

细胞周期蛋白E和生存素在结直肠癌中表达意义的探讨

王艳煜¹, 陈莉², 张建宾³, 王懿龄⁴ (1. 上海市奉贤区中心医院 病理科, 上海 201400; 2. 南通大学 病理教研室, 南通 226019; 3. 南通肿瘤医院, 南通 226361; 4. 上海市肿瘤医院 病理科, 上海 200032)

摘要: 目的 研究结直肠癌中细胞周期蛋白E和生存素基因的表达, 探讨其与结直肠癌的临床病理因素间的关系。方法 采用免疫组织化学SP法检测67例结直肠癌组织石蜡切片中细胞周期蛋白E和生存素蛋白的表达情况。结果 ①细胞周期蛋白E和生存素蛋白在结直肠癌中阳性表达率分别为44.77% (30/67)和49.25% (33/67); ②细胞周期蛋白E和生存素蛋白的表达率及表达强度均分别与结直肠癌的细胞分化和淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$); ③结直肠癌中细胞周期蛋白E和生存素蛋白的表达未见明显相关性 ($P > 0.05$)。结论 ①细胞周期蛋白E可能作为一种细胞周期调节蛋白在结直肠癌细胞中特异性表达, 其高表达的癌细胞常分化差, 进展快且易发生转移, 常为TNM晚期, 因此细胞周期蛋白E具有癌基因的性质; ②生存素作为一种癌蛋白, 特异性表达于结直肠癌细胞中, 与肿瘤的分化和转移密切相关, 其高表达的癌细胞常分化差, 易转移, 预后差; ③结直肠癌形成发展多步骤过程是多因素协同作用的结果, 癌基因生存素和细胞周期蛋白E激活并上调蛋白的表达; ④生存素和细胞周期蛋白E表达强度间无显著相关性, 细胞周期蛋白E过表达导致结直肠癌细胞的细胞周期从G1期转化为S期, DNA合成增加, 而生存素过表达则使DNA合成后的细胞从G2期转化为M期, 癌细胞分裂活跃, 两者的协同作用反映在癌生长和浸润转移的生物学表型特征上。

关键词: 结直肠癌; 细胞周期蛋白E; 生存素

Significance of cyclin E and survivin expression in colorectal carcinoma

WANG Yan-yu, CHEN Li, ZHANG Jian-bin, WANG Yi-ling (1. Fengxian Branch Hospital of Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 201400 China; 2. Pathology department of Nantong University, Nantong 226019, China; 3. Nantong Cancer Hospital, Nantong 226361, China; 4. Pathology Department of Shanghai Cancer Hospital, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To study expression of cyclin E and survivin gene in colorectal carcinoma and investigate their relationships with clinicopathological factors. **Methods** Immunohistochemical (IHC) study was performed in formalin-fixed paraffin-embedded sections from 67 patients with colorectal carcinoma using antibodies against cyclin E and survivin. **Results** ①IHC results showed positive rate of expression of cyclin E and survivin protein in CRC was 44.77% (30/67) and 49.25% (33/67), respectively; ②Expression rate and intensity of cyclin E and survivin were closely associated with cell differentiation and lymph node metastasis, respectively ($P < 0.05$). ③The expression correlation between cyclin E and survivin protein in CRC was not obviously ($P > 0.05$). **Conclusions** ①Cyclin E may play a role of regulating cell cycle and expressed specifically in CRC. Tumor cells with highly expressed cyclin E are often poor-differentiation, quickly-progressive, easily-metastasis as well as late stage of TNM, so cyclin E maintain the nature of oncogene; ②As an oncogene, survivin expressed specifically in CRC and closely associated with differentiation and metastasis. Tumor cells with highly expressed cyclin E are often poorly-differentiation, easily-metastasis and with poor prognosis; ③The development and progression of CRC is a result of multiple steps and multiple factors, including activation and upregulation of survivin and cyclin E; ④Survivin expression has no obvious

基金项目: 南通市级科研基金委员会资助 (S40024)

通讯作者: 王艳煜 Email: wangabigail_858@yahoo.com

relationship with expression intensity of cyclin E. Overexpression of cyclin E made tumor cells transfer from G1 stage to S stage and increase DNA synthesis, while overexpression of survivin made post-synthesised cells transfer from G2 stage to M stage and increase tumor cells division. The mutual synergistic effects between cyclin E and survivin reflects in facilitating the development and infiltration as well as metastasis of carcinoma.

