DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.022
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0705-03

论著

p27Kip1和Ki-67在人肾透明细胞癌中的表达及意义

唐 伟,沈 俊 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

提 要:目的 通过检测细胞周期素依赖激酶抑制蛋白p27Kip1(p27)和增殖细胞核抗原Ki-67在肾透明细胞癌中的表达情况,探讨其与临床病理指标及预后的关系。方法 采用免疫组化SP法测定42例肾透明细胞癌及20例癌旁正常肾组织中p27蛋白和Ki-67抗原的表达。结果 在肾透明细胞癌与癌旁正常肾组织中p27或Ki-67的表达均有显著性差异($P<0.05$)。肾透明细胞癌的病理分级与p27的表达呈负相关,而与Ki-67抗原的表达呈正相关($P<0.01$)。肾透明细胞癌中p27表达与Ki-67抗原表达、肿瘤有无转移呈负相关($P<0.01$);Ki-67抗原表达与肿瘤有无转移呈正相关($P<0.01$)。结论 在人肾透明细胞癌的发生、发展及转移过程中,由于缺乏p27基因持续激活的后继支撑,p27蛋白被逐渐消耗,Ki-67抗原表达上调;p27表达与Ki-67表达对评估肾透明细胞癌患者预后有一定价值。

关键词:肾透明细胞癌;p27Kip1;Ki-67
中图法分类号:R394.3;R730.23;R737.11 文献标识码:A

Expressions of p27Kip1 protein and Ki-67 antigen in human clear cell carcinoma of kidney and its significance

TANG Wei, SHEN Jun (Department of Urology, The First Affiliated Clinical Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the expressions of p27Kip1 (p27) protein and Ki-67 antigen in human clear cell carcinoma of kidney and to find out the relationship between the expression levels and the clinical pathological characteristics and prognosis in cases of clear cell carcinoma of kidney. Methods The expressions of p27 protein and Ki-67 antigen in the adjacent tissues of carcinoma in 20 cases and 42 cases of clear cell carcinoma of kidney were detected by immunohistochemistry. Results The positive rates of p27 protein and Ki-67 antigen in clear cell carcinoma of kidney were significantly higher than those of the both in the adjacent tissues of carcinoma ($P<0.05$), and p27 and Ki-67 were not concurrently expressed in renal clear cell carcinoma (RCCC). The histological tumor grading was negatively correlated with the expression rate of p27 ($P<0.01$) but positively with the expression of Ki-67 antigen ($P<0.01$). In RCCC, negative correlation was found between the expression of p27 and that of Ki-67 ($P<0.01$) and tumor metastasis ($P<0.01$). Conclusion p27 and Ki-67 may play an important role in the genesis, development and metastasis of human renal clear cell carcinoma, respectively. The expressions of Ki-67 and p27 may contribute to evaluating the prognosis of patients with RCCC.

Key words: renal clear cell carcinoma; p27Kip1; Ki-67

p27Kip1(p27)是细胞周期素依赖激酶抑制物(Cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI)家族成员,有广谱的CDK抑制活性。它主要与G_1-S期转化相关的cyclinE-CDK2、cyclinD1-CDK4结合,通过PRb途径,阻止细胞通过G_1/S检验点(Checkpoint)进入增殖周期。p27的表达在多种肿瘤组织中明显下调,是一种后选的抑癌基因,它的组织表达可能对肿瘤患者的预后判断有一定帮助[1]。Ki-67抗原在细胞周期的G_1-M期表达,而在G_0期表达受抑,与G_1/S检验点严格相关,是细胞进入增殖周期的良好标志。本实验旨在研究p27和Ki-67抗原在人肾透明细胞癌及其癌旁组织中的表达水平,探讨其与临床病理指标的相关性,评价对患者预后的价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本组病例自我院泌尿外科1995至2001年患者中,仔细筛选获得,共42例。所有病例均经病理确诊为肾透明细胞癌,癌

