

细胞周期蛋白 E 及相关因子表达 与肾癌发生、侵袭及转移的相关性研究*

(430030 武汉) 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科 王江 陈安民 郭风劲 陈剑峰

【摘要】 目的 探讨肾癌细胞周期蛋白 E(cyclin E)、周期依赖性激酶 2(CDK2)和周期依赖性激酶抑制因子 P27 的表达状况及其意义。方法 应用免疫组化 SP 法及 RT-PCR 检测 37 例肾癌组织、13 例癌周正常肾组织中 cyclin E、CDK2 和 P27 蛋白及 mRNA 表达。并将上述指标与临床病理特征进行统计学分析。结果 肾癌组织中 cyclin E、CDK2 阳性表达率分别为 51.4%、43.2%，明显高于癌旁正常肾组织 ($P < 0.05$)，并且随肿瘤分级及分期的升高、肿瘤转移而升高；两者 mRNA 含量变化同蛋白表达水平相符；相反，P27 在肾癌和癌旁正常肾组织中表达量分别为 48.6%、69.2%，二者差异显著 ($P < 0.05$)，P27 表达随肿瘤分级及分期升高、肿瘤的远位转移出现降低趋势。**结论** cyclinE、CDK2、P27 参与了肿瘤形成及侵袭过程，是反映肾癌生物学特征有价值的标志物。

【关键词】 肾癌；细胞周期蛋白 E；周期依赖性激酶 2；周期依赖性激酶抑制因子 P27；转移

Expression of cyclin E and related cytokines and its correlation with neoplasia, invasion and metastasis of renal cell carcinoma. WANG Jiang, CHEN Anmin, GUO Fengjin et al. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030

【Abstract】 Objective To investigate the effects of the gene expression of cyclinE, CDK2 and P27 in renal carcinogenesis, and to explore its correlation with biological behaviors of tumor. **Methods** Immunohistochemical method and semiquantitative RT-PCR were applied to examine the expression of cyclin E, CDK2 and P27 proteins and mRNAs in 37 cases of renal cell carcinoma, 13 cases of normal renal tissues adjacent to the tumor tissues. The relationship between those indexes and clinicopathological parameters were analyzed statistically. **Results** The positive rate of cyclin E and CDK2 in renal cell carcinomas was 51.4% and 43.2% respectively, significantly higher than in paracarcinoma normal renal tissues ($P < 0.05$). The expression of cyclinE and DCK2 was positively related with grade, stage and metastasis of tumors ($P < 0.05$). On the contrary, the positive rate of P27 expression in renal cell carcinoma tissues and paracarcinoma normal renal tissues was 48.6% and 69.2% respectively with the difference being significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Abnormalities of cyclin E and CDK2 and P27 may play important roles in tumorigenesis and progression of renal cell carcinoma, and they are valuable predictors to evaluate the biological behaviors of the disease.

【Key words】 Renal cell carcinoma; cyclin E; CDK2; P27; Metastasis

肾细胞癌亦称肾腺癌，是成年人中最常见的一种肾脏肿瘤。虽然现代诊疗技术不断提高，但仍有相当数量的患者就诊时已存在转移灶（约 50%）或以转移症状就诊，其中以骨转移灶为首发症状的患者也有增多趋势。从基因着手研究肿瘤发生与转移的机制成为诊治的根本突破点。诸多研究证实细胞周期调控异常不仅是肿瘤发生的重要前提，同时也促进了肿瘤恶性增殖和转移。此类异常主要表现为细胞周期分布时相的变化和相关调控因子——细胞周期蛋白 (cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDKs) 及其抑制剂 (CKIs) 的表达异常。本试验旨在通过对周期相关基因的研究，为肿瘤早期诊疗和

