维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)06－0715－05

PTEN、CDK4 蛋白在子宫内膜癌中的表达及其临床意义

唐良萏[1], 贾　英[1], 李佳平[2], 喻　蓉[3], 卞度宏[1]

(1. 重庆医科大学临床学院妇产科　400016, 2. 成都市第三人民医院妇产科　610031, 3. 荣昌县妇幼保健院　402460)

【摘　要】目的:探讨 PTEN、CDK4 蛋白表达与子宫内膜癌(EC)的发生、发展及复发的关系。方法:采用免疫组织化学 S－P 法,测定 50 例 EC、12 例不典型增生子宫内膜及 10 例正常子宫内膜中 PTEN、CDK4 蛋白的表达情况。结果:1. PTEN 蛋白在 EC 中的表达明显低于正常子宫内膜及不典型增生子宫内膜中的表达($P<0.05$),且与 EC 肌层浸润程度相关。2. CDK4 蛋白在 EC 和不典型增生子宫内膜中的表达明显高于正常内膜组,且与 EC 的临床分期、组织学分级、肌层浸润程度及有无复发显著相关。结论:PTEN 蛋白表达下降或缺失及 CDK4 的过度表达可能在 EC 的发生、发展、浸润及复发中具有重要作用。

【关键词】PTEN 蛋白;CDK4 蛋白;子宫内膜癌;免疫组化

【中国图书分类法分类号】R737.6　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－02－20

Expression of PTEN, CDK4 protein in endometrial carcinoma and its clinical significance

TANG Liangdan, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the relationship between cyclin dependent kinase 4 (CDK4), PTEN protein expression and carcinogenisis, progression and recurrence of endometrial carcinoma. *Methods*: A specific and sensitive immunohistochemical S－P assay was used to detect the expression of PTEN and CDK4 in paraffin－embedded sections of 50 cases of endometrial carcinoma, 12 atypical hyperplasia of endometrium and 10 normal endometrium. *Results*: 1. The positive immunostainning rates of PTEN in endometrial carcinoma, atypical hyperplasia of endometrium and normal endometrium were 56.00%, 91.00%, 100.00%, respectively; and the difference was statistically significant between carcinoma and normal endometrium or atypical hyperplasia of endometrium ($P<0.05$). The expression of PTEN correlated with muscle invasion ($P<0.05$), but not with histological grade or recurrence. 2. The positive rate of CDK4 nuclear expression in carcinoma and in atypical hyperplasia of endometrium was significantly higher than that in normal endometrium ($P<0.05$). The nuclear positive expression and overexpression rates of CDK4 were significantly higher in stage Ⅱ～Ⅲ, moderately poorly differentiated ($G_2－G_3$) carcinoma, >1/2 muscle invasion cancer and in recurrence cases. *Conclusion*: The results suggest that the aberrant expressions of PTEN and CDK4 are closely related to the occurrence, development and recurrence of endometrial carcinoma.

【Key words】 PTEN protein; CDK4 protein; Endometrial carcinoma; Immunohistochemistry

本课题采用 PTEN、CDK4 基因多克隆抗体免疫组织化学方法,检测了 50 例子宫内膜癌(EC)、12 例不典型增生子宫内膜及 10 例正常子宫内膜中的 PTEN、CDK4 基因蛋白产物的表达,并探讨其与 EC 组织的临床分期、组织学分级及复发等的关系,现报道如下。

1　材料与方法

1.1　一般资料

从我校病理教研室 1993～1999 年存档蜡块中,随机抽取 50 例子宫内膜腺癌、12 例不典型增生子宫内膜(轻度 3 例、中度 3 例、重度 6 例)及 10 例正常子宫内膜(子宫肌瘤切除标本)。EC 患者平均年龄 54.5 岁,FIGO 手术病理分期为:Ⅰ期 36 例,Ⅱ期 8 例,Ⅲ期 6 例;病理分级为 G_1 24 例,G_2 21 例,G_3 5 例,术前均未作化疗或放疗。随访所有 EC 患者,时间 3 年,失访 9 例,其余 41 例中 15 例(36.59%)肿瘤复发。

