DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.010
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
534 2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)06-0534-04

大肠癌、大肠腺瘤 Cyclin D1、P16 和 PCNA 蛋白表达及其意义

阎晓初,柳凤轩,贺光友,于冬梅,王宗前 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨细胞周期调控因子蛋白表达在大肠癌发生发展中的作用及其对预后影响。方法 采用免疫组化染色对113例大肠癌、14例大肠腺瘤、11例腺瘤癌变组织中Cyclin D1、P16和PCNA进行了检测。结果 大肠癌、腺瘤和癌变Cyclin D1、P16以及PCNA阳性表达率与正常大肠粘膜相比均相差显著($P<0.05$),腺瘤癌变Cyclin D1表达明显增高,大肠癌P16表达明显降低。大肠癌、腺瘤癌变的PCNA较腺瘤组显著增高($P<0.01$)。Cyclin D1、PCNA过度表达者,其5年生存率均显著降低。结论 Cyclin D1过度表达与P16基因突变失活可能加速细胞周期转化,促进大肠癌的发生;Cyclin D1过度表达在大肠癌早期形成过程中可能起一定作用。Cyclin D1、PCNA过度表达提示为大肠癌预后不良的危险因素。

关键词:大肠肿瘤;细胞周期;免疫组化;预后
中图法分类号:R394.2;R735.34 文献标识码:A

Expression and significance of Cyclin D1, P16 and PCNA in colorectal adenoma and carcinoma

YAN Xiao-chu, LIOU Feng-xuan, HE Guang-you, YU Dong-mei, WANG Zong-qian (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of the expression of cell cycle regulators on the development and prognosis of colorectal carcinoma. Methods The expressions of Cyclin D1, P16 and proliferation cell nuclear antigen (PCNA) were detected with immunohistochemical staining in the tissues of 14 cases of adenoma, 11 cases of adenoma with malignant degeneration and 113 cases of carcinoma in large intestine. Results The positive rate of Cyclin D1, P16 and PCNA were significantly different between colorectal carcinoma, adenoma, adenoma with malignant degeneration and normal mucosa ($P<0.05$). Overexpression of Cyclin D1 was found in adenoma with malignant degeneration and underexpression of P16 in carcinoma. Expression of PCNA was increased more obviously in carcinoma and adenoma with malignant degeneration than in adenoma ($P<0.01$). The 3 or 5-year survival rate was significantly lower in the patients with a tumor of strong Cyclin D1 and PCNA expression than in the patients with a tumor of negative expression of Cyclin D1 and PCNA. Conclusion The overexpression of Cyclin D1 and inactivation of the mutation of P16 gene might accelerate the progression of the cell cycle and promote the carcinogenesis of the large intestine. Overexpression of Cyclin D1 may play a role in the initiation of colorectal carcinoma. The overexpessions of Cyclin D1 and PCNA predict unfavorable prognosis of colorectal carcinoma.

Key words: colorectal neoplasm; cell cycle; immunohistochemitry; prognosis

近年来,有关细胞周期及其调控机制研究已取得了较大进展,且愈来愈多的证据表明,细胞周期调节失控是肿瘤发生发展的重要机制[1]。有关大肠肿瘤细胞周期调控因子表达的研究,文献[2~3]报道不多,细胞周期调控因子表达与大肠癌预后关系的研究报道甚少[4],为此,本研究采用免疫组化方法对113例大肠癌的细胞周期调控因子Cyclin D1、P16和增殖细胞核抗原(Proliferation cell nuclear antigen, PCNA)进行检测,探讨细胞周期调控因子表达在大肠癌发生发展中的作用

作者简介:阎晓初(1963—),男,四川省苍溪县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事大肠肿瘤、分子病理方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754212

收稿日期:1999-11-25;修回日期:2000-03-10

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

及对预后判断的意义。

1　材料与方法

1.1　标本

收集我院 1987～1996 年间手术切除的大肠癌 113 例, 男 54 例, 女 59 例; 年龄 20～83 岁, 平均年龄 55.6 岁。右半结肠 50 例; 左半结肠 63 例。高分化腺癌 33 例, 中分化腺癌 58 例, 低分化腺癌 22 例。Dukes 分期: A 期 22 例, B 期 37 例, C 期 41 例, D 期 13 例。所有病例均获得随访结果, 随访时间 20～87 个月, 平均 45.6 个月。同时选择正常大肠粘膜 10 例、大肠腺瘤 14 例(不典型增生Ⅰ级 5 例、Ⅱ级 5 例、Ⅲ级 4 例)和腺瘤癌变 11 例。所有标本经 10%中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度 3～5 μm, 行 HE 染色和免疫组化染色。