Key words:Colorectal carcinoma; Cyclin E; Survivin

结直肠癌(colorectal carcinoma)为当今世界的第三大恶性肿瘤,仅次于肺癌和乳腺癌。每年全球结直肠癌新发病例大于94万,约50万死亡,居美国肿瘤死亡的第二位^[1,2]。随着人民生活水平和饮食结构的改变,我国结直肠癌的发病率呈增高趋势,已成为我国近25年来发病率增长最快的恶性肿瘤,而且经济越发达地区发病速度越快,因此有必要对结直肠癌的发病机制进行深入研究。研究证实结直肠癌的发生发展(包括侵袭和转移)是一个多阶段、多步骤、多基因参与的复杂过程,与多个癌基因的激活和过度表达、抑癌基因及DNA修复基因突变或功能缺失密切相关。目前,肿瘤细胞形成的分子机制及其与癌基因和抑癌基因的关系已成为研究热点,近年来对结直肠癌相关基因及其表达产物的检测已逐步应用于临床诊断^[43]。

细胞周期蛋白E基因定位于19号染色体1区2带,编码由395个氨基酸组成的分子量为45 kD的蛋白,通过结合并激活CKD2,使包括pRB在内的底物磷酸化失活而与E2F分离,被释放的E2F促使许多与细胞周期相关基因的转录,使细胞从G1晚期进入S期。已有研究报道细胞周期蛋白E与恶性肿瘤有关,如乳腺癌中细胞周期蛋白E过量表达与肿瘤发生及其恶性表型和不良预后密切相关。Farley等^[4]报道在卵巢癌中以免疫组织化学法检测到细胞周期蛋白E的表达高达45%,以荧光原位杂交法检测10例卵巢癌病例中有8例细胞周期蛋白E基因高表达^[4]。

生存素基因为一种凋亡抑制基因(也称存活蛋白基因),1997年由Altieri等^[5]在研究效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1)时发现。人类生存素基因位于17号染色体端粒处q25,为一个胞质蛋白,相

对分子量16.5 kD。人生存素基因具有G2/M期特异表达的特点,通过有丝分裂促进细胞的异常增殖,选择性表达于某些恶性肿瘤,而在正常成人已分化组织中不表达,在胚胎发育期广泛分布于不同胚胎组织中。Mega等研究了122例食管鳞癌标本中生存素的表达,检测出68例表达阳性,且总体情况比表达阴性患者预后差^[6]。

1 资料与方法

1.1 结直肠癌肿瘤组织标本

结直肠癌标本67例,由南通市肿瘤医院病理科提供,为2004至2005年结直肠癌手术切除组织的病理蜡块,所有标本术前均未行放疗和化疗。采用TNM分级,以双盲法对结直肠癌进行病理观察和分级:低分化癌21例(低分化腺癌、黏液腺癌、印戒细胞癌和未分化癌);高、中分化癌46例(腺癌),I期4%(3/67)、II期53%(36/67)、III期37%(25/67)、IV期4%(3/67);肿瘤浸润在黏膜层/黏膜下层16.4%(11/67)、肌层16.4%(11/67)、浆膜层67.1%(45/67);无淋巴结转移组58.2%(39/67)、淋巴结转移组41.8%(28/67),并取40例相对正常的结直肠组织(距癌变部位大于5 cm以上)。同时以PBS代替一抗为阴性对照,用已知细胞周期蛋白E和生存素蛋白阳性表达的肝癌组织为阳性对照。以20例正常结直肠组织为正常对照。

1.2 方法

1.2.1 细胞周期蛋白E和生存素蛋白表达的检测:以免疫组织化学法检测结直肠癌标本中细胞周期蛋白E和生存素蛋白的表达。

1.2.2 免疫组织化学结果判断:免疫组织化学阳性反应均呈棕黄色,肿瘤细胞中细胞周期蛋白E阳性反应定位于癌细胞核中,生存素阳性反应定位于癌细胞质或细胞膜,参照Kawaski等^[7]半定量积分法

