

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.05.017

p16、Cyclin D1 和 COX-2 蛋白在子宫内膜不同增生性病变中的表达及意义

熊艳¹,熊永炎²

Expression and Significance of p16,Cyclin D1 and COX-2 Protein in Various Hyperplastic Lesions of Endometrium

XIONG Yan¹, XIONG Yong-yan²

1. Department of Gynecological Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China, 2. Department of Pathology

Abstract: Objective To detect the expressions of p16, Cyclin D1, COX-2 protein in various hyperplastic lesions of endometrium and explore the potentiality of these proteins as markers in diagnosis of EIN and endometrioid adenocarcinoma. **Methods** Expression of p16, Cyclin D1, COX-2 protein was detected in 131 cases of various hyperplastic endometrial lesions by immunohistochemistry and analyzed by statistics. **Results** (1) 26 EIN and 68 benign hyperplasia were rediagnosed in 94 endometrial hyperplasia. (2) There was no significant differences in positive expression and overexpression rate of p16 and Cyclin D1 among proliferative endometrium, benign hyperplasia, EIN and endometrioid adenocarcinoma ($P > 0.05$). (3) Positive expression and overexpression rate of COX-2 in EIN and endometrioid adenocarcinoma was significantly higher than those in proliferative endometrium and benign hyperplasia ($P < 0.01$), but difference was not obvious in EIN and endometrioid adenocarcinoma ($P > 0.05$). **Conclusion** In contrast to expression of p16 and Cyclin D1, overexpression of COX-2 may be an early event in the tumorigenesis for endometrioid adenocarcinoma; and this protein was useful tumor markers in distinguishing benign hyperplasia from EIN and endometrioid adenocarcinoma.

Key words: Endometrial intraepithelial neoplasia; Endometrial cancer; p16; Cyclin D1; COX-2; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨 p16、Cyclin D1 及 COX-2 蛋白在子宫内膜的癌前病变及子宫内膜样腺癌中的诊断价值。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法,对 131 例不同增生性子官内膜病变组织中 p16、Cyclin D1 及 COX-2 蛋白的表达进行检测,并对子宫内膜样腺癌发病新模式的不同阶段 3 种蛋白的表达进行对比观察。**结果** (1)根据 EIN 组织学诊断及分类标准,在 94 例子官内膜增生病例中共检出 EIN 病例 26 例,其余 68 例为良性子宫内膜增生病例。(2)p16 和 Cyclin D1 蛋白在增殖期子宫内膜、良性子宫内膜增生、EIN 及子宫内膜样腺癌 4 组中的阳性表达率及高表达率均无明显差异(P 均 > 0.05)。(3)COX-2 蛋白在正常增殖期子宫内膜组织中不表达;在 EIN 和子宫内膜样腺癌组阳性表达率及高表达率均分别显著高于增殖期子宫内膜和良性子宫内膜增生组(P 均 < 0.01),而两组间在阳性表达率和高表达率上均无明显差异(P 均 > 0.05)。**结论** 与 p16、Cyclin D1 蛋白表达相比,COX-2 蛋白的高表达在子宫内膜样腺癌的发生过程中可能是一种早期分子事件。其表达在鉴别良性子宫内膜增生和 EIN、子宫内膜样腺癌方面可能是一种有用的肿瘤性标志物。

关键词: 子宫内膜上皮内瘤变;子宫内膜肿瘤;p16;Cyclin D1;COX-2;免疫组织化学

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2010)05-0551-04

0 引言

子宫内膜增生是一种常见病,其分类方案很多。直至目前,子宫内膜增生的分类一般是按

WHO1994/2003 方案进行^[1]。2000 年, Mutter 及其子宫内膜协作小组首次提出了“子宫内膜上皮内瘤变”(endometrial intraepithelial neoplasia, EIN)的概念及分类系统^[2]。目前许多文献认为, EIN 是 I 型子宫内膜癌(子宫内膜样腺癌)的癌前病变^[3-4]。从癌变的角度来看,子宫内膜样腺癌的发生要经历“良性子宫内膜增生→EIN→子宫内膜样腺癌”的癌

