

大肠腺癌组织中 p57^{kip2} 蛋白和基因的表达及其与临床病理的关系

岳辉¹, 台卫平¹, 杨小乔¹, 张宁², 杨琳², 蒋会勇²

Expression of p57^{kip2} Protein and p57^{kip2} mRNA in Human Colorectal Adenocarcinoma and Their Clinicopathological Correlation

YUE Hui¹, TAI Wei-ping¹, YANG Xiao-qiao¹, ZHANG Ning², YANG Lin², JIANG Hui-yong²

1. Department of Gastroenterology, The Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, China; 2. General Hospital of Shenyang Military Region

Abstract: **Objective** To investigate the effects of inhibiting factor of cell cycle regulation p57^{kip2} protein and gene in the genesis and progression of human colorectal adenocarcinoma. **Methods** The expressions of p57^{kip2} protein in tumor tissues of 37 patients with colorectal adenocarcinoma and in normal colorectal mucosal tissues of 26 subjects were detected by SP immunohistochemical technique. The expressions of p57^{kip2} gene mRNA in tumor tissues and adjacent colorectal tissues of 32 patients were detected by RT-PCR. **Results** p57^{kip2} protein positive-expression rate in tumor tissues of colorectal adenocarcinoma was 40.5%, which was lower than that in normal colorectal mucosal tissues ($\chi^2 = 5.039, P < 0.05$), p57^{kip2} protein positive-expression correlated significantly with tumor cell differentiation and lymph node metastasis ($\chi^2 = 8.914, \chi^2 = 4.416, P < 0.05$); p57^{kip2} gene mRNA positive-expression rate in tumors of colorectal adenocarcinoma was 34.4%, which was lower than that in adjacent colorectal mucosal tissues ($\chi^2 = 4.016, P < 0.05$), and was not correlate remarkably with tumor cell differentiation, lymph node metastasis; the expression level of p57^{kip2} gene mRNA in tumor tissue was lower than in adjacent colorectal mucosal tissues ($P < 0.05$). **Conclusion** The decreased expression of p57^{kip2} protein may play an important role in the genesis and progression of colorectal adenocarcinoma. The decreased expression of p57^{kip2} gene mRNA may contribute to the occurrence of colorectal adenocarcinoma. The decreased expression of p57^{kip2} protein may relate with the decreased expression of the expressions of p57^{kip2} gene mRNA.

Key words: p57^{kip2} protein; p57^{kip2} gene mRNA; Human colorectal adenocarcinoma

摘要: **目的** 探讨细胞周期调控抑制因子 p57^{kip2} 蛋白和基因在大肠腺癌发生发展中的作用。 **方法** 采用免疫组化技术 SP 法, 检测 p57^{kip2} 蛋白在 37 例大肠腺癌和 26 例正常大肠黏膜组织中的表达; 采用 RT-PCR 技术, 检测 p57^{kip2} 基因 mRNA 在 32 例大肠腺癌和癌旁组织中的表达。 **结果** p57^{kip2} 蛋白阳性表达率在大肠腺癌组织中为 40.5%, 显著低于正常大肠黏膜组织 ($\chi^2 = 5.039, P < 0.05$), 并与大肠腺癌组织分化程度和淋巴结转移均有关 ($\chi^2 = 8.914, \chi^2 = 4.416, P < 0.05$); p57^{kip2} 基因 mRNA 阳性表达率在大肠腺癌组织中为 34.4%, 显著低于癌旁大肠黏膜组织 ($\chi^2 = 4.016, P < 0.05$), 并与大肠腺癌组织分化程度、淋巴结转移无关; 大肠腺癌组织 p57^{kip2} 基因 mRNA 表达水平显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$)。 **结论** p57^{kip2} 蛋白的低表达与大肠腺癌的发生发展有关, p57^{kip2} 基因 mRNA 的低表达与大肠腺癌的发生有关, 且 p57^{kip2} 基因 mRNA 的低表达可能是 p57^{kip2} 蛋白低表达的原因之一。

关键词: p57^{kip2} 蛋白; p57^{kip2} 基因 mRNA; 大肠腺癌

中图分类号: R735.3⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)12-0881-04

0 引言

细胞周期调控异常是细胞过度增殖和肿瘤发生

的重要原因^[1]。正常的细胞周期 G₁ 期进程是由一系列的细胞周期蛋白 (cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs) 来调控的, 作为 CDKIs, 负性调控细胞周期蛋白和细胞周期蛋白激酶复合物活性的两个主要家族, INK4 和 CIP/KIP 家族已经被报道。CIP/KIP 家族包括 p21、p27 和 p57 蛋白, 它