作者简介:唐 伟(1963-),男,重庆市人,副教授,主要从事泌尿外科及肿瘤方面的研究。电话:(023)69012218

收稿日期:2003-02-21;修回日期:2003-03-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

旁正常肾组织取自同组病例，共20例。年龄33～78岁，平均57岁。男女比例为2.5∶1。Fuhrman[2]分级：G1级6例，G2级16例，G3级20例。Robson[3]分期：Ⅰ期14例，Ⅱ期15例，Ⅲ期9例，Ⅳ期4例。

即用型一抗p27Kip1和Ki-67鼠抗人单克隆抗体，二抗（抗兔和鼠IgG）及S-P试剂盒均为美国Maxim公司产品，购自福州迈新生物技术公司。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

采用链霉亲合素-过氧化物霉法。4 μm厚连续切片，脱蜡，高温高压抗原修复，常规免疫组化染色（详见S-P试剂盒说明书）。已知p27和Ki-67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。p27以＜50%为低表达，＞50%为高表达[4]；Ki-67以＜30%为低表达，＞30%为高表达[4]。

1.4 统计学处理

实验数据以SPSS11.0数据处理软件进行统计分析，采用χ^2检验进行计数资料的率间比较；Spearman等级相关分析肾透明细胞癌中p27、Ki-67表达与临床病理资料的关系。

2 结果

2.1 p27在肾透明细胞癌组织与癌旁正常组织中的表达

在肾透明细胞癌组织中，肿瘤细胞核与胞质均可见p27阳性着色，且p27阳性细胞及染色强度呈异质性分布。p27在肾透明细胞癌标本中表达阳性率为52.4%。在癌旁组织中，p27阳性细胞多见于远曲小管上皮，着色以核为主，部分细胞胞质着色，其阳性表达率为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，见图1。

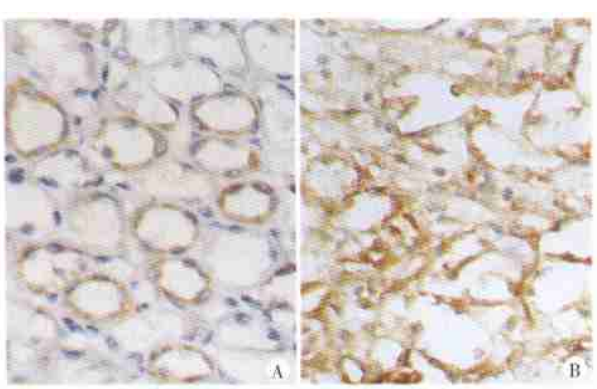


图1 **p27Kip1**在癌旁组织（**A**）和肾透明细胞癌（**B**）中的表达 （S-P×400）

Fig 1 Expression of p27Kip1 in adjacent tissue of carcinoma（A） and RCCC（B） （S-P×400）

2.1.2 Ki-67在肾透明细胞癌组织及癌旁正常组织中的表达

Ki-67抗原阳性细胞核着色，在肾癌旁组织中虽发现有散在阳性细胞表达，但其阳性表达率均＜10%；而在肾透明细胞癌组织中Ki-67抗原表达于胞核，虽然其阳性表达强弱不一，但几乎所有的细胞均有表达，且多数阳性表达率＞50%。因而Ki-67在肾透明细胞癌组织及癌旁正常组织中的表达阳性率差别是极其显著的，即在肾癌组织Ki-67的阳性表达率高于其在癌旁组织中的阳性表达率，见图2。

