

人脑星形细胞瘤中 p27 kip1 蛋白和增殖细胞核抗原 PCNA 表达的变化 *

张丽红¹ 齐 蕾² 单丽辉² 柴翠翠² 韩 伟² 王立峰^{2△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院放射科 黑龙江 哈尔滨 150001 ;

2 哈尔滨医科大学附属第一医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 :目的 研究 p27^{kip1} 蛋白和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在星形细胞瘤中的表达与肿瘤病理分级的关系 探讨 p27^{kip1} 蛋白在星形细胞瘤演变过程中的意义。方法 SP 免疫组化法对 64 例星形细胞瘤的 p27^{kip1} 蛋白和 PCNA 表达进行观察。结果 随着病理级别的升高 ,p27^{kip1} 阳性细胞百分率降低 ,而 PCNA 则相反 ,两者的表达成显著负相关。结论 p27^{kip1} 表达的缺失可能与星形细胞瘤的发生发展密切相关 ,PCNA 能较客观地反映肿瘤的恶性程度。

关键词 :p27^{kip1} 蛋白 ;PCNA ;星形细胞瘤 ;免疫组织化学

中图分类号 :R739.41 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2011)20-3919-04

Expression and significance of p27kip1 and PCNA in human brain astrocytomas*

ZHANG Li-hong¹, QI Lei², SHAN Li-hui², CHAI Cui-cui², HAN Wei², WANG Li-feng^{2△}

(1 Department of radiology, The First Hospital of the Harbin Medical University, 150001, Harbin, China; ;

2 Department of Pathology, The First Hospital of the Harbin Medical University, 150001, Harbin, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of the p27^{kip1} and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in human brain astrocytomas and relationship with the pathology grade and discuss the value of p27^{kip1} in astrocytoma development. **Methods:** SP immunohistochemical analysis was used for detection the expression of p27^{kip1} and PCNA in 64 astrocytomas. **Results:** The percents of p27^{kip1} positive labeling cells decreased along with the growing of pathology grade in human astrocytomas. However, PCNA was on the contrary, a significant negative correlation is observed between the p27^{kip1} and PCNA. **Conclusion:** The decreased p27^{kip1} protein expression might play an important role in the genesis and development of human brain astrocytomas, immuohistochemical analysis of PCNA might be useful in deciding the grade of malignant of astrocytoma.

Key words: p27^{kip1} protein; PCNA; Astrocytoma; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification: R739.41 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)20-3919-04

前言

p27^{kip1} 是一个广谱细胞周期素依赖性激酶(CDK)抑制剂,被认为是一种抑癌基因^[1]。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)与细胞周期有密切关系,可反映处于增殖状态的肿瘤细胞数量,用以判定肿瘤的恶性程度。我们的前期研究发现 p27^{kip1} 在胃癌和胃肠道类癌中均与肿瘤的分化程度有关,并与 Ki-67 的表达呈负相关^[2-3]。但 p27^{kip1} 在人脑星形细胞瘤中的研究鲜见报道。本研究利用 SP 免疫组化方法观察 p27^{kip1} 蛋白及 PCNA 在人脑星形细胞瘤中的表达情况以及两者的相关性,进而探讨 p27^{kip1} 蛋白在人脑星形细胞瘤发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

取自哈尔滨医科大学第一临床医学院 1999~2000 年胶质

瘤手术标本的存档蜡块 64 例,其中毛细胞性星形细胞瘤 2 例,星形细胞瘤 II 级 19 例,星形细胞瘤 III 级 22 例,星形细胞瘤 IV 级 21 例,正常脑组织标本 6 例,取自非脑病死亡的尸体解剖脑标本的存档蜡块。

1.2 试剂

即用型鼠抗人 p27 蛋白单克隆抗体及即用型鼠抗人 PCNA 单克隆抗体均购自 Maxium 公司。SP 试剂盒购自福州迈新公司。

1.3 方法

辣根过氧化物酶标记的 SP 法,即:石蜡切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢-甲醇封闭 5min, PBS (pH7.2)漂洗后置 EDTA (pH8.0)中,微波炉抗原修复 5min, PBS 漂洗后依次滴加一抗 4℃过夜,二抗 37℃15min,辣根酶标记的链酶卵白素工作液 15min, PBS 漂洗后 DAB 显色,自来水充分冲洗终止反应,苏木素复染,脱水,透明,封片。以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

* 基金项目 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1155G33)