收稿日期: 2007-12-13; 修回日期: 2008-02-13
 基金项目: 辽宁省博士科研启动基金资助项目 (20021029)
 作者单位: 1. 510317 广州, 广东省第二人民医院消化内科; 2. 沈阳军区总医院
 作者简介: 岳辉 (1962-), 男, 博士, 教授, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究

们通过与 CD Ks 结合及抑制 CD Ks 的功能使细胞周期俘获在 G₁ 期^[2]。但细胞周期 G₁/S 期调控因子 p57^{kip2} 蛋白及基因表达与大肠腺癌关系的研究在国内少见报道,本研究采用免疫组化 SP 法检测 p57^{kip2} 蛋白在大肠腺癌组织和大肠正常黏膜组织中的表达,采用 RT-PCR 技术,检测 p57^{kip2} 基因 mRNA 在大肠腺癌和癌旁组织中的表达,旨在探讨两者在大肠腺癌的发生发展中的作用及其与临床病理的关系。

1 资料和方法

1.1 病例和大肠腺癌及对照组织标本

收集 1999 年 12 月~2001 年 12 月沈阳军区总医院手术切除标本大肠腺癌 37 例,男 21 例,女 16 例,平均年龄 59.9 岁(26~72 岁),所有病人术前均未经放疗、化疗,其中高分化大肠腺癌 14 例,中低分化大肠腺癌 23 例,15 例有淋巴结转移。收集经大肠镜检查得到的正常大肠黏膜活检标本 26 例,其中男 15 例,女 11 例,平均年龄 59.5 岁(24~80 岁)。以上均经病理学诊断证实。所有标本均经福尔马林固定,石蜡包埋。收集沈阳军区总医院 2000 年 10 月~2002 年 1 月手术切除大肠腺癌标本 32 例,男 19 例,女 13 例,平均年龄 58.75 岁(29~76 岁),所有病人术前均未接受放疗、化疗,其中高分化大肠腺癌 12 例,中低分化大肠腺癌 20 例,16 例有淋巴结转移,Dukes 分期:A+B 期 18 例,C 期 14 例,以上病例均经病理学证实,所有标本术后立即分别在癌灶中央和距癌组织边缘 5.0 cm 以外的癌旁黏膜组织处取材,各取 4 块,进行分类编号后的标本放入 EP 管中,立刻投入液氮中冻存。

1.2 免疫组织化学方法

将福尔马林固定石蜡包埋的组织制备成 4 μm 厚连续切片并用多聚赖氨酸包被切片,用做免疫组织化学研究。p57^{kip2} 蛋白表达检测采用免疫组化技术 SP 法,使用抗 p57^{kip2} 鼠抗人单克隆抗体(57P06)和 SP 试剂盒(UltraSensitive™ kit-9720)。脱蜡的切片在 EDTA 修复液中以高温高压行抗原修复并与相应的抗体 4 ℃ 孵育过夜,对于免疫组化染色按照 UltraSensitive™ SP 试剂盒说明书进行操作,所有的试剂均购自中国福州迈新生物技术公司。p57^{kip2} 蛋白以胞核或胞质染色为棕褐色颗粒者为阳性反应细胞,400 倍显微镜下每张载玻片计数 500 个细胞,依据染色阳性细胞所占细胞总数的百分比,将结果分为阴性(-):标本中无阳性反应细胞或 < 10%;阳性(+):按标本中阳性细胞所占细胞的百分比分为:(+)10%~25%,(++)>25%~50%,(+++

