

P27蛋白和PCNA在肝门部胆管癌中的表达及临床意义

李铸, 周宁新, 张德林, 吕雅莉

■背景资料

肝门部胆管癌是肝外胆管癌的主要类型, 占肝外胆管癌的58%-75%, 由于所处位置隐秘, 以往多在尸检中发现。近年来随着影像诊断技术的发展, 其发病率似有上升的趋势。

李铸, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550004
周宁新, 中国人民解放军第二炮兵总医院肝胆胃肠病研究所 北京市 100088

张德林, 贵州省人民医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550002

吕雅莉, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853

作者贡献分布: 李铸为本课题的设计者和完成者; 周宁新指导该课题的设计和论文完成; 张德林协助实验操作; 吕雅莉提供标本收集。

通讯作者: 李铸, 主治医师, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院肝胆外科。wind-xiaozhu@163.com

电话: 0851-6773015

收稿日期: 2010-05-13 修回日期: 2010-07-06

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Clinical significance of P27 and PCNA expression in hilar cholangiocarcinoma

Zhu Li, Ning-Xin Zhou, De-Lin Zhang, Ya-Li Lv

Zhu Li, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Ning-Xin Zhou, Institute of Hepatobiliary and Gastrointestinal Surgery, General Hospital of the Second Artillery Corps of Chinese PLA, Beijing 100088, China

De-Lin Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Ya-Li Lv, Department of Pathology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Zhu Li, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wind-xiaozhu@163.com

Received: 2010-05-13 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To analyze the clinical significance of P27 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in hilar cholangiocarcinoma.

METHODS: The expression of P27 and PCNA was detected by immunohistochemistry in 44 hilar cholangiocarcinoma specimens and 8 normal bile duct tissue specimens.

RESULTS: The positive rates of P27 and PCNA expression in hilar cholangiocarcinoma were 77.2% and 100%, respectively. P27 expression had a significant correlation with histological grade, lymph node metastasis and perineural

invasion. PCNA expression was associated with histological grade, lymph node metastasis and vascular invasion. The survival of patients with low or absent P27 expression was significantly lower than that of patients with high P27 expression. PCNA expression in grade III and IV cancer was associated with poor survival when compared with that in grade II cancer.

CONCLUSION: P27 and PCNA expression is associated with the development and progression of hilar cholangiocarcinoma and can be used as prognostic markers for the disease.

Key Words: Hilar cholangiocarcinoma; P27; Proliferating cell nuclear antigen; Immunohistochemistry

Li Z, Zhou NX, Zhang DL, Lv YL. Clinical significance of P27 and PCNA expression in hilar cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2478-2482

摘要

目的: 探讨P27蛋白和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在肝门部胆管癌的表达及临床意义。

方法: 免疫组织化学方法测定44例肝门部胆管癌中P27蛋白与PCNA的表达情况, 并与8例正常胆管组织进行对照分析。

结果: 肝门部胆管癌P27表达的阳性率为77.2%(34/44), PCNA为100%(44/44)。P27的表达与肿瘤的分化、淋巴转移及神经浸润显著相关($P<0.05$), 与年龄、性别、肿瘤浸润深度、肿瘤分型、血管转移、临床分期等无显著相关。而PCNA的阳性表达与肿瘤的分化、淋巴转移及血管转移显著相关, 与年龄、性别、肿瘤浸润深度、肿瘤类型、神经浸润及临床分期等无显著相关。P27蛋白与PCNA之间呈负相关关系。P27低表达组与缺失组的生存曲线明显低于高表达组生存曲线。而PCNA II级患者预后较其他预后要好, IV级预后最差。

结论: 肝门部胆管癌中P27联合PCNA的检测对判断肿瘤的恶性程度、预测转移趋势及示预后均有重要意义。

■同行评议者

陈进宏, 副主任医师, 复旦大学附属华山医院外科

关键词: 肝门部胆管癌; P27蛋白; 增殖细胞核抗原; 免疫组织化学

李铸, 周宁新, 张德林, 吕雅莉. P27蛋白和PCNA在肝门部胆管癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2478-2482
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2478.asp>

