维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253－3626(2003)04－0496－04

# P27kipl 和 cyclin E 在肾细胞癌中表达的研究

沈 俊,唐 伟

(重庆医科大学临床学院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨细胞周期素依赖激酶抑制蛋白 P27kipl(P27)和细胞周期素 E(cyclin E)在肾癌中表达情况,并研究二者与肾癌生物学行为的关系。方法:采用免疫组化 SP 法测定 42 例肾透明细胞癌及 20 例癌旁正常肾组织石蜡切片中 P27 蛋白和 cyclin E 蛋白的表达。结果:P27 在癌旁正常肾组织中的阳性率为 20.0%,在肾细胞癌组织中的阳性率为 52.4%($P<0.01$)。P27 在肾癌组织分级 $G_1$、$G_2$、$G_3$ 的阳性率分别为 83.3%、68.7%、30.0%,P27 表达与肾癌的分级呈负相关($P<0.01$)。Cyclin E 在癌旁正常肾组织中的阳性率为 30.0%,在肾细胞癌组织中的阳性率为 54.8%($P<0.01$)。Cyclin E 在 $G_1$、$G_2$、$G_3$,肾癌组织中的阳性率分别为 83.3%、68.8%、35.0%,cyclin E 蛋白的表达与肾癌的分级亦呈负相关($P<0.05$)。P27 和 cyclin E 在肾癌中的表达呈正相关($P<0.01$),$r=0.54$。结论:P27 和 cyclin E 与肾癌的组织学分级呈负相关,提示:P27 和 cyclin E 有可能作为判别肾癌分化程度的标志物,并可能成为判断肾癌预后的有用指标。

【关键词】肾癌;P27kipl;cyclin E;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R737.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－12－26

# Expression of P27kipl protein and cyclin E protein in renal cell carcinoma

*SHEN Jun, et al*

(*Department of Urology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of P27kipl (P27) protein and cyclin E protein in human renal cell carcinoma and in paracarcinoma kidney cortex tissue, and to explore the correlation of these protein expressions with biological behavior of tumors. *Methods*: P27 and cyclin E expressions were studied in formalin－fixed, paraffin－embedded sections of renal cell carcinoma and in paracarcinoma kidney cortex tissue by means of a specific and sensitive immunohistochemical S－P assay. *Results*: The positive rates of P27 protein and cyclin E protein in renal cell carcinoma were significantly higher than those in paracarcinoma kidney cortex tissues ($P<0.01$), and P27 and cyclin E were concurrently expressed in RCC. There was an inverse relationship between the expression rate of P27 and the histological tumor grades ($P<0.01$), and the same with cyclin E. *Conclusion*: P27 and cyclin E expression rates are negatively correlated with the malignant degree of RCC, indicating that P27 and cyclin E might be a useful prognostic marker for renal cell carcinoma.

【Key words】Renal carcinoma; P27kipl; Cyclin E; Immunohistochemistry

细胞周期的运转主要是受细胞周期素(cyclin),周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)及周期素依赖激酶抑制蛋白(cyclin dependent kinase, inhibitor, CDKI)三者共同调控,其正常与否和细胞的增生、分化、衰老以及癌变密切相关。其中 CDKI 通过与 cyclin、CDK 或 cyclin－CDK 复合物的结合,抑制 CDK 的活性,导致细胞周期停止,阻断细胞的增殖过程。为了进一步研究分析上述因素与肿瘤分级、分期的关系,应用免疫组织化学方法检测细胞周期素依赖激酶抑制蛋白 P27kipl(P27)和细胞周期素 E(cyclinE)在肾透明细胞癌中的表达情况,并且观察两种蛋白在肾癌中表达的相关性,报告如下。