作者简介 张丽红,女,硕士,副主任医师,主要研究方向:肿瘤学

△通讯作者 王立峰,电话:Tel:13604805297, E-mail: hljwlf@yahoo.cn

(收稿日期 2011-05-23 接受日期 2011-06-18)

1.4 结果判定

p27kip1 与 PCNA 均以肿瘤细胞核棕褐色染定义为免疫组化阳性 (反应性星形细胞和血管周围淋巴细胞不计为阳性细胞)。每张切片随机计数三个高倍视野(400)中至少 1000 个肿瘤细胞中的阳性肿瘤细胞数 ,计算阳性肿瘤细胞百分比 ,即阳性肿瘤细胞百分比 阳性细胞数 / 计数肿瘤细胞数 100%。按组织切片中肿瘤细胞的显色比例进行半定量 :- (无阳性细胞) ,+ (阳性细胞 25%) ,++ (阳性细胞 25%~50%) ,+++ (阳性细胞 75%)。

1.5 统计学处理

应用 SPSS10.0 软件进行数据处理 ,计数资料采用 X^2 检验 ,p27kip1 与 PCNA 间的关系采用直线相关分析。检验水准 $\alpha =0.05$, $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 p27kip1 蛋白在人脑星形细胞瘤中的表达

p27kip1 蛋白阳性表达表现为细胞核染成棕褐色 (图 1) ,阳性细胞多呈弥漫性 ,局灶性分布 ,并且肿瘤的病理分级愈高 ,p27kip1 蛋白的表达愈低(见表 1)。

表 1 p27kip1 蛋白在人星形细胞瘤中的表达
Table 1 Expression of p27kip1 in human brain astrocytomas

WHO grade	p27kip1				Total	Positive rate (%)
	-	+	++	+++		
Normal (A group)	2	1	2	1	6	66.67* [#]
Grade I~II(B group)	12	8	1	0	21	42.86\$
Grade III(C group)	20	2	0	0	22	9.09*
Grade IV(D group)	20	1	0	0	21	4.76 ^{##}

$X^2=25.388$; $P=0.03$

Note: Expression of p27kip1 was significantly correlated with the grade of brain astrocytomas ($X^2=25.388$ $P=0.03$); * $P<0.05$
A group compared with C group; # $P<0.01$ A group compared with D group; \$ $P<0.01$ B group compared with D group.

2.2 PCNA 在人脑星形细胞瘤中的表达

PCNA 阳性表达表现为细胞核染成棕褐色(图 2) ,阳性细

胞多呈弥漫性 ,局灶性分布 ,并且肿瘤的病理分级愈高 ,PCNA 的表达愈高(见表 2)。

表 2 正常脑组织及星形细胞瘤中 PCNA 的表达
Table 2 Expression of PCNA in normal brain tissue and human brain astrocytomas

WHO grade	PCNA				Total	Positive rate (%)
	-	+	++	+++		
Normal (A group)	6	0	0	0	6	0.0*
Grade I~II(B group)	13	6	2	0	21	38.10 [#]
Grade III(C group)	8	4	6	4	22	63.64* ^{##}
Grade IV(D group)	6	10	1	4	21	71.43 ^{\$}

$X^2=26.182$ $P=0.002$

Note: Expression of PCNA was significantly correlated with the grade of brain astrocytomas ($X^2=26.182$ $P=0.002$); * $P<0.05$
A group compared with C group; # $P=0.085$ B group compared with C group; \$ $P=4.414$ C group compared with D group.

2.3 p27kip1 蛋白与 PCNA 在人脑星形细胞瘤中表达相关性的分析(见表 3)

通过对肿瘤中 p27kip1 蛋白与 PCNA 在人脑星形细胞瘤中表达的相关性分析 ,我们发现 ,两者呈明显的负相关。

表 3 p27kip1 蛋白与 PCNA 在人脑星形细胞瘤中表达的相关性分析
Table 3 Correlation analysis of p27kip1 expression and PCNA expression in human brain astrocytomas

WHO grade	Positive rate of p27kip1 (%)	Positive rate of PCNA (%)
Normal (A group)	66.67	0.0
Grade I~II(B group)	42.86	38.10
Grade III(C group)	9.09	63.64
Grade IV(D group)	4.76	71.43