收稿日期:2009-10-30;修回日期:2010-02-01

作者单位:1. 430071 武汉大学中南医院妇瘤科, 2. 病理科

作者简介:熊艳(1972-),女,博士,主治医师,主要从事妇科肿瘤研究工作

变过程或发病模式^[4]。

本文以 EIN 组织学诊断标准和 EIN 分类系统为依据,观察 p16、CyclinD1 及 COX-2 等 3 种标志物在子宫内膜样腺癌癌变过程不同阶段的表达情况,以探讨可能用于 EIN 和子宫内膜样腺癌诊断的肿瘤性标志物。

1 资料和方法

1.1 病例选择 131 例子官内膜标本为武汉大学中南医院病理科 2001~2006 年存档病例。其中 10 例为增殖期子宫内膜;94 例子官内膜增生病例。按照 WHO1994/2003 分类方案诊断,其中无非典型性简单型增生 38 例,无非典型性复杂型增生 33 例,复杂型非典型性增生 23 例;27 例为子宫内膜样腺癌。患者年龄 28~65 岁,均龄 44.3 岁。

1.2 EIN 诊断及分类标准 按 EIN 诊断及分类标准^[5]将 94 例子官内膜增生病例重新诊断,并分类为“良性子宫内膜增生”和“EIN”2 个功能类型。

1.3 免疫组织化学染色 131 例子官内膜标本每例蜡块连续切片 4 张,分别用于 HE 染色和 3 种蛋白免疫组织化学染色。p16、Cyclin D1 及 COX-2 抗体购于福州迈新生物技术开发有限公司,均为即用型单克隆抗体。采用免疫组织化学 SP 法,具体操作步骤按说明书进行。3 种抗体分别以肺非小细胞癌、乳腺癌及结肠腺癌组织作为阳性对照,以 PBS 取代一抗作阴性对照。每张切片随机选择 10 个高倍视野($\times 400$),每个视野计数 100 个细胞计算阳性细胞百分比。

1.4 免疫组织化学染色结果的评估

1.4.1 p16 蛋白 阳性染色为细胞核和(或)细胞质呈棕黄色着色。结合相关文献^[6-7],将其蛋白表达分为: - :无阳性染色细胞或阳性细胞 $\leq 10\%$; + :阳性细胞 $11\% \sim 50\%$; + + : $>51\% \sim 90\%$; + + + : $>90\%$ 。

1.4.2 Cyclin D1 蛋白 阳性染色为细胞核呈棕黄色着色。参照相关文献^[8],蛋白表达分为: - :无阳性染色细胞或阳性细胞 $\leq 10\%$; + :阳性细胞 $11\% \sim 30\%$; + + : $31\% \sim 60\%$; + + + : $>60\%$ 。

1.4.3 COX-2 蛋白 阳性染色为细胞质呈棕黄色着色。根据相关文献^[9],蛋白表达分为: - :无阳性染色细胞; + :阳性细胞 $\leq 10\%$; + + : $11\% \sim 50\%$; + + + : $>50\%$ 。

1.5 统计学方法 结果采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析。相关组间率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 根据 EIN 组织学诊断及分类标准,在 94 例子官内膜增生病例中共检出 EIN 病例 26 例,其余 68 例为良性子宫内膜增生病例。

2.2 p16 蛋白在子宫内膜不同增生性病变中的表达 p16 蛋白在增殖期子宫内膜、良性子宫内膜增生、EIN 及子宫内膜样腺癌中的阳性表达率及高表达率,见图 1、表 1。经统计学处理,各组在阳性表达率和高表达率差异无统计学意义(P 均 >0.05)。

2.3 Cyclin D1 蛋白在子宫内膜不同增生性病变中的表达 Cyclin D1 蛋白在增殖期子宫内膜、良性子宫内膜增生、EIN 及子宫内膜样腺癌中的阳性表达率,见图 2、表 1。经统计学处理,各组在阳性表达率和高表达率上的差异无统计学意义(P 均 >0.05)。

2.4 COX-2 蛋白在子宫内膜不同增生性病变中的表达 COX-2 蛋白在增殖期子宫内膜、良性子宫内膜增生、EIN 及子宫内膜样腺癌中的阳性表达率及高表达率,见图 3、4、表 1。EIN 和子宫内膜样腺癌组阳性表达率及高表达率均分别显著高于增殖期子宫内膜和良性子宫内膜增生组(P 均 <0.01),而 EIN 和子宫内膜样腺癌组之间在阳性表达率及高表达率上差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