作者介绍:唐良萏(1966－　),女,博士,副教授,
主要研究方向:妇科肿瘤

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 试剂与方法

1.2.1 试剂 PTEN 基因多克隆抗体和 S-P 试剂盒购于福州迈新生物技术公司;CDK4 基因多克隆抗体购于武汉博士德公司。

1.2.2 方法 按 SP 试剂盒要求进行操作,检测 PTEN、CDK4 基因蛋白产物的表达。

1.3 结果判定

1.3.1 PTEN 蛋白定位于细胞浆,呈棕黄色颗粒。高倍镜下计数 1000 个细胞,对阳性细胞所占的百分比(0% 为无,<15% 为 +,15% ~ 50% 为 ++,>50% 为 +++)及染色强度(淡黄色为弱染,棕黄色为中染,棕褐色为强染)进行评分,强染或中染加阳性细胞数>50% 者为阳性。

1.3.2 CDK4 蛋白阳性染色定位于细胞浆和细胞核,呈棕黄色。按细胞浆和细胞核的阳性细胞数的多少分为 4 个等级:阴性(-)为无阳性细胞,弱阳性(+)<5%,中度阳性(++)15% ~ 50%,强阳性(+++)>50%。均采用双盲法阅片。

1.4 统计学处理

所有资料采用 SPSS 10.0 统计软件,计数行 χ^2 检验和 Fisher's 精确检验统计分析($P<0.05$ 有统计学意义)。

2 结 果

2.1 不同性质子宫内膜组织中 PTEN 蛋白的表达

10 例正常子宫内膜 100.00% 呈阳性染色(图 1);12 例不典型增生子宫内膜中 11 例阳性,阳性率为 91.00%(P>0.05);50 例 EC 中 28 例阳性(图 2),阳性表达率为 56.00%,明显低于正常子宫内膜及不典型增生内膜($P<0.05$)。

2.2 PTEN 蛋白表达与 EC 临床病理特征的关系

PTEN 蛋白在 ECIa-Ib 期中的阳性率显著高于 Ic 期($P<0.05$);无肌层浸润或肌层浸润≤1/2 与肌层浸润>1/2 或伴淋巴结转移组相比,差异有显著性($P<0.05$),结果见表 1。

2.3 CDK4 蛋白在不同性质子宫内膜组织中的表达

细胞核内 CDK4 的表达:不典型增生子宫内膜和 EC 中 CDK4 的阳性表达率分别为 66.67%、和 72.00%(图 3),明显高于正常子宫内膜组的 30.00%($P<0.05$);过度表达率(+++)在正常、增生和 EC 组织中分别为 10.00%、33.33% 和 24.00%($P>0.05$)。而 EC 与不典型增生内膜间的阳性表达率和过度表达率,均无统计学差异($P>0.05$)。

细胞浆内 CDK4 的表达:正常子宫内膜、不典型子宫内膜和 EC 中 CDK4 蛋白阳性率分别为 90.00%、100.00% 和 92.00%,过度表达率分别为 90.00%、83.33% 和 88.00%,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 CDK4 核表达与 EC 临床病理特征的关系(见表 2)

