

# p27 和 CyclinE 在宫颈鳞癌表达及其与临床病理特征关系

Expressions of p27 and CyclinE in Cervical Squamous Epithelial Carcinoma and Their Relationship with Clinicopathological Features // WU Hong-lian, LV Jie-qiang

吴红莲, 吕杰强

(温州医学院附属第六医院 丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000)

**摘要:** [目的] 探讨宫颈鳞状细胞癌组织中 p27 和 CyclinE 的表达及其与临床病理因素和预后的关系。[方法] 采用免疫组化二步法检测 70 例宫颈鳞癌 (CSES)、30 例宫颈鳞状上皮内瘤变 (CIN) 以及正常宫颈组织 (NCE) 中 p27 和 CyclinE 的表达, 并分析两者的表达与 CSEC 患者临床病理因素及预后的关系。[结果] p27 蛋白在 CSEC、CIN 和 NCE 中的阳性表达率分别为 42.9%、76.7% 和 96.0%; 而 CyclinE 的阳性表达率则分别为 64.3%、26.7% 和 6.0%。p27 和 CyclinE 蛋白表达均与组织学分级、间质浸润、淋巴结转移以及脉管浸润有关 ( $P < 0.05$ ), 两者的表达呈显著负相关 ( $r = -0.504, P < 0.01$ )。[结论] CyclinE 高表达伴 p27 低表达提示肿瘤的高侵袭性及不良预后。

**关键词:** 宫颈肿瘤; 癌, 鳞状细胞; p27; CyclinE; 免疫组化

**中图分类号:** R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)05-0364-04

宫颈癌是我国女性最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁妇女健康<sup>[1]</sup>。细胞周期调节失控导致细胞无限制生长, 从而引起肿瘤。本文旨在探讨细胞周期调控因子 p27 和 CyclinE 在宫颈癌中的表达及其与临床病理因素的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取丽水市人民医院病理科 2002 年 1 月至 2005 年 1 月确诊的手术切除宫颈鳞癌 (cervical squamous epithelial carcinoma, CSEC) 石蜡包埋病例 70 例, 均具有完整的临床、病理及随访资料。所有病例均为初治者, 术前均未接受放射治疗或化学药物治疗。年龄 35~67 岁, 平均年龄 47.5 岁, 其中 <45 岁 31 例, ≥45 岁 39 例。按病理学分级: I~II 级 29 例, III 级 41 例。按 FIGO 标准分期: Ia 期 16 例, Ib 期 17 例, IIa 期 17 例, IIb 期 20 例。局部癌灶大小: <4cm 38 例, ≥4cm 32 例。根据术后病理肌层浸润程度: 浅肌层及以下 28 例, 浅肌层以上 42 例; 伴脉管浸润 29 例, 无脉管浸润 41 例; 伴随淋巴结转移者 19 例, 无淋巴结转移者 51 例。选取同期宫颈活检组

收稿日期: 2012-03-06; 修回日期: 2012-04-06

组织病理学检查证实为宫颈鳞状上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 患者 30 例, 年龄 31~56 岁, 平均 41.2 岁。其中, CIN I 8 例, CIN II 9 例, CIN III 13 例。另选取 50 例正常宫颈组织 (normal cervical squamous epithelium, NCE) 作为对照。

### 1.2 试剂

即用型 p27 鼠抗单克隆抗体、CyclinE 鼠抗单克隆抗体、SP 免疫组化染色超敏试剂盒购自福建迈新生物技术公司。

### 1.3 实验方法

采用免疫组织化学二步法分别检测标本中 p27 和 CyclinE 的表达, 以购买的阳性片免疫组化染色结果为阳性对照。以 PBS 替代第一抗体的免疫组化染色结果为阴性对照。

按说明书操作, 石蜡切片经过二甲苯脱蜡→梯度酒精脱水→抗原修复→柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复→过氧化物酶阻断溶液阻断内源性过氧化物酶→封闭非特异性抗原→加一抗→过夜→二抗→三抗 (链霉素抗生物素蛋白—过氧化物酶溶液)→DAB 染色→苏木素复染→脱水、透明→封片。