Note : $r=-0.985$, $P=0.015$

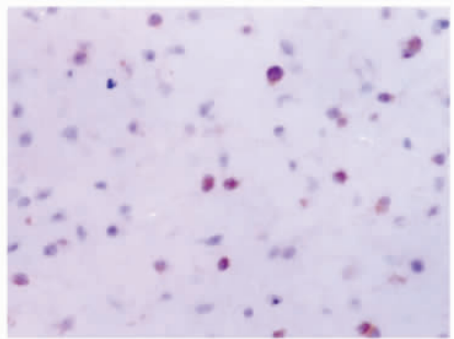


图1 人脑星形胶质细胞瘤 II 级(WHO 分类)中 p27kip1 免疫组化染色, 阳性产物定位于肿瘤细胞的细胞核(400×)

Fig.1 brain astrocytomas II (WHO) ,the positive expression of p27kip1 was in the nuclei of tumor cells(400×)

3 讨论

细胞增殖是生命的基本特征之一。真核细胞的细胞周期包括 G1、S、G2、M 期。在真核生物细胞周期中起调节核心作用的分子包括:细胞周期蛋白(又称周期素)、细胞周期蛋白依赖激酶和细胞周期依赖激酶抑制蛋白。目前抑制进入 S 期的蛋白包括两组:(1)视网膜母细胞瘤基因的蛋白产物和其相关蛋白 P170 和 P130;(2)两个 CDK 抑制家族:一个是 Ink4 家族,包括 p16Ink4a, p15Ink4b, p18Ink4c, p19Ink4d^[4-5],主要抑制 CyclinD 依赖激酶 cdk4 和 cdk6;另一个是 Cip/Kip 家族,包括 p21^{Cip/WAF1}、p27^{Kip1} 和 p57^{Kip2}。与 Ink4 家族不同,Cip/Kip 家族的蛋白都有 60 个同源残基氨基酸,能和许多不同的细胞周期蛋白与细胞周期蛋白依赖激酶的结合物相互作用,发挥其抑制作用^[6-7]。

p27^{Kip1} 作为 CDK 抑制剂(CDI)家族的一员,通过与 DK 或细胞周期素-CDK 复合物结合,抑制酶活性,具有阻止细胞通过 G1/S 期转换的“关卡”作用,从而抑制细胞的增殖,使细胞有机会修复损伤的 DNA 或 DNA 复制中产生的错误,因而 p27^{Kip1} 通常被认为是一种抑癌基因。尽管 p27^{Kip1} 的编码基因很少发生重组和突变,但其表达水平的降低与人类许多肿瘤的预后不良有关。Takayuki H 等人发现 p27^{Kip1} 低表达增加肿瘤转移机会,影响患者的预后,可作为一个浸润行为和不良预后指标^[8]。Sun X 等人在 CT26 结肠癌小鼠模型中研究发现,转染 p27^{Kip1} 后可以明显抑制结肠癌肺转移瘤的形成和生长,并延长肺转移小鼠的寿命^[9]。本研究结果表明,p27^{Kip1} 蛋白在正常脑组织中的表达(66.67%)明显高于其在脑星形胶质细胞瘤中的表达(18.46%),提示 p27^{Kip1} 蛋白的表达缺失与脑星形胶质细胞瘤的发生可能有关。在星形细胞瘤 I-II、III 和 IV 中 p27^{Kip1} 蛋白的阳性率分别为 42.86%、9.09%和 4.76%,其阳性率随着星形细胞瘤恶性程度的增高而降低,表明 p27^{Kip1} 蛋白的表达缺失与人脑星形胶质细胞瘤的分化程度呈负相关,这与高宝莲等人的研究结果一致^[10]。据 Piva R 报道间变性胶质瘤中 p27^{Kip1} 表达下降,在胶质母细胞瘤中几乎检测不到 p27^{Kip1} 的表达^[11]。转染 p27cDNA 的腺病毒载体至低表达 p27^{Kip1} 蛋白的星形胶质瘤细胞中可使该细胞则失去肿瘤细胞的生长特性,且在裸鼠中不能形成肿瘤^[12]。因此 p27^{Kip1} 基因及其蛋白产物对于胶质瘤细胞的增殖有着

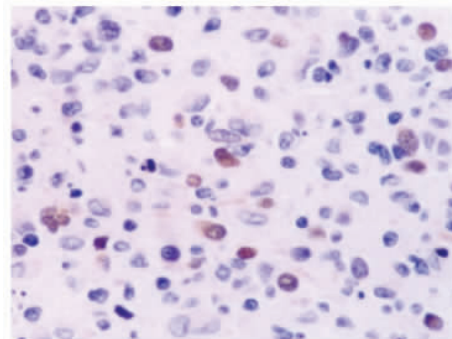


图2 人脑星形胶质细胞瘤 II 级(WHO 分类)中 PCNA 免疫组化染色, 阳性产物定位于肿瘤细胞核 (400×)

