

p16 和 cyclinD₁ 蛋白在膀胱移行细胞癌中的表达及意义

张孝斌¹, 陈立新², 程帆¹, 张杰¹

摘要:目的 探讨 p16、cyclinD₁ 蛋白表达与膀胱移行细胞癌(TCC)临床分期、病理分级及预后的关系。方法 采用免疫组化 S-P 法检测 59 例膀胱 TCC 中 p16、cyclinD₁ 蛋白的表达。结果 膀胱 TCC 组织中 p16 蛋白阳性表达率为 42.4%, 随临床分期、病理分级增高而下降, cyclinD₁ 蛋白阳性表达率为 61%, 随临床分期增高而上升; p16、cyclinD₁ 蛋白表达间呈负相关; p16 阳性组和 cyclinD₁ 阴性组复发率明显低于 p16 阴性组和 cyclinD₁ 阳性组; p16 阳性组和 cyclinD₁ 阴性组 3 年存活率明显高于 p16 阴性组和 cyclinD₁ 阳性组。结论 p16、cyclinD₁ 蛋白检测可作为膀胱 TCC 辅助诊断及预后判断的参考指标。

关键词:膀胱肿瘤; 基因; 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)01-0032-03

Expression of p16 protein and cyclinD₁ protein in transitional cell carcinoma(TCC) of urinary bladder and their implications

ZHANG Xiao-bin, CHEN Li-xin, CHENG Fan, et al

Department of urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: **Objective** To explore the expression of p16 protein and cyclinD₁ protein in the TCC of urinary bladder and their relations to the clinical stages, pathological grades and prognosis. **Methods** S-P immunohistochemical method was used to detect p16 and cyclinD₁ proteins expression in 59 cases with the TCC of urinary bladder. **Results** Positive rate of p16 was 42.4%, with the progress of the tumor of grade and stage, the positive rate of p16 protein decreased. Positive rate of cyclinD₁ was 61%, with the progress of the tumor stage, the positive rate of cyclinD₁ protein increased; expression of p16 protein was reversely correlated with cyclinD₁ protein; there were significant difference between positive and negative cases of p16 and cyclinD₁ in recurrence and 3-years survival rate. **Conclusion** The detection of p16 and cyclinD₁ protein could be used as the markers of diagnosis and prognosis of the TCC of urinary bladder.

Key words: Bladder neoplasms; Genes; Immunohistochemistry

应用免疫组织化学 S-P 法, 检测 p16、cyclinD₁ 蛋白在膀胱移行细胞癌(TCC)组织中的表达, 结合临床资料, 评价其在膀胱 TCC 中的表达意义。

1 材料和方法

1.1 标本

武汉大学人民医院 1995~1997 年术后膀胱 TCC 石蜡包埋标本 59 例。其中男 41 例, 女 18 例。

年龄 38~82 岁, 平均 59 岁。34 例获得术后随访 3~6 年。WHO 病理分级: I 级 16 例, II 级 24 例, III 级 19 例。UICC 临床分期: T_{is}-T₁ 16 例, T₂ 17 例, T₃ 14 例, T₄ 12 例。每例石蜡标本 4~5μm 连续切片 5 张, 其中一张用以 HE 染色。

1.2 试剂

鼠抗人 p16 单克隆抗体、鼠抗人 cyclinD₁ 单克隆抗体及 S-P 免疫组化试剂盒均由福建迈新生物技术公司提供。

1.3 方法

(1) 免疫组织化学 S-P 染色按试剂盒说明操作。煮沸法抗原修复, 第一抗体工作浓度为 1:

收稿日期: 2001-04-10; 修回日期: 2001-06-18

作者单位: 1. 430060 武汉大学人民医院泌尿外科; 2. 武汉大学人民医院研究生

50,第二、三抗体工作浓度均为 1:100。用乳腺癌组织阳性片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。(2)结果判断:肿瘤细胞核染成棕黄色或棕褐色,胞浆染成浅黄色或棕黄色为阳性反应,阳性细胞为 0 记作(-),占肿瘤细胞 20% 以下为(+),大于 20% 为(++).

1.4 统计方法 χ^2 检验。

2 结果

2.1 p16、cyclinD₁免疫组织化学染色

p16 蛋白在膀胱 TCC 组织中阳性表达率为 42.4%(25/59),主要为细胞核染色 72%(18/25)见图 1,胞浆染色为 28%(7/25)。阳性细胞呈片状分布。cyclinD₁ 蛋白阳性表达率为 61%(36/59),均为细胞核染色,见图 2,阳性细胞呈散状分布。

