基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1309-04

细胞周期蛋白 D1、P16 与 PCNA 在子宫内膜异位症在位和异位内膜组织中的表达研究

龙行涛,唐良茜,周 敏,张 婧
(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、P16 与增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)在子宫内膜异位症发生发展中作用。方法:应用 SABC 免疫组化技术检测子宫内膜异位症患者(观察组)在位内膜(25 例)及异位子宫内膜(28 例)和其它良性病变妇女子宫内膜组织(对照组,35 例)中 cyclinD1、P16 及 PCNA 蛋白表达水平。结果:PCNA 蛋白在异位内膜阳性表达均明显高于在位内膜及对照组($P<0.05$);CyclinD1 蛋白在异位内膜中阳性表达明显高于在位内膜和对照组($P<0.05$);P16 蛋白在对照组中阳性表达均明显高于在位内膜及异位内膜($P<0.05$)。CyclinD1 和 P21 蛋白在异位内膜中表达呈显著负相关性(kappa 系数为 -0.521,$P<0.01$)。三者在异位内膜增生期与分泌期表达无显著差异性($P>0.05$)。结论:cyclinD1、P21 及 PCNA 蛋白异常表达在子宫内膜异位症异位内膜增殖中起重要作用。

【关键词】细胞周期蛋白 D1;子宫内膜异位症;子宫内膜
【中国图书分类法分类号】R711.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-23

Expression of cyclinD1, P16 and PCNA in ectopic and eutopic endometrium tissues of patients with endometrtosis and their clinical significance

LONG Xing-tao, et al
(*Department of Gynecology and Obestetrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the possible roles of CyclinD1, P16 and PCNA play in the pathogenesis and development of endometriosis. *Methods*: Twenty-five specimens of eutopic endometrium and Twenty-eight specimens of ectopic endometrium tissues were obtained from 28 patients with endometriosis(observation group). Thirty-five specimens of endometrium were also obtained from women with other benign diseases(control group). CyclinD1, P16 and PCNA was detected by immunohistochemistry. *Results*: The positive expression of PCNA protein in ectopic endometrium was significantly higher than that in the eutopic endometrium and control group($P<0.05$). The positive expression of CyclinD1 protein in ectopic endometrium was significantly higher than that in the eutopic endometrium and control group ($P<0.05$). The positive expression of P16 in control group was significantly higher than that in the eutopic endometrium and ectopic endometrium ($P<0.05$). It showed that in the ectopic endometrium the positive expression of CyclinD1 and P16 were negatively spearman correlation(kappa coefficient =-0.521, $P<0.01$). The positive expression of CyclinD1, P16 and PCNA protein in proliferative phase compared with the secretory phase of the eutopic endometrium, there was no significant difference ($P>0.05$). *Conclusion*: The abnormality expression of CyclinD1、P16 and PCNA in the ectopic endometrium may be involved in the proliferation of endometrium in endometriosis.

【Key words】Cyclin D1; P16; PCNA; Endometriosis; Endometrium

子宫内膜异位症(内异症)(Endometriosis,Ems)主要发生于生育期年龄妇女。发病率近来逐渐升高,其发病率约为 10%~15%[1]。目前确切病因尚不清楚,内异症虽是一种良性疾病,但却表现出与恶性肿瘤相似的一些生物学特征,病理表现为细胞增生、浸润、转移及复发。目前已从分子水平揭示了癌症和子宫内膜异位症之间的相似性[2]。细胞周期调节蛋白在肿瘤的增生和恶性转化行为中起了重要作用[3]。细胞周期蛋白 D1 是细胞周期 G_1/M 期限制点重要的正性调节因子,P16 是 CDK 抑制蛋白,它与 CyclinD1 竞争性结合 CDK4,对细胞周期起负调控作用[4]。PCNA 是反映细胞增殖的最好指标。本实验通过测定三者在异位内膜、在位内膜及正常内膜组织中表达水平,探讨三者在内异症发生发展中的作用。

作者介绍:龙行涛(1983-),男,硕士,研究方向:妇科肿瘤。
通讯作者:唐良茜,女,教授,E-mail:ldtang2002@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30772034);重庆市科委计划项目(编号:2007BB5316)。