1.2　免疫组化染色

采用 S-P 法, 第一抗体 Cyclin D1(1∶40)、P16(1∶40)和 PCNA(1∶100)分别为美国 Santo Cruz 和 Zymed 公司产品。S-P 试剂盒系丹麦 Dako 公司产品。其中 Cyclin D1 和 P16 进行微波抗原修复。每批染色均设立阳性和阴性对照。结果判定: 根据阳性细胞所占视野面积的百分比和染色强度分别记为: (－)无明显阳性反应细胞, (＋)阳性细胞的面积小于 25%, 着浅棕色; (＋＋)阳性细胞面积大于 25%, 呈棕色或深棕色; PCNA 采用计数标记指数(Labeling index, LI), 即平均每 100 个细胞中 PCNA 阳性细胞数。

1.3　统计学处理

采用 χ^2 检验, 单因素方差分析和 Kaplan-Meier 生存率曲线分析及 log rank 检验。

2　结果

2.1　大肠癌中 Cyclin D1、P16 和 PCNA 蛋白的表达

正常大肠粘膜、大肠腺瘤、腺瘤癌变和大肠癌细胞周期调控因子 Cyclin D1、P16 和 PCNA 显示不同程度的表达, 见表 1。其中 Cyclin D1、PCNA 以细胞核表达为主, P16 主要为细胞浆着色, 见图 1、2。大肠癌、腺瘤和癌变 Cyclin D1、P16 以及 PCNA 阳性表达率与正常大肠粘膜相比均相差显著($P<0.05$), 腺瘤癌变 Cyclin D1 表达明显增高, 大肠癌 P16 表达明显降低。大肠癌、腺瘤癌变的 PCNA LI 较腺瘤组显著增高($P<0.01$)。大肠腺瘤随腺瘤不典型增生分级增加, Cyclin D1 表达率和 PCNA LI 逐渐增高, 而 P16 表达率逐渐降低。

表 1　正常大肠、腺瘤、腺瘤癌变及大肠癌 **Cyclin D1**、**P16** 和 **PCNA** 表达

Tab 1　Expression of Cyclin D1, P16 and PCNA in normal mucosa, adenoma, adenoma with malignant degeneration and carcinoma of large intestine

Group	Cases	Cycin $D1^+$(%)	$P16^+$(%)	PCNA LI($\bar{x}\pm s$)
Normal mucosa	10	1(10.00)	8(80.00)	22.34±6.57
Adenoma	14	8(57.14)▲	9(64.29)	36.12±12.32▲
Malignant deqeneration	11	8(72.73)▲	7(63.64)	47.74±17.29▲
Carcinoma	113	62(54.87)▲	52(46.02)▲	50.62±15.41▲

▲: $P<0.05$ *vs* normal mucosa

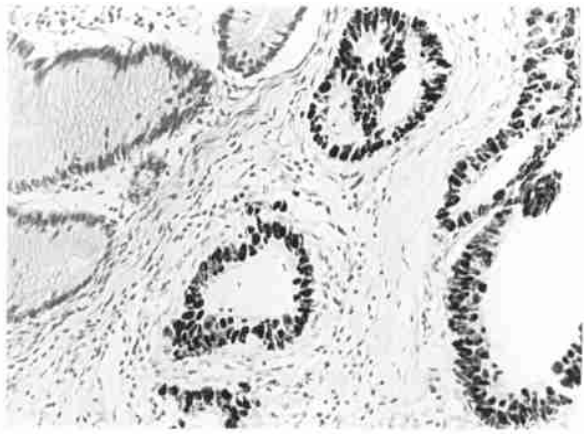


图 1　中分化腺癌癌组织 **Cyclin D1** 呈细胞核强阳性表达, 癌旁粘膜呈阴性　(S-P× 200)