进一步研究做铺垫。

材料与方法

一、材料 收集我院 2006 年 1 月~2007 年 3 月肾癌手术切除标本 37 例，其中男 22 例，女 15 例，年龄 35~78 岁，平均 61.0 岁。每例标本均切取肿瘤组织，其中 13 例取距肿瘤边缘 2 cm 以上的癌周组织（病理证实无肿瘤细胞浸润，无明显炎症等病变）。标本一半经 10% 甲醛固定备用，另一半置于液氮冻存。主要试剂：一抗 P27kip1、cyclin E、CDK2 鼠抗人抗体，二抗（羊抗鼠 IgG）及 SP 试剂盒（北京中山生物技术公司）；DAB 酶底物显色试剂盒（南京建成生物技术公司）；Trizol 试剂（Gibco 公司）；引物合成由 invitrogen 公司完成。RT-PCR 试剂盒由 Promega 公司提供。

*国家 973 重点基础研究发展规划资助项目 (No. 2002CB513107)；
通讯作者

二、实验方法

1. 免疫组化法 标本经 10% 甲醛固定后,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。步骤见 SP 试剂盒说明。已知 P27、cyclin E 及 CDK2 表达阳性的结肠癌标本作阳性对照,用 PBS 液代替一抗作阴性对照。

2. 半定量 RT-PCR 法 按照 Genebank 查询目的基因 cDNA 依据引物设计原则设计相应引物, cyclin E: 上游 5-CTGGATGTTGACTGCCTTGA-3', 下游 5-CTGGATGTTGACTGCCTTGA-3'; CDK2: 上游 5-ACTGGCATTCTCTTCCC-3', 下游 5-CTCCGTCCATCTTCATCC-3'; P27: 上游 5-CAGCTTGCCCGAGTTCTA-3', 下游 5-TCTGAGGCCAGGCTTCTT-3'; GAPDH: 上游 5-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3', 下游 5-TCTAGACGGCAGTCA GGTCCACG3'。检测 cyclin E、CDK2 和 P27 mRNA 的表达。取 50~100 mg 瘤组织,以 Trizol 试剂提取总 RNA,后用紫外分光光度计测定其纯度(A260/A280 1.8)并定量。在逆转录酶(AMV)催化下合成 cDNA,以其为模板在 TaqDNA 酶催化下进行 PCR 扩增。扩增体积 25 μl,以 GAPDH 为内参照。将 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。

三、结果判断 肿瘤组织 cyclin E、P27 表达主要在胞核中,而 CDK2 表达主要在胞浆中。以细胞核染成棕褐色或核内有棕黄色颗粒、胞浆黄褐色深染为阳性细胞。每张染色切片先用低倍镜(10 × 10)选择 5 个染色适中的视野,再换用高倍镜(10 × 40),计数视野中阳性细胞数占所有细胞数的比率及阳性细胞核中颗粒数、大小,分为如下级别:阴性(-):瘤细胞完全不染色或阳性细胞 < 10%;阳性(+):10%~50%的瘤细胞染色呈棕黄色;强阳性(++):> 50%的瘤细胞染色呈棕褐色。RT-PCR 结果置于凝胶图像分析系统(UVP 公司)进行吸光度扫描,应用 LabWorks4.5 分析软件进行定量分析,用目的基因的吸光度值与 GAPDH 吸光度的比值代表目的基因的相对表达含量。

四、统计学处理 应用 SPSS 12.0 统计软件。免疫组化结果采用 χ^2 检验和确切概率法进行统计分析,半定量 RT-PCR 结果采用方差分析。

结 果

一、免疫组化结果 cyclin E 阳性显色部位在细胞核(图 1),其在肾癌组织中阳性表达率为 51.4%;CDK2 的阳性显色部位主要在胞浆,其在肾癌组织中阳性表达率为 43.2%;P27 阳性显色部位

主要集中于胞核(图 2),其在肾癌组织中阳性表达率为 48.6%。cyclin E、CDK2、P27 的表达与临床、病理的关系见表 1。cyclin E 表达量随肿瘤分期增高而表达增强,肾癌分级越高 cyclin E 表达越强,并随癌组织的侵袭力增强而升高。同样,分期越高 CDK2 阳性表达越多,并随肿瘤侵袭转移力的增强而提高;CDK2 阳性表达各级别间比较,G1 与 G2、G3 间有显著性差异($\chi^2 = 5.00, P < 0.05$)。相反,P27 的表达量随肿瘤分期增高而减少,分级中 G1 与 G2 阳性率比较虽无显著性差异,但 G1 与 G3、G2 与 G3 比较有显著性差异($P < 0.05$),并随肿瘤恶性度升高而逐渐降低。