1　资料与方法

1.1　研究对象

随机选择重庆医科大学附属第一医院妇产科 2008 年 5 月至 2009 年 1 月住院行开腹或者腹腔镜手术治疗的内异症患者 28 例（观察组）。征得重庆医科大学伦理委员会通过并与患者达成协议。于手术时取其异位子宫内膜组织及同时刮取子宫在位内膜组织。获得异位内膜组织 28 例（卵巢子宫内膜异位囊肿 23 例，腹壁子宫内膜异位囊肿 5 例，其中增生期 17 例，分泌期 11 例）。在位内膜组织 25 例（增生期 15 例，分泌期 10 例）。患者年龄（38.2 ± 6.5）岁。临床分期依据 1985 年美国生育协会修订的子宫内膜异位症分期法（r-AFS）全部为Ⅱ、Ⅲ期病例。另取同期因其它良性疾病行手术治疗的 35 例子宫内膜组织作为对照（对照组）（增生期 19 例，分泌期 16 例）。患者年龄（41.4 ± 7.6）岁。两组年龄无统计学意义（P>0.05）。全部病例均经组织病理学检查证实，排除了内膜合并其它病变的病例。所有病人均有规则月经周期，术前 3 月均未接受激素治疗，均未妊娠及哺乳。排除了合并子宫腺肌病、功血、多囊卵巢综合症等其它激素依赖性疾病病例。

1.2　实验方法及主要试剂

4%甲醛固定组织标本，常规石蜡包埋，组织切片厚 4 μm，HE 染色后镜下观察到典型子宫内膜组织者为入选标本。免疫组化步骤按 SABC 试剂盒（武汉博士德）说明书操作。兔抗人 *cyclinA*、*P16* 多克隆抗体（*Bioword Technology Inc*）。用二氨基联苯胺（DAB）显色。阳性结果判定标准：光镜下每张切片选取 5 个有代表性高倍镜视野，计数 1 000 个细胞，计算阳性细胞百分率。阴性，无阳性染色细胞或者阳性染色细胞数 <5%；阳性，阳性染色细胞数 >5%；弱阳性，阳性染色细胞 ≤ 25 %，强阳性，阳性染色细胞 > 50 %[5]。

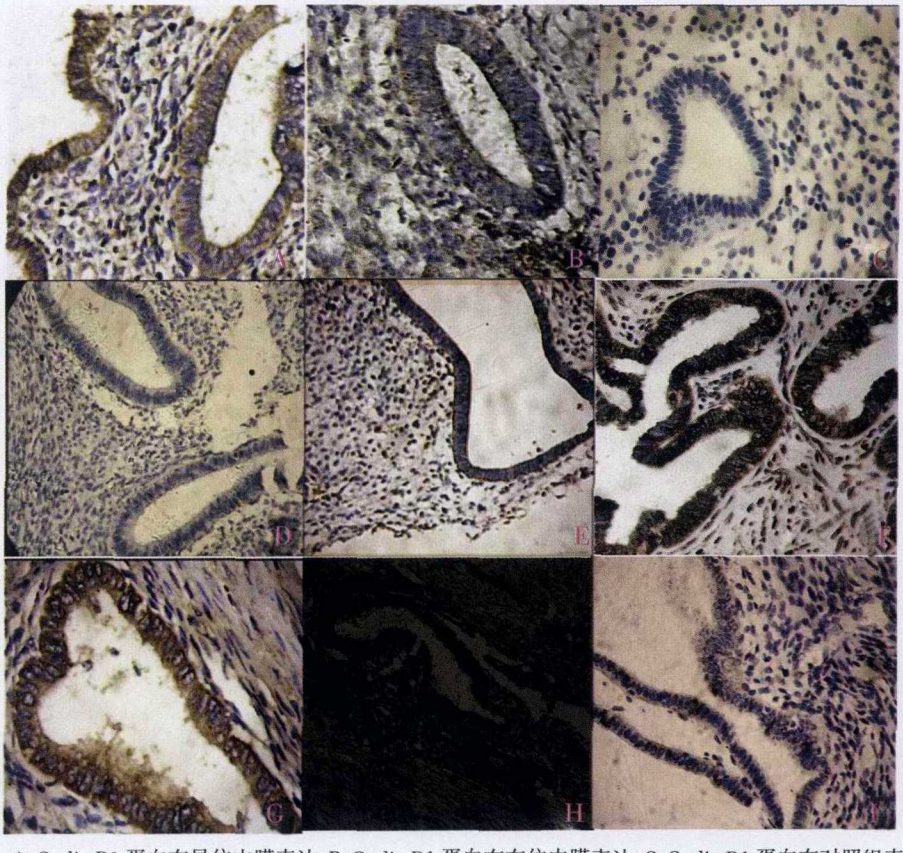
1.3　统计学方法

采用成组设计多样本比较的 Kruskal-Wallis 秩和检验，应用 SAS 软件先进性总体比较，若有差异时再进行两两比较；采用 kappa 一致性检验分析 cyclin D1 与 P16 表达相关性。

2　结　果

2.1　Cyclin D1、P16 及 PCNA 蛋白在不同子宫内膜中表达

Cyclin D1、P16 及 PCNA 蛋白阳性表达均主要位于腺细胞的细胞核，见图 1。CyclinD1 蛋白在异位内膜中阳性表达均明显高于在为内膜及对照组内膜（P<0.05）；在位内膜 Cyclin D1 蛋白阳性表达高于对照组内膜，但差异性无显著性（P>0.05）；P16 蛋白在对照组内膜中阳性表达均明显高于在位内