Fig 1　Strong positive expression of Cyclin D1 in cell nuclears of moderate-differentiated adenocarcinoma　negative expression of Cyclin D1 in mucosa adjacent to the carcinoma　(S-P× 200)

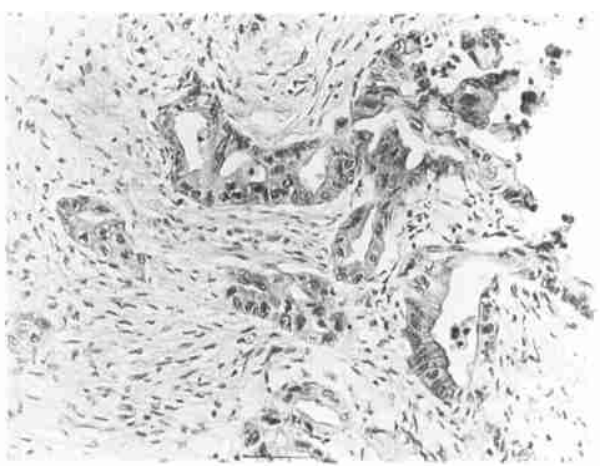


图 2　中分化腺癌 **P16** 呈细胞浆阳性表达　(S-P× 200)

Fig 2　Positive expression of P16 in cytoplasm of moderate-differentiated adenocarcinoma　(S-P× 200)

本组 113 例大肠癌的 Cyclin D1、P16 表达以及 PCNA LI 在不同性别、年龄的患者间无明显差别; 与肿瘤部位、大小、组织学类型以及 Dukes 分析亦无关。

2.2　Cyclin D1、P16 表达与细胞增殖活性的关系, 见表 2

大肠腺瘤中 Cyclin D1 阳性与阴性病例的 PCNA LI 相接近, 经统计学处理两组间差异均无显著性($P>0.05$)。腺瘤癌变中 Cyclin D1 阳性表达者 PCNA LI 显著高于阴性者($P<0.05$), 在大肠癌 Cyclin D1 阴性时, PCNA LI 较低, Cylin D1 阳性表达者, PCNA LI 明显增高($P<0.01$)。大肠腺瘤、腺瘤癌变和大肠癌中 P16 阳性与阴性者间, PCNA LI 相差不显著($P>0.05$), 但阳性表达者的 PCNA 指数均值偏低。

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

表2 大肠腺瘤、腺瘤癌变和大肠癌 Cyclin D1、P16 表达与 PCNA LI 比较

Tab 2 Comparison of PCNA LI and expression of Cyclin D1 and P16 in adenoma, adenoma with malignant change and carcinoma of large intestine

Histological type	Cases	PCNA LI($\bar{x}\pm s$)			
		Cyclin D1$^-$	Cyclin D1$^+$	P16$^-$	P16$^+$
Adenoma	14	30.43±6.64	40.38±14.21	40.18±14.70	33.87±11.07
Malignant change	11	33.70±14.08	53.01±12.74 *	53.23±6.55	44.61±18.38
carcinoma	113	46.27±14.91	54.21±15.00 **	52.34±14.45	48.62±16.38

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Cyclin D1$^-$

2.3 大肠癌 Cyclin D1、P16 和 PCNA 表达与预后关系

本组大肠癌经随访观察，5年内死于本病者31例，占27.43%。Kaplan-Meier 生存率曲线分析，Cyclin D1 强阳性、弱阳性和阴性表达者，5年生存率分别为47.75%、65.91%和67.39%，见图3。经 Log rank 检验，强阳性组5年生存率显著低于阴性组和弱阳性组（$P<0.05$）。P16 强阳性、弱阳性和阴性表达者，5年生存率较接近，分别为61.00%、70.42%和59.13%，3组间差异无显著性（$P>0.05$）。从生存曲线看，P16阴性表达者预后相对较差。PCNA LI 低者（≤40%）5年生存率为80.46%，PCNA LI 高者（>40%）5年生存率为59.21%，见图4，两组间差异显著（$P<0.05$）。

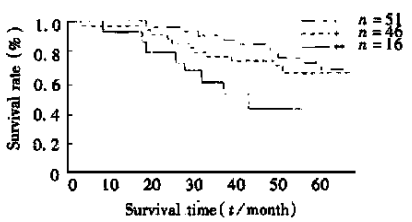


图3 Cyclin D1 表达与大肠癌预后的关系

Fig 3 The relationship between the expression of Cyclin D1 and prognosis in large intestine carcimona