判断结果,阳性细胞数<5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分;阳性强度淡黄色为1分,黄色为2分,棕黄色为3分。两积分相乘,0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为中等阳性(2+),9~12分为强阳性(3+)。

1.3 统计学处理

运用State 7.0软件对相关数据资料进行统计学处理。

细胞周期蛋白E和生存素指标率的比较用 χ^2 检验,等级资料的比较采用秩和检验,两样本比较采用Wilcoxon法,多样本比较采用Kruskal-Wallis法,根据不同临床病理特征分组的表达阳性率比较采用Fisher确切概率法。

2 结果

2.1 结直肠癌中细胞周期蛋白E和生存素蛋白的表达

2.1.1 细胞周期蛋白E蛋白在结直肠癌中的表达 细胞周期蛋白E阳性染色均定位于肿瘤细胞的胞核中,呈棕黄色颗粒(图1)。本组标本细胞周期蛋白E蛋白阳性表达率为44.77%(30/67),其中(+)19.6%(13/67),(2+)为13%(9/67),(3+)为11.9%(8/67)。正常结直肠黏膜上皮中无表达,阴性对照未见阳性反应(表1)。

2.1.2 生存素蛋白在结直肠癌中的表达 生存素阳性染色定位于肿瘤细胞的胞浆或胞膜上,呈棕黄色颗粒状(图2、3),阳性细胞呈弥漫或局灶分布。本组标本生存素蛋白表达总阳性率为49.25%(33/67),其中(+)为10%(7/67),(2+)为17%(12/67),(3+)为20%(14/67),正常肠黏膜中未见生存素表达,阴性对照组未见阳性反应(表1)。

2.1.3 细胞周期蛋白E蛋白和生存素蛋白表达与结直肠癌临床病理因素的关系(表1) 由表可见,细胞周期蛋白E和生存素蛋白在分化较差的组织表达率均显著高于高分化组($P < 0.05$);有淋巴结转移组均高于无淋巴结转移组($P < 0.05$);不同分期的结直肠癌细胞,细胞周期蛋白E蛋白的表达

均有显著差异(Kwallis法),进一步组间两两比较(秩和检验,ranksum法)结果I期和II期、I期和III~IV期间有显著差异($P < 0.05$),而II和III期间无显著差异($P > 0.05$)。细胞周期蛋白E蛋白表达与其他临床病理因素间的关系均无显著统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 结直肠癌中细胞周期蛋白E和生存素表达间的相关性

结直肠癌中生存素和细胞周期蛋白E表达的阳性率和阳性强度无显著相关性($P > 0.05$)(表2)。

3 讨论

细胞周期中有较多的限制点,其中G1到S期为最主要的限制点,细胞周期蛋白E作为细胞周期G1期周期素,其作用机制主要为细胞周期G1~S期限制(check point),细胞周期蛋白E与CDK2形成激酶复合体,使pRb磷酸化而加速S期,对于启动DNA复制有较为重要的意义,Ohtsubo等^[8]研究处于G1期的正常人成纤维细胞,通过微注射细胞周期蛋白E抗体,成功抑制了成纤维细胞进入S期。

本研究结果显示细胞周期蛋白E在结直肠癌中的检测率为44.77%,文献报道检出阳性率为45.20%^[9],本组的检出率略为降低,分析原因可能是本组采用的免疫组织化学两步法不能敏感性差异或抗原修复不完全等原因造成。本研究显示结直肠癌细胞周期蛋白E的表达呈细胞异质性即该蛋白表达阳性的同一标本中,并非所有的肿瘤细胞均呈阳性染色,但在分化差肿瘤细胞的表达率和阳性强度显著高于高中分化组,而TNM分期中III、IV级中的表达显著高于I~II级,说明高表达细胞周期蛋白E的癌细胞可加快DNA的合成。细胞周期蛋白E蛋白主要定位于细胞核,但偶尔也见于细胞浆中,不同亚细胞定位的原因,有文献报道是由于细胞的“shuttling”机制所致,Gloria等^[10]通过激光扫描细胞仪(laser scanning cytometry)和细胞荧光计(cytofluorometer)观察正常的纤维母细胞和肿瘤细胞株,细胞周期蛋白E在G1中期定位在细胞浆中,而在G1~S期时就转运至细胞核中,在G2~S期细胞周期蛋白E几乎测不出。