### 1.4 结果判断

免疫组化切片在光镜下按统一放大倍数 (×400 倍), 由两位有经验的病理科医师一起观察 CyclinE

和 p27 在不同组织中的表达情况。

p27 和 CyclinE 的染色程度判断:p27 和 CyclinE 的染色主要表达于细胞核,但 p27 在胞浆中有弱表达。染色结果以染色强度结合阳性细胞数百分比综合计分作定性分析。组织切片中细胞核染为棕褐色或棕黄色者为阳性细胞标志。阳性表达判断参照 Caide 等<sup>[6]</sup>的计数方法,放大 400 倍镜下计数 5 个视野,阳性细胞率=阳性细胞数/总细胞数×100%,对于视野中肿瘤细胞阳性程度不同时,取明显着色者计数。肿瘤细胞阳性程度:切片中阳性细胞率>5%为阳性病例,5%~25%为(+)计为 1 分,26%~50%为(++)计为 2 分,>50%为(+++)计为 3 分,<5%为阴性病例(-),计为 0 分。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学分析。计数资料采用  $\chi^2$  检验,相关分析采用 Spearman 等级相关分析。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 p27 在 CSEC、CIN 及 NCE 表达

在 NCE 组中 p27 阳性表达多数位于表层分化完毕的细胞核中,胞浆弱表达,而在 CSEC 组中胞核呈阳性表达,胞浆弱表达,见图 1。p27 阳性表达率在 NCE 中最高,而在 CSEC 中最低,见表 1。在组织学分级 III 级、淋巴结转移阳性、脉管浸润阳性及间质浸

表 1 CSEC、CIN 和 NCE 中 p27 及 CyclinE 蛋白表达的比较

组别	例数	p27					阳性率(%)	CyclinE					阳性率(%)
		-	+	++	+++	-		+	++	+++			
CSEC	70	40	12	10	8	42.9	25	11	14	20	64.3		
CIN	30	7	13	5	5	76.7	22	4	2	2	26.7		
NCE	50	2	8	15	25	96.0	47	2	1	0	6.0		