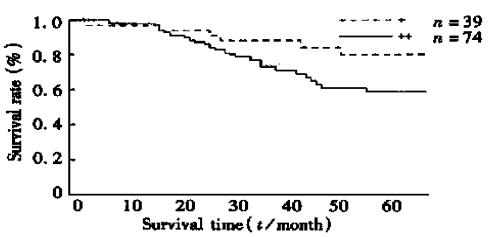


图4 PCNA 标记阳性程度与大肠癌预后的关系

Fig 4 The relationship between the PCNA LI and prognosis in large intestine carcimona

3 讨论

细胞周期调控因子为一组调节细胞增殖、分化的正负信号，它们通过相互促进和抑制作用以维持细胞周期的正常进程。在恶性肿瘤细胞中，这些调控因子常发生突变或失活，致使正常调节紊乱，导致细胞周期进程加快，促进肿瘤形成与发展。Cyclin D 在细胞周期中可与 CDK 结合，促进细胞周期进程，因而被视为一种原癌基因。而 P16 则抑制 CDK 的活性，阻止细胞周期的转化。研究发现 Cyclin D1 和 P16 与食管癌、肺癌和乳腺癌等肿瘤的发生发展有关[5~6]。而在大肠肿瘤报道不多，其结果亦不一致。Cyclin D1 在大肠癌的阳性表达率为30%~60%，大肠腺瘤约为34%~83%不等，一些报告显示腺瘤阳性率低于癌，另一些则发现腺瘤检出率比腺癌高。而 P16 在大肠癌的检出情况差异很大，一般多低于正常大肠粘膜和腺瘤[8]。本组大肠癌 Cyclin D1 阳性率为54.87%，与大肠癌组织学类型、Dukes 分期、大小、部位和患者性别、年龄等因素无显著相关性。在腺瘤和腺瘤癌变阳性率分别为57%和72%，无较大肠癌高，而在正常大肠粘膜仅有1例弱阳性表达，腺瘤中 Cyclin D1 表达，随不典型增生分级增加而增高，表明 Cyclin D1 过度表达在大肠癌早期形成过程中有可能起一定的作用。这与 Arber 等[9]的报道结果相吻合。P16 在大肠癌表达率为46%，低于正常大肠粘膜、大肠腺瘤和癌变，且腺瘤中 P16 表达随不典型增生程度增加而减少。提示 P16 基因突变失活导致 P16 蛋白表达量减少。同时本实验还显示 P16 表达减少时，Cyclin D1 表达增加，使其与 CDK4 结合增多，从而促进了细胞的增殖分裂，这可能是大肠癌发生的重要分子机制。

细胞周期的转化可反映细胞的分裂、增殖程度。有关细胞周期调控因子对肿瘤细胞增殖活性影响的研究，文献报道相对较少。本研究中，我们观测到大肠癌 Cyclin D1 阴性表达者，其 PCNA 标记指数较低，而阳性表达尤其是强阳性表达者，PCNA 指数较阴性者显著增高（$P<0.05$）。表明 Cyclin D1 过度表达可加速细胞进入 S 期，以促进大肠癌细胞不断分裂和增殖。P16 蛋白阴性表达者，PCNA 指数略高于阳性表达组，提示 P16 过度表达则可抑制 Cyclin D1-CDK4 的活性，减缓细胞 $G_1\rightarrow S$ 期的转化，以阻止癌的发生和发展。

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

有关细胞周期调控因子与大肠癌预后关系的报道甚少。Cyclin D1 作为细胞周期正调节因子，可促进肿瘤的发生与发展，本实验结果显示 Cyclin D1 不仅与大肠癌发生相关，而且对大肠癌预后也有一定的影响，我们通过生存曲线分析，发现 Cyclin D1 阳性表达，尤其是强阳性表达者，其 3 年、5 年生存率显著低于阴性组。提示 Cyclin D1 蛋白过度表达患者预后较差。而 P16 蛋白阳性和阴性表达对大肠癌术后生存时间影响不大，两组 3 年、5 年生存率比较接近（$P > 0.05$）。PCNA 与恶性肿瘤预后的关系，多数观点认为 PCNA 表达增强者，其预后一般较差[10]。本研究结果显示 PCNA 标记指数高的大肠癌，其 3 年、5 年生存率较 PCNA 指数低者显著降低，证实 PCNA 过度表达与大肠癌预后较差有关。

参考文献：

[1] Hortwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266(5192): 1 821－1 828.

