维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)01-0066-04

Rb和MCM2蛋白在前列腺癌中的表达及临床意义

李云祥，苟　欣，张世卿，何卫阳

（重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆　400016）

【摘　要】目的：探讨视网膜母细胞瘤易感基因（Rb）和微染色体维持蛋白 2（MCM2）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（PCa）组织，20 例良性前列腺增生（BPH）及 10 例正常前列腺组织(NP)中 pRb 蛋白与 MCM2 的表达。结果：pRb 在 PCa，BPH 与 NP 组织中的阳性表达率分别为 44.90%，80%，90%，PCa 中 pRb 的水平明显低于 BPH（$P<0.05$）及 NP（$P<0.05$），且与 PCa 病理分级（$P<0.05$）和临床分期（$P<0.05$）呈负相关。MCM2 在 PCa，BPH 与 NP 组织中的阳性表达率分别为 67.35%，25%和 10%，PCa 中 MCM2 的水平明显高于 BPH（$P<0.05$）及 NP（$P<0.05$），且与 PCa 病理分级（$P<0.05$）和临床分期（$P<0.05$）呈正相关。MCM2 表达与 pRb 表达呈负相关（$r_s=-0.596$，$P<0.01$）。结论：Rb 基因参与了前列腺癌的发生、发展过程，检测 Rb 基因和 MCM2 有助于判定前列腺癌恶性程度及预后。

【关键词】前列腺癌；微染色体维持蛋白 2（MCM2）；视网膜母细胞瘤易感基因(Rb)

【中国图书分类法分类号】R737.25　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-09-09

Expression and clinical significance of Rb gene and MCM2 in prostate cancer

LI Yunxiang, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of retinoblastoma susceptibility gene (Rb) and minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) in primary prostate cancer (PCa) and its clinical significance. *Methods*: The expression of MCM2 protein and pRb were detected in 49 cases of PCa, 20 cases of benign prostate hyperplasia (BPH), 10 cases of normal prostate tissues (NP) by EliVisionTM plus immunohistochemical staining. *Results*: The positive expression rate of pRb in PCa, BPH, NP were 44.90%, 80% and 90% 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 ($P<0.05$) and clinical stages ($P<0.05$) of PCa. The positive expression rate of MCM2 in PCa, BPH, NP were 67.35%, 25% and 10% respectively, however, the expression level of MCM2 in PCa was significantly higher than that in BPH ($P<0.05$) and NP ($P<0.05$), and was positively correlated with pathological grades ($P<0.05$) and clinical stages ($P<0.05$) of PCa. The expression level of MCM2 in PCa was negatively correlated with pRb ($r_s=-0.596$, $P<0.01$). *Conclusion*: Rb might be involved in the occurrence and development of PCa. The determination of Rb and MCM2 can be an index for estimating the level of malignancy and prognosis of PCa.

【Keywords】Prostate cancer; Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2); Retinoblastoma susceptibility gene (Rb)

细胞周期失控与细胞癌变密切相关。视网膜母细胞瘤易感基因（retinoblastoma susceptibility gene，Rb)在细胞周期的 G_1 期到 S 期的过渡中起中心环节作用。当 Rb 抑癌基因失活时表现为肿瘤组织细胞增殖活性增加[1]。通过微染色体维持蛋白（minichromosome maintenance protein，MCM）中的 MCM2 来检测其增殖指数较为可靠，它是进入 S 期所必需的[2]。Rb 基因和 MCM2 在细胞周期及 DNA 复制的过程中起着重要的作用。我们采用免疫组织化学 EliVision™ plus 法检测前列腺癌组织中 Rb 蛋白和 MCM2，对两者在不同病理分级及临床分期中的表达进行了对比及相关分析，以探讨其在前列腺癌发病机制中的作用。

1　材料和方法

1.1　材料

选取重庆医科大学临床学院泌尿外科 1998～2003 年手术切除，并经病理确诊的前列腺癌（prostate cancer，PCa）标本。患者年龄 54～89 岁，平均 74 岁。组织学分级：高、中、低分化各 14、14、21 例。Jewett-Whitmore（J-W）分期：A、B、C、D

作者介绍：李云祥（1975-　），男，住院医师，硕士，主要研究方向：泌尿男生殖系肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