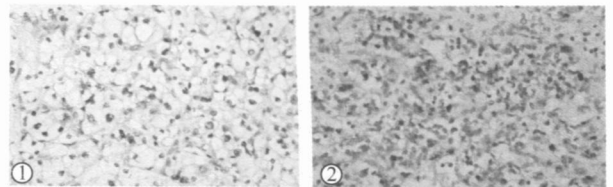


图 1 肾癌组织中 cyclin E 的阳性表达 胞核胞浆深染(DAB 显色 ×400)

图 2 肾癌组织中 P27 的阳性表达 胞核胞浆深染(DAB 显色 ×400)

二、半定量 RT-PCR 结果 电泳结果见图 3。按分期研究发现,cyclin E、CDK2 的 mRNA 含量随分期的升高而增加,P27 的 mRNA 量却呈现递减趋势(表 2),采用单因素多个样本均数比较显示,各标志物分期间均有显著性差异(P 均 < 0.05)。依分级发现 cyclin E、CDK2 的 mRNA 含量随 G1、G2、G3 逐渐增多,P27 的 mRNA 含量却逐渐减少;统计显示 cyclin E、CDK2、P27 mRNA 表达各级别间有显著性差异(P 均 < 0.05)。肾癌中 cyclin E、CDK2 的 mRNA 含量均高于癌周正常肾组织,并且转移组高于非转移组,骨转移组最高;相反,P27 的 mRNA 量随肿瘤侵袭性升高而减少,统计显示 P 均 < 0.05。

三、在肾癌组织中三种标志物表达的相关性 cyclinE 与 CDK2 的蛋白表达呈正相关($r = 0.938, P < 0.05$);而 cyclinE 及 CDK2 均与 P27 呈负相关($r_1 = -0.9284, r_2 = -0.8202, P$ 均 < 0.05)。

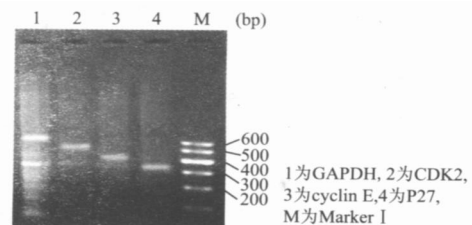


图 3 肾癌组织凝胶电泳图(RT-PCR)

表 1 cyclin E、CDK2、P27 在肾癌组织中的表达与临床、病理的关系

组别	n	cyclin E 蛋白表达				CDK2 蛋白表达				P27 蛋白表达				
		- (例)	+ (例)	~ (例)	++ (例)	阳性率 (%)	P 值 (χ ² 值)	- (例)	+ (例)	~ (例)	++ (例)	阳性率 (%)	P 值 (χ ² 值)	
TNM 分期														
T1	13	9	4		30.8		11	2		15.4		3	10	76.9
T2	9	6	3		33.3	<0.05	5	4		44.4	<0.05	4	5	55.6
T3	7	2	5		71.4	(8.69)	3	4		57.1	(7.95)	6	1	14.3
T4	8	1	7		87.5		2	6		75.0		6	2	25.0
Fuhrman 分级														
G1	9	7	2		22.2	<0.05	8	1		11.1	<0.05	3	6	66.7
G2	15	8	7		46.7	(6.59)	8	7		46.7	(5.63)	6	9	60.0
G3	13	3	10		76.9		5	8		61.5		10	3	23.1
癌周正常组织														
未转移组	23	15	8		34.8	<0.05	17	6		26.1	<0.05	8	15	65.2
转移(除骨转移)	9	3	6		66.7	(11.34)	4	5		55.6	(10.04)	7	2	22.2
骨转移	5	0	5		100		0	5		100		4	1	20.0

表 2 cyclin E、CDK2、P27 mRNA 在肾癌组织中的表达与临床、病理的关系(珉±s)