作者介绍:沈 俊(1973－ ),男,住院医师,硕士研究生,主要研究方向:泌尿系统肿瘤诊断与治疗。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 42 例肾癌石蜡标本取自重庆医科大学临床学院泌尿外科 1995～2001 年手术切除病例,并经病理证实为肾透明细胞癌,再从其中选取癌旁正常肾组织 20 例。年龄 33～78 岁,平均 57 岁。男女比例为 2.5:1。Fuhrman 分级:$G_1$ 级 6 例,$G_2$ 级 16 例,$G_3$ 级 20 例。Robson 分期:Ⅰ期 14 例,Ⅱ

维普资讯 http://www.cqvip.com



期 15 例,Ⅲ期 9 例,Ⅳ期 4 例。

1.1.2 一抗 P27kipl 和 cyclinE 鼠抗人单克隆抗体,二抗(抗兔和鼠 IgG)及即用型 S-P 试剂盒均为美国 Maxim 公司产品,购自福建迈新生物技术公司。DAB 酶底物显色试剂盒由校病理教研室提供(购自中国五联化工厂,上海)。

1.2 实验方法

采用免疫组化方法,标本经 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,4μm 厚连续切片。免疫组化方法详见 S-P 试剂盒说明书。已知 P27 和 cyclinE 表达阳性的结肠癌标本作为阳性对照,用 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断

主要以细胞核染成棕褐色或核内有棕黄色颗粒为阳性细胞。每张染色切片先用低倍镜(10×10)选择 5 个染色适中的视野,再换用高倍镜(10×40)计数视野中阳性细胞数占所有细胞数的比例,<10% 为阴性(-),>10% 为阳性(+)。

1.4 统计学处理

采用 $\chi^2$ 检验和直接概率法。

## 2 结 果

2.1 P27 在肾癌组织中的表达

2.1.1 P27 在肾癌组织与癌旁正常组织中的表达 P27 在肾细胞癌标本中表达阳性率为 52.4%,显色部位位于细胞核,而在癌旁正常肾组织阳性率为 20.0%,强度明显弱于癌组织。$\chi^2=5.83$,$P<0.05$,差别有显著意义,即在肾癌组织 P27 的阳性表达率高于其在癌旁正常肾组织中的表达率。参见图 1。

2.1.2 P27 表达与肾癌分级的关系 根据 Fuhrman 分级,P27 在肾癌标本 $G_1$、$G_2$、$G_3$ 各级中的阳性率分别为:83.3%、68.7%、30.0%,3 组相比差别有显著性意义($\chi^2=8.04$,$P<0.05$)。再用 $\chi^2$ 分割法进一步比较每两组之间差别,$G_1$ 与 $G_3$ 比较阳性率差别有极显著性意义($\chi^2=5.4$,$P<0.05$);$G_1+G_2$ 与 $G_3$ 比较阳性率差别有显著性($\chi^2=7.67$,$P<0.01$)。因而提示 P27 表达高低与肾细胞癌分级有关,随肿瘤恶性程度的增高而逐渐降低。

2.1.3 P27 表达与肾癌临床分期的关系 P27 在肾癌临床分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期标本中阳性率分别为 64.3%、53.3%、44.4%、25.0%,随肿瘤分期增高,P27 表达有逐渐降低的趋势,但统计学检验差别无显著性意义($\chi^2=2.23$,$P>0.05$)。