注:p27 和 Cyclin E 表达,CSEC 与 CIN 或 NCE 比较,均  $P<0.05$ 。

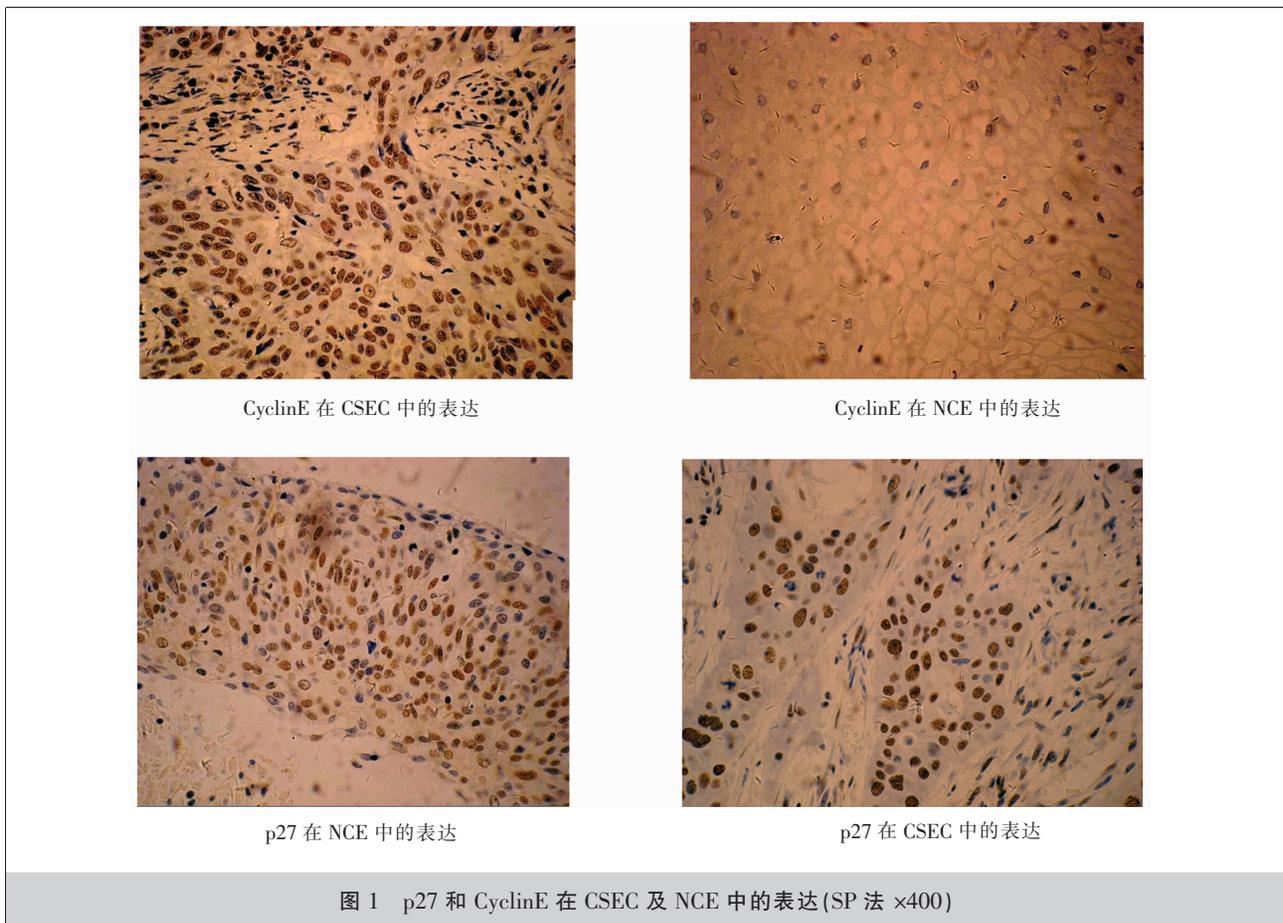


图 1 p27 和 CyclinE 在 CSEC 及 NCE 中的表达(SP 法 ×400)

润(浅肌层以上)中, p27 阳性表达率显著降低, 见表 2。p27 蛋白阳性表达组的 5 年生存率明显高于其阴性表达组( $P < 0.05$ ), 见图 2。

### 2.2 CyclinE 在 CSEC、CIN 及 NCE 表达

CyclinE 的阳性表达位于细胞核。在 CSEC 细胞核中呈强阳性, 在 CIN 中呈阳性或弱阳性, 在 NCE 中呈阴性, 偶见弱阳性表达, 见图 1。CyclinE 蛋白的阳性表达率在 CSEC 中最高, 在 NCE 中最低, 见表 1。CSEC 中 CyclinE 表达与组织学分级、间质浸润、盆腔淋巴结转移和脉管浸润显著相关, 见表 2。CyclinE 蛋白阳性表达组的 5 年生存率明显低于其阴性表达组( $P < 0.05$ ), 见图 3。

### 2.3 CSEC 中 p27 及 CyclinE 表达的相关性

经统计学 Spearman 等级相关分析发现, CSEC 中 p27 与 CyclinE 蛋白表达呈显著负相关( $r = -0.504$ ,  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

### 3.1 p27 在 CSEC 中的表达及意义

p27 蛋白是细胞分化中的关键抑制因子, 可防止组织细胞过度增殖<sup>[2]</sup>, 与肿瘤发生、发展及预后密切相关。在人类几乎所有的上皮性肿瘤中都有 p27