期分别为 7、19、15、8 例。所有患者术前均未接受放射治疗与化学治疗。标本均经 10%福尔马林固定、石蜡包埋。另选取 20 例良性前列腺增生(benign prostate hyperplasia, BPH)摘除术标本及 10 例尸体肾移植供体的正常前列腺组织(normal prostate tissues, NP)标本作对照。

1.2 试剂

鼠抗人 MCM2 单克隆抗体(浓缩型)购自 Lab Vision 公司,鼠抗人 Rb 单克隆抗体及 EliVision™ plus 免疫组化试剂盒购自福建迈新生物试剂公司。

1.3 方法

石蜡块 5 μm 厚连续切片,并用一张作 HE 染色。MCM2 稀释比例为 1:100,Rb 为即用型,免疫组化操作步骤按 EliVision™ plus 法试剂盒说明书进行[5],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,用已知的乳腺癌标本做阳性对照。

1.4 结果判断

Rb 或 MCM2 在腺上皮细胞核染成棕黄色为阳性。在低倍镜下选择组织结构良好、背景清晰的 5 个阳性细胞最密集的区域,每个区域在高倍镜视野下(×400)计算 100 个细胞中的阳性细胞数,取其平均值作为增殖标记指数。按阳性细胞数占视野中总细胞数的百分比进行判断:无阳性着色或与背景色无反差或阳性细胞数 <10% 为阴性(−),阳性细胞数在 10%以上为阳性(+)。

1.5 统计分析

用 SAS8.2 软件包,作 χ^2 检验,Spearman 等级相关分析,显著性检验水准为 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 表达特征

Rb、MCM2 免疫反应产物多定位于胞核,部分可定位于胞浆或核膜,阳性显色为棕黄色(见图 1,2)。从表 1 可知,Rb 在 NP、BPH 与 PCa 中的表达率依次降低,前二者间无统计学意义,而 PCa 与 NP 及 BPH 比较有统计学差异($P<0.05$)。MCM2 在 NP、BPH 与 PCa 中的表达率依次增高,在 NP 及 BPH 组

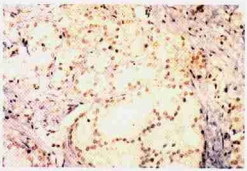


图 1 前列腺癌中 pRb 表达(DAB×200)

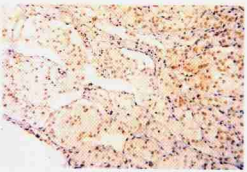


图 2 前列腺癌中 MCM2 表达(DAB×200)

表 1 前列腺组织中 Rb、MCM2 表达强度与病理分级之间的关系

类型	例数	Rb		阳性率(%)	MCM		阳性率(%)
		(−)	(+)		(−)	(+)	
正常组织	10	1	9	90	9	1	10
增生组织	20	4	16	80	15	5	25
前列腺癌	49	27	22	44.90	16	33	67.35
病理分级							
高分化	14	4	10	71.43	8	6	42.86
中分化	14	6	8	57.14	5	9	64.29
低分化	21	17	4	19.05	3	18	85.71
临床分期							
A	7	1	6	85.71	5	2	28.57
B	19	7	12	63.16	8	11	57.89
C	15	12	3	20	2	13	86.67
D	8	7	1	12.5	1	7	87.5

维普资讯 http://www.cqvip.com

织中以基底细胞表达为主，在癌组织中广泛分布于腺上皮，间质中很少表达。PCa 组织中 MCM2 的表达率明显高于 NP 与 BPH，差异性有统计学意义（$P<0.05$），其在 NP 与 BPH 中的表达无统计学意义。

2.2 Rb、MCM2 表达与主要临床病理参数间的关系（见表 1）

随着肿瘤分化的降低与临床分期的进展，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（$r_s=-0.468$，$P<0.05$）；A-C 与 A-D，B-C，B-D 期间差异有统计学意义（$P<0.05$）。

随着肿瘤分化的降低与临床分期的进展，MCM2 表达率升高且以强阳性表达为主；MCM2 与病理分级间呈正相关性（$r_s=0.380$，$P<0.05$）；MCM2 高低分化间差异有统计学意义（$P<0.05$）；MCM2 与临床分期间呈正相关性（$r_s=0.422$，$P<0.05$）；A-C 与 A-D 期间差异有统计学意义（$P<0.05$）。

2.3 Rb 和 MCM2 的相互关系（表 2）

经 Spearman 等级相关分析证明 MCM2，pRb 表达呈显著的负相关（$r_s=-0.596$，$P<0.0001$）。随着病理分级的增高，pRb 表达率降低而 MCM2 增加。