)>50%。

1.3 RT-PCR 方法

液氮冻存标本复融后,分别取大肠癌和相应的癌旁大肠黏膜组织,提取总 RNA(总 RNA 分离试剂盒,Code No. MK0042,华美生物工程公司);配制反转录 cDNA 的合成体系合成 RT-cDNA(反转录试剂盒,Code No. RR023CA,大连宝生物工程公司);分别取 p57^{kip2} RT-cDNA 和其 PCR 引物及 TagDNA 聚合酶(TaKaRa Tag™)配制 PCR 扩增体系扩增 p57^{kip2} 基因 cDNA,以上均按说明书操作。其中反转录 PCR 的温度和时间为:65 1 min 30 5 min 30 ~65 15~30 min 98 5 min 5 5 min 合成 p57^{kip2} 反转录 cDNA;采用 Gene-fisher 软件设计 p57^{kip2} 引物序列(产物长度为 500 bp):5-CGTTCCTTCTCGGGTGA-3 (Forward Primer),5-CTGTACTCACTTGGCTCA-3 (Reverse Primer)(上海生工生物技术公司合成),内参照 -actin 引物序列(产物长度为 690 bp):5-TG-TATGCCTCTGGTCGTACCAC-3 (Forward Primer),5-ACA GA GTACTTGCCTCA GGA G-3 (Reverse Primer)(北京奥科生物技术有限公司合成);p57^{kip2} 基因 cDNA PCR 扩增循环条件:94 4 min 94 40 s 55 1 min 72 1 min 72 27 min,共 32 个循环,参照 Schwaller J 研究工作的循环条件^[3]。PCR 扩增产物与内参标记物 -actin 以及 X174-HincII digest DNA Maker 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,p57^{kip2} 在 500 bp 处有亮带出现者为 p57^{kip2} mRNA 表达阳性,否则 p57^{kip2} mRNA 表达阴性;用电泳凝胶成像自动分析系统检测各扩增产物的含量,被测基因 mRNA 相对含量(或表达水平)为:被测基因 mRNA 的密度/-actin mRNA 的密度 ×100。

1.4 统计学方法

SAS System(Release 6.12)和 Microsoft Excel 统计软件包,χ² 检验、确切概率法和 t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p57^{kip2} 蛋白在大肠腺癌组织中的表达及与临床病理的关系

p57^{kip2} 蛋白定位于正常大肠黏膜细胞和阳性病例的大肠腺癌细胞核或胞质中,呈较细的棕褐色颗粒,但以细胞核染色为主。大肠腺癌组织中 p57^{kip2} 蛋白阳性表达率显著低于正常大肠黏膜组织(χ² = 5.039, P < 0.05),中低分化大肠腺癌组织 p57^{kip2} 蛋白阳性表达率显著低于高分化者(χ² = 8.914, P <

0.05), 淋巴结转移组 p57^{kip2} 蛋白阳性表达率显著低于无淋巴结转移组 ($\chi^2 = 4.416, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 p57^{kip2} 蛋白在大肠腺癌组织中的表达

Tab 1 Expression of p57^{kip2} protein in human colorectal adenocarcinoma

Characteristics	p57 ^{kip2} protein expression				Positive rate (%)
	-	+	++	+++	
Tumor tissues	22	12	3	0	40.5
Well-differentiation	4	7	3	0	71.4
Moderate or poor-differentiation	18	5	0	0	21.7
Lymph node metastasis	12	3	0	0	20.0
Non-lymph node metastasis	10	9	3	0	54.5
Normal colorectal tissues	8	15	1	2	69.2

2.2 p57^{kip2} mRNA 在大肠腺癌和癌旁组织中的表达及与临床病理的关系

p57^{kip2} 基因 mRNA 在大肠腺癌组织中阳性表达率显著低于癌旁大肠黏膜组织 ($\chi^2 = 4.016, P < 0.05$), 即在 p57^{kip2} 基因转录水平上大肠腺癌组织 p57^{kip2} mRNA 与癌旁组织比较已经有降低, 但 p57^{kip2} mRNA 阳性表达与大肠腺癌组织分化程度、淋巴结转移均无相关性 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 p57^{kip2} mRNA 在大肠腺癌组织中的表达

Tab 2 Expression of p57^{kip2} mRNA in the colorectal adenocarcinoma

Characteristics	p57 ^{kip2} mRNA		Positive rate (%)
	-	+	
Tumor tissues	21	11	34.37
Well-differentiation	7	5	41.66
Moderate or poor-differentiation	14	6	30.00
Lymph node metastasis	10	6	37.50
Non-lymph node metastasis	11	5	31.25
Adjacent tissues	13	19	59.38

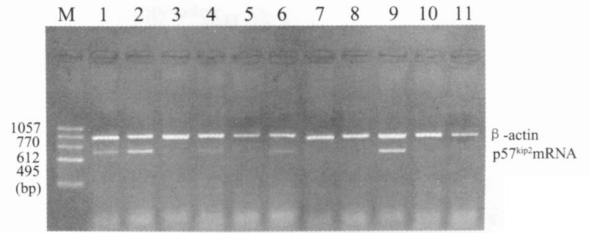
2.3 p57^{kip2} 基因 mRNA 在大肠腺癌和癌旁组织中表达水平的比较

p57^{kip2} 基因 mRNA 在大肠腺癌组织中表达水平显著低于癌旁大肠黏膜组织 ($P < 0.05$), 见表 3; p57^{kip2} 在大肠癌组织和癌旁组织中的 mRNA 表达, 见图 1。