0 引言

肝门部胆管癌是肝外胆管癌的主要类型, 占肝外胆管癌的58%-75%, 由于所处位置隐秘, 以往多在尸检发现. 近年来随着影像诊断学技术的发展, 其发病率似有增多的趋势^[1]. 本试验通过对44例肝门部胆管癌中P27蛋白与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达研究, 探讨其生物学意义和临床意义. 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选取中国人民解放军总医院1996-2000年经手术切除、术前未行放化疗、有明确病理结果及详细随访资料的肝门部胆管癌标本44例, 用中性甲醛固定, 常规石蜡包埋. 其中男29例, 女15例, 年龄17-73(平均53)岁. 按临床分期, I-II期15例, III期0例, IV期29例, 其中IVa期27例, IVb期2例. 病理分级(39例): 高分化腺癌13例, 中分化腺癌17例, 低分化腺癌9例. 肿瘤分型: I型3例; II型19例; IIIa型9例; IIIb型6例; IV型4例; Va型0例; Vb型3例^[2]. 对照组标本选取行根治性切除的胆管癌标本的远端边缘的正常胆管组织. 鼠抗人P27蛋白单克隆抗体和鼠抗PCNA单克隆抗体均购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 抗兔/鼠通用型免疫组织化学检测试剂盒购于上海基因有限公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 采用两步法(做高温高压抗原修复), 一抗工作浓度P27为1:20, PCNA为1:125. 用正常扁桃体组织(由北京中杉金桥生物技术有限公司提供)作为阳性对照, 用PBS代替一抗做阴性对照.

1.2.2 结果判断标准: P27蛋白结果判断标准^[3]: 以细胞核或胞核伴胞质内出现棕黄色颗粒为阳性结果, 每张切片选5个高倍视野进行细胞计数, 按阳性细胞数占同类细胞的百分比. P27的表达分为高表达组: 阳性细胞 $\geq 50\%$; 低表达组: 阳性细胞 $< 50\%$; 及阴性表达组: 无阳性细胞染色. PCNA结果判断标准: 选择细胞染色最明显高

倍视野处, 计算PCNA标记指数(PCNA labelling index, PCNA LI) = 阳性细胞/总计算的细胞数 $\times 100\%$. 一般计算200个胆管上皮细胞, 只要细胞核呈棕黄色, 不论染色强弱, 即计算为PCNA阳性细胞. 分为5级: 0级: 未见阳性细胞, I级: 阳性细胞 $\leq 25\%$; II级: 阳性细胞26%-50%; III级: 阳性细胞51%-75%; IV级: 阳性细胞 $\geq 76\%$.

统计学处理 采用四格表 χ^2 检验. 生存分析采用Kaplan-Meier法, 生存率的比较采用Log-rank检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性. Kaplan-Meier曲线由Stata自动生成.

2 结果

2.1 P27蛋白与PCNA在肝门部胆管癌中的表达 P27蛋白与PCNA染色阳性细胞均为细胞核着色. P27蛋白阳性率为77.3%(34/44), 其中高表达14例(31.8%), 低表达20例(45.5%), 阴性表达10例(22.7%), 而对照组中, P27蛋白阳性率为100%(8/8), 以高表达为主; PCNA在所有的肿瘤细胞中染色均为阳性. 其中I级1例, II级12例, III级24例, IV级7例. 而对照组中PCNA阳性率为87.5%(7/8), 以低表达为主, 6例阳性表达 $< 25\%$. 对照组与肝门部胆管癌组织中的P27蛋白阳性率比较没有显著性差异, 但对照组与肝门部胆管癌组织中的PCNA阳性率差异显著.

2.2 P27蛋白和PCNA的表达与肝门部胆管癌临床病理的关系

2.2.1 P27蛋白与肝门部胆管癌临床病理的关系: P27阳性表达与肿瘤分化、神经及淋巴的转移呈显著相关($P < 0.05$). P27在高、中分化组、无神经浸润组和无淋巴转移组阳性表达率明显高于低分化组、已经发生神经浸润组及已经发生淋巴转移组. 与患者性别、年龄、肿瘤浸润深度、肿瘤分型、血管转移、临床分期等在统计学上差异无显著(表1).

2.2.2 PCNA的表达与肝门部胆管癌临床病理的关系: PCNA的阳性表达与肿瘤的分化、淋巴转移及血管转移显著相关($P < 0.01$); PCNA在中、低分化组, 淋巴结及血管转移组中的强阳性表达率明显高于高分化组, 淋巴结未转移组和血管未转移组. PCNA阳性表达与患者年龄、性别、肿瘤浸润深度、肿瘤类型、神经浸润和临床分期等在统计学上差异无显著(表1).

2.3 P27蛋白和PCNA之间的相互关系 P27蛋白和PCNA之间呈负相关关系, 相关系数为-0.5614. 二者之间呈线性关系($P = 0.0006$, 图1).

■ 相关报道

Jarnagin等发现P27的表达随胆树近端向远端延伸而呈进行性下降, 其推论P27等细胞周期蛋白的表达取决于肿瘤位置和形态.

