文章编号:1000-5404(2006)15-1611-03

论著

E2F-3,pRb蛋白在前列腺癌中的表达及其临床意义

李云祥,苟 欣,何卫阳,张世卿 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨细胞周期调控因子E2F-3和pRb蛋白在前列腺癌发病机制中的作用及其临床意义。**方法** 应用免疫组化EliVision™ plus二步法检测49例前列腺癌(prostate cancer, PCa)标本,20例良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)及10例正常前列腺组织(normal prostate, NP)中E2F-3与pRb蛋白的表达。**结果** E2F-3在PCa、BPH与NP中的阳性表达率为63.27%(31/49),20%(4/20)和10%(1/10),PCa中E2F-3的水平明显高于BPH($P<0.05$)及NP($P<0.05$),且与PCa病理分级临床分期呈正相关(r_s分别为0.487、0.517, $P<0.05$)。pRb中在PCa,BPH与NP中的阳性表达率为44.90%(22/49),80%(16/20),90%(9/10),PCa中pRb的水平明显低于BPH及NP($P<0.05$),且与PCa病理分级、临床分期呈负相关(r_s分别为-0.401、-0.468, $P<0.05$)。E2F-3表达与pRb表达呈负相关($r_s=-0.617$, $P<0.01$)。**结论** E2F-3对PCa的发生发展发挥有重要的作用,且其表达与pRb蛋白的异常表达密切相关。

关键词:前列腺癌;细胞周期调控子;E2F-3蛋白;pRb蛋白
中图法分类号:R341;R730.23;R737.25 **文献标识码**:A

Expression and clinical significance of E2F-3 and pRb in human prostate cancer

LI Yun-xiang, GOU Xin, HE Wei-yang, ZHANG Shi-qing (Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the expression of E2F-3 and pRb in primary prostate cancer (PCa) and its clinical significance. **Methods** The expression of E2F-3 protein and pRb was detected in 49 PCa, 20 benign prostatic hyperplasia (BPH), 10 normal prostate tissues (NP) by EliVision™ plus immunohistochemical staining. **Results** The positive expression rate of E2F-3 in PCa, BPH, NP was 63.27% (31/49), 20% (4/20) and 10% (1/10), respectively. The expression level of E2F-3 in PCa was significantly higher than that in BPH ($P<0.05$) and NP ($P<0.05$), and was positively correlated with pathological grades ($r_s=0.487$, $P<0.05$) and clinical stages ($r_s=0.517$, $P<0.05$) of PCa. The positive expression rate of pRb in PCa, BPH, NP was 44.90% (22/49), 80% (16/20), 90% (9/10), respectively. The expression level of pRb in PCa was significantly lower than that in BPH ($P<0.05$) and NP ($P<0.05$), and was negatively correlated with pathological grades ($r_s=-0.401$, $P<0.05$) and clinical stages ($r_s=-0.468$, $P<0.05$) of PCa. The expression level of E2F-3 in PCa was negatively correlated with pRb expression ($r_s=-0.617$, $P<0.01$). **Conclusion** E2F-3, closely associated with pRb, may play an important role in the genesis and progression of primary prostate cancer.

Key words: prostate carcinoma; cell cycle regulators; E2F-3 protein; pRb

E2F对细胞生长的调控具有特异性,既能促进细胞由G_1期向S期过渡,又能诱导某些细胞发生凋亡,其活性受到pRb及其家族的直接调控。在调节细胞的增殖中,即对转录起激活或抑制作用,这主要是因在不同的环境中,E2F所结合的靶基因不同,能调节多种生长促进基因而表现出不同的作用形式[1]。E2F-3作为E2Fs家族成员之一,对细胞周期和DNA的复制起重要的调节作用。Rb基因在细胞周期的G_1期到S期发挥着中心环节作用。前列腺癌发病率在我国目前呈上升趋势,E2F-3与pRb在其表达的研究尚少。本实验用免疫组织化学EliVision™ plus法观察E2F-3蛋白及pRb在49例前列腺癌中的表达水平,对二者在不同的病理分级及临床分期中的表达进行了初步研究,探讨其在前列腺癌发生发展中的作用和临床意义。