组别	n	Cyclin E	CDK2	P27
TNM 分期				
T1	13	0.19 ±0.23	0.31 ±0.33	0.39 ±0.27
T2	9	0.34 ±0.14	0.38 ±0.22	0.32 ±0.30
T3	7	0.51 ±0.35	0.61 ±0.13	0.28 ±0.16
T4	8	0.78 ±0.49	0.58 ±0.54	0.19 ±0.51
Fuhrman 分级				
G1	9	0.21 ±0.21	0.30 ±0.31	0.49 ±0.43
G2	15	0.44 ±0.51	0.41 ±0.41	0.37 ±0.33
G3	23	0.53 ±0.21	0.59 ±0.25	0.27 ±0.19
癌周正常组织				
未转移组	23	0.32 ±0.22	0.41 ±0.13	0.34 ±0.14
转移(除骨转移)	9	0.50 ±0.34	0.47 ±0.12	0.30 ±0.26
骨转移	5	0.76 ±0.51	0.63 ±0.40	0.22 ±0.25

讨 论

已有研究表明, cyclin E、CDK2、P27 在众多人类肿瘤中异常表达并具有协同作用。Chappuis 等^[1]对 288 例乳腺癌患者 cyclin E 及 P27 蛋白检测发现, cyclin E 高表达和 P27 低表达的患者预后较差, 经 COX 多元变量分析发现 cyclin E 可以作为评估乳腺癌预后的独立指标。So 等^[2]对 88 例胃癌术后标本进行免疫组化染色, 发现 cyclin E 阳性表达的肿瘤 P27 低表达, 死亡率明显升高。同样, 在对肺癌、肝癌等肿瘤的研究中发现 cyclin E、CDK2 的高表达不仅与肿瘤的病理、临床分期有关甚至同转移与否也密切相关, 直接影响到患者的预后^{[3][4]}。本实验发现: 肾癌 cyclin E 蛋白的阳性表达率

(51.4%) 明显高于癌旁正常肾组织(23.1%), 其中, 强阳性 7 例而癌周仅 1 例 ($P < 0.05$); CDK2 在癌周组织中表达为 38.5%, 也低于肾癌组织的 43.2%。cyclin E、CDK2 的 mRNA 表达显示肾癌也较癌周正常肾组织明显增高, 同多数研究结论相符。两者的过度表达及协同趋势的确参与了肾癌的发生发展过程。

此外, 部分学者认为, P27 与 cyclin E 之间存在一种正反馈作用机制。他们是基于对肿瘤早期研究结果发现 P27 及 cyclin E 均存在过度表达, 而晚期两者表达出现下调, 因此认为: 抑癌因子 P27 表达增加是由于致癌基因 cyclin E 的过度表达引起。随着肿瘤恶性度的升高, 瘤细胞生长可能转由其它癌基因调控, 而不再依赖 cyclin E 的作用, cyclin E 自然下调。进而 P27 的过表达失去反馈支撑, 随之减少。本组研究结果完全相反: 癌周组织中 P27 表达 69.2%, 明显高于肾癌组织的 48.6%, 且随转移出现表达量进一步减少。上述推断同认为 cyclin E、P27 还不足以作为评判肿瘤预后标准的观点一样, 这很可能与肿瘤异型性以及同种肿瘤的不同亚型间周期调控因子差异有关。

在对三者于肿瘤转移中作用的研究中, Yue 等^[5]对前列腺癌研究发现, 瘤组织中 cyclin E 表达较癌周组织明显增加, 同时淋巴结转移者表达更强; 与肿瘤分化、分级明显相关, 可独立地判断预后。Yasui 等^[6]采用 Western-blot、Northern-blot 及免疫组化技术对胃癌检测发现 56% 标本中无 P27 蛋白表达, 40% 标本中 P27 的 mRNA 呈低表达, P27

随肿瘤分级的升高、侵袭范围扩大、淋巴结转移而表达减少,同时 P27 与 cyclinE 呈负相关,认为 P27 可作为判定肿瘤恶性度高低的标志。Mihara 等^[7]对口腔癌组织中 CDK2 检测发现,CDK2 的过度表达明显与淋巴结转移、肿瘤分级、侵袭范围、5 年生存率相关。认为 CDK2 高表达患者预后较差。本组研究同样发现,已发生转移的患者标本中 cyclin E 蛋白阳性率(66.67%)、CDK2 (55.6%) 更有升高趋势,明显高于未转移者,转移组 cyclin E、CDK2 的 mRNA 含量也显著增加。P27 却呈现相反趋势。进一步提示:cyclin E、CDK2 阳性表达率提高、P27 的降低预示肿瘤远处转移率也提高,癌细胞的转移与细胞周期基因调控有关。

