DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.031
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

文章编号:1000-5404(2000)05-0481-03

论著

P27蛋白在骨肉瘤中表达的意义及其与预后的关系

仲召阳[1],罗 进[2],王 东[1],陈 俐[1] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042;[2]武警四川总队医院病理科,乐山 614000)

提 要:目的 探讨P27蛋白表达与骨肉瘤临床病理、肿瘤细胞增殖活性及其与预后的关系。方法 应用S-P免疫组化法检测80例骨肉瘤P27蛋白及增殖细胞核抗原(PCNA)的表达,计算其标记指数(Labeling index,LI)。结果 p27 LI在0%~97.5%之间,PCNA LI在9%~98%之间,而在正常骨及良性骨瘤中不见表达。P27蛋白表达与骨肉瘤Dahlin分型、Price分级无关,而与WHO分型、PCNA LI密切相关。生存率分析显示,p27 LI<48.4%的骨肉瘤预后较好,LI>48.4%的骨肉瘤预后较差。结论 骨肉瘤P27蛋白表达与肿瘤细胞增殖活性及生存率密切相关,其表达对骨肉瘤诊断和预后评估可能具有重要价值。

关键词:骨肉瘤;P27蛋白;免疫组化;预后
中图法分类号:R394.3;R738.1 文献标识码:A

Expression of P27 protein in osteosarcoma and its prognostic significance

ZHONG Zhao-yang, LUO Jing, WANG Dong, CHEN Li (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the P27 protein expression in osteosarcoma and its relation to clinicopathological features, tumor cells proliferation and the prognosis. Methods The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and P27 protein was semiquantitatively analyzed with S-P immunohistochemistry in a consecutive prospective series of 80 cases of osteosarcoma. Meanwhile, the labeling index (LI) was calculated. Results In all the 80 cases, the range of P27 LI was 0%~97.5% and that of PCNA LI 9%~98%. However, the benign bone tumor normal bone tissue were negative in the staining. The expression of P27 protein was not correlated to Dahlin's type and Price's grade but closely correlated with WHO classification as well as PCNA LI. Furthermore, the patients with a P27 LI less than 48.4% showed a better survival rate than those with a P27 LI more than 48.4%. Conclusion P27 protein expression is closely related to survival in osteosarcoma and PCNA, suggesting that P27 protein may serve as a valuable marker for diagnosis and an indicator to predict the prognosis of osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma; P27 protein; immunohistochemistry; prognosis

p27是新近发现的一种潜在肿瘤抑制基因,属于CDKIS(Cyclin-dependent kinase inhibitos)家族。已有研究表明,p27基因及其表达产物对人体多种恶性肿瘤的增殖和分化有调控作用[1,2],而在骨肉瘤中的研究,国内外尚未有报道。本研究应用S-P法检测80例人体骨肉瘤中P27蛋白的表达,以探讨其与骨肉瘤细胞增殖活性及其预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

80例骨肉瘤选自1968~1993年附属大坪医院存档病例。其中男性52例,女性28例,肿瘤侵犯软组织74例(92.5%),肿瘤直径5~25 cm,平均10 cm,组织学分级参照Price分级法,组织学分型参照Dahlin标准和1993年WHO分型。全部病例均随访,总体2年存活率33.8%,5年存活率18.3%。此外选用15例骨瘤,12例骨软骨瘤,10例正常骨作对照组。

1.2 免疫组化染色

全部标本均经10%福尔马林固定,石蜡包埋,5 μm连续切片,增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和

作者简介:仲召阳(1977—),男,江苏省连云港市人,医师,主要从事骨肉瘤与血管的关系方面的研究。电话:(023)68757384
收稿日期:1999-10-05;修回日期:2000-01-03

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

P27 单克隆抗体均为 Dako 公司产品，加强型 S-P 法进行免疫组化染色。用已知 P27 阳性的直肠癌作阳性对照，PBS 液取代第一抗作阴性对照。

1.3 结果判定及统计学处理

每张切片观察 5 个具有代表性的高倍视野(× 400)，计数 400 个细胞 P27 阳性细胞数。PCNA 标记计数(Labeling index，LI)＝PCNA 阳性细胞数/观察的肿瘤细胞数× 100%；P27 LI＝p27 阳性细胞数/观察的肿瘤细胞数× 100%，根据 p27 LI 将标记结果分为 0～Ⅲ级：0 级阴性(＜ 10%)；Ⅰ级(10%～30%)；Ⅱ级(30%～66%)；Ⅲ级(＞ 66%)。P27 蛋白表达与骨肉瘤临床病理的关系，应用 Pearson χ^2 检验进行统计学分析，P27 LI 与 PCNA LI 相关性采用 Spearman 秩和相关检验，以中位数将 P27 染色结果分为高表达与低表达两组，统计两组骨肉瘤存活期，并行 Long-rank 检验。