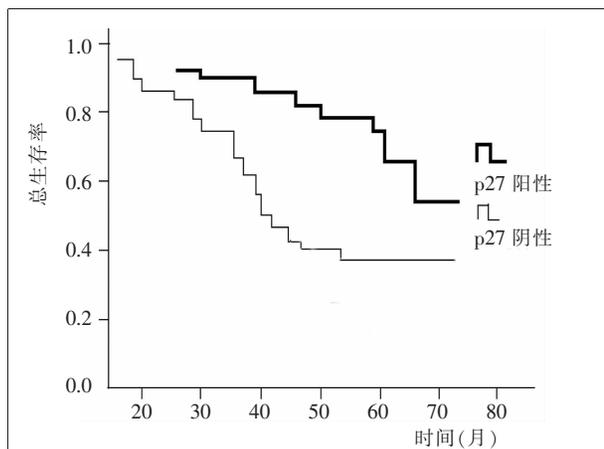


图 2 p27 蛋白表达与 CSEC 预后的关系

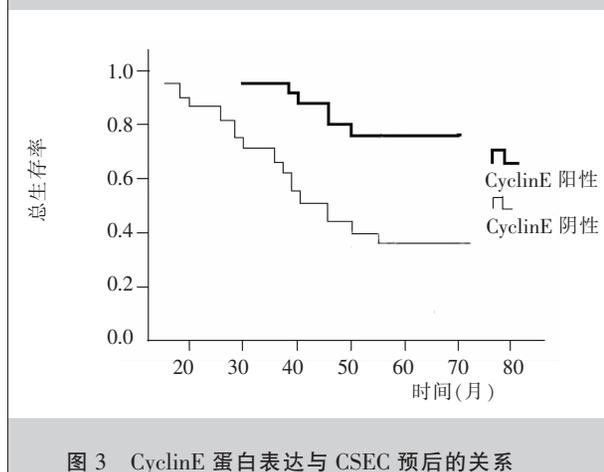


图 3 CyclinE 蛋白表达与 CSEC 预后的关系

表 2 宫颈癌中 p27 及 CyclinE 蛋白的表达与临床病理因素的关系

临床病理参数	例数	p27					P	CyclinE					P	
		-	+	++	+++	阳性率(%)		-	+	++	+++	阳性率(%)		
组织学分级														
I~II 级	29	12	8	4	5	58.6	0.025	16	4	3	6	44.8	0.004	
III 级	41	28	4	6	3	31.7		9	7	11	14	78.0		
临床分期														
I 期	33	16	7	4	6	51.5	0.167	12	8	4	9	63.6	0.915	
II 期	37	24	5	6	2	54.2		13	3	10	11	64.9		
年龄(岁)														
<45	31	18	7	2	4	42.0	0.890	11	6	7	7	64.5	0.971	
≥45	39	22	5	8	4	43.6		14	5	7	13	64.1		
癌灶大小(cm)														
<4	38	21	7	5	5	44.7	0.729	13	4	9	12	65.8	0.775	
≥4	32	19	5	5	3	40.6		12	7	5	8	62.5		
间质浸润														
浅肌层及以下	28	11	4	6	7	60.7	0.015	15	5	4	4	46.4	0.011	
浅肌层以上	42	29	8	4	1	31.0		10	6	10	16	76.2		
淋巴结转移														
阴性	51	23	9	11	8	54.9	0.001	23	8	10	10	54.9	0.007	
阳性	19	17	2	0	0	10.5		2	3	4	10	89.5		
脉管浸润														
阴性	41	15	11	8	7	46.3	0.000	21	6	5	9	48.8	0.001	
阳性	29	25	1	2	1	13.8		4	5	9	11	86.2		

蛋白表达的下降或缺失,且随恶性程度的增加其表达呈下降趋势。在乳腺癌<sup>[3]</sup>、食管癌、前列腺癌<sup>[4]</sup>等研究证实:p27蛋白的表达强度与肿瘤的组织学分级、生存期明显相关。本研究中p27蛋白在CSEC→CIN→NCE的阳性表达率逐渐升高,这与Skomedal等<sup>[5]</sup>在宫颈癌的研究结果相似,表明p27是宫颈癌的抑制因素,宫颈癌中p27的下调消除了对细胞周期的抑制,使细胞无限地增殖,导致肿瘤发生。肿瘤的分化程度影响患者的预后,本研究显示p27的表达随着肿瘤分化程度降低,阳性表达率逐渐下降,这提示p27与肿瘤的生物学恶性行为有关。同时本研究结果显示,p27的阳性表达率与临床分期、患者年龄及肿瘤大小无明显关系,而与淋巴结转移、间质浸润深度和脉管浸润显著相关。这可能与p27的下调降低细胞间的黏附能力,使肿瘤易于发生转移。另外从本研究中还发现p27阳性表达组生存率明显高于阴性表达组。以上均提示p27低表达或表达缺失与肿瘤的发生、恶性进展相关,并提示预后不良。