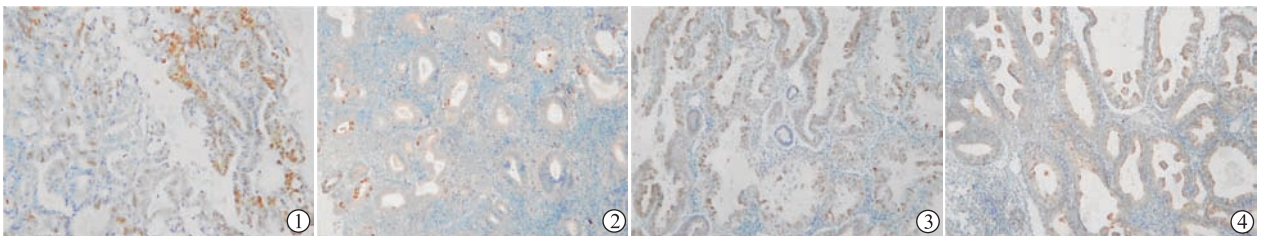


图 1 p16 在子宫内膜样腺癌中呈局灶性核/质表达(SP $\times 200$) 图 2 cyclin D1 在 EIN 病变中呈局灶性核表达(SP $\times 100$) 图 3 COX-2 在 EIN 病变中呈明显阳性表达,其中有 2 个背景子宫内膜腺体不表达(SP $\times 100$) 图 4 COX-2 在子宫内膜样腺癌中呈明显阳性表达(SP $\times 100$)

Figure 1 Focal (nuclear /cytoplasmic) expression of p16 in endometrioid adenocarcinoma(SP $\times 200$) Figure 2 Focal (nuclear) expression of cyclin D1 in EIN lesion(SP $\times 100$) Figure 3 Diffuse positive expression of COX-2 in EIN lesion (SP $\times 100$) Figure 4 Diffuse positive expression of COX-2 in endometrioid adenocarcinoma(SP $\times 100$)

表 1 不同子宫内膜病变中 p16、CyclinD1 和 COX-2 蛋白的表达情况

Table 1 Expression of p16, Cyclin D1 and COX-2 protein in 131 endometrial lesions

EIN classification	n	p16			Cyclin D1			COX-2				
		-	+	3+	-	+	3+	-	+	3+		
Proliferative endometrium	10	3	6	1	0	7	2	1	0	10	0	0
Benign hyperplasia	68	22	33	13	0	50	15	3	0	60	5	3
EIN	26	8	13	5	0	17	6	3	0	8	6	7
Endometrioid adenocarcinoma	27	4	16	7	0	19	4	4	0	8	5	8
Total	131	37	68	26	0	93	27	11	0	86	16	11

Note: - and + were categorized as low expression; 2+ and 3+ were scored as overexpression

3 讨论

自 WHO1994 年关于子宫内膜增生分类方案问世后的 10 余年中,人们发现该分类虽然使子宫内膜增生的分类标准及诊断术语得到统一,但在实际应用中确实存在一些弊端:如分类复杂,诊断标准主观性强;诊断、分类(尤其是癌前病变)的可重复性较差;分类对临床治疗及预后判断缺乏明确指导意义等^[10-11]。Mutter 等^[5]认为,子宫内膜增生实际上包括两种功能类型,一种是由异常的激素引起的一般性子宫内膜的改变,另一种则为单克隆性恶性前子宫内膜增生。前者称为“良性子宫内膜增生”,后者则称为“子宫内膜上皮内瘤变(EIN)”。后者当再次获得遗传学损伤后可以转化成恶性表型(子宫内膜样腺癌)^[2,4]。因此,“良性子宫内膜增生”属于真正意义上的子宫内膜增生,与雌激素紊乱有关;而 EIN 则属于 I 型子宫内膜癌真正意义上的癌前病变。近 10 年的临床实践表明,与子宫内膜增生 WHO1994/2003 分类相比,EIN 诊断及分类系统具有诊断准确性高、可重复性好、对子宫内膜癌的发生预测性高等优势^[4]。本文正是以新的 EIN 诊断及分类标准为依据,对 94 例按照 WHO1994/2003 分类标准诊断的子宫内膜增生病例再诊断、再分类,目的是探讨几种免疫标志物在子宫内膜样腺癌新发病模式中不同阶段的表达及其意义。