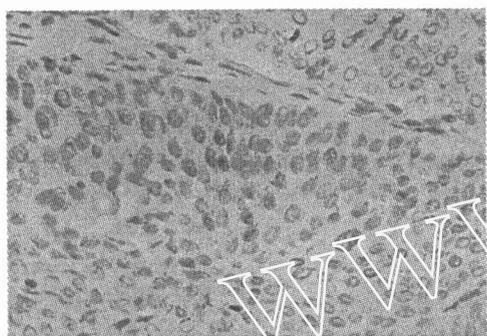


图1 膀胱移行细胞癌 p16 蛋白表达于细胞核,阳性细胞呈片状分布

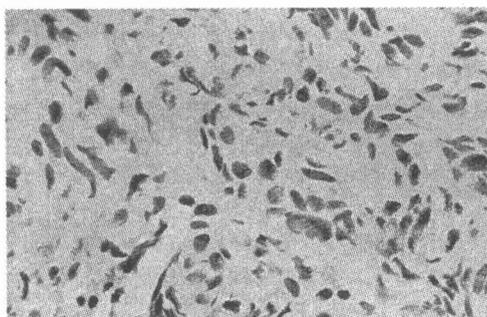


图2 膀胱移行细胞癌 cyclinD₁ 蛋白表达于细胞核,阳性细胞呈散状分布

2.2 p16、cyclinD₁蛋白表达与病理分级关系

p16 蛋白在 I、II、III 级肿瘤中阳性表达率分别为 68.7%、37.5% 和 26.3%,随肿瘤分级升高而下降,I 级与 III 级比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。cyclinD₁ 蛋白在 I、II、III 级中阳性表达率分别为 43.8%、66.7%、69.5%,各级间无差异性,见表 1。

2.3 p16、cyclinD₁蛋白表达与临床分期关系

p16 蛋白在各期肿瘤中阳性表达率分别为 T_{is}-T₁ 81.3%、T₂ 41.2%、T₃ 21.4%、T₄ 16.7%,随临

床分期增高而下降,T_{is}-T₁ 组与 T₂、T₃、T₄ 组比较差异均有显著性意义($P < 0.01$)。cyclinD₁ 蛋白在各期肿瘤中阳性表达率分别为 T_{is}-T₁ 25%、T₂ 64.7%、T₃ 76.6%、T₄ 83.3%,随临床分期增高而上升,T_{is}-T₁ 组与 T₂ 组比较差异有显著性意义($P < 0.05$),T_{is}-T₁ 与 T₂-T₄ 组比较差异均有显著性意义($P < 0.01$),见表 2。

表 1 p16、cyclinD₁ 蛋白表达与膀胱 TCC 病理分级关系

病理分级	例数	p16 蛋白		cyclinD ₁ 蛋白	
		阳性	阴性	阳性	阴性
I	16	11	5	7	9
II	24	9	15	16	8
III	19	5	14	13	6
合计	59	25	34	36	23

$\chi^2 = 6.61 P < 0.05 \quad \chi^2 = 2.71 P > 0.05$

表 2 p16、cyclinD₁ 蛋白表达与膀胱 TCC

临床分期关系

临床分期	例数	p16 蛋白		cyclinD ₁ 蛋白	
		阳性	阴性	阳性	阴性
T _{is} -T ₁	16	13	3	4	12
T ₂	17	7	10	11	6
T ₃	14	3	11	11	3
T ₄	12	2	10	10	2
合计	59	25	34	36	23

$\chi^2 = 15.69 P < 0.01 \quad \chi^2 = 10.56 P > 0.01$

2.4 p16 蛋白表达与 cyclinD₁ 蛋白表达间相互关系 p16 蛋白表达与 cyclinD₁ 蛋白表达呈负相关($P < 0.05$),见表 3。

表 3 膀胱 TCC p16 蛋白表达与 cyclinD₁ 蛋白表达关系

p16	cyclinD ₁ 蛋白		合计
	阳性	阴性	
阳性	11	14	25
阴性	25	9	34
合计	36	23	59

$\chi^2 = 5.28 P < 0.05$

2.5 p16、cyclinD₁蛋白表达与预后的关系

获得随访的 34 例病人中,除 1 例行全膀胱切除外,其余 33 例均为保留膀胱手术,其中有 16 例复发,p16 阳性组复发率为 20%(3/15),明显低于阴性组(72.2%)($P < 0.01$),cyclinD₁ 阳性组复发率为 65%(13/20),明显高于阴性组(23.1%)($P < 0.05$),p16 阳性组 3 年存活率为 86.7%(13/15),阴性组 3 年存活率为 36.8%(7/19),两组间 3 年存活率差异有显著性意义($P < 0.05$)。cyclinD₁ 阳性表达组 3 年存活率为 42.9%(9/21),cyclinD₁ 阴性表达组 3 年存活率为 84.6%(11/13),两组间 3 年存活率比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