作者简介:李云祥(1975-),男,四川省南充市人,硕士,医师,主要从事泌尿及男性生殖系肿瘤方面的研究,现在四川省南充市中心医院泌尿外科。电话:13164402656

收稿日期:2005-07-26;修回日期:2005-09-15

1 材料与方法

1.1 材料

选取我院1998－2004年手术切除，并经临床和病理确诊的49例前列腺癌(prostate cancer, PCa)标本。患者年龄54～89(74.74±7.57)岁。组织学分级：高、中、低分化分别为14、14、21例。Jewett-Whitmore(J-W)分期：A、B、C、D期分别为7、19、15、8例。另选取20例前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)手术标本及10例尸体肾移植供体的正常前列腺组织(normal prostate, NP)为对照。所有患者术前均未放疗与化疗。标本均经10%甲醛固定，石蜡包埋，5 μm厚连续切片。

1.2 试剂

鼠抗人E2F-3单克隆抗体(浓缩型)购自Neo Markers公司，即用型鼠抗人Rb单克隆抗体及EliVision™ plus免疫组化检测试剂盒购自福建迈新生物试剂公司。

1.3 方法

石蜡块连续切片，并用1张作HE染色，E2F-3稀释比例为1∶100，Rb为即用型，免疫组化操作步骤按试剂盒说明书进行，其中抗原修复均采用高压加热法。用PBS代替一抗作阴性对照，用乳腺癌标本做阳性对照。

1.4 免疫组化结果判断

根据各免疫组化标记物在不同分组前列腺上皮组织中的表达强度与反应特点，在光镜高倍镜下半定量划分反应等级：弱阳性(+)：阳性细胞数<10%，显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色；强阳性(+++)：阳性细胞数>60%，多数细胞呈黄至棕黄色染色；中度阳性(++)：阳性细胞数及显色强度介于弱与强阳性之间；凡显色强度与背景无明显差别者为阴性(－)。

1.5 统计学处理

采用SAS 8.1统计软件行χ^2检验、秩和检验、确切概率法及Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 E2F-3、pRb的表达特征

E2F-3与pRb都主要在细胞核表达，均为黄色或黄棕色颗粒。从表1可知PCa中E2F-3的表达显著高于BPH及NP($P<0.05$)，表达率分别为63.27%(31/49)，20%(4/20)，10%(1/10)；且在PCa中的表达多是中度阳性或强阳性，而在BPH及NP是弱阳性。

表1 E2F-3，pRb在前列腺组织中的表达及与PCa病理分级、临床分期的关系

组织类型	例数	E2F-3(%)				pRb(%)			
		－	+	++	+++	－	+	++	+++
正常前列腺组织NP	10	9(90.00)	1(10.00)[a]	0(0.00)[a]	0(0.00)[a]	1(10.00)	0(0.00)[a]	0(0.00)[a]	9(90.00)[a]
良性前列腺增生组织BPH	20	16(80.00)	4(20.00)[a]	0(0.00)[a]	0(0.00)[a]	4(20.00)	0(0.00)[a]	2(10.00)[a]	14(70.00)[a]
前列腺癌组织PCa	49	18(36.73)	9(18.37)	17(34.69)	5(10.20)	27(55.10)	10(20.41)	8(16.33)	4(8.16)
分化程度									
高	14	9(64.29)	3(21.43)	2(14.29)	0(0.00)	4(28.57)	4(28.57)	3(21.43)	3(21.43)
中	14	6(42.86)	2(14.29)	5(35.71)	1(7.14)	6(42.86)	4(28.57)	3(21.43)	1(7.14)
低	21	3(14.29)	4(19.05)	10(47.62)	4(19.05)	17(80.95)	2(9.52)	2(9.52)	0(0.00)
临床分期									
A	7	6(85.71)	1(14.29)	0(0.00)	0(0.00)	1(14.29)	3(43.86)	2(28.57)	1(14.29)
B	19	9(47.37)	4(21.05)	5(26.32)	1(5.26)	7(36.84)	4(21.05)	5(26.32)	3(15.79)
C	15	2(13.33)	2(13.33)[b]	8(53.33)[b]	3(20.00)[b]	12(80.00)	2(13.33)[bc]	1(6.67)[bc]	0(0.00)[bc]
D	8	1(12.50)	2(25.00)[b]	4(50.00)[b]	1(12.50)[b]	7(87.50)	1(12.50)[bc]	0(0.00)[bc]	0(0.00)[bc]