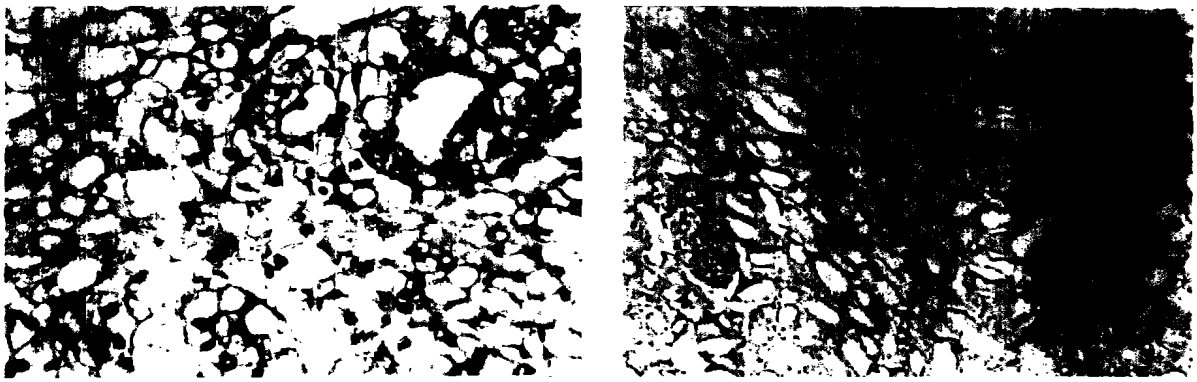


图 1 P27 在肾癌组织中的表达(1A),(S-P 400×)
P27 在癌旁正常肾组织中的表达(1B),(S-P 100×)

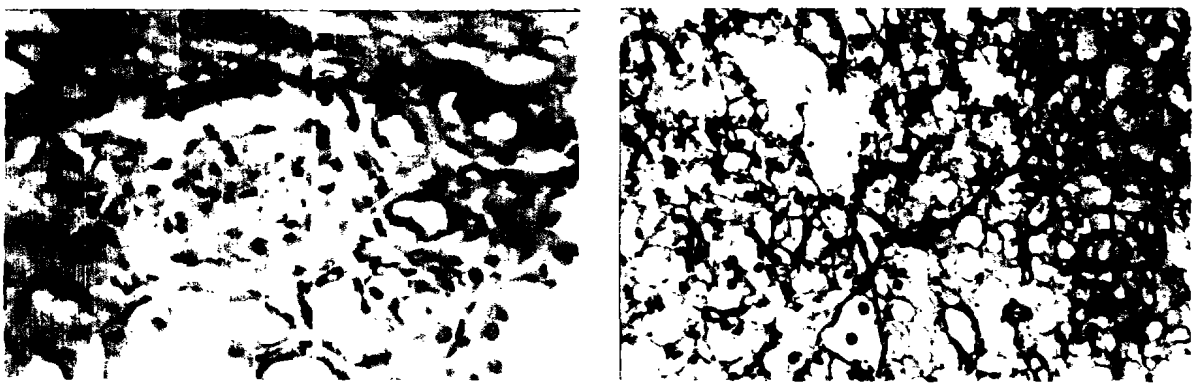


图 2 cyclinE 在肾癌组织中的表达(2A),(S-P 400×)
cyclinE 在癌旁正常肾组织中的表达(2B),(S-P 400×)

维普资讯 http://www.cqvip.com



表 1 肾透明细胞癌临床病理指标与 P27 及 cyclinE 表达之间的关系

| 临床病理指标 | 患者(例) | P27 蛋白表达 | | $\chi^2$ | $P$ | cyclinE 蛋白表达 | | $\chi^2$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 低表达 | 高表达 | | | 低表达 | 高表达 | | |
| Fuhrman 分级 | | | | | | | | | |
| $G_1$ | 6 | 1 | 5 | 8.04 | <0.05 | 1 | 5 | 4.34 | <0.05 |
| $G_2$ | 16 | 5 | 11 | | | 5 | 11 | | |
| $G_3$ | 20 | 14 | 6 | | | 13 | 7 | | |
| Robson 分期 | | | | | | | | | |
| Ⅰ | 14 | 3 | 11 | 2.23 | >0.05 | 3 | 11 | 2.5 | >0.05 |
| Ⅱ | 15 | 5 | 10 | | | 4 | 11 | | |
| Ⅲ | 9 | 4 | 5 | | | 3 | 6 | | |
| Ⅳ | 4 | 3 | 1 | | | 2 | 2 | | |
| cyclinE | | | | | | | | | |
| 低表达 | 19 | 10 | 9 | 12.0 | <0.01 | | | | |
| 高表达 | 23 | 3 | 20 | | | | | | |