表 2 前列腺癌组织中 Rb 与 MCM2 蛋白间表达的关系

Rb	例数	MCM2	
		(-)	(+)
(-)	27	2	25
(+)	22	14	8

3 讨 论

3.1 Rb 基因在前列腺癌中表达的意义

Rb 基因是最早发现的抑癌基因。定位于染色体 13 q 14，编码 110KD 具有 DNA 结合能力的核磷蛋白，后者在细胞周期的调节中起主导作用，参与细胞周期的调节，抑制细胞生长，同时还可调控与细胞增殖有关的原癌基因的表达[4]。Rb 的去磷酸化（活化形式）通过结合并阻断某些转录因子的作用而抑制细胞从 G_1 期进入 S 期，阻止细胞转录，抑制 DNA 合成。故 Rb 功能的缺失将导致细胞周期的失调，引起细胞的非控制性增殖而导致肿瘤的发生[5]。

本实验用 Rb 单克隆抗体行免疫组化法检测 49 例人前列腺癌组织中 Rb 基因表达产物的分布，结果发现 Rb 失活 22 例，占 44.90%，提示 Rb 蛋白失活与 PCa 的发生密切相关，即 Rb 蛋白失活是 PCa 发生的重要原因之一。且在不同病理分级的前列腺癌组织中 Rb 蛋白的阳性表达率不同，肿瘤分化程度越低，则阳性表达越低。高分化肿瘤阳性表达率明显高于低分化肿瘤，统计学有显著性差异（$P<0.05$）。本结果表明 Rb 基因可能与前列腺癌细胞的分化过程有关，在低分化前列腺癌中 Rb 基因的失活更为常见，由于 Rb 基因不能表达或异常转录无功能的 Rb 蛋白，从而使抑制细胞周期由 G_1 期向 S 期过渡的功能丧失，细胞增殖失控，使肿瘤细胞在人体内形成肿瘤的能力增强。本结果还表明 Rb 基因的表达与前列腺癌的临床分期有显著相关性（$P<0.05$），C、D 期的阳性表达率较 A 期低，提示 Rb 基因异常与前列腺癌的浸润及转移有关。Maddison 研究认为前列腺癌中 Rb 基因存在 60% 左右的失活，其失活加速前列腺癌的进展与转移[6]，这与我们的研究较为一致。

3.2 MCM2 在前列腺癌中表达的意义

MCM 是由 6 个亚基构成的六聚体环状蛋白质即 MCM2-7，由 cdc 基因编码。目前较一致认为，它们是一组在序列上高度同源，功能上密切相关的蛋白。是真核生物 DNA 复制的必需因子，是 DNA 复制许可因子，在 DNA 复制起始与延伸中起关键作用，能确保 DNA 的复制在每个细胞周期中仅发生一次[7]。在 G_1 期，MCM 结合到 DNA 形成复制前复合物。而 MCM2 是其复合物中的一种，在静止期细胞中 MCM2 含量极少，在正常增殖细胞和转化细胞中，MCM2 的含量在 G_1 期开始增加，S 期早期达到高峰，并与染色质结合，在 S 期至有丝分裂期是游离的 MCM2，G_2 期与 M 期时降低。由于这种与细胞增殖过程相一致的周期性变化，目前已将它视为 S 期细胞的标志物，被认为是特异性增殖相关因子，且被认为是癌前标志[8]。通过检测 MCM2 即可直接反应 MCM 蛋白的水平。

恶性肿瘤的特点是分化受阻而增殖无限，故 MCM2 正是研究肿瘤细胞动力学及评估某些肿瘤预后的较好指标。我们应用 MCM2 单克隆抗体检测前列腺癌标本，结果显示阳性颗粒位于细胞核内，阳性细胞着色深浅不一，呈颗粒状或弥漫状，这是因为 DNA 复制的起点多少不一，DNA 复制