2 结果

2.1 P27 蛋白免疫组化染色结果

P27 阳性产物呈棕褐色细颗粒状，主要位于胞核，部分可见于胞浆内。阳性细胞呈弥漫或灶性分布，见图 1。P27 标记指数在 0%～97.5%，平均指数 51.5%，中位数 48.4%，80 例骨肉瘤免疫组化染色结果阴性 14 例(17.5%)，Ⅰ级 24 例(30%)，Ⅱ级 14 例(17.5%)Ⅲ级 28 例(35%)。正常骨、骨肉瘤边缘反应性新生骨和良性骨肿瘤未见着色。

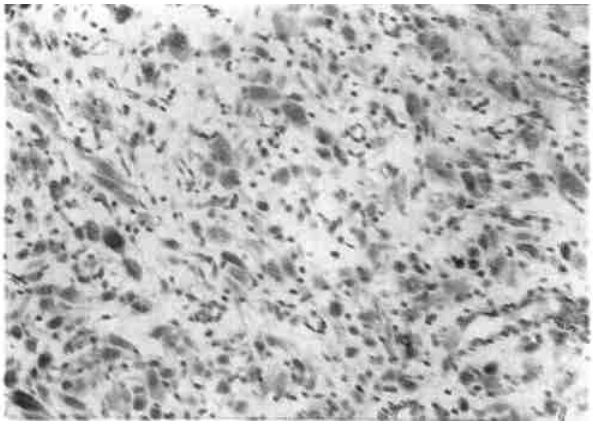


图 1 骨肉瘤 P27 蛋白免疫组化染色，阳性反应主要定位于细胞核，部分可见与胞浆 (S-P× 200)

Fig 1 Immunohistochemical staining of P27 protein in osteosarcoma The positive product is most localized in nuclear of tumor cell, a little in cytoplasm (S-P× 200)

2.2 PCNA 免疫组化染色结果

PCNA 的表达呈颗粒状阳性，定位于细胞核，见图 2。骨肉瘤中骨母细胞、纤维母细胞、软骨母细胞、小圆细胞、多核巨细胞，对 PCNA 均呈阳性表达。随着骨肉瘤分化程度不同，PCNA 表达亦呈显著异质性。PCNA 的标记指数为 9%～98%，平均指数为 54.5%。

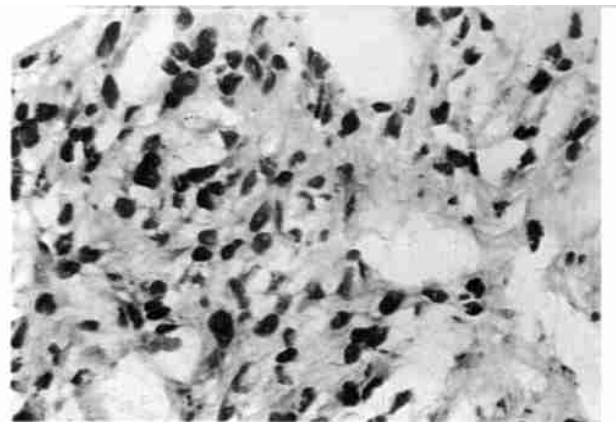


图 2 骨肉瘤 PCNA 免疫组化染色，阳性反应主要定位于细胞核 (S-P× 200)

Fig 2 Immunohistochemical staining of P27 protein in osteosarcoma, the positive product is most localized in nuclear of tumor cell (S-P× 200)

2.3 P27 蛋白表达与骨肉瘤临床病理关系

P27 蛋白表达与患者的年龄、性别、肿瘤的大小，Price 分级和 Dahlin 氏分型无关，而与 WHO 分型密切相关，即 WHO 分型中高分化型 P27 蛋白表达明显低于其它类型(P＜ 0.05)，见表 1。

表 1 P27 蛋白表达与骨肉瘤临床病理关系

Tab 1 The relationship between the expression of p27 protein and clinicopathological data in osteosarcoma

Parameter	n	P27 negative	P27 positive			P
		—	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	
Sex						
male	52	9	16	10	17	＞0.05
female	28	5	8	4	11	
Tmor size (cm)						
＜10	39	6	11	8	14	＞0.05
≥10	41	8	13	6	14	
Invade the soft tissue						
Invasion	74	13	22	13	26	＞0.05
Uninvasion	6	1	2	1	2	
Price's grading						
Ⅰ	12	2	3	3	4	
Ⅱ	30	5	11	5	9	＞0.05
Ⅲ	38	7	10	6	15	
Dahlin's classification						
Osteoblastic	24	3	6	5	10	
Chondroblastic	25	6	7	4	8	＞0.05
Fibroblastic	24	4	8	4	8	
mixed type	7	1	3	1	2	
WHO classification						
Well-differentiated	14	6	4	3	1	＜0.05
Classic	59	8	17	11	23	
Telangiectatic	4	0	1	0	3	
Small type	3	0	2	0	1	

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

2.4　P27 蛋白表达与 PCNA 的关系

本组骨肉瘤中 PCNA 高表达者 P27 多显示为高表达, 经 Spearman 秩和相关检验, 等级相关系数 $r_s = 0.445$ ($P < 0.01$), 提示 PCNA 和 P27 之间存在显著正相关。

