

p27^{kip1}、E2F-1 在胃癌中的表达及其相关性研究邵培双¹ 金晓明² 孙晓东³ 王天真² 姜洋^{2,1}

(1 哈尔滨医科大学附属第五医院门诊部 大庆 163316; 2 哈尔滨医科大学病理教研室 哈尔滨 150086

3 黑龙江省大庆油田总医院病理科 大庆 163316)

摘要 目的:研究 p27^{kip1} 蛋白、转录因子 E2F-1 在胃癌中的表达及其与胃癌病理参数之间的关系,并探讨二者相关性。方法:应用免疫组化 S-P 法,对 90 例胃癌患者的癌组织、34 例癌旁正常胃黏膜进行检测,分析 p27^{kip1}、E2F-1 蛋白表达及其与胃癌病理参数之间的关系。结果:p27^{kip1} 在正常胃组织、胃癌组织中的阳性率分别为 55.9%(19/34)、31.1%(28/90),二者差异有统计学意义($p<0.05$),其阳性表达率与胃癌组织的浸润深度($p<0.05$)、组织学分型($p<0.01$)、分化程度($p<0.01$)、淋巴结转移($p<0.05$)均相关;E2F-1 在正常胃组织、胃癌组织中的阳性率分别为 17.6%(6/34)、36.7%(33/90),二者差异有统计学意义($p<0.05$),其阳性表达率与胃癌的组织学分型相关,而与胃癌的浸润深度($p>0.05$)、分化程度($p>0.05$)、淋巴结转移无关($p>0.05$)。结论:p27^{kip1} 在胃癌组织中的表达明显低于在正常组织,相反,E2F-1 蛋白在胃癌组织中的表达却明显增强;p27^{kip1} 蛋白表达与胃癌的浸润深度、组织学分型、分化程度、淋巴结转移等病理参数相关;E2F-1 表达与胃癌的组织学分型相关;p27^{kip1}、E2F-1 在胃癌中的表达呈负相关。

关键词: 胃癌;p27^{kip1};E2F-1;免疫组织化学**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** AThe Expression and Clinical Role of p27^{kip1} and E2F-1
in Gastric Carcinoma and Their Correlation

SHAO Pei-shuang, JIN Xiao-ming, SUN Xiao-dong, et al

(The Fifth affiliated Hospital of Harbin Medical University, Daqing 163316, Heilongjiang, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical role of p27^{kip1} and E2F-1 in gastric carcinoma (GC) and their correlation. **Methods:** 90 primary gastric carcinoma specimens and 34 tumor sideward normal mucosa specimens were immunohistochemically examined. The expression of p27^{kip1} and E2F-1, including their correlation and clinicopathologic parameters, was analysed. **Results:** The positive rates of p27^{kip1} in normal and tumor mucosas were 55.9%(19/34) and 31.1%(28/90) respectively, which was related to depth of infiltration (DI) of GC tissue ($P<0.05$), classification of histology (CH), degree of differentiation (DD), and metastasis of lymphonodus (ML). There was statistical difference between the two. The positive rates of E2F-1 in normal and GC tissues were 17.6%(6/34) and 36.7%(33/90), which was related to DI of GC ($P>0.05$), CH, DD ($P>0.05$), but not related to ML($P>0.05$). **Conclusion:** The expression of p27^{kip1} in GC tissue was much lower than that in the normal tissue. On the contrary, the expression of E2F-1 in GC tissue obviously increased. Abnormal protein expression of p27^{kip1} and E2F-1 was considered involving in origination and/or progression of gastric carcinoma, and might be a useful prognostic indicator in patients with gastric carcinoma.