细胞周期调控机理研究表明, cyclinD₁ 基因对细胞增殖具有重要意义。cyclinD₁ 蛋白与细胞周期素依赖激酶(CDK₄)结合形成 cyclinD₁/CDK₄ 复合物后, CDK₄ 被激活, 通过调节底物 Rb 蛋白的磷酸化, 释放转录因子 E₂F, 促进细胞 G₁/S 期转换, 从而促进细胞增殖。p16 基因是人类发现第一个最直接抑制肿瘤发生的细胞固有成分。p16 基因的缺失、突变以及甲基化广泛存在于多种肿瘤中, 其在肿瘤发生发展中的重要作用已被许多研究证实^[1-3]。p16 蛋白通过与 cyclinD₁ 竞争性结合 CDK₄, 阻止 G₁/S 期转换, 并与 Rb 蛋白、cyclinD₁ 形成一个反馈调节环, 共同参与细胞周期的调控。因此当 p16 基因缺失、突变或 5' CpG 岛甲基化而失活时, cyclinD₁ 与 CDK₄ 结合占优势, 细胞过度增殖, 导致肿瘤发生^[4]。

本组资料, p16、cyclinD₁ 蛋白阳性表达率分别为 42.4% 和 61%, 表明膀胱肿瘤也是 p16、cyclinD₁ 基因高表达肿瘤类型, 提示 p16 和 cyclinD₁ 在膀胱肿瘤发生发展中有重要作用, 还提示 p16 蛋白阳性表达率随肿瘤病理分级、临床分期增高而下降, 高分化(I 级)、浅表型(T₁-T₂)肿瘤明显高于低分化(III 级)、浸润型(T₂-T₄)肿瘤。有文献报道^[5,6], 在大鼠膀胱癌模型的癌前病变中检测到 cyclinD₁ 蛋白的阳性表达, 并发现, 高分化的膀胱肿瘤(I 级)中 cyclinD₁ 蛋白阳性表达较高, 而在 III 级中未发现 cyclinD₁ 蛋白的阳性表达, 认为 cyclinD₁ 可能在细胞增殖的初始阶段发挥功能, 是肿瘤发生的早期分子事件, 国内也有类似报道^[7], 而本资料显示 cyclinD₁ 蛋白阳性表达率随临床分期增高而上升, 浸润型肿瘤明显高于浅表型肿瘤, 而且随病理分级增高也有上升趋势, 表明 cyclinD₁ 是癌组织由浅表型向浸润型发展的重要原因之一。因此, p16 和 cyclinD₁ 可作为肿瘤细胞恶性增殖的指标。

Okamoto 等^[8]报道, p16 和 cyclinD₁ 在多种肿瘤中出现相反表达, 本组资料显示 p16 和 cyclinD₁ 表达间呈负相关, 与其吻合。表明 p16 基因失活和

cyclinD₁ 基因过表达两者作用相联合, 使肿瘤获得更大的生长趋势, 也提示 p16、cyclinD₁ 蛋白产物的联合检测比单一基因蛋白产物检测更有价值, 能提供更多肿瘤组织生物学信息。

获随访的病例中, p16 阳性表达组复发率明显低于阴性组, cyclinD₁ 阳性组复发率高于阴性组; 而 p16 阳性表达组 3 年存活率高于阴性组, cyclinD₁ 阳性表达组 3 年存活率低于阴性组, 提示 p16 阴性表达、cyclinD₁ 阳性表达者术后复发率高, 3 年存活率低, p16 和 cyclinD₁ 蛋白检测可望作为膀胱 TCC 预后的重要参考指标。

参考文献:

- [1] Kamb A, Cruis NA, Feldhaus TW, et al. A cell cycle regulatory potentially involved in genesis of many tumor type [J]. *Science*, 1994, 264(5157): 426-446.
- [2] Spruck CH, Gonzalez-zulueta M, Shibata A, et al. p16 gene in uncultured tumors [J]. *Nature*, 1994, 370(6486): 183.
- [3] Gonzalez-zulueta M, Bender CM, Yung AS, et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN₂ tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(20): 4531-4535.
- [4] Lukas J, Aagaard L, Strauss M, et al. Oncogenic aberrations of P16INK₄/CDKN₂ and cyclinD₁ cooperate to deregulate G₁ control [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(21): 1355-1357.
- [5] Lee CC, Yamamoto S, Wanibuchi H, et al. CyclinD₁ overexpression in rat two-stage bladder carcinogenesis and its relationship with oncogenes, tumor expressor genes and cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(6): 4765-4776.
- [6] Lee CC, Yamamoto S, Morimura K, et al. Significance of cyclinD₁ overexpression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its correlation with histopathologic features [J]. *Cancer*, 1997, 79(4): 780-789.
- [7] 李涛, 陈承志, 陈明, 等. 细胞周期蛋白 D₁ 在膀胱移行细胞癌中表达的意义 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 1999, 20(11): 658-660.
- [8] Okamoto A, Douglas JD, Elis AS, et al. Mutation and altered expression of p16 INK₄ in human cancer [J]. *Pro Natl Acad USA*, 1994, 91(11): 11045-11053.

(贺文校对)