■应用要点

PCNA是反映细胞增殖活性的指标. P27蛋白与其联合应用将有助于判断肝门部胆管癌的恶性程度及预后.

表 1 P27蛋白与PCNA和各病理参数的关系 (*n*)

临床病理参数	<i>n</i>	P27阳性			PCNA阳性				
		高	低	阴性	0级	I级	II级	III级	IV级
性别									
男	29	10	12	7	0	1	8	13	7
女	15	4	8	3	0	0	4	11	0
年龄(岁)									
<50	31	12	10	9	0	1	8	18	4
>50	13	2	10	1	0	0	4	6	3
肿瘤浸润深度									
T1+T2	17	6	9	2	0	0	6	9	2
T3	27	8	11	8	0	1	6	15	5
肿瘤分类									
I型	3	0	3	0	0	0	0	3	0
II型	19	6	9	4	0	1	6	8	4
III a型	9	6	1	2	0	0	4	5	0
III b型	6	3	1	2	0	0	1	3	2
IV型	4	0	3	1	0	0	0	3	1
V a型	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V b型	3	1	1	1	0	0	2	1	0
肿瘤分化									
高分化	13	11	2	0 ^b	0	1	12	0	0 ^b
中分化	17	1	13	3	0	0	0	16	1
低分化	9	0	2	7	0	0	0	4	5
血管转移									
有	4	1	1	2	0	1	0	1	2 ^b
无	40	13	19	8	0	0	12	23	5
神经侵犯									
有	12	3	3	6 ^a	0	1	2	6	3
无	32	11	17	4	0	0	10	18	4
淋巴转移									
有	7	2	1	4 ^a	0	0	1	1	5 ^b
无	37	12	19	6	0	1	11	23	2
临床分期									
I-II期	15	5	8	2	0	0	5	8	2
III-IV期	29	9	12	8	0	1	7	15	6

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01.

2.4 P27蛋白和PCNA与生存随访的关系 P27蛋白高、低及阴性表达组的平均生存时间为84、72与65 mo. P27高、低表达及缺失表达组各组生存率经Logrank检验, 在统计学上差异不显著, 但在Kaplan-Meier曲线上, P27的高表达组生存曲线明显高于低表达组与缺失组的生存曲线(图2A). PCNA平均生存时间分别为缺失、79、74与56 mo(I级患者由于病例数少, 中位生存时间表现为缺失), 各级别患者的生存时间经Logrank检验, 在统计学上存在显著性差异(*P*<0.05), 其中II级患者预后较其他级别患者预后要好, IV级最差(图2B).

3 讨论

在肿瘤发生、发展过程中, 细胞周期调节失控是一个重要的分子事件. 作为细胞周期负性调节因子的P27, 其异常表达活性的改变会影响细胞周期进程^[4]. 进而影响细胞增殖, 其与肿瘤发生、发展密切相关. P27Kip1是由Polyak等^[5]于1994年首先克隆出来的, 他是CDKI家族成员之一, 主要作用于G₁期, 抑制cyclin/CDK复合物的活性, 阻止pRb磷酸化, 使细胞周期停滞于G₁期, 抑制细胞增殖. 近年发现, 在多种消化系肿瘤中^[4,6,7], P27Kip1蛋白的异常表达与肿瘤的进展和不良预后密切相关.

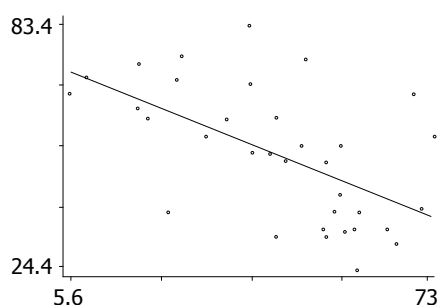


图1 P27蛋白与PCNA之间的相互关系。

本组肝门部胆管癌病例中P27蛋白的阳性表达率为77.2%, 不同于国内刘岳兰等^[8]关于胆管癌的P27的阳性表达率为40.82%的报道. 考虑原因可能和肿瘤位置有关. Jarnagin等^[9]发现P27的表达随胆树近端向远端延伸而呈进行性下降, 其推论P27等细胞周期蛋白的表达取决于肿瘤位置和形态.