Key words: Gastric carcinoma; p27^{kip1}; E2F-1; Immunohistochemistry

细胞周期与肿瘤发生、发展的关系是当前肿瘤研究的热点之一,细胞周期的动态过程有赖于正、负因子的调控。p27^{kip1} 作为细胞周期依赖性激酶抑制物 (Cell Cycle Dependent Kinase Inhibitor CKI),通过与细胞周期素 E (cyclinE) 或 cyclinE- 细胞周期依赖性激酶 (Cycle Dependent Kinase CDK) 复合物结合,调控细胞周期,发挥抑癌基因的作用;转录因子 E2F-1 与二聚体伴侣蛋白 (DimErization Partner Protein, DP) 结合形成有功能的异二聚体后,结合到靶基因启动子中特殊的 DNA 序列(5' TTTSSCGC3', S = C 或 G) 上,调节基因转录,在细胞增殖分化及肿瘤抑制与形成过程中既受 cyclins、CDK、CKI、Rb 等上游基因的调控,又控制着一系列下游基因的表达,从而起到癌基因作用^[1]。在细胞周期中,E2F-1 作用的发挥必然受到 p27^{kip1} 等 CKI 的间接抑制。本研究采用免疫组织化学方法对胃癌组织及癌旁正常组织进行了 p27、E2F-1 的检测,探讨其表达情况

与胃癌组织学类型、分化程度、浸润深度、淋巴结转移等的关系及二者相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源

大庆油田总医院 2003 年 1 月至 2005 年 5 月胃癌根治术均经病理证实为胃癌的存档石蜡块 90 例,男性 62 例,女性 28 例,年龄 32~84 岁,平均年龄 57 岁。胃癌组织伴转移淋巴结者 44 例,无淋巴结转移者 46 例,同时取手术残端正常胃黏膜 34 例。90 例标本中组织学分型为管状腺癌 18 例,乳头状腺癌 5 例,低分化腺癌 49 例,黏液癌 13 例,印戒细胞癌 5 例;按癌组织浸润深度分为黏膜层 8 例,固有肌层 19 例,浆膜及浆膜外 63 例;按分化程度分为低分化腺癌 67 例,高、中分化腺癌 23 例。所有病例术前未经放疗和化疗治疗。

1.2 免疫组化

1.2.1 免疫组化试剂

兔抗人 E2F-1 多克隆抗体博士德生物工程公司提供,鼠抗人 p27^{kip1} 单克隆抗体 (9002)、S-P 试剂盒、DAB 显色试剂盒均由北京中山生物制品有限公司提供。

作者简介:邵培双,女(1969-),大学,副主任护师,

病理学硕士,主要研究方向:肿瘤病理学;

E-mail:peishuangshao626@163.com

(收稿日期:2006-08-10 接受日期:2006-10-28)

1.2.2 免疫组化操作

采用 S-P 法,按照免疫组化常规步骤操作。p27kip1 单克隆抗体稀释浓度为 1:40,E2F-1 多克隆抗体稀释浓度为 1:50,40℃ 过夜。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定标准

p27kip1 以细胞核出现棕黄色颗粒、E2F-1 以细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞。在 400 倍光镜下至少观察 10 个视野,在每个视野(不重复不重叠)内记数 100 个肿瘤细胞或正常胃黏膜细胞,按阳性细胞数在同类细胞中所占比率大于 5% 为 (+)。

1.4 统计学方法

采用 χ^2 检验及 Fisher 精确概率算法,在 spss10.0 软件下操作。 $P \leq 0.05$ 说明存在统计学意义。

2 结果

2.1 p27kip1 在正常胃组织及胃癌中的表达(图 1)

p27kip1 在正常胃组织中的表达与其在胃癌组织中的表达相比,差异有显著意义($\chi^2=6.4335, p<0.05$)。其结果见表 1:

表 1 p27kip1 在正常胃组织及胃癌中的表达

Table 1 The expression of p27kip1 in normal mucosas and gastric carcinoma

类型	例数	+	-	阳性率
正常胃组织	34	19	15	55.9%
胃癌组织	90	28	62	31.1%

2.2 p27kip1 的表达与胃癌的临床关系

p27kip1 在管状腺癌中的表达高于其在低分化腺癌中的表达($\chi^2=14.2708, p<0.01$),在高中分化胃癌中的表达高于其在低分化胃癌中的表达($\chi^2=16.7687, p<0.01$)。在无淋巴结转移胃癌中的表达高于有淋巴结转移胃癌中的表达($\chi^2=4.5615, p<0.05$)。p27kip1 的表达与浸润深度呈负性相关(p27kip1 的表达中,浸润粘膜及粘膜下层的胃癌与浸润肌层的胃癌相比较,按精确概率法计算, $P=0.0214$;与浸润到浆膜及浆膜外的胃癌比较 $\chi^2=6.38, p<0.05$;浸润肌层的胃癌与浸润到浆膜及浆膜外的胃癌比较 $\chi^2=4.01, p<0.05$ 。其差异均有显著意义)。其结果见表 2:

表 2 p27kip1 的表达与胃癌的临床关系

Table 2 The relationship between p27kip1 and gastric carcinoma

临床资料	例数	+	-	阳性率
组织学类型				
乳头状腺癌	5	3	2	60.0%
管状腺癌	18	12	6	66.7%
低分化腺癌	49	9	40	18.4%
粘液腺癌	13	3	10	23.1%
印戒细胞癌	5	1	4	20.0%
分化程度				
高中分化	23	15	8	65.2%
低分化	67	13	54	19.4%
淋巴结转移				
有	44	9	35	20.5%
无	46	19	27	41.3%
浸润深度				
粘膜及粘膜下层	9	6	3	66.7%
肌层	18	9	9	50.0%
浆膜及浆膜外	63	13	50	20.6%

2.3 E2F-1 在正常胃组织及胃癌中的表达(图 2)

E2F-1 在正常胃组织中的表达与其在胃癌组织中的表达相比,差异有显著意义($\chi^2=4.14, p<0.05$)。其结果见表 3

表 3 E2F-1 在正常胃组织及胃癌中的表达

Table 3 The expression of E2F-1 in normal mucosas and gastric carcinoma

类型	例数	+	-	阳性率
正常胃组织	34	6	28	17.6%
胃癌组织	90	33	57	36.7%

2.4 E2F-1 的表达与胃癌的临床关系

E2F-1 在管状腺癌、粘液腺癌中及低分化胃癌中的表达较高,而与分化程度、淋巴结转移及浸润深度无关(E2F-1 的表达,高中分化的胃癌与低分化的胃癌相比较 $\chi^2=0.0808, p>0.05$;有淋巴结转移的胃癌与无淋巴结转移的胃癌相比较, $\chi^2=0.0034, p>0.05$;浸润粘膜及粘膜下层的胃癌与浸润肌层的胃癌相比较,按精确概率法计算, $P=0.4631$,与浸润到浆膜及浆膜外的胃癌比较 $\chi^2=0.0103, p>0.05$ 。浸润肌层的胃癌与浸润到浆膜及浆膜外的胃癌比较 $\chi^2=0.8508, p>0.05$) 其差异均无统计学意义。其结果见表 4

表 4 E2F-1 的表达与胃癌的临床关系

Table 4 The relationship between E2F-1 and gastric carcinoma

临床资料	例数	+	-	阳性率
组织学类型				
乳头状腺癌	5	1	4	20.0%
管状腺癌	18	8	10	44.4%
低分化腺癌	49	17	32	34.7%
粘液腺癌	13	7	6	53.8%
印戒细胞癌	5	0	5	0.0%
分化程度				
高中分化	23	9	14	39.1%
低分化	67	24	43	35.8%
淋巴结转移				
有	44	16	28	36.4%
无	46	19	27	41.3%
浸润深度				
粘膜及粘膜下层	9	3	6	33.3%
肌层	18	5	13	27.8%
浆膜及浆膜外	63	25	38	39.7%

2.5 p27kip1 与 E2F-1 在胃癌中表达的相关性

p27kip1 表达阳性者 E2F-1 表达少,二者呈负相关。见表 5:

表 5 p27kip1 与 E2F-1 在胃癌中表达的相关性

Table 5 The correlation between p27kip1 and E2F-1

p27kip1	E2F-1		χ^2	p
	+	-		
+	6	22	4.06	<0.05
-	27	35		

3 讨论

肿瘤的发生、发展与细胞周期失控密切相关,细胞周期的顺利进行和完成依赖于一系列正负调节因子的相互作用,这些

因子主要有细胞周期素 (Cyclins)、细胞周期素依赖性激酶 (CDKs)、细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 (CKIs)。p27^{kpl} 蛋白是 CKIs 家族成员之一, Koff^[1] 于 1993 年发现, 其基因定位于染色体 12P12.0-13.1, 主要抑制 CyclinD-CDK2、CyclinE-CDK 2 等 G1 期激酶复合物, 阻止细胞由 G1 期向 S 期转化。p27^{kpl} 蛋白基因缺失、突变罕见于人类肿瘤, 但其蛋白水平在多种肿瘤中明显下降^[1]。Yasui 等报道 p27^{kpl} 阳性表达率和表达强度的降低与胃癌的进展期、浸润深度、淋巴结转移有显著相关性^[1]。王福生^[9]等发现胃癌中 p27^{kpl} 蛋白的表达与分化程度、淋巴结转移显著相关, 认为在胃癌中低表达反映了其恶性进展。研究中 p27^{kpl} 蛋白的降低与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移显著相关, 表明在胃癌进展中逐渐失去了作为细胞周期调控的负调节能力, 使癌细胞的恶性程度升高。因此, 检测 p27^{kpl} 在胃癌中的表达可反映胃癌的临床生物学行为, 从而间接预示胃癌患者的预后。

E2F-1 是转录因子 E2F 家族的成员, 通过与二聚体伴侣蛋白 (Dimerization Partner protein, DP) 结合形成有功能的异二聚体后, 结合到靶基因启动子中特殊的 DNA 序列上, 调节基因转录, 在细胞增殖分化及肿瘤形成过程中发挥作用。在 G1 早期与去磷酸化的 pRb 结合的 E2F-1/DP1 无生物学活性, 不能完成转录。在 G1 中后期去磷酸化的 pRb 被 cyclin D/ cdk4/ 6 和 cyclin E/ cdk2 所催化而磷酸化, 导致了 E2F1/DP1 的释放, 这种异源二聚体与 c-myc、DNA 聚合酶 α 、CDK、cyclin D1 等几个在细胞分裂进入 S 期所需的生长调控基因的启动子上的 E2F 位点结合, 激活了它们的转录, 使细胞进入 S 期。在 S 期, 通过 cyclin A/ cdk2 和 cyclin A/ cdc2 的催化, E2F-1/DP1 磷酸化, E2F-1 再次失活, 使细胞进入 G2/M 期^[6]。当细胞通过 M 期进入下一个细胞周期时, pRb 去磷酸化并再次结合到 E2F-1 上。因此, 在 G1 中后期和 S 期, E2F-1 的时控激活是正常细胞周期进展的关键。实验也证明 E2F-1 的过表达可引起大鼠胚胎成纤维母细胞向肿瘤细胞转化^[7]。本研究发现, 胃癌组织中的 E2F-1 呈高表达 (36.7%), 而癌旁正常黏膜中呈低表达 (17.6%), 说明在 E2F-1 胃癌中起癌基因作用。同时 E2F-1 在管状腺癌、粘液腺癌中及低分化胃癌中的表达较高, 而与不同分化程度、浸润深度的胃癌及有无淋巴结转移的胃癌之间无显著差异, 又说明

E2F-1 的高表达与胃癌发生有关, 并且是胃癌发生演进中的早期关键步骤。这与 Yasui 等^[1]对胃癌中 E2F-1 表达的研究及司晓辉^[9]对颌骨软骨瘤中表达的研究结果相符合。

4 结论

p27^{kpl} 在胃癌组织中的表达明显低于在正常组织, 其表达与胃癌的浸润深度、组织学分型、分化程度、淋巴结转移等病理参数相关; 相反, E2F-1 蛋白在胃癌组织中的表达却明显增强, 其表达与胃癌的组织学分型相关; p27^{kpl} 与 E2F-1 在胃癌中表达的呈负性相关, 对胃癌病人联合检测 p27^{kpl} 与 E2F-1 表达水平, 有助于判断病人预后, 为术后及时采取化疗及基因治疗提供可靠依据。