2.5　P27 蛋白表达与骨肉瘤病人预后的关系

本组肿瘤 P27 蛋白 LI 中位数为 48.4%, 以此将骨肉瘤分为高表达组和低表达组, 行 log-rank 检验。Log-rank 检验结果: $\chi^2 = 7.37$, 两者相差显著 ($P < 0.05$), 表明 P27 高表达组骨肉瘤患者的生存期较低表达组显著缩短。

3　讨论

本研究 P27 蛋白在良性肿瘤及正常骨中不表达, 而在骨肉瘤中表达率高达 82.5%, 提示 P27 蛋白可作为骨肉瘤诊断和鉴别诊断的标记物, 具有一定的临床实用价值。

p27 基因是最近发现的 CDKIS 家族成员之一, 在细胞的增殖和分化调控中起着非常重要作用。人 p^{27Kip1} 由 198 个氨基酸组成的热稳定蛋白, 与 p^{27Kip1} 在 N 端具有高度同源性, 其 N 端 28～87 位的 60 个氨基酸具有 2 个 Ser 磷酸化点, 具有 Cdk 激酶抑制作用, 153～169 位的 17 个氨基酸序列为核定位序列, 与细胞周期的调控功能密切相关[3]。p27 对肿瘤细胞、上皮细胞、胚胎成纤维细胞及接近体内状态的实质性细胞的原代培养物均表现为抑制作用, 使细胞滞留于 G_1 期[4]。在前列腺[5]、乳腺、结直肠癌[6]及肺部恶性肿瘤[1]中 p27 表达越低, 肿瘤的分级越高, 恶性程度越大, 预后越差, 复发的可能性越大, 而且转移的肿瘤 P27 蛋白表达的强度及数量显著低于原发灶肿瘤。本研究结果则与此相反, 显示骨肉瘤分化越低, 增殖指数越高, p27 的表达越强。有作者在对软骨肉瘤的研究也出现类似结果[7], 提示上述差异可能与癌和肉瘤的组织异质性有关。另一方面在有些肿瘤中发现 p^{27Kip1} 的突变, 沉默突变构成了 p27 基因的局部位点的多态现象[8], Morosetti 等[9]提出了野生型 p27(wild-type p27)概念, 这也可能是上述结果的原因之一。

PCNA 是 DNA 聚合酶 δ的一种辅助蛋白, 分子量为 3.6×10^4, 主要合成于 G_1 和 S 期, 可作为组织学原位 G_1 和 S 期的标记物。本研究显示 p27 和 PCNA 呈显著正相关。已知 p27 是 CDKIS 家庭成员之一, 是一种潜在的抑制基因, 上述免疫组化检测结果的矛盾性, 可能是 p^{27Kip1} 基因结构和调控复杂性的反映, 其机制有待于今后进一步研究。此外, P27 蛋白表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小及 Dahlin 分型、Price 分级均无关, 而与 WHO 骨肉瘤新分型密切相关, 同时我们通过对 80 例随防资料的骨肉瘤病例进行研究, 结果表明 P27 LI > 48.4%比 P27 LI < 48.4%的骨肉瘤预后差, 提示 P27 蛋白检测可能是一项判估骨肉瘤病人预后有价值的指标。

参考文献:

[1] Kawana H, Tamaru J, Tanaka T, *et al*. Role of $P^{27 Kip 1}$ and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer[J]. Am J Pathol, 1998, 153(2): 505－513.

[2] Yasui W, Kudo Y, Semba S, *et al*. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor P^{27Kip1} is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinoma[J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88(7): 625－629.

[3] Luo Y, Huorwitz J, Massagu J. Cell-cycle inhibitor by independent CDK and PCNA binding domains in p^{21Kip1}[J]. Nature, 1995, 375(6 529): 159－161.

[4] Bullrich F, Maclachlan T K, Sang N, *et al*. Chromosomal mapping of members of the cdc2 family of protein kinases, cdk3, cdk6, PISSLRE and PITALRE, and a cdk inhibitor, p^{27Kip1}, toregions involved in human cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55(6): 1 199－1 205.

[5] Yang R M, Naitoh J, Murphy M, *et al*. Low p27 expersion predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer [J]. J Urol, 1998, 159(3): 941－945.

[6] Thomas G V, Szigeti K, Murphy M, *et al*. Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenoma metastases[J]. Am J Pathol, 1998, 153(3): 681－687.

[7] 龙汉安, 张贤良, 魏于全, 等. P27 蛋白在软骨肉瘤中表达的意义[J]. 癌症, 1998, 17(4): 257－258.

[8] Ferrando A A, Balb M, Pend A M, *et al*. Mutational analysis of the human cycle-dependent kinase inhibitor p^{27Kip1} in primary breast carcinoma[J]. Science, 1996, 97(1): 91－94.

[9] Morosetti R, Kawamata N, Gombart A F, *et al*. Alterations of the p^{27Kip1} gene in non-Hodgkin's lymphoma and adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. Blood, 1995, 86(5): 1 924－1 930.

（编辑　薛国文）

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