2.2 cyclinE 在肾癌组织中的表达

2.2.1 cyclinE 在肾癌组织与癌旁正常肾组织中的表达 cyclinE 在肾细胞癌中表达阳性率为 54.8%，显色部位在细胞核；而在癌旁正常肾组织中其阳性率为 25.0%，且强度明显弱于癌组织。$\chi^2=4.85$，$P<0.05$，差别有极显著性意义，即 cyclinE 在肾癌组织中的表达率高于癌旁正常肾组织。参见图 2。

2.2.2 cyclinE 表达与肾癌分级的关系 在肾癌标本 $G_1$、$G_2$、$G_3$ 各级中 CyclinE 表达阳性率分别为 83.3%、68.8%、35.0%，$G_1$ 与 $G_3$ 比较阳性率差别有显著性意义（$\chi^2=4.34$，$P<0.05$）；$G_1+G_2$ 与 $G_3$ 比较阳性率差别有显著性意义（$\chi^2=6.02$，$P<0.05$）；即 cyclinE 表达与肾细胞癌分级有关，随肿瘤恶性程度增高而逐渐降低。

2.2.3 cyclinE 表达与肾癌临床分期的关系 cyclinE 在肾细胞癌临床分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期标本中阳性率分别为 64.3%、60.0%、44.4%、25.0%。随肿瘤分期增高，cyclinE 表达有逐渐减弱趋势，但差别无显著性意义（$\chi^2=2.5$，$P>0.05$）。

2.3 P27 与 cyclinE 在肾癌组织中表达的相关性

在 22 例 P27 表达阳性的肾细胞癌标本中，有 20 例 cyclinE 同时表达阳性；并且在 P27 表达阴性的 20 例肾细胞癌标本中，有 12 例 cyclinE 也表达阴性，二者符合率为 76.2%。进行相关性检验，二者呈正相关（$\chi^2=12.2$，$P<0.01$），$r=0.54$。

## 3 讨 论

P27kipl 是 CDKI 的家族成员之一，其编码产物 P27 蛋白作为细胞周期的负调控因子，它能抑制包括 cyclinE－CDK2 在内的多种 $G_1$ 期 cyclin－CDK 激酶活性，使细胞不能通过 $G_1$ 期，从而防止细胞过度增殖形成肿瘤[1]。然而，在肿瘤患者中极少见 P27kipl 基因突变[1-3]，因此多数研究者认为 P27 在肿瘤发生中的作用主要取决于蛋白表达水平的异常。本研究结果显示：肾癌组织中 P27 蛋白表达阳性率高于癌旁正常肾组织。同样的趋势出现在肝脏和软骨组织中，即肝癌和软骨肉瘤呈 P27 高表达，而相应的正常组织则表达较低。但在肺癌[4]，前列腺癌[5]等癌组织中 P27 蛋白的表达较相应正常组织为低，并发现 P27 蛋白的低表达与肿瘤的分级、分期有关，这可能与组织特异性有一定的关系[6]。本研究也发现，P27 表达与肾癌的分级呈负相关，分级越高，P27 表达越低。因此认为 P27 有可能作为一种判别肾癌分化程度的标志物。

CyclinE 与 CDK2 结合形成 cyclinE－CDK2 复合物是主要的 $G_1$ 期激酶复合物之一，该复合物浓度是细胞通过 $G_1$/S 调节点的关键。CyclinE 过表达，可以使细胞通过 $G_1$ 期进入 S 期，过度增殖形成肿瘤。

目前已发现人类多种肿瘤发生与 cyclinE 的过表达相关。本研究结果显示，肾癌组织中，cyclinE 表达阳性率明显高于癌旁正常肾组织，但随肿瘤分级增多，组织分化降低，cyclinE 的表达逐渐下降。Del－Pizzo－JJ 等[7]研究发现低分级膀胱移行细胞癌较高分级者更易表达 cyclinE。CyclinE 表达与肾癌分级呈负相关，表明 cyclinE 表达亦可能作为肾癌分化程度的标志物。