A. Cyclin D1 蛋白在异位内膜表达；B. Cyclin D1 蛋白在在位内膜表达；C. Cyclin D1 蛋白在对照组表达；D. P16 蛋白在异位内膜表达；E. P16 蛋白在在位内膜表达；F. P16 蛋白在对照组表达；G. PCNA 蛋白在异位内膜表达；H. PCNA 蛋白在在位内膜表达；I. PCNA 蛋白在对照组表达

图 1　不同子宫内膜组织中 Cyclin D1、P16 及 PCNA 蛋白免疫组化染色结果（DAB 染色 × 200）

膜及异位内膜（$P<0.05$）。PCNA 蛋白在异位内膜中阳性表达均明显高于在位内膜及对照组（$P<0.05$），见表 1。

2.2 Cyclin D1、P16 及 PCNA 蛋白在不同月经周期中表达

CyclinD1 蛋白在异位内膜和在位内膜增生期阳性表达与分泌期比较均没有差异性（$P>0.05$），而在对照组内膜增生期阳性表达明显高于分泌期，两者比较有显著差异性（$P<0.05$）；P16 蛋白在对照组增生期阳性表达显著低于分泌期，两者比较有显著差异性（$P<0.05$），而在在位内膜及异位内膜增生期与分泌期比较无显著差异性（$P>0.05$）；PCNA 蛋白在不同子宫内膜组织增生期与分泌期比较均无显著差异性（$P>0.05$），见表 1。

2.3 Cyclin D1、P16 蛋白在异位内膜中表达的相关性

kappa 一致性检验表明，异位内膜组中 Cyclin D1 蛋白与 P16 蛋白表达呈显著负相关性（kappa 系数为 -0.521，$P<0.01$），见表 2。

表 1 各组患者不同时期内膜组织中 Cyclin D1、P16 及 PCNA 蛋白表达

组别	例数	CyclinD1 蛋白				p16 蛋白				PCNA 蛋白			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
观察组异位内膜													
增生期	17	2	6	6	3	14	2	1	0	1	8	5	3
分泌期	11	3	4	3	1	8	3	0	0	2	6	2	1
合计	28	5	10	9	4	22	5	1	0	3	14	7	4
观察组在位内膜													
增生期	15	9	5	1	0	11	3	1	0	11	1	3	0
分泌期	10	8	2	0	0	4	1	2	3	7	1	1	1
合计	25	17	7	1	0	15	4	3	3	18	2	4	1
对照组													
增生期	19	11	5	3	0	9	4	3	3	15	2	1	1
分泌期	16	15	1	0	0	1	9	5	1	12	2	2	0
合计	35	26	6	3	0	10	13	8	4	27	4	3	1

表 2 Cyclin D1、P16 蛋白在不同组别中表达的相关性

组别	P16 表达		Cyclin D1 表达	
	阳性	阴性	阳性	阴性
异位内膜	6	22	23	5
在位内膜	10	15	8	17
对照组	25	10	9	26

3 讨 论

3.1 PCNA 在异位子宫内膜中变化及意义

PCNA 存在于细胞核中，是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白，为 DNA 复制所必需，主要表达于细胞周期的 S 期，可作为细胞增殖的有效标志[6]。本研究结果显示 PCNA 蛋白在异位症患者异位内膜中呈高表达，明显高于在为内膜及对照组内膜，提示子宫异位内膜处于活跃的增生状态。

3.2 CyclinD1 在异位子宫内膜中变化及意义

在细胞增殖周期中，CyclinD1 是 G_1 期与 S 期时相转变调控点的重要调控因子。许多人类肿瘤组织中均发现染色体 11q13 区域的 CyclinD1 基因的过度表达，并且与肿瘤的浸润、转移、分期及愈后等临床病理参数显著相关[3]。内异症虽是良性疾病，却有恶性肿瘤的一些生物学特征，如细胞不正常生长，增殖活性改变，新生血管，凋亡细胞数量减少，并具有转移和浸润的特点。本研究结果显示，Cyclin D1 蛋白在异位内膜中表达明显高于在位内膜及对照组。Cyclin D1 蛋白在对照组增生期表达明显高于分泌期，提示了生理情况下增生期内膜活跃的增生状态，利于内膜的再生和修复，而在异位内膜中表达失去周期性，分泌期仍有较高的表达，说明异位病灶增生能力的持续活跃可能是其异位生长的原因之一。我们推测 Cyclin D1 在子宫内膜异位症发病中起着重要作用，持续性地表达使整个月经周期中凋亡作用减弱和细胞增殖活跃，使异位内膜具有较高的活力。其机制可能是内异症患者异位内膜高表达 CyclinD1 与 CDK4 结合，使后者激活，活化的 CDK4 使 Rb 磷酸化，失去抑制 E2F 启动 DNA 合成的作用，使细胞由 G1-S 期过渡，从而使内异症患者异位内膜细胞增殖能力增强[7]。