a：$P<0.05$，与PCa比较；b：$P<0.05$，与A期比较；c：$P<0.05$，与B期比较

pRb在PCa中表达显著低于BPH及NP($P<0.05$)，表达率分别为44.90%(22/49)，80%(16/20)，90%(9/10)；且在PCa中的表达多是弱阳性或中度阳性，而在BPH及NP是强阳性。

2.2 E2F-3，pRb在前列腺组织中的表达与PCa主要临床病理参数间的关系

从表1可见随着病理分化降低与临床分期进展，E2F-3表达率升高且以强阳性表达为主；E2F-3与病理分级间呈正相关性($r_s=0.487$，$P<0.05$)；E2F-3高低分化间差异有统计学意义($P<0.05$)；E2F-3与临床分期间呈正相关性($r_s=0.517$，$P<0.05$)。A期表达率分别与C期、D期两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

随着病理分化降低与临床分期进展，pRb表达率降低以弱阳性为主；pRb与病理分级间呈负相关性($r_s=-0.401$，$P<0.05$)；pRb高低及中低分化间差异有统计学意义($P<0.05$)；pRb与临床分期间呈负相关性($r_s=-0.468$，$P<0.05$)；除A期与B期表达率差异不显著外，其余组间两两比较均差异显著($P<0.05$)。

2.3 E2F-3，pRb在PCa中的相互关系

经Spearman等级相关分析证明E2F-3，pRb表达呈显著负相关($r_s=-0.617$，$P<0.01$)。随着病理分级的增高，pRb表达率降低而E2F-3增加，且二者的强阳性表达率呈负相关。

3 讨论

E2F转录因子家族包括E2F-1到E2F-6 6个成员，其在结构上具有高度的同源性，包括DNA结合区、

DP 二聚体形成区和转录活化区。据其结构和功能分为 3 个亚群：E2F-1、E2F-2、E2F-3 为 1 群，只能与 pRb 结合受其调控；E2F-4、E2F-5 为一群却与 p107 或 p130 结合受其调控；E2F-6 不受 pRb、p107 或 p130 调控，不与任何口袋蛋白结合[2]。E2F-3 定位于 6p22，与其类似物 E2F-1、E2F-2 一样，具有促进 G_0/G_1 与 S 期转换作用。但 E2F-1 主要在静止期细胞重新进入细胞周期（$G_0 \rightarrow G_1$ 期）中起作用；而在循环细胞的 G_1/S 期转换中起主要作用的是 E2F-3，它可特异性地与 pRb 结合，在细胞周期的进展中起促进作用[3]。E2F-1 活性完全抑制的细胞或缺失 E2F-1 功能的小鼠，它们的生长发育很正常，DNA 的合成速度及细胞周期进程也不受影响，这说明 E2F-1 不为细胞增殖所需要，不是细胞进入 S 期所必需的[4]。Humbert 等[5]通过对 E2F-3 突变型小鼠胚胎成纤维细胞的研究发现，E2F-3 的突变或功能不足损害了 E2F 敏感性基因的转录活性和有丝分裂及激活转录的活性，如 B-myb、cyclin A、cdc2、cdc6 和 DHFR 基因，而它们的表达是依赖 E2F-3 而非 E2F-1，E2F-3 调节一个或多个基因的表达水平决定了 G_1/S 期的过渡时间与 DNA 的合成速度而控制细胞的增殖，故 E2F-3 对基因的转录活性起决定作用。