表 3 p57^{kip2} 基因 mRNA 在大肠腺癌和癌旁组织中表达水平的比较

Tab 3 Comparison of p57^{kip2} mRNA expression between colorectal adenocarcinoma and adjacent colorectal tissues

Characteristics	p57 ^{kip2} gene mRNA	
	cases	Level of expression
Tumor tissue	32	54.58 ± 13.58
Adjacent tissue	32	97.49 ± 7.44



M: X174- Hinc digest DNA Marker; 1,3,5,7,9: colorectal tumor tissues; 2,4,6,8,10: adjacent colorectal tissues; 11: blank control; internal control: -actin

图 1 p57^{kip2} 基因在大肠癌组织和癌旁组织中的 mRNA 表达

Fig 1 Expression of p57^{kip2} gene mRNA in colorectal tumor tissues and adjacent tissues

3 讨论

p57^{kip2} 蛋白是细胞周期负性调控因子, 其基因定位于 11p15.5 染色体, 为 p57^{kip2} 基因的表达产物, 属 CIP/ KIP 家族, 与 p21、p27 功能相似。Lee 等^[4] 认为 p57^{kip2} 基因在肿瘤的发生发展中起着重要作用, 而且其抑癌作用可能是其产物 p57^{kip2} 蛋白与 cyclin-CDK 复合物结合, 阻止细胞增殖, 从而使细胞周期停滞在 G₁ 期。Matsumoto 等^[5] 在 2000 年报道采用免疫组化技术研究 92 例食管鳞状细胞癌 p57^{kip2} 蛋白阳性表达率为 (43.3 ± 3.2)%, 并认为该研究是第一次采用免疫组化技术对 p57^{kip2} 蛋白在非肿瘤性食管上皮和食管鳞状细胞癌组织中表达进行了研究, 从那以后, 一些关于 p57^{kip2} 蛋白在肝癌、甲状腺癌组织中表达的研究被报道^[6-7]。而 p57^{kip2} 蛋白与大肠腺癌发生发展的关系很少报道^[8]。本结果显示大肠腺癌组织中 p57^{kip2} 蛋白表达阳性率显著低于正常大肠黏膜组织, 大肠腺癌组织中 p57^{kip2} 蛋白表达强度随着恶性程度的增高和淋巴结转移而降低, 提示 p57^{kip2} 蛋白的表达降低与大肠腺癌的发生、恶性程度和淋巴结转移均有关。Kondo 等^[9] 认为在正常情况下 p57^{kip2} 基因的父亲源基因被印记, 母亲源基因被表达, 在肿瘤中 p57^{kip2} 基因的印记缺失和印记错误导致了 p57^{kip2} 基因表达水平的降低。本研究结果显示大肠腺癌组织中 p57^{kip2} 基因 mRNA 阳性表达率及表达水平均显著低于癌旁大肠黏膜组织, 但 p57^{kip2} 基因 mRNA 在大肠腺癌组织中表达强度与恶性程度的增高及淋巴结转移无相关性, 提示 p57^{kip2} 基因 mRNA 低表达与大肠腺癌的发生有关, 而与大肠腺癌的恶性程度及淋巴结转移无关。Loda 等^[10] 检测了 149 例人原发性结肠癌的 p27^{kip1} 蛋白表达水平, 分析了 p27^{kip1} 蛋白表达和降解, 发现 p27^{kip1} 蛋白表达水平低或无的结肠癌表现出 p27^{kip1} 增强的水解酶活动, 提示 p27^{kip1} 蛋白低表达是由于蛋白水解酶介导的降解活动增加而不是基因表达降

低,即在大肠癌组织中存在着 p27^{kip1} 蛋白低表达的转录后机制。本研究结果显示 p57^{kip2} 基因 mRNA 在大肠腺癌组织与癌旁正常大肠组织中的表达水平有显著差异,即 p57^{kip2} 基因在大肠腺癌组织中的表达水平在转录水平上已有下降,而与 p27^{kip1} 有所不同,且 p57^{kip2} 基因的表达下降可能是该蛋白表达降低的原因之一。