3.3 P16 蛋白在异位子宫内膜中变化及意义

P16 是 CDK 抑制蛋白，它与 CyclinD1 竞争性结合CDK4，抑制 CyclinD1-CDK4 复合物的催化活性，使 CDK4 不能发挥激酶活性，无法完成对视网膜母细胞瘤蛋白的磷酸化，从而抑制转录因子 E2F 的转录作用，从而阻止细胞从 G_1 期进入 S 期和启动 DNA 合成，抑制细胞无限分裂和增殖，对细胞周期起负调控作用[8]。本研究结果显示 P16 蛋白在异位内膜中表达明显低于对照组。对照组分泌期表达高于增生期，而在异位内膜中表达失去周期性。我们推测持续性低表达的 P16 可能减弱了抑制 DNA 合成和细胞增殖，从而降低对细胞周期负调控的作用。

3.4 CyclinD1 与 P16 蛋白表达的相关性

本研究结果显示在异位症患者异位内膜组织中 CyclinD1 与 P16 蛋白表达呈显著负相关性。目前对多种肿瘤研究结果也显示，蛋白质 P16 表达缺失和 CyclinD1 过度表达常同时存在，提示这两种异常的共同存在可使肿瘤细胞获得更大的生长优势。Rb-P16-CyclinD1-CDK4 途径是 G_1/S 期转移调节的中心[9]。P16 失活或下调时，CDK4 被激活，随之 Rb 蛋白磷酸化，其抑制作用减弱，从而使 P16 代偿性增加，导致 CyclinD1 活性下降，P16 的激活与 CyclinD1 的下调，又反过来使 CDK4 活性抑制，因此 Rb、P16、CyclinD、CDK4 共同组成个反馈调节环，调节细胞的生长周期，CyclinD1 激活 CDK4 的过程可通过 P16 蛋白与 CDK4 竞争性的结合而受到抑制，使 Rb 正常地行使 G_1 期停滞功能，从而启动细胞凋亡，抑制细胞增殖[10]。我们推测 Rb-P16-CyclinD1-CDK4 途径异常在子宫内膜异位症发生、发展起着重要作用。在正常细胞中，CyclinD1 和 P16 处于平衡状态，精确调节 P16 与细胞增殖失控、转移和浸润关系密切。

综上所述：子宫异位内膜细胞增生活跃，CyclinD1 与 P16 在异位内膜细胞增殖中起着重要作用，为我们今后从分子靶向方面来治疗子宫内膜异位提供了新的靶点。但细胞周期 G_1 到 S 的调节是一个及其复杂的过程，其中 Rb-P16-CyclinD1-CDK4 途径是细胞周期调控的一种机制，在这个途径中同时存在着 P16 的失活与 Rb 磷酸化的负调控和 CyclinD1 过表达与 Rb 磷酸化的正调控。作为 Rb 磷酸化的上游激活物，p16 的失活与 cyclinD1 的过表达与内异症发生的相关程度有多大，在内异症发生发展中具体分子机制等尚待进一步研究阐明。

参 考 文 献

[1] Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments[J].Ann N Y Acad Sci ,2008,1127: 92-100.

[2] Varma R, Rollason T, Gupta J K, et al. Endometriosis and the neoplastic process[J]. Reprod, 2004, 127(3): 293-304.

[3] 林 晓，李 昱，张 雄.Beta-Catenin，APC 蛋白，C-myc 及 CyclinD1 在卵巢上皮肿瘤中的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(1)：50-54.

[4] Zhao X, Song T, He Z, et al. A novel role of cyclinD1 and p16 in clinical pathology and prognosis of childhood medulloblastoma[J].Med Oncol, 2009, [Epub ahead of print].

[5] 朱淑玲，杨清绪. 免疫组化染色结果分析[J].临床病理，2007，45(16)：557-559.

[6] 李 蓉，朱晓玲，田桂兰. C-erbB2、p53 基因及 PCNA 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医科大学学报，2007，32(12)：1285-1287.

[7] Koseoglu R D, Sezer E, Eyibilen A, et al. Expressions of p53, cyclinD1 and histopathological features in basal cell carcinomas[J]. J Cutan Pathol, 2009, 36(9): 958-965.

[8] Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(4): 199-221.

[9] Gibson S L, Dai C Y, Lee H W, et al.Inhibition of colon tumor progression and angiogenesis by the ink4a/Arf locus[J].Cancer Res, 2003, 63(4): 742-746.

[10] 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): 4818-4823.

（责任编辑：冉明会）

欢迎投稿，欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132