维普资讯 http://www.cqvip.com

起点愈多，MCM2 的量亦愈多，细胞着色相对就愈深，所以细胞核阳性表达强度可以反映出细胞 DNA 复制的活跃程度[9]。统计分析显示，低分化的前列腺癌 MCM2 表达增多、增强，明显高于高分化者，有显著性差异（$P<0.01$），这符合肿瘤的分化程度与增殖活性的一般规律。同时，本结果还提示 MCM2 表达强度在前列腺癌各临床分期亦有显著性差异（$P<0.05$），C、D 期的前列腺癌 MCM2 阳性表达增强；A、B 期的前列腺癌 MCM2 阳性表达较弱，可见 MCM2 与前列腺癌的病程密切相关。MCM2 能较好地反映细胞增殖的水平和 PCa 的临床病理特征。该实验结果与 Maxwell 用荧光标记单克隆 MCM2 抗体检测法有所差别，可能是抗体及采用的方法不同有关，但均认为与病理分级分化相关，随临床分期的进展，MCM2 高阳性表达率也呈明显的上升趋势，且与年龄无相关性[10]。

3.3 前列腺癌中 Rb 基因与 MCM2 表达的相互关系及意义

结果表明 Rb 与 MCM2 之间呈负相关性，即 Rb 阳性表达标本的 MCM2 计数明显低于阴性表达标本；而 Rb 阴性表达标本的 MCM2 计数明显高于阳性表达标本，两者比较有显著性差异（$P<0.05$）。有关实验证实 Rb 及相关蛋白可特意地结合 MCM7，从而抑制 DNA 的复制，认为 MCM 是肿瘤抑制基因的靶点，在 G_1 期 Rb 被 cyclin-cdk 激酶磷酸化，与启动 MCM7 的装配与释放有关[11]。而 MCM2 与 MCM7 结构相同，功能类似。MCM2 是细胞 DNA 复制所必需的，Rb 基因不能表达或异常表达，降低了细胞内某些抑制因素的作用，使细胞增殖处于失控状态，继而可产生肿瘤或使原有肿瘤的恶性程度增加而致 MCM2 表达增强。从 Rb 基因与 MCM2 的相互关系可推论，Rb 基因的失活和 MCM2 的高表达将使前列腺细胞趋向于肿瘤，这在恶性程度高和侵袭力强的肿瘤细胞中表现得更加明显。已研究证实 MCM7 可作为前列腺癌的增殖标志物，本试验表明 MCM2 增殖指标与前列腺癌的临床病理是相吻合的[12]。

综上所述，前列腺癌的发病机制涉及 Rb 和 MCM2 调节通路的异常，Rb 抑癌基因失活，细胞增殖失控，而 MCM2 能较好地反映癌细胞的增殖规律。Rb 与 MCM2 和前列腺癌的发生及临床进展密切相关。

参 考 文 献

[1] Zeng L, Lee WH. Retinoblastoma tumor suppressor and genome stability [J]. Adv Cancer Res, 2002;85:13-50.

[2] Borel F, Lacroix FB, Margolis RL. Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis [J]. J Cell Sci, 2002;115(Pt 14):2829-2838.

[3] Shan Rong, James Guo, Richard J.Cote, et al. Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (Power vision) for immunohistochemistry [J]. Applied Immu & Mole Mophy, 1999;7(3):201-208.

[4] Hanahan D, Weinberg RA. The all marks of cancer [J]. Cell, 2000;100 (1): 57-70.

[5] Hernando E, Nahle Z, Juan G, et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control [J]. Nature, 2004; 430 (7001): 797-802.

[6] Maddison LA, Sutherland BW, Barrios RJ, et al. Conditional deletion of Rb causes early stage prostate cancer [J]. Cancer Res. 2004; 64(17):6018-6025.

[7] Takisawa H, Mimura S, Kubota Y. Eukaryotic DNA replication complex to initation complex [J]. Curr Opin Cell Biol, 2000; 12: 690-696.

[8] Alison MR, Hunt T, Forbes SJ. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers [J]. Gut, 2002; 50(3): 290-291.

[9] Bryant JA, Moore K, Aves SJ. Origins and complexes: the initiation of DNA replication [J]. J Exp Bot, 2001; 52 (355): 193-202.

[10] Meng MV, Grossfeld GD, Williams GH, et al. Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer [J]. Clin Cancer Res, 2001; 7(9): 2712-2718.

[11] Gladden AB, Diehl JA. The cyclin D1-dependent kinase associates with the pre-replication complex and modulates rb . MCM7 binding [J]. J of Biol Chem, 2003; 276(11): 9754-9760.

[12] Padmanabhan V, Callas P, Philips G, et al. DNA replication regulation protein MCM7as a marker of proliferation in prostate cancer [J]. J Clin Pathol, 2004; 57(10): 1057-1062.