综上所述,研究结果表明,p57^{kip2} 蛋白表达降低可能有助于大肠腺癌发生发展。p57^{kip2} 基因 mRNA 的低表达与大肠腺癌的发生有关,且 p57^{kip2} 基因 mRNA 的低表达可能是 p57^{kip2} 蛋白低表达的原因之一。

参考文献:

[1] Clurman BE, Roberts JM. Cell cycle and cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(20): 1499-1501.
 [2] 岳辉,于皆平,李建英,等. 胰腺癌 p27^{kip1}、cyclinE 和增殖细胞核抗原的表达及与临床病理关系研究[J]. 肿瘤防治研究, 2003, 30(4): 265-267.
 [3] Schwaller J, Pabst T, Bickel M, et al. Comparative detection and quantitation of human CDK inhibitor mRNA expression of p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p16, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}, p21^{WAF}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2} by RT-PCR using a polycompetitive internal

standard[J]. Br J Haematol, 1997, 99(4): 896-900.
 [4] Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57^{kip2}, a cyclin dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution[J]. Genes Dev, 1995, 9(6): 639-649.
 [5] Matsumoto M, Farihata M, Ohsuki Y, et al. Immunohistochemical characterization of p57^{kip2} expression in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2000, 20(38): 1947-1952.
 [6] Nakai S, Masaki T, Shiratori Y, et al. Expression of p57 (KIP2) in hepatocellular carcinoma: relationship between tumor differentiation and patient survival[J]. Int J Oncol, 2002, 20(4): 769-775.
 [7] Ito Y, Yoshida H, Nakano K, et al. Expression of p57/ Kip2 protein in normal and neoplastic thyroid tissues[J]. Int J Mol Med, 2002, 9(4): 373-376.
 [8] Noura S, Yamamoto H, Sekimoto M, et al. Expression of second class of KIP protein p57 KIP2 in human colorectal carcinoma[J]. Int J Oncol, 2001, 19(1): 39-47.
 [9] Kondo M, Matsuka S, Vinchida K, et al. Selective maternal allele loss in human lung cancers of the maternally expressed p57^{kip2} gene at 11p15.5[J]. Oncogene, 1996, 12(6): 1365-1368.
 [10] Loda M, Cukor B, Tam SW, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinoma[J]. Nat Med, 1997, 3(2): 231-234.

[编辑:安 凤;校对:周永红]

· 简讯 ·

欢迎订阅《肿瘤》杂志

《肿瘤》杂志(刊号:CN31-1372/R,ISSN1000-7431)是上海市肿瘤研究所、癌基因及相关基因国家重点实验室和世界卫生组织癌症研究合作中心共同主办的专业学术期刊,于 1981 年 1 月创刊,是国内最早报道肿瘤相关领域成果和进展的专业期刊之一。自创刊以来,该刊一直被北大图书馆出版的《中文核心期刊要目总览》;中国科学院的“中国科学引文数据库”和中国科学技术信息中心的“中国科技论文核心数据库”收录;并被 Cambridge Scientific Abstracts, CSA(美国)、Chemical Abstracts(美国)、EMBASE(Elsevier,荷兰)、VINITI Abstracts Journal(俄罗斯)、Index Copernicus(波兰)、JST-China(日本)、等数据库收录;是经卫生部和国家食品药品监督管理局共同审核认定的可以发布处方药广告的医学、药学专业刊物。

《肿瘤》杂志报道国内外肿瘤基础和临床研究的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法和新动态,设有专家论坛、研究快报、专题报道、基础研究、临床研究、流行病学研究、技术方法、病例报告、临床病理讨论、综述、讲座等栏目。为从事肿瘤防治和研究的医药卫生工作者、医学院校的师生及其他有关学科人员提供了学术交流的平台,旨在推动和促进我国肿瘤事业发展和国内外学术交流。

《肿瘤》期刊为月刊,大 16 开本,每册定价人民币 12.00 元,全年 144 元。每月 25 日出版,国内外公开发行。邮发代号 4-289,国外发行代号 BM4731。全国各地邮局均可订阅,亦可与编辑部直接联系订购(联系人:张老师,可享受 9 折优惠)。联系地址:上海市斜土路 2200 弄 25 号(邮编:200032);联系电话:021-64032388,64436792;传真 021-64032388;E-mail:tumor@cjtsci.com;网址:http://www.cjtsci.com