参考文献

- [1] 夏可义, 肖强, 陆云飞, 等. E2F-1 在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2005, 12(2): 124-126
- [2] Koff A, Otsuki M, Polyak K, et al. Negative regulation of G1 in mammalian cell; inhibition of cyclinE dependent kinase by TGF- β [J]. Science, 1993, 260: 536-539
- [3] Hengst L, Read SI. Translational control of p27^{kpl} accumulation during the cell cycle [J]. Science, 1996, 271: 1861-1864
- [4] Yasui W, Kudo Y, Semba S, et al. Reduced expression of cyclin dependent kinase inhibitor p27 KIP1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinoma [J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88: 625-629
- [5] 王福生, 蒋丹斌, 宋怀宇, 等. p27kip1 在胃癌中的表达与临床病理分期和预后的关系 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2000, 16(6): 487-488
- [6] Krek W, Xu G, Livingston DM. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of a S phase checkpoint [J]. Cell, 1995, 83(7): 1149-1158
- [7] Yang XH, Siadek TL. Overexpression of the E2F-1 transcription factor gene mediates cell transformation [J]. Gene Expr, 1995, 4: 195-204
- [8] Yasui W, Naka K, Suzuki T, et al. Expression of P27 Kip1, cyclin E and E2F-1 in primary and metastatic tumors of gastric carcinoma [J]. Oncol Rep, 1999, 6: 983-987
- [9] 司晓辉. 颌骨软骨肉瘤中 E2F-1 表达及意义 [J]. 北京口腔医学, 2000, 8(3): 125-127

(图 1, 图 2 请见封 3)

肖惟丹 (上接第 72 页)

- [3] Vanherweghem JL. Misuse of herbal remedies: the case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy) [J]. Altern Complement Med, 1998, 4(1): 9-13
- [4] Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, et al. Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? [J]. Kidney Int, 1994, 45(6): 1680-8
- [5] Pirani L, Salinas-Madrigal L, Koss MN. Evaluation of percutaneous renal biopsy. In: Sommers SC, ed. Kidney pathology decennial [J]. New York: Appleton-Lentury-Crofts, 1975: 109-163
- [6] 叶志斌, 崔若兰. 服用木通煎剂引起肾脏损伤 1 例 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 570
- [7] 唐政. 轻度肾小球病变伴严重小管间质损害, 中草药导致的肾损害 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1998, 7(5): 494-9
- [8] 崔太根, 王海燕, 尚明英. 药典法定剂量关木通对大鼠肾功能及间质

影响的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(2): 106-13

- [9] 赵青. 结缔组织生长因子在肾间质纤维化中的表达及其意义 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, 2: 21
- [10] 谌贻璞, 陈文. 马兜铃酸肾病存在四种临床病理类型 [J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(6): 406-407
- [11] 陈扬为. 马兜铃酸肾病的认识及防治 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(1): 46-47
- [12] 黄枝优, 何秀田. 马兜铃酸肾病的临床研究状况 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13(8): 494-495
- [13] 张勉之, 张大宁. 补肾活血法治疗马兜铃酸肾病 65 例 [J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(1): 30
- [14] 俞东容, 毛黎明. 马兜铃酸肾病及其防治 [J]. 浙江中医学院学报, 2002, 26(1): 22-23
- [15] 李红霞. 马兜铃酸肾病研究概况 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2004, 68: 145-147

光交联剂 SANPAH 在处理后的牛颈静脉血管表面接枝生物短肽 RGD

乔 刚 胡建国 吴忠仕 李小冰 赵向东 高 华

(中南大学湘雅二医院心胸外科 410011)

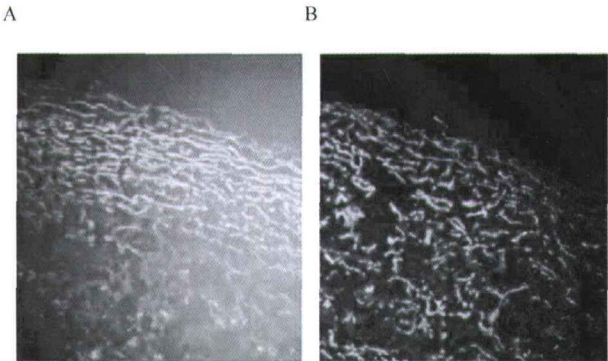


图 1 不同波长激发的胶原本身的荧光对比 (单纯去细胞后的血管切片)
Picture.1 The fluorescence of collagen itself under different wave-length light

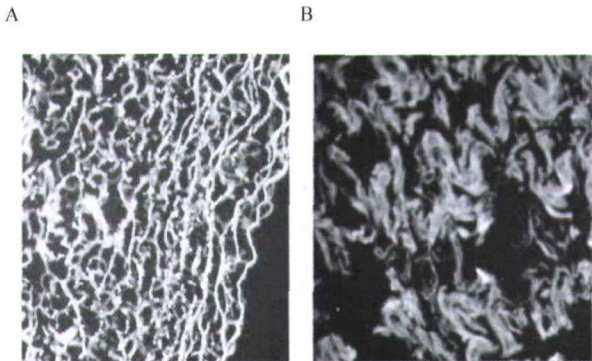


图 2 单纯 GRGDSPK-FITC 涂覆血管片的荧光照相
Picture.2 Only coating GRGDSPK-FITC on the vessel patches directly