### 3.2 CyclinE在CSEC中的表达及意义

CyclinE在细胞周期的G<sub>1</sub>晚期和S期表达,且在G<sub>1</sub>/S期达到峰值。CyclinE蛋白的过早及过高表达可加速细胞进入S期,促进细胞的增殖。CyclinE-CDK2复合物的作用被认为是启动DNA复制及进入S期的重要调节因素,而其作用与细胞中的CyclinE的表达水平及CDK2的激酶活性密切相关。G<sub>1</sub>期的缩短,减少了细胞对生长因子的依赖性,从而有利于肿瘤的发生。有学者在乳腺癌、胃癌<sup>[6]</sup>中均发现CyclinE基因的扩增出现在细胞癌变的早期。本研究中发现CyclinE在CSEC中的阳性表达率明显高于CIN及NCE,在CIN中的阳性表达率也高于NCE,由此推断CyclinE过表达参与CSEC的发生及恶性进展。本研究中分析了CyclinE蛋白的表达与临床病理因素之间的关系。结果显示CyclinE蛋白的表达随肿瘤组织学分化程度降低,阳性表达率呈增高趋势。另外从本研究中还发现CyclinE阳性表达组生存率明显低于CyclinE阴性表达组。以上表明CyclinE的过度阳性表达与CSEC的发生发展密切相关,可能是影响宫颈癌分化、进展及淋巴结浸润机制的重要因素之一,并提示预后不良。其原因可能是CyclinE过度表达促使细胞通过G<sub>1</sub>期进入S期,使细胞过度增殖失控而致肿瘤形成。

### 3.3 p27和CyclinE在CSEC中表达的相互关系

本研究显示,p27与CyclinE蛋白表达呈负相关。随着宫颈癌分化程度降低,CyclinE的表达逐渐增高,而p27的表达逐渐降低。研究发现CyclinE在多种肿瘤中有基因扩增及过表达,在肿瘤的发生、发展中起重要作用,并且已经被证实是一种癌基因。其主要在G<sub>1</sub>晚期发挥正性调控作用,通过与CDK结合,使CDK活化,促进细胞周期由G<sub>1</sub>期向S期转化。p27是一种细胞周期抑制剂,主要通过CyclinE-CDK2的结合,抑制CDK的活性而发挥抑癌作用,阻止细胞进入S期而停滞于G<sub>1</sub>期,如两者失调将导致细胞增殖和恶变,提示它们之间可能存在负反馈调节机制。已有研究证实<sup>[7]</sup>,多种实体肿瘤中p27表达下调和CyclinE过度表达,可能是通过共同途径参与肿瘤的发生、发展,并认为联合两者的检测,有益于指导临床辅助治疗及筛选不良预后。

总之,本实验通过联合检测p27和CyclinE在CSEC中的表达,提示CyclinE的高表达和p27的低表达或表达缺失可能与肿瘤的发生发展关系密切,两者联合检测对判断CSEC的恶性倾向和评估预后具有重要的参考价值,为临床上进一步了解宫颈癌的生物学行为、判断预后、指导术后临床辅助治疗提供帮助。

### 参考文献:

- [1] 郑荣寿,张思维,吴良有,等.中国肿瘤登记地区2008年恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2012,21(1):1-12.
- [2] Ray A,James MK,Larochelle S,et al. p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes[J]. Mol Cell Biol,2009,29(4):986-999.
- [3] 陈海霞,武培敬.p27蛋白在乳腺癌中的表达[J].肿瘤学杂志,2002,8(2):96-97.
- [4] Dreher T,Zentgraf H,Abel U,et al. Reduction of PTEN and p27kip1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer.Analysis in radical prostatectomy specimens and needle biopsies [J]. Virchows Arch,2004,444(6):509-517.
- [5] Skomedal H,Kristensen Gb,Lie AK,et al. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53,MDM2,p27,cdk4,cyclin D1,RB,and EGFR in cervical carcinomas[J]. Gynecol Oncol,1999,73(2):223-228.
- [6] Kravtsov VG,Shakhmurov MG,Sukmanov OV,et al. Expression of cycline-dependent kinase p27 in the low differentiated gastric adenocarcinoma [J]. Arkh Patol,2006,68(5):14-16.
- [7] Kim YT,Zhao M.Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma[J].Yonsei Med J,2005,46(5):597-613.