P27 通过阻断 CDK 的磷酸化，进而抑制 cyclinE/CDK2 激酶活性而发挥细胞周期负调节者的

维普资讯 http://www.cqvip.com



作用,使细胞不能进入S期,从而抑制细胞增殖。本组实验显示:肾透明细胞癌组织中,P27 与 cyclinE 表达增多,但随着病理学分级增高二者表达又同时递减,即这两种蛋白在肾细胞癌中的表达呈正相关。这一结果说明在人类肾癌组织中两者表达水平可能是通过一定机制协同调节的。同样,在其它一些肿瘤细胞系中亦发现这种正相关关系[7~9]。

因而认为,P27 与 cyclinE 之间存在一种正反馈关系,在肾癌组织中 cyclinE 表达水平较癌旁正常肾组织显著增强,通过该反馈机制引起 P27 表达水平亦增高,从而对抗 cylinE 表达所产生的促细胞增殖作用,使细胞生长减缓。换言之,在肾癌发生早期,作为抑癌因子的 P27 表达增加是由于致癌基因 cyclinE 的过度表达引起。但随着肿瘤恶性程度的进一步升高,肿瘤细胞的生长可能转由其它癌基因调控,而不需再依赖 cyclinE 的作用,cyclinE 随即自然下调。一旦 cyclinE 的表达水平下调,P27 的过表达就会失去反馈支撑,随之被逐一耗竭。这一假说可以解释为何在组织学分级较低的肾癌组织标本中 P27 和 cyclinE 表达增加,而在恶性程度较高、分级较高的组织标本中表达降低这一现象。

根据实验结果分析,认为 P27 蛋白与 cyclinE 可作为判别肾细胞癌分化程度的标志物,并有可能成为临床判断肾癌患者预后的有用指标,这一点还将有待于对肾癌患者术后的随访调查去进一步完善。

## 参 考 文 献

[1] Ponce - Castaneda MV, Lee M Ⅱ, Latres E, et al. P27kipl: chromosomal mapping to 12p12 - 13.1 and absense of mutations in human tumors[J]. Cancer Res, 1995;55(6):1211 - 1214.

[2] Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, et al. Molecular analysis of the cyclin - dependent kinase inhibitor gene P27kipl in human malignancies[J]. Cancer Res, 1995;55(6):2266 - 2269.

[3] Tukeuchi S, Bartram CR, Wade M, et al. Allelotype analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Res, 1995;55(22):5377.

[4] Esposito V, Baldi A, De luca A, et al. Prognostic role of the cyclin - dependent kinase inhibitor P27kipl in non - small cell lung caner[J]. Cancer Res, 1997;57:3381 - 3385.

[5] Tsihlias J, Kapusta LR, Deboer G, et al. Loss of cyclin - dependent kinase inhibitor P27kipl is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 1998;58:542 - 548.

[6] Lioyd RV, Jin L, Qian X, et al. Aberrant P27kipl expression in endocrine and other tumors[J]. Am J Pathol, 1997;150:401 - 407.

[7] Del Pizzo JJ, Borkowski A, Jacobs SC, et al, Loss of cell cycle regulators P27(Kip1) and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. Am J Pathol[J]. 1999;155(4):1129 - 1136.

[8] Sgambato A, Zhang YJ, Arber N, et al. Deregulated expression of P27kipl in human breast cancers[J]. Clin Cancer Res, 1997;3:1879 - 1887.

[9] Doki D, Imoto M, Han, E, et al. Correlations between the levels of expression of cyclinD1 and other cell cycle - regulated genes in human esophageal cancer cell lines[J]. Carcinogenesis, 1997;18:1139 - 1148.