Fig.2 brain astrocytomas II (WHO) ,the positive expression of PCNA was in the nuclei of tumor cells(400×)

极其重要的调节作用,并提示它与胶质瘤的发生有着密切关系。

研究肿瘤增殖动力学的一个重要方面是检测肿瘤细胞的增殖活性,细胞增殖活性可以判断肿瘤恶性程度及评估肿瘤生物学行为,是判断肿瘤预后的重要指标,PCNA 即是其中之一。PCNA 是一种分子量为 38kD 的酸性核蛋白,它是 DNA 多聚酶的辅助蛋白,是 DNA 合成所必需的细胞周期调节蛋白,其定位于细胞核,在 G1 晚期 DNA 开始复制之前表达升高,S 期表达最高,G2 和 M 期表达下降,G0 期检测不到,所以只有处于增殖状态的细胞才能检测到 PCNA 的存在,可以较好的反映细胞增殖活性,目前多用于评价肿瘤细胞增殖活性及肿瘤生物学行为。本研究结果表明,PCNA 阳性染色定位于细胞核,被染成棕黄色。正常脑组织中 PCNA 阳性表达率极低,各级星形细胞瘤中均有不同程度的 PCNA 阳性表达,星形细胞瘤 I-II 级 PCNA 免疫组化染色阳性细胞较少,染色强度低;星形细胞瘤 III 级和 IV 级 PCNA 免疫组化染色阳性细胞明显增多,且染色强度高。高度恶性星形细胞瘤中 PCNA 表达与低度恶性星形细胞瘤比较差异有显著性,表明 PCNA 能有效地反映细胞的增殖活性和肿瘤的恶性程度,可能是星形细胞瘤的重要预后指标之一,这与 Guzinska-Ustymowicz K 等人在结直肠癌中的结果一致^[13]。对本组实验结果的统计分析发现,p27^{Kip1} 蛋白与 PCNA 的表达呈显著负相关。即随着 p27^{Kip1} 蛋白表达的减少,PCNA 的表达逐渐增多,这与在结肠癌和乳腺癌中的研究结果一致^[14-15]。表明在细胞进入增殖周期时 PCNA 开始增加并促进细胞增殖,而 p27^{Kip1} 通过与 cyclins-CDK 结合可以抑制 CDK 蛋白激酶的活性,使细胞不能通过 G1 期,抑制癌细胞 DNA 合成,从而抑制细胞的分裂、增殖和肿瘤的发生、发展。当 p27^{Kip1} 蛋白表达减少时,其抑制作用亦随之减弱,间接促进肿瘤细胞的增殖,表现为 PCNA 表达的增加。

研究表明 p27^{Kip1} 的表达受多种因素调控。Schiffer D 研究发现 p27^{Kip1} 的降解由 F-box 蛋白中具有原癌基因特点的 Skp2 所介导^[16]。Q Wang 等人报道在人结肠癌细胞中糖原合成酶激酶 3(glycogen synthase kinase-3,GSK-3)通过下调 Skp2 的表达来上调 p27^{Kip1} 的表达,并可以增加 p27^{Kip1} 与 CDK2 结合,进而通过 PI3K/Akt/GSK-3 信号通路调节肠细胞的细胞周期^[17]。Zeng JP 等人在胃癌中发现,敲除 FoxM1 基因后(FoxM1 基因

对有丝分裂基因有调节作用,可促进恶性肿瘤的发生),可以使 skp2 基因表达下调, p27kip1 表达增高,进而抑制 p53 和 p16 依赖的癌细胞的衰老^[18]。总之, p27kip1 表达的水平受多种因素调控,至于哪一种因素起决定作用及其它们之间存在何种相关性,还有待进一步研究。

综上所述,我们通过检测 p27kip1 和 PCNA 在星形细胞瘤中的表达情况,分别从细胞生长的抑制和增殖两个不同的方面反映了肿瘤细胞的分化能力。联合检测 p27kip1 和 PCNA 不仅能较全面地反映星形细胞瘤发生发展过程中细胞周期的特点,而且对预测星形细胞瘤的生物学行为也具有重要的意义,有望指导临床星形细胞瘤的治疗。但 p27kip1 蛋白在星形细胞瘤中表达机制尚不清楚,且细胞周期的调节机制又较复杂,因此对于 p27kip1 对肿瘤的影响还有待于深入研究。