本研究发现, P27蛋白在肝门部胆管癌组织中以低表达为主. Motagnolia等^[10]认为, 一旦受到恶性增殖信号的刺激, P27的蛋白表达水平下降, 一方面由于合成降低, 更主要的是由于细胞蛋白翻译后泛素蛋白酶体降解途径的速度提高. P27蛋白水平功能的下降减低了它对CDK或cyclin/CDK复合物活性的抑制效应, 导致CDK的活化效应递增, 使细胞能够完成细胞周期G₁-S期的重要转换, 驱动细胞周期的运行, 而使细胞增殖、分裂过快、过多直至肿瘤形成. 我们推测P27蛋白在肝门部胆管癌中的低表达有可能缘于相同的机制.

本试验中, P27阳性表达与肿瘤分化、神经及淋巴的转移呈显著相关($P<0.05$). P27在高、中分化组的阳性表达率明显高于低分化组($P<0.01$). 这说明其可作为一个预示恶性程度的指标. 在肝门部胆管癌中, 神经浸润是一种特殊的重要的转移方式. 肝门处由于在解剖上神经、血管、淋巴管的紧密关系, 肿瘤可能首先浸润小血管、淋巴管, 在神经纤维周围形成“卫星”灶, 继而浸润神经周围间隙^[11]. 本试验结果显示P27蛋白在无神经浸润组和无淋巴结转移组的阳性表达率显著高于神经浸润组和淋巴结转移组($P<0.01$), 这说明P27蛋白的低表达或丢失可促进细胞外基质的降解和改变细胞间的黏附力, 促进肿瘤转移. P27各组生存率经Logrank检验, 虽然在统计学上差异无显著, 但在卡-迈二氏曲线上, P27高表达组生存曲线明显高于低表达组与缺失组的生存曲线, 且高表达组

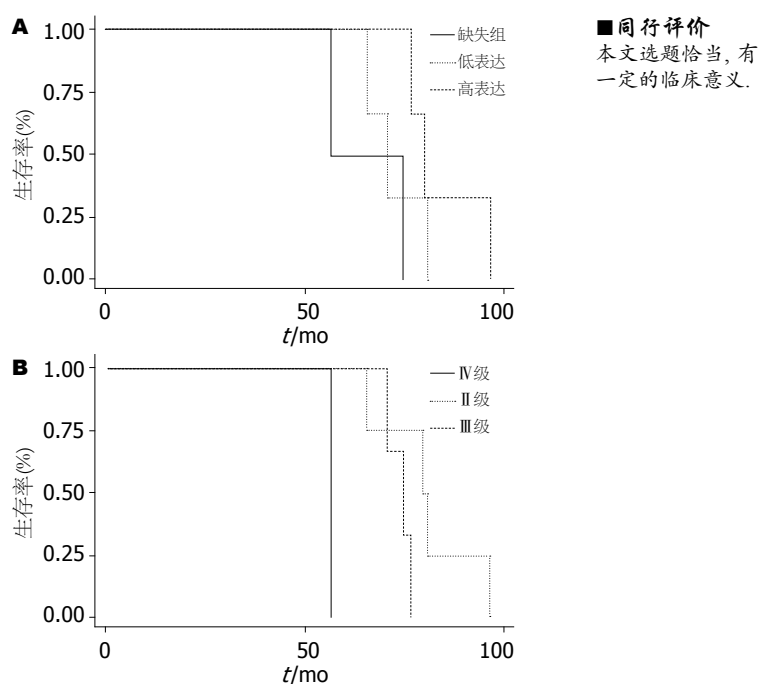


图2 生存曲线. A: P27蛋白表达组; B: PCNA表达组.

的中位生存时间(84 mo)明显长于低表达组(72 mo)及缺失组(65 mo). 可当增加样本量时可能得到各组生存率存在差异性的结论. 这说明P27高表达组的预后要优于低表达组及缺失组. 综述以上表明肝门部胆管癌的分化程度越低, 肿瘤浸润范围越广, P27蛋白的表达就越低或缺失越高, 提示肝门部胆管癌病程演变与P27蛋白缺失有关. 这和国外报道相似^[12]. 这充分说明P27是一种抑癌基因蛋白, 在肝门部胆管癌的发生发展中起着重要作用.