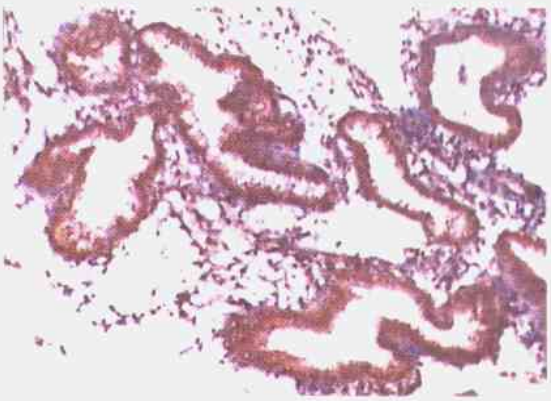


图 1 正常子宫内膜组织 PTEN 免疫组化染色呈阳性。SP×100

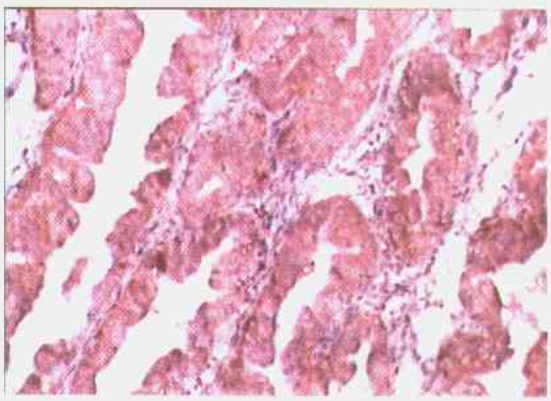


图 2 EC 组织 PTEN 免疫组化染色呈阳性。SP×200

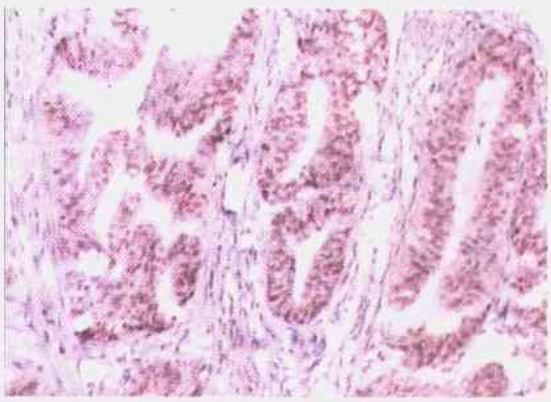


图 3 EC 组织 CDK4 免疫组化染色核呈阳性(+++)。SP×200

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 PTEN 表达与 EC 临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	PTEN 蛋白表达例数		阳性率(%)	P 值
		阳性	阴性		
临床分期					
Ⅰ	36	21	15	58.33	*>0.05
Ia－Ib	25	19	6	76	
Ic	11	2	9	18	**<0.05
Ⅱ～Ⅲ	14	7	7	50.00	
组织学分级					
G_1	24	13	11	54.17	
G_2	21	13	8	61.90	>0.05
G_3	5	2	3	40.00	
肌层浸润					
无肌层浸润或≤肌层浸润 1/2	25	19	6	76.00	<0.05
肌层浸润>1/2 或伴淋巴结转移	25	9	16	36.00	
复发情况					
未复发	26	15	11	57.70	
复发	15	7	8	46.67	>0.05

注：* Ⅰ期与Ⅱ～Ⅲ期比较；** Ia～Ib 与 Ic 比较

表 2 CDK4 核表达与 EC 临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	胞核 CDK4 蛋白核表达			阳性率(%)	过度表达率(%)
		－	+++	+++		(+++)
临床分期						
Ⅰ	36	13	18	5	58.33	13.89
Ⅱ	8	1	2	5	87.50	62.50*
Ⅲ	6	0	3	3	100.00	50.00*
组织学分级						
G_1	24	9	12	3	62.50	12.50
G_2	1	4	10	7	70.83	33.33*
G_3	5	1	1	3	80.00	60.00*
肌层浸润						
无浸润或≤1/2	25	11	11	3	56.00	12.00
浸润>1/2 或淋巴结转移	25	3	12	10	88.00*	40.00*
复发情况						
未复发	26	11	12	3	57.69	11.54
复发	15	1	6	8	93.33*	53.33*

注：* $P<0.05$

表 3 PTEN、CDK4 蛋白核表达与 EC 临床病理特征关系

分类	例数	肌层浸润		P 值	复发		P 值
		浸润>1/2 或淋巴结转移例数	%		复发组例数	%	
协同异常	18	8	44.44		7	38.89	
对照组	32	17	53.125	>0.05	8	25.00	>0.05

表 4 PTEN、CDK4 蛋白核表达与 EC 临床病理特征关系

分类	例数	组织学分级		P 值	临床分期		P 值
		G_2～G_3 例数	%		Ⅱ～Ⅲ例数	%	
协同异常	18	9	50.00		6	33.33	
对照组	32	15	46.88	>0.05	8	25.00	>0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.5 CDK4 蛋白和 PTEN 与 EC 的关系

2.5.1 EC 中 CDK4 核表达与 PTEN 表达之间的相关性分析 50 例 EC 中,PTEN 阳性、CDK4 阴性与 PTEN 阴性、CDK4 阳性组共 28 例(56.00%),与二者同时阳性和二者同时阴性组共 22 例(44.00%)相比较,前者高于后者,但差异无显著性($P>0.05$),即 PTEN 与 CDK4 不呈反向表达。

2.5.2 PTEN、CDK4 蛋白核表达与 EC 临床病理特征关系 50 例 EC 中,PTEN 阴性而 CDK4 阳性核表达者(协同异常表达)18 例;对照组 32 例,包括 PTEN 阳性同时 CDK4 阳性核表达 18 例,PTEN 阳性同时 CDK4 阴性核表达 10 例,PTEN 阴性同时 CDK4 阴性核表达 4 例,两组临床病理特征分析见表 3、4。