国内外研究表明生存素有较强的抗凋亡活

表 1 细胞周期蛋白E蛋白和生存素蛋白表达与结直肠癌临床病理因素的关系 [例 (%)]

	性别		年龄		组织分化		TNM分期			淋巴结转移	
	男 (43)	女 (24)	> 45 (53)	≤ 45 (14)	较好 (46)	较差 (21)	I 期 (3)	II 期 (36)	III~IV 期 (28)	阳性 (28)	阴性 (39)
细胞周期蛋白E 阳性表达	17 (40)	13 (54)	21 (40)	9 (64)	11 (24)	19 (90)	1 (33)	10 (28)	19 (68)	21 (75)	9 (23)
生存素 阳性表达	18 (42)	15 (63)	23 (43)	10 (71)	13 (39)	20 (95)	0 (0)	9 (25)	24 (86)	19 (68)	24 (36)

表 2 生存素和细胞周期蛋白E表达的关系 (例)

生存素	细胞周期蛋白E				
	总数	(-)	(+)	(2+)	(3+)
-	34	22	2	5	5
+	7	1	3	3	0
2+	12	7	4	0	1
3+	14	7	4	1	2

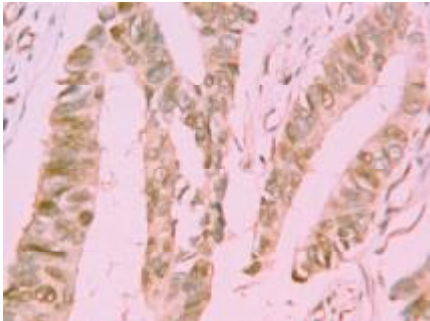


图 1 结直肠癌细胞的细胞周期蛋白E定位 (SP,400×)

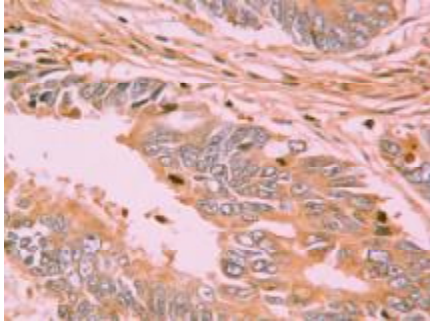


图 3 结直肠癌细胞生存素的定位 (SP,400×)

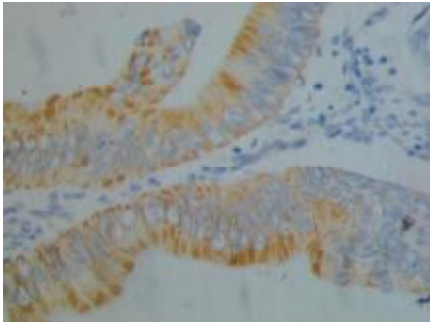


图 2 结直肠癌细胞生存素的定位 (SP,400×)

性，主要机制为在Fas，Bax和一些抗癌药物的刺激下，生存素进入细胞核并与CDK2结合，促使p27脱离CDK2/细胞周期蛋白E复合体，诱导RB磷酸化而启动细胞周期；也可与CDK4结合，使CDK4/P21复合物中的p21释放，p21与线粒体胱冬肽酶3（caspase 3）的前体结合，从而抑制细胞凋亡。生存素也可直接与激活的胱冬肽酶3和胱冬肽酶7结合，阻断凋亡过程。生存素的抗凋亡作用成为其促肿瘤细胞存活的主要机制。Hela细胞检测生存素 mRNA的表达时发现G2/M期细胞中的生存素较停留在G1/S期的增加10倍。由此可见，处于G2/M期的肿瘤细胞生存素阳性反应最强。