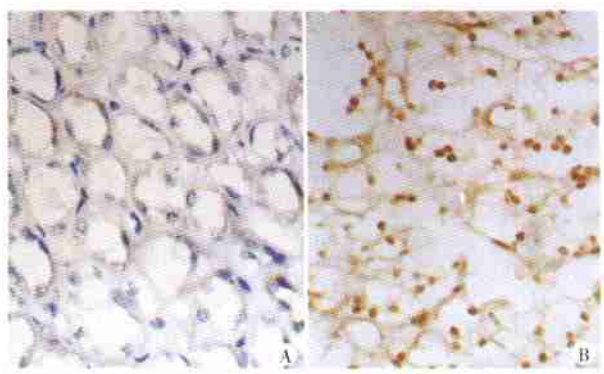


图2 **Ki-67**在癌旁组织（**A**）和肾透明细胞癌（**B**）中的表达 （S-P×400）

Fig 2 Expression of Ki-67 in adjacent tissue of carcinoma（A） and RCCC（B） （S-P×400）

2.2 肾透明细胞癌中p27表达及Ki-67表达与临床病理指标之间的关系

肾透明细胞癌组织中p27表达与Fuhrman分级、肿瘤有无转移及Ki-67表达呈负相关；Ki-67抗原表达与Fuhrman分级、肿瘤有无转移呈正相关，见表1。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%，虽然随肿瘤分期增高，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（$\chi^2=2.23$，$P>0.05$）；同样，Ki-67表达随肿瘤分期增高有逐渐升高的趋势，但统计学检验差别亦无显著性意义（$\chi^2=3.39$，$P>0.05$）。

表1 肾透明细胞癌临床病理指标与**p27**及**Ki-67**表达之间的关系

Tab 1 Relationship of the clinical pathological parameters of renal clear cell carcinoma and the expression of p27Kip1 and Ki-67

Tumor	*n*	p27		r_s	*P*	Ki-67		r_s	*P*
		Low	High			Low	High		
Grade									
G1	6	1	5	0.435	0.004	4	2	0.401	0.008
G2	16	5	11			7	9		
G3	20	14	6			3	17		
Stage									
Ⅰ	14	3	11	−0.291	0.062	9	5	0.276	0.077
Ⅱ	15	5	10			6	9		
Ⅲ	9	4	5			3	6		
Ⅳ	4	3	1			1	3		
Lymph node metastasis									
(−)	29	8	21	−0.461	0.002	13	16	0.346	0.018
(+)	13	10	3			1	12		
Ki-67									
Low	14	4	10	0.485	0.001				
High	28	22	6						

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

目前发现的 CDKI 按结构和功能的不同分成两大类: 一类为 InK4 (Inhibitor of CDK4) 家族, 它包括 p16InK4a、p15 InK4b、p18 InK4c、p19, InK4d 其蛋白结构均有 4 个回沟状重复序列 (Ankyrin repeats), 特异地与 cyclinD-CDK4/CDK6 形成复合物, 抑制其激酶活性; 另一类为 Cip/Kip (CDK-interacting protein/kinase inhibition protein) 家族, 包括 p21Waf1/Cipl、p27Kip1 和 p57kip2, 这些蛋白高度同源, 其羧基端均含有一双枝核定位信号 (Bipartitie nuclear localization signal), 可与多种 cyclin 及 CDK 相结合, 普遍抑制 G_1 期 cyclinE-CDK2、cyclinD-CDK4/CDK6 以及其他 cyclin-CDK 的激酶活性。