参考文献(References)

- [1] Polyak K, Lee MH, Frdgment-Bromage H, et al. Clong of p27kip1, a cyclin-dependent kinases inhibitor and a potenial mediator of extracellular antimi-togenic signals [J]. Cell, 1994, 78: 59-66
- [2] 张丽红, 李争艳, 刘杨. p27kip1、Ki-67 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 哈尔滨医科大学报, 2008, 42 (4): 525-526
ZHANG Li-hong, LI Zheng-yan, Li Yang. The expression of p27kip1 and Ki-67 and their significance in gastric carcinoma [J]. Journal Of Harbn Medical University., 2008, 42 (4): 525-526. (In Chinese)
- [3] 王立峰, 戚基萍, 张淑杰等. 胃肠道类癌中 p27Kip1、Ki-67、CD31 的表达及意义[J]. 诊断病理学杂志, 2006, 13(1): 73-74
Wang Li-feng, Qi Ji-ping, Zhang Shu-jie, et al. The expression of P27 kip1, Ki-67, CD31 and their significance in gastrotestinal carcinoid tumors [J]. J Diag Pathol, 2006, 13(1): 73-74 (In Chinese)
- [4] Chan FK M, Zhang J, Cheng L, et al. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4 [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15: 2682-2688
- [5] Hirai H, Roussel MF, Kato JY, et al. A Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclinD-dependent kinases CDK4 and CDK6 [J]. Mol Cell Bio, 1995, 1: 2682-2688
- [6] Sryoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-CDK protein kinases activity, is related to p21 [J]. Cell, 1994, 78: 67-74
- [7] Polyak K, Lee MH, Frdgment-Bromage H, et al. Clong of p27kip1, a cyclin-dependent kinases inhibitor and a potenial mediator of extracellular antimi-togenic signals [J]. Cell, 1994, 78: 59-66
- [8] Takayuki H, Tomoyasu I, Kenji A, et al. p19 promotes ubiquitin dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor or p27kip1 [J]. Cancer Res, 2007, 67(22) : 10789-10795
- [9] Sun X, Zhang HW, Zhang ZR. Growth inhibition of the pulmonary metastatic tumors by systemic delivery of the p27kip1 gene using lyophilized lipid-polycation-DNA complexes [J]. J Gene Med, 2009, 11: 535-544
- [10] 高宝莲, 王东林. 人脑胶质瘤中 EGFR 和 p27kip1 表达及其意义 [J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(1): 50-52
Gao Bao-lian, Wang Dong-lin. Expression of EGFR and p27kip1 in Human Glioma and their Significance [J]. Journal of Oncology, 2010, 16(1): 50-52 (In Chinese)
- [11] Piva R, Cancelli I, Cavalla P et al. Proteasome-dependent degradation of p27kip1 in glioma [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1999, 58(7): 691-696
- [12] Alleyne CH Jr, He J, Yang J, et al. Analysis of cyclin dependent kinase inhibitor in malignant astrocytomas [J]. Int J Oncol, 1999, 14(6): 1111-1116
- [13] Guzinska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemon A, et al. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer [J]. Anticancer Res. 2009, 29(8): 3049-3052
- [14] E Ioachim. Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1, p27kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features [J]. Int J Clin Pract, 2008, 62(11): 1736-1743
- [15] 代志军, 王西京, 刘小旭. 乳腺癌组织 p27Kip1 的表达及其与细胞增殖的关系 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(2): 114-116
DAI Zhi-jun, WANG Xi-jing, LIU Xiao-xu. Relationship between expression of p27Kip1 and cell proliferation in breast carcinoma tissues [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2009, 16(2): 114-116. (In Chinese)
- [16] Schiffer D, Cavalla, Fiano V, et al. Inverse relationship between p27kip1 and the F-box protein Skp2 in human astrocytic by immunohistochemistry and Western blot [J]. Neurosci Lett, 2002, 328(2): 125-8
- [17] Wang Q, Zhou Y, Wang X, et al. p27kip1 nuclear localization and cyclin-dependent kinase inhibitory activity are regulated by glycogen synthase kinase-3 in human colon cancer cells [J]. Cell Death and Differentiation, 2008, 15: 908-919
- [18] Jiping Zeng, Lixiang Wang, Qiao Li. FoxM1 is up-regulated in gastric cancer and its inhibition leads to cellular senescence, partially dependent on p27kip1 [J]. J Pathol, 2009, 218: 419-427