研究表明,细胞周期基因家族参与肿瘤骨转移^{[8][9]}。本试验中 5 例骨转移患者 cyclin E、CDK2 蛋白全部阳性表达,与转移组(除骨转移)比较显著增高;而 P27 蛋白表达仅 1 例阳性,骨转移中表达率明显降低。同样检测指标的 mRNA 含量与蛋白表达水平相符。说明三者对于评判肿瘤是否发生骨转移也有一定价值,但本组样本量偏少以及未取骨转移瘤分析也可能在一定程度上影响了研究结果,故对于 cyclin E、CDK2、P27 能否作为判断肿瘤骨转移的标准有待进一步研究。另外,按照公认的肾癌 TNM 分期及 Fuhrman 组织分级,Hedberg 等^[10]对人肾癌中 cyclin E、P27 的表达进行检测后得出,肾癌组织 cyclin E 的表达阳性率明显高于癌周正常组织,并有部分病例出现强阳性,cyclin E 的高表达同肿瘤分期、分级紧密相关,而 P27 阳性率随瘤体增大反而降低,P27 低表达的患者预后较差。另采用组织芯片法分析发现,传统病理类型肾癌随病理分级的提高及瘤体直径的增加,P27 表达量逐渐减少,且预后较差。本实验同样发现,随着分级、分期的升高,肾癌组织 cyclin E、CDK2 蛋白表达以及 mRNA 表达量增加。相反,P27 的含量按此分类却呈逐渐下降趋势。作为另一种验证方法,提示随肾癌恶性程度提高三者的确在转录和翻译水平上发生改变,与肿瘤的发生及转移密切相关,为肿瘤早期诊断、靶

向治疗及评估预后提供参考。但本实验中部分样本量偏少、仅取材于原发灶以及无随访资料在一定程度上影响了结果判定,需更多研究证实。

参 考 文 献

- 1 Chappuis PO, Donato E, Goffin JR et al. Cyclin E expression in breast cancer: predicting germline BRCA1 mutations, prognosis and response to treatment. *Ann Oncol*, 2005, 16(5):735
- 2 So JB, Samarasinge K, Raju GC et al. Expression of cell-cycle regulators p27 and cyclin E correlates with survival in gastric carcinoma patients. *J Surg Res*, 2000, 94(1):56
- 3 Schraml P, Bucher C, Bissig H et al. Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. *J Pathol*, 2003, 200(3):375
- 4 Zhou Q, He Q, Liang LJ. Expression of P27, cyclin E and cyclin A in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(11):2450
- 5 Yue H, Jiang HY. Expression of cell cycle regulator P57kip2, cyclinE protein and proliferating cell nuclear antigen in human pancreatic cancer: an immunohistochemical study. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(32):5057
- 6 Yasui W, Naka K, Suzuki T et al. Expression of P27kip1, cyclin E and E2F-1 in primary and metastatic tumors of gastric carcinoma. *Oncol Rep*, 1999, 6(5):983
- 7 Mihara M, Shintani S, Nakahara Y et al. Overexpression of CDK2 is a prognostic indicator of oral cancer progression. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(3):352
- 8 Huang WC, Wu D, Xie Z et al. Beta2-microglobulin is a signaling and growth-promoting factor for human prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res*, 2006, 66(18):9108
- 9 Margheri F, D Alessio S, Serrat íS et al. Effects of blocking urokinase receptor signaling by anti-sense oligonucleotides in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *Gene Ther*, 2005, 12(8):702
- 10 Hedberg Y, Ljungberg B, Roos G et al. Expression of cyclin D1, D3, E and P27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. *Br J Cancer*, 2003, 88(9):1417

收稿日期:2007-10-15