Rb 基因是人类最早发现的抑癌基因，位于染色体 13q14，基因产物是分子量为 $(110 \sim 115) \times 10^3$ 的具有 DNA 结合能力的核磷酸化蛋白，主要参与细胞周期的调节，对细胞生长起负调控作用，它是调节细胞增殖信号通路的中心成分。Rb 基因的直接上游调解者是周期蛋白和 CDKs，其活性增加可引起 pRb 的磷酸化，不能与 E2F 转录因子结合，致使 E2F 聚集，激活了 DNA 复制和细胞周期进展所需的许多基因的转录。但在 E2F 的靶点中，还有 cyclin E 和其相关激酶 cdk2，E2F-3 的释放能激活 cyclin E/cdk2 复合物，使 Rb 发生磷酸化而失活，而这又进一步增强了 E2F-3 的活性和 cyclin E/cdk2 的聚集，这一反馈环独立于 cyclin D1/cdk 4 的作用使 Rb 持续失活[6]。

本研究结果表明，Rb 与 E2F-3 蛋白主要在腺上皮的细胞核中表达。49 例前列腺癌中 Rb 阳性率为 44.90%，显著低于正常组织及增生组织；且在肿瘤的不同病理分级中其阳性表达率不同，肿瘤的分化程度越低，阳性表达也越低，且渐以弱阳性为主；随着分化的降低其抑癌功能渐性失活和缺失。E2F-3 在前列腺癌中的阳性率为 63.27%，其阳性表达率随肿瘤分化降低而升高且渐以强阳性为主，这与国外报道基本接近且认为 E2F-3 是独立的预后指标[7]。Rb 与 E2F-3 和前列腺癌的病理特征均有明显的统计学意义。本实验通过 Spearman 相关分析表明两者有显著地负相关，说明 Rb 在 PCa 发生发展中的作用与 E2F-3 的作用是相互制约与紧密联系的。我们在实验中还发现 pRb 功能失活和 E2F-3 功能增强与肿瘤的临床进程有关，细胞周期的 G_1 期中可能发生了磷酸化，pRb 结合的 E2F-3 释放，促使 E2F-3 过表达而加快了细胞由 G_1 期进入 S 期，最终导致细胞增殖增加，甚至与肿瘤的侵袭和瘤细胞的快速增殖密切相关，这在膀胱肿瘤中得以证实[8]。E2F-3 的作用特性表现出细胞组织的特异性。在前列腺癌中存在 Rb 等位基因的缺失或失活，它是前列腺癌进展的早期分子事件，导致其所结合的 E2F-3 释放或不能被结合而呈异常高表达能够促使细胞过度增殖和向恶性转化[9]。

综上所述，pRb、E2F-3 与前列腺癌的临床病理有紧密的联系，其通路有助于前列腺癌的发病机制的研究；检测其表达有助于前列腺癌的早期诊断与治疗，恶性程度与预后的判断。

参考文献：

[1] BLACK A R, AZIZKHAN-CLIFFORD J. Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control[J]. Gene, 1999, 237(2): 281 - 302.

[2] TRIMARCHI J M, FAIRCHILD B, WEN J, *et al*. The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(4): 1519 - 1524.

[3] LEONE G, DEGREGORI J, YAN Z, *et al*. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase[J]. Genes Dev, 1998, 12(14): 2120 - 2130.

[4] FIELD S J, TSAI F Y, KUO F, *et al*. E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation[J]. Cell, 1996, 85(4): 549 - 561.

[5] HUMBERT P O, VERONA R, TRIMARCHI J M, *et al*. E2F3 is critical for normal cellular proliferation[J]. Genes Dev, 2000, 14(6): 690 - 703.

[6] SEARS R C, NEVINS J R. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate[J]. J Biol Chem, 2002, 277(14): 11617 - 11620.

[7] FOSTER C S, FALCONER A, DODSON A R, *et al*. Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome[J]. Oncogene, 2004, 23(35): 5871 - 5879.

[8] OEGGERLI M, TOMOVSKA S, SCHRAML P, *et al*. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(33): 5616 - 5623.

[9] MADDISON L A, SUTHERLAND B W, BARRIOS R J, *et al*. Conditional deletion of Rb causes early stage prostate cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64(17): 6018 - 6025.

（编辑　栾　嘉）