[2] Wang A, Yoshimi N, Ino N, *et al*. Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1997, 123(2): 124－127.

[3] Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, *et al*. Expression of p21WAF1/CIP1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p53 protein expression[J]. Pathol Int, 1997, 47(7): 470－477.

[4] Maeda K, Chung Y S, Kang S M, *et al*. Overexpression of cyclin D1 and p53 associated with disease recurrence in colorectal adenocarcinoma[J]. Int J Cancer, 1997, 74(3): 310－315.

[5] 郑 杰，周传农，萧 风，等. P16、Rb 和细胞周期素 D1 蛋白在食管癌中的表达及其意义[J]. 中华病理学杂志，1996，25(6)：336－339.

[6] Mate J L, Ariza A. Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labeling index and poor cytoplasmic differentiation[J]. J Pathol, 1996, 180(4): 395－399.

[7] Bartkowa J, Lukas J, Muller H, *et al*. Cyclin D1 protien expression and function in human breast cancer[J]. Int J Cancer, 1994, 57(3): 353－361.

[8] 池田公正，门田卓士，迁江正树，等. 大肠癌における cyclin D、CDK4、inhibitor(p16) の发现[J]. 日本临床，1996，54(4)：353－361.

[9] Arber N, Hibshoosh H, Moss S F, *et al*. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis [J]. Gastrenterology, 1996, 110(3): 669－674.

[10] 吴建农，王懿龄. 大肠癌增殖细胞核抗原的表达与淋巴结转移关系[J]. 临床与实验病理学杂志，1997，13(3)：244－245.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2000)06-0537-01

经验与短篇

鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤颅中窝侵犯 1 例报告

A case report of inverted papilloma of nasal cavity and sinus with middle cranial extension

杨 桦，孟祥贵，李 红，邓安春 （第三军医大学附属新桥医院耳鼻咽喉科，重庆 400037）

鼻腔内翻性乳头状瘤累及颅内临床少见，现将我院收治的 1 例累及颅中窝报告如下。患者男性，33 岁。因鼻衄，鼻阻 5 年，左侧头痛 40 d，于 1995 年 3 月 6 日入院。患者 13 年前曾因左侧鼻腔内翻性乳头状瘤行鼻内途径肿瘤摘除术。查体：左眼上睑下垂，视力为右眼 5.0，左眼 4.8，双眼视野检查无缺损。双鼻腔通气差，左鼻腔充满灰白色，表面呈桑椹状，质硬的新生物。鼻窦 CT 冠状位扫描显示，左侧鼻腔内见软组织块影，最大层面积 2 cm× 5 cm，累及左上颌窦、筛窦、蝶窦、蝶鞍，左上颌窦窦壁及左侧蝶鞍骨质破坏，并向颅内侵犯，鞍旁软组织影包绕颈内动脉及挤压海绵窦。患者入院后左侧头痛进一步加剧，球结膜水肿，眼球运动受限，出现海绵窦综合症。入院诊断鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤（侵犯左上颌窦、筛窦、蝶窦及颅中窝）。于 1995 年 3 月 28 日全麻下行鼻左侧切开经路肿瘤摘除手术，术中见肿瘤灰白色，无包膜。基底位于筛窦内侵犯左侧上颌窦致上颌窦内侧破坏，破坏鼻中隔后上份抵右侧鼻腔和前组筛窦一部分，蝶窦前壁及中隔破坏，充满肿瘤组织，蝶窦顶壁骨质破坏约 1.2 cm× 1.0 cm，破损处仍见肿瘤组织。因肿瘤与海绵窦及颈内动脉密切贴附故蝶鞍及中颅窝肿瘤未能彻底摘除。病

（下转 540 页）

作者简介：杨 桦（1959－），男，广东省汕头市人，硕士，主治医师，主要从事耳鼻咽喉科方面的研究，发表论文 7 篇。电话：(023)68755495

收稿日期：2000-03-09；修回日期：2000-05-08

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