18	9	15
>1/2	16	9	7	3	13

* P<0.05# 包括浆液性乳头状腺癌、透明细胞癌

3.2 cyclinE 表达在子宫内膜癌中的意义

细胞周期分子生物学研究表明,cyclinE 是 G₁期细胞增殖信号的蛋白,其过度表达可导致细胞增殖失控,最终形成癌。大量研究表明,cyclinE 与肿瘤的发生发展关系密切^[6]。本研究结果显示,cyclinE 蛋白在内膜癌中表达率显著高于正常子宫内膜组织和内膜不典型增生组织,从蛋白水平证明 cyclinE 与子宫内膜癌的发生有关。但未发现与分级分期有关,与文献报道^[7]一致。本资料显示在子宫内膜癌 cyclinE 阳性表达率为 70% (28/40),表明 cyclinE 过表达是常见的并且是早期出现的分子异常。

3.3 P27kip1 和 cyclinE 协同异常表达的意义

细胞周期的调控分子机制是靠细胞周期蛋白和抑制因子对细胞周期蛋白依赖性激酶的调节作用来完成的。P27kip1 是负调节因子,cyclinE 是正调节

因子。在正常细胞中, P27kip1 和 cyclinE 处于平衡状态。当 P27kip1 失活、cyclinE 过度表达时, 细胞迅速增殖而恶变。本实验中发现 P27kip1 阳性表达率与 cyclinE 阳性表达率之间存在反向关系, 即 P27kip1 阳性表达率低的子宫内膜癌 cyclinE 细胞阳性率高, 表明处于分裂增殖状态的 P27kip1 表达减少, cyclinE 表达增加, 细胞失去 P27kip1 的反馈性抑制, 获得 cyclinE 的增殖信号, 表现为无限增殖的倾向。说明 P27kip1 的失活与 cyclinE 过度表达通过共同途径参与肿瘤的形成。

综上所述, P27kip1、cyclinE 异常表达与子宫内膜癌发生密切相关, P27kip1 还与子宫内膜癌的进展相关, 有可能是子宫内膜癌一个有意义的预后指标。

参考文献:

[1] Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al. Expression of cell cycle regulators P27kip1 and cyclinE, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients [J]. Nat Med, 1997, 3 (2): 220-225.

[2] Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, et al. The cooperative role of P27 with cyclinE in the prognosis of advanced gastric carcinoma [J]. Cancer, 2000, 89 (6): 1214-1219.

[3] Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bataillon H, et al. Cloning of P27kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential negative regulator of transcription in mammalian cells [J]. Cell, 1994, 78 (1): 59-66.

[4] Bamberger AM, Riethdorf L, Milde-Langosch K, et al. Strongly reduced expression of the cyclin inhibitor P27 in endometrial neoplasia [J]. Virchows Arch, 1999, 434 (5): 423-428.

[5] Singh SP, Lipman J, Goldman J, et al. Loss or altered subcellular localization of P27 in Barrett's associated adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 1998, 58 (8): 1730-1735.

[6] Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin-dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions [J]. Clin Pathol, 2001, 54 (3): 229-235.

[7] Ito K, Sasano H, Yoshida Y, et al. Immunohistochemical study of cyclins D and E and cyclin-dependent kinase (cdk) 2 and 4 in human endometrial carcinoma [J]. Anticancer Research, 1998, 18 (3A): 1661-1664.

(贺文校对)

(上接第 169 页)

受到 RNase 的攻击; 可以重复利用, 一个分子可以破坏多个靶 RNA 分子。核酶的发现为肿瘤的基因治疗提供了更具特异性的新手段。因此, 构建抗 VEGF 核酶基因真核表达载体可更有效地抑制肿瘤细胞的恶性增殖。Ke 等^[3]以神经母细胞瘤为模型, 构建了两种针对 VEGF 共同 5' 端序列的锤头状核酶, 证实它们可定向地切割 VEGF, 其体外切割效率达到 65%~95%。Parry TJ 等^[4]设计了针对 VEGF mRNA 的核酶, 发现无论抗 Flt-1 或 KDR 核酶都显著抑制不同的高转移肺癌中原发性肿瘤的生长。目前, 针对 Flt-1 mRNA 的核酶 ANGIOZYME 以及针对 HCV RNA 基因组 5'-UTR 的核酶 HEPTAZYME 已被用于临床试验^[5]。

发卡状核酶和锤头状核酶是最常用的基因治疗模型。与后者相比, 发卡状核酶介导的切割反应更接近人体的生理环境, 切割效率更高。因此我们将自行设计和构建的抗 VEGF 发卡状核酶基因真核表达载体转染人卵巢癌 SKOV3 细胞, 经 G418 抗性筛选获得阳性克隆, RNA 斑点杂交证实核酶基因已在 SKOV3 细胞中表达。MTT 检测结果, 可见 SKOV3-RZ 组细胞生长速度较另两种细胞减慢, SKOV3-RZ 组细胞生长曲线较平缓。细胞贴壁克隆形成试验及

软琼脂克隆形成试验表明, SKOV3-RZ 组细胞克隆形成率明显下降。细胞周期分析发现, SKOV3-RZ 组细胞 G₁ 期细胞显著增多, S 期细胞显著减少, 说明 DNA 合成受抑制。以上结果表明, 抗 VEGF 发卡状核酶基因可明显抑制卵巢癌细胞的增殖, 本研究为进一步开展卵巢癌的基因治疗奠定了基础。

参考文献:

[1] Yan RL, Jin Ming, Qian XH, et al. Cleavage of hairpin ribozyme target transcribed VEGF RNA in vitro [J]. Journal of Medical College of PLA, 2001, 16 (2): 102-106.

[2] Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M, et al. The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer [J]. Int J Gynecol Pathol, 1997, 16 (3): 256-262.

[3] Ke LD, Fuyou J, Cheu X, et al. A novel approach to glioma gene therapy: down-regulation of the vascular endothelial growth factor in glioma cells using ribozymes [J]. Int J Oncol, 1998, 12 (6): 1391-1396.

[4] Parry TJ, Cushman C, Gallagher AM, et al. Bioactivity of anti-angiogenic ribozymes targeting Flt-1 and KDR mRNA [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27 (13): 2569-2577.

[5] Galderisi U, Cascino A, Giordano A. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents [J]. J Cell Physiol, 1999, 181 (2): 251-257.

(贺文校对)