3 讨 论

PTEN—第十染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白基因(Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten,PTEN)是新近发现的一种肿瘤抑制基因,定位于 10 号染色体 10q23.3 区,PTEN 的阳性标记位于细胞浆,其作用主要表现在调控细胞周期、诱导细胞凋亡、调节细胞迁移、浸润、整合素介导的细胞铺展及局部粘附的形成等。PTEN 的功能异常主要通过基因突变、基因同源性丢失、启动子甲基化、表达缺失等方式发生。

PTEN 基因在 EC 中的突变率为 30%~50%,是目前发现的 EC 中突变率最高的基因,EC 也是迄今发现的 PTEN 基因突变率最高的肿瘤。PTEN 蛋白表达的丢失,是多种机制引起 PTEN 基因功能丧失的表现,包括 PTEN 基因同源性丢失,无义突变和启动子甲基化等[1]。Kanamori[2] 等对 103 例 EC 进行研究发现,36%PTEN 蛋白表达丢失,15%为 PTEN 蛋白表达下降,且 Western-blotting 显示在 PTEN 蛋白阴性病例的 PTEN 表达明显较阳性病例低,认为 PTEN 蛋白异常参与了 EC 的发生、发展。本研究发现,PTEN 蛋白在正常子宫内膜、不典型增生子宫内膜及 EC 中的阳性表达率呈逐渐下降趋势,推测 PTEN 蛋白表达可能是正常子宫内膜生长的必要因素之一,而 PTEN 蛋白表达下降或缺失可能使子宫内膜生长失控,最终导致 EC 的发生。Depowski[3] 对 151 例原发性乳腺癌研究发现,48%的乳腺癌标本缺乏 PTEN 蛋白表达,且 PTEN 蛋白表达的丢失与雌激素受体的丢失相关。本研究发现 PTEN 蛋白的表达与 EC 的肌层浸润深度、淋巴结转移相关,且 PTEN 基因可能参与了 EC 的发展过程,临床上测定内膜组织、肿瘤组织中的 PTEN 蛋白表达有助于预测 EC 的发生、肌层浸润程度,对 EC 早期诊断及治疗具有参考价值。

CDK4 基因位于 12q13 染色体,作为周期蛋白激酶,其作用机理主要是 CDK4 与 Cyclin D 形成复合物,磷酸化其底物如 Rb 等,释放转录因子 E2F,使 DNA 合成得以进行。目前发现在多种肿瘤如黑色素瘤、神经胶质瘤、大肠癌等中有 CDK4 的基因扩增和蛋白表达失调,有学者认为 CDK4 异常表达可促进肿瘤的发展,具有早期诊断和判断预后的价值[4,5]。

CDK4 的阳性标记位于细胞浆及细胞核,在 EC 中,胞核着色更常见。Mittnachts 等认为作为 CDK4 的下游效应因子 Rb 基因产物位于细胞核,而且与 CDK4 形成复合物的 Cyclin D 也位于细胞核,CDK4 的核表达可能有助于细胞的增殖过程。本研究提示作为细胞周期正向调节因子,CDK4 细胞核表达增加在 EC 的发生中可能有一定的促进作用,且 CDK4 与 EC 的病程进展有关,推测其对肿瘤分化、发展有促进作用,与文献报道一致[6]。另外,CDK4 的阳性表达率及过度表达率与肌层浸润深度、复发明显相关,具有很好的预后价值。

真核生物细胞周期的调控有赖于 CDK4 的活化,Cyclin 是 CDK 的正调节因子,可活化 CDK;CDKI 则是负调节因子,使 CDK 失活。CDK4 与 CyclinD 形成复合物,直接促进 G1/S 转换。P27 为非特异性 CDKI,可抑制 CDK4-Cyclin 复合物结合并抑制其对 Rb 蛋白的磷酸化作用,从而影响细胞周期的进程。PTEN 作为磷酸酶,通过使磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸(PIP3)去磷酸化,抑制依赖 PIP3 激活的丝、苏氨酸激酶 PKB/Akt 活性,影响因子 P27、BAD 等的磷酸化水平,从而介导 G1 期停顿,诱导凋亡,对细胞生长具有负性调节作用,当 PTEN 缺失或表达下降、CDK4 过度表达,可共同促使细胞迅速增殖而加速恶变过程。Zhu 等[7] 研究发现 PTEN 不但直接对 P27 水平有调节作用,且在 EC 细胞株内,PTEN 蛋白表达通过改变 CyclinD3-CDKI 的表达水平而调节 P27 的活动,说明 PTEN 介导细胞周期阻滞的多基因机制。本研究提示 PTEN 表达缺失或下降与 CDK4 过度表达与 EC 的