p27Kip1 是 CDKI 家族成员之一, 其主要作用为抑制 cyclinE-CDK2、cyclin D-CDK4 复合物的激酶活性, 它不但与该复合物结合, 抑制已激活的激酶活性, 而且可通过其 C 末端的相互结合而抑制 CAK 对 CDK2 Thr160 和 CDK4 Thr172 的磷酸化, 阻断后者的活化, 维持 PRb 低磷酸化或未磷酸化状态, 阻止一组核内转化因子 E2F 的释放, 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 p27 基因突变, 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[5]。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。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; 此外, 有研究证实, p27 蛋白缺乏可导致细胞间粘附力下降, 使肿瘤容易转移[6]。而在我们的实验当中也发现: P27 表达的高低和肿瘤的转移呈负相关, 在有淋巴结远处转移的肾透明细胞癌中 p27 阳性表达率极低, 而没有转移的则 p27 阳性表达率极高。因此认为 p27 极有可能成为一种判别肾癌分化程度的新的标志物, 并且对肾癌患者的预后判断有着重要的价值。另外, 从实验的另外一个角度我们还发现这样一个现象, 即在肾透明细胞癌的发生、发展过程中, p27 蛋白的表达是从一个正常的低点骤然跃升至最高点, 然后逐渐回落的过程。这可能是因为在肿瘤的初发阶段由于致癌因素的刺激而导致 p27 基因的大量激活, 从而引起 p27 蛋白表达骤升, 但是, p27 基因的激活只是瞬时的而非持续的, 随着肿瘤的发展(G1→G2→G3), p27 蛋白被逐渐消耗。

我们在实验中发现, 肾癌组织中 Ki-67 抗原表达阳性率明显高于癌旁正常肾组织; 此外, Ki-67 的表达与肾透明细胞癌的分级、淋巴结转移均成正相关; 还有, 在我们随访的已死亡患者当中无一例其 Ki-67 水平是低表达(< 50%)的。由此可以看出 Ki-67 是一种很好的判断细胞增殖状态的标记, 即 Ki-67 不仅可作为判别肾透明细胞癌分化程度的标志物, 而且还可能对肾癌患者的预后做出有价值的评估。

实验统计结果表明, p27 表达与 Ki-67 抗原表达呈负相关。原因在于: ①作为细胞周期负性调控因子, p27 蛋白下调可能促进肿瘤细胞的增殖; ②p27 表达下调也可能通过减少肿瘤细胞凋亡而促进肿瘤的发生[7]。另外, 比较 p27 及 Ki-67 在肿瘤发生、发展中的作用, 二者可能均参与了肾透明细胞癌转移的过程, 而其作用正好相反。但其具体作用机制尚待进一步深入研究。最后需要说明的是, p27 及 Ki-67 与肿瘤临床分期虽有一定的相关趋势, 但却无统计学意义。这是因为病理临床分期易受主客观因素影响, 难以准确反映肿瘤恶性程度。

根据实验结果分析, 我们认为在人肾透明细胞癌的发生、发展及转移过程中, p27 蛋白下调, Ki-67 抗原上调, 二者可作为判别肾癌分化程度新的标志物, 对临床肾癌患者预后的评估有着重要的意义。

参考文献:

[1] Lloyd R V, Erickson L A, Jin L, *et al*. P27Kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers [J]. Am J Pathol, 1999, 154(2): 313—323.

[2] Ficarro V, Righetti R, Pilloni S, *et al*. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases [J]. Eur Urol, 2002, 41(2): 190—198.

[3] Delahunt B, Eble J N, McCredie M R, *et al*. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growthkinetics and patient survival in 66 cases[J]. Human Pathol, 2001, 32(6): 590—595.

[4] Kamai T, Takagi K, Asami H, *et al*. Prognostic significance of p27Kip1 and Ki-67 expression in carcinoma of the renal pelvis and ureter[J]. BJU Int, 2000, 86(1): 14—19.

[5] Xiao H, Zeng X C. Study on the clinical significance of p27Kip1, cyclinE, p21waf1 and p16 in acute leukemia and their correlation[J]. J Leuk, 2000, 9(5): 271—273.

[6] Fero M, Rivkin M, Tasch M, *et al*. A syndrome of multi-organ hyperplasia with features of gigantism tumorigenesis and femal sterility in p27Kip1 deficient mice[J]. Cell, 1996, 85(5): 733—744.

[7] Levkau B, Koyama H, Raines E W, *et al*. Cleavage of p21cipl/waf1 and p27Kip1 mediates apotosis in endothelial cells through activation of CDK2: role of a caspace cascade[J]. Mol Cell, 1998, 1(4): 553—563.

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net