本研究结果显示生存素只表达于结直肠癌组织,阳性率49.25%(33/67),正常结直肠上皮细胞中无表达,表明生存素是一个癌相关基因,该结果与国外文献报道一致。本研究显示生存素的表达与结直肠癌病理分级明显相关,高中分化的结直肠癌中生存素表达阳性率和阳性强度显著低于低分化结直肠癌,且生存素高表达的肿瘤组织TNM分期常为III期和IV期,因此生存素可作为结直肠癌预后差的指标。

Ito等^[11]应用肝癌细胞株体外研究发现,生存素可以与周期素依赖蛋白激酶CDK4结合,使p21蛋白自CDK4解离。正常情况下,p21紧密结合G1期和S期的蛋白激酶复合体(细胞周期蛋白D1-CDK4和细胞周期蛋白E-CDK2)而抑制其活性,使细胞停留在G₁期,一旦p21自复合体解离则使CDK4活化,导致细胞周期蛋白E-CDK2激活和Rb磷酸化,细胞进入增殖周期,最终导致大量细胞无限制增殖。生存素过表达,细胞失去正常增殖周期凋亡“开关”(check point)的限制而使细胞增殖增加,凋亡减少,细胞增殖与凋亡的平衡被打破,最终导致肿瘤的发生。

本研究结果显示生存素和细胞周期蛋白E的表达无显著相关性,推测其可能作用机制为细胞周期蛋白E过表达导致结直肠癌细胞从G₁期转化为S期,使DNA合成增加。生存素过表达则使DNA合成后的细胞从G₂期转化为M期,两者在细胞周期调控中的作用点不同,前者主要使细胞DNA合成增多,后者促进细胞核分裂,两者的协同作用反映在肿瘤的生长和浸润转移等生物学表型特征上^[12,13]。

参考文献

- [1] Arkin DM. Global cancer statistics in the year 2000[J]. *Lancet Oncol*,2001,2:533-543.
- [2] 陈莉,孔庆尧. 病理临床与进展[M]. 上海:上海第二军医出版社,2000.19-24.
- [3] Dosaka-Akita H, Hommura F, Mishina T, et al. A risk-stratification model of non-small cell lung cancers using cyclin E, Ki-67, and ras p21: different roles of G1 cyclins in cell proliferation and prognosis[J]. *Cancer Res*,2001,61:2500-2504.
- [4] Farley J, Smith LM, Darcy KM, et al. Cyclin E expression is a significant predictor of survival in advanced, suboptimally debulked ovarian epithelial cancers: a Gynecologic Oncology Group study[J]. *Cancer Res*,2003,63:1235-1241.
- [5] Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions[J]. *Curr Opin Cell Biol*,2006,18:609-615.
- [6] Mega S, Miyamoto M, Li L, et al. Immunohistochemical analysis of nuclear survivin expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dis Esophagus*,2006,19:355-359.
- [7] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer[J]. *Cancer Res*,1998,58:5071-5074.
- [8] Ohtsubo M, Sakai H, Takano H, et al. Atypical takotsubo cardiomyopathy with preservation of apical contraction: a case report including pathological findings[J]. *J Cardiol*,2005,46:237-242.
- [9] Fields AC, Cotsonis G, Sexton D, et al. Survivin expression in hepatocellular carcinoma: correlation with proliferation, prognostic parameters, and outcome[J]. *Mod Pathol*,2004,17:1378-1385.
- [10] Juan G, Cordon-Cardo C. Intranuclear compartmentalization of cyclin E during the cell cycle: disruption of the nucleoplasm-nucleolar shuttling of cyclin E in bladder cancer[J]. *Cancer Res*,2001,61:1220-1226.
- [11] Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*,2000,31:1080-1085.
- [12] Carter BZ, Milella M, Altieri DC, et al. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia[J]. *Blood*,2001,97:2784-2790.
- [13] 黄国俊,张德超,毛友生,等. 肺癌的临床分期与外科病理TNM分期比较[J]. *中华肿瘤杂志*,2005,27:551-553.

收稿日期: 2007-12-20