PCNA是一种仅在增殖细胞中合成或表达的核内多肽, 其合成、表达与细胞周期有关. PCNA从细胞增殖周期G₁期开始在细胞核内出现, S期最为明显. 因此, 免疫组织化学方法显示PCNA表达阳性细胞是处于DNA合成期细胞, 即分裂增殖状态的细胞. PCNA在肿瘤的良恶性的划分、恶性程度的确定等方面有广泛的应用^[13]. 在本试验中PCNA在中、低分化组, 淋巴结及血管转移组中的强阳性表达率明显高于高分化组, 淋巴结未转移组和血管未转移组. 这说明PCNA表达率越高, 增殖活性愈高, 分化愈差, 发生血管浸润与淋巴转移几率就越高, 提示PCNA可客观的反映肝门部胆管癌的分化程度及恶性程度. PCNA各级别患者生存时间经Logrank检验, 在统计学上存在显著性差异($P<0.05$), 其中II级患者预后较其他级别患者预后要好, IV级最差. 这说明PCNA阳性表达越强, 恶性程度越高, 预后

越差,这和国外报道相似^[14]。

P27与PCNA的表达呈负相关关系。推断P27是抑制细胞增殖的,当其表达减弱,导致细胞周期失控,其抑制功能减弱,引起细胞恶性增殖,导致PCNA表达升高。这说明P27与PCNA在肝门部胆管癌的发生、发展过程中可能具有拮抗作用。

总之,肝门部胆管癌的发生是多因素、多阶段、进行性的过程,存在着细胞周期调控的异常与蛋白水平的变化,P27作为细胞周期抑制剂,具有多种生物学功能。P27蛋白是通过翻译和泛素蛋白酶体降解来进行调节的。P27蛋白通过影响cyclin CDK复合物活性来阻滞细胞停滞于G₁期,从而抑制细胞增殖,诱导细胞分化,促进细胞凋亡。PCNA是反映细胞增殖活性的指标。P27蛋白与其联合应用将有助于判断肝门部胆管癌的恶性程度及预后。

4 参考文献

- 1 黄志强. 黄志强胆道外科. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社, 2000: 795-816
- 2 周宁新, 黄志强, 冯玉泉, 顾万清, 蔡守旺, 张文智, 黄晓强, 段云鹏, 王敬, 纪文斌. 肝门部胆管癌103外科治疗远期疗效的评析. 中华外科杂志 1997; 35: 649-651
- 3 Fiorentino M, Altimari A, D'Errico A, Gabusi E, Chieco P, Masetti M, Grigioni WF. Low P27 Expression is an independent predictor of survival for patients with either hilar or peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3994-3999
- 4 Xuan YH, Choi YL, Shin YK, Kook MC, Chae SW, Park SM, Chae HB, Kim SH. An immunohistochemical study of the expression of cell-cycle-regulated proteins p53, cyclin D1, RB, p27, Ki67 and MSH2 in gallbladder carcinoma and its precursor lesions. *Histol Histopathol* 2005; 20: 59-66
- 5 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66
- 6 张广建, 寇有为, 王强. 胃癌组织中P27表达与cyclin D1、cyclin E表达的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3809-3814
- 7 Hu YX, Watanabe H, Li P, Wang Y, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Sawabu N. An immunohistochemical analysis of p27 expression in human pancreatic carcinomas. *Pancreas* 2000; 21: 226-230
- 8 刘岳兰, 朱卫东. P27kip1蛋白在胆管癌中的表达及其与浸润转移的关系. 中国医师杂志 2004; 6: 1693-1694
- 9 Jarnagin WR, Klimstra DS, Hezel M, Gonen M, Fong Y, Roggin K, Cymes K, DeMatteo RP, D'Angelica M, Blumgart LH, Singh B. Differential cell cycle-regulatory protein expression in biliary tract adenocarcinoma: correlation with anatomic site, pathologic variables, and clinical outcome. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1152-1160
- 10 Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Herskho A, Pagano M. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 1999; 13: 1181-1189
- 11 钩又三子. 神经束的脉管外通液路与淋巴管癌瘤的神经浸润に注目して. 脉と臓 1991; 12: 121-127
- 12 Nitti D, Belluco C, Mammano E, Marchet A, Ambrosi A, Mencarelli R, Segato P, Lise M. Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome. *J Surg Oncol* 2002; 81: 167-175; discussion 175-176
- 13 沈翀, 劳山, 陈罡. 肿瘤细胞增殖标志物蛋白功能及意义的研究进展. 微创医学 2009; 4: 273-275
- 14 Russo G, Zamparelli A, Howard CM, Minimo C, Bellan C, Carillo G, Califano L, Leoncini L, Giordano A, Claudio PP. Expression of cell cycle-regulated proteins pRB2/p130, p107, E2F4, p27, and pCNA in salivary gland tumors: prognostic and diagnostic implications. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3265-3273

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务

本刊讯 2009-12-28,《世界华人消化杂志》按时完成2009年1-36期的出版任务,出版各类文章774篇,全部经过同行专家评议。其中评论性文章158篇(20.41%),原创性文章237篇(30.62%),研究快报91篇(11.76%),临床经验253篇(32.69%),病例报告13篇(1.68%),会议纪要2篇(0.26%)。

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。