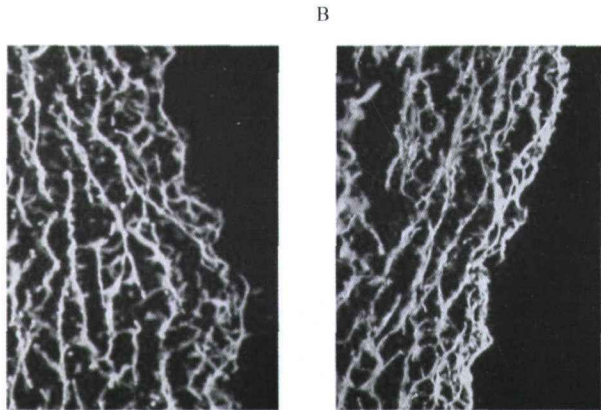


图 3 单纯涂覆 GRGDSPK-FITC 和应用光交联剂 SANPAH 接枝 GRGDSPK-FITC 的荧光照片对比
Picture.3 The contrast between using SANPAH grafting and coating GRGDSPK-FITC directly on the vessel patches

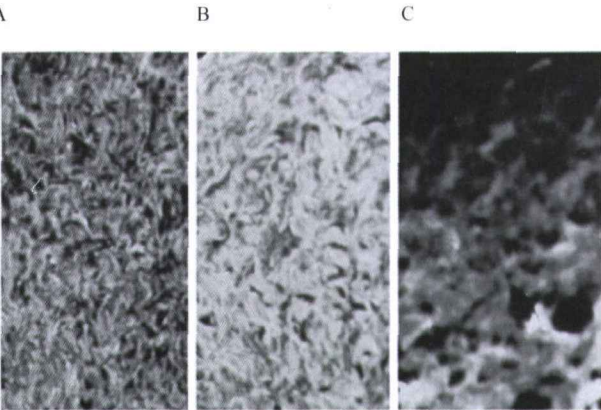


图 4 GRGDSPK-FITC 与 SANPAH 不同摩尔比的荧光照片
Picture.4 Different mole ratios of GRGDSPK-FITC and SANPAH

(正文请见第 81 页)

p27^{kip1}、E2F-1 在胃癌中的表达及其相关性研究

邵培双¹ 金晓明² 孙晓东³ 王天真² 姜 洋^{2,1}

(1 哈尔滨医科大学附属第五医院门诊部 大庆 163316; 2 哈尔滨医科大学病理教研室 哈尔滨 150086)
3 黑龙江省大庆油田总医院病理科 大庆 163316)

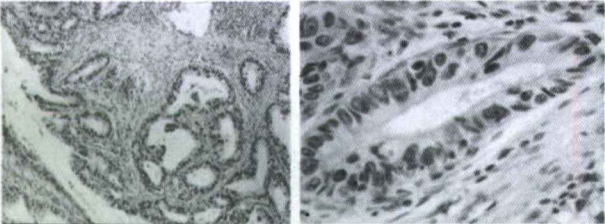


图 1 p27^{kip1} 免疫组化检测, 癌细胞胞核呈阳性表达。
sABC 法, ×115。右图为局部放大, ×460。
Figure.1 and figure 4 the expression of p27^{kip1} in gastric carcinoma

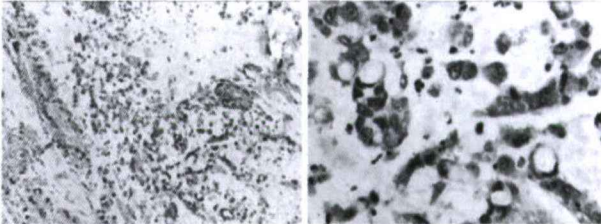


图 2 E2F-1 免疫组化检测, 癌细胞胞浆呈阳性表达。
sABC 法, ×115, 右图为局部放大×460。
Figure.2 and figure 4 the expression of E2F-1 in gastric carcinoma