维普资讯 http://www.cqvip.com

形成、发展和不良预后有关,但无协同作用。

PTEN、CDK4 与肿瘤密切相关,这两种细胞调节因子已受到人们关注。有报道以腺病毒为载体,PTEN 基因转染两种 PTEN 完全失活的 EC 细胞系 Ishikawa 3H12 及 RL95-2 后,诱导细胞凋亡,并抑制 Ishikawa 3H12 在裸鼠体内的成瘤性,提示 PTEN 有可能成为 EC 病人基因治疗的一种选择[8]。此外,CDK4 过度表达的患者,可望通过采用反义核酸技术,在转录和翻译水平上阻断肿瘤细胞中 CDK4 的异常表达,引起细胞的表型逆转或凋亡,因此,PTEN 和 CDK4 的研究有望为肿瘤的治疗开辟新途径。

参 考 文 献

[1] McMenamin ME, Soung P, Perera S, et al. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high gleason score and advanced stage[J]. Cancer Res, 1999, 59: 4291-4296.

[2] Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 892-895.

[3] Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer[J]. Modern Pathology, 2001, 14: 672-676.

[4] Pilotti S, Torre GD, Mezzelani A, et al. The expression of MDM2/CDK4 gene product in the differential diagnosis of well differentiated liposarcoma and large deep-seated lipoma[J]. Br J Cancer, 2000, 82: 1271-1275.

[5] Dong Y, Sui L, Sugimoto K, et al. Cyclin D1-CDK4 complex a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas[J]. Int J Cancer, 2001; 95: 209-215.

[6] Shiozawa T, Nikaido T, Shimizu M, et al. Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and $p16^{INK4}$ in human endometrioid-type endometrial carcinoma[J]. Cancer, 1997, 80: 2250-2256.

[7] Zhu X, Kwon CH, Schlosshauer PW, et al. PTEN induces G_1 cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61: 4569-4575.

[8] Sakurada A, Hamada H, Fukushige S, et al. Adenovirus-mediated delivery of the PTEN gene inibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer[J]. Int J Oncol, 1999; 15: 1069-1074.

(上接第 711 页)不能维持血糖的稳定,致血糖升高,甲亢时高胰岛素血症的出现可能是胰岛素受体减少,β细胞代偿的结果。

总之,对甲亢患儿应密切关注糖代谢状况,了解其血糖升高的可能机制及时控制高血糖,对患儿的全面康复和防止各种并发症具有极其重要的临床意义。

参 考 文 献

[1] 吴瑞萍,胡亚美,江载芳,主编. 实用儿科学[M]. 第 6 版,北京:人民卫生出版社,1996;1952-1954.

[2] 王慕逖,主编. 儿科学[M]. 第 5 版,北京:人民卫生出版社,2001;445.

[3] Pandolfi C, Pellegrini L, Dede A. [Blood glucose and insulin responses to oral glucose in hyperthyroidism][J]. Minerva-Endocrinol, 1996; 21(2): 63-65.

[4] Gasinska T, Nowak S. Impaired carbohydrate tolerance in patients with hyperthyroidism evaluation of some influencing factors[J]. Endokrynol Pol, 1993; 44(1): 37-46.

[5] Casla A, Arrieta F, Grant C, et al. Effect of short and long-term experimental hyperthyoidism on plasma glucose level and insulin secretion during an intravenous glucose load and on insulin binding, insulin receptor kinase activity, and insulin action in adipose tissue[J]. Metabolism, 1993; 42(7): 814-821.

[6] Vardi P, Modan-Mozes D, Ish-Shalom S, et al. Low titer, competitive insulin autoantibodies are spontaneously produced in autoimmune diseases of the thyroid[J]. Diabetes Res Clin Pract, 1993; 21(2): 161-166.

[7] Ng WY, Thai AC, Lui KF, et al. Occurrence of antibodies to insulin in patients with autoimmune thyroid disease[J]. Ann Acad Med Singapore, 1993; 22(4): 544-548.

[8] Bech K, Damsbo P, Eldrup E, et al. Beta-cell function and glucose and lipid oxidation in Graves' disease[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 1996; 44(1): 59-66.