p16 基因又称多肿瘤抑制基因(MTS1),其编码的基因产物 p16 蛋白是细胞增殖的负调节物,在正常细胞周期中可抑制细胞无限制地增殖^[12]。p16 在人体肿瘤发生过程中的作用目前还不清楚。虽然如此,p16 蛋白的失活和过表达均可见于人体不同的肿瘤中,尤其作为一种诊断或预后判断的标志物,p16 蛋白也已广泛应用于妇科病理学中^[13]。如同其他所有生物学标志物一样,p16 蛋白既非格外特异,也非特别敏感,但在鉴别小的高级别 CIN 病变,区别高级别 CIN 与良性拟似病变、宫颈原位腺癌与良性拟似病

变、宫颈内膜腺癌与子宫内膜腺癌、卵巢的转移性宫颈腺癌等方面,p16 蛋白与其他标志物联用具有不容置疑的作用和价值^[13]。据报道,p16 蛋白在子宫内膜癌(尤其是子宫内膜样腺癌)中通常呈弱阳性或阴性表达,而且这种异常表达率在文献中的报道非常不一致。据认为,p16 蛋白在子宫内膜癌中异常表达率上的差异可能与免疫组织化学染色的方法、抗体、病例分组及阳性判断标准等诸多方面因素有关^[7]。Ignatov 等^[14]研究结果表明,p16 蛋白在子宫内膜癌中异常表达与 p16 基因缺失和启动子超甲基化有密切关系。由此看来,作为 Rb 通路中的一部分,p16 基因在人体肿瘤(尤其散发性子宫内膜癌)发生中的作用是不稳定的,p16 蛋白在子宫内膜癌中的表达变化也是非常具有争议的。至于 p16 蛋白在子宫内膜癌前病变中的表达,文献中报道较少。本研究 131 例不同增生子宫内膜组织中 p16 蛋白表达显示,增殖期子宫内膜、良性子宫内膜增生、EIN 及子宫内膜样腺癌虽然均有一定数量病例呈阳性表达,但是都以低表达(弱阳性或阴性)为主,高表达病例极少,且各组在阳性表达率和高表达率上的差异均无统计学意义,说明 p16 蛋白在子宫内膜样腺癌发生过程中的作用尚值得进一步研究,p16 蛋白目前尚不宜作为区别良性子宫内膜增生和 EIN、子宫内膜样腺癌的肿瘤标志物。

Cyclin D1 是细胞周期成分中被认为与人体肿瘤的发生有着直接关系的一种 D 型周期素。已发现 Cyclin D1 蛋白在套细胞性淋巴瘤、食管癌、胃癌、结肠直肠癌、宫颈癌、乳腺癌等恶性肿瘤中均呈现过表达状态,Cyclin D1 甚至成为套细胞性淋巴瘤诊断的重要标志物^[15-18]。Nikaido 等^[19]报道 Cyclin D1 蛋白在子宫内膜癌中的阳性率为 40%,并且其弥漫阳性与临床高分期及组织学高分级有关,并认为 Cyclin D1 蛋白调节障碍在子宫内膜癌的发生中具有一定作用。Ito 等^[20]发现 56%子宫内膜癌组织中存在 Cyclin D1 蛋白的过表达,但其表达与患者的生存或临床结果无相关性。Ruhul Quddus 等^[8]报告,与增殖期、分泌期子宫内膜及简单型增生子宫内膜比较,Cyclin D1 蛋白在复杂性增生及子宫内膜样腺癌中呈显著过表达,提示 Cyclin D1 蛋白在子宫内膜癌的发生过程中可能具有一定的作用。Mitselou 等^[21]则认为,Cyclin D1 蛋白在正常子宫内膜及子宫内膜增生组织中呈局限性表达,在子宫内膜癌中虽然阳性表达可见于所有病例,但过表达者则仅见于 18.2%的病例中,且其表达与临床病理学参数之间无明显相关性。我们的研究结果发现,在增殖期子宫内膜、良性子宫内膜增生、EIN 及子宫内膜样腺癌组织中,Cyclin D1 蛋白的阳性表达率及高表达率均较低,且各组之间在上述表达

率上的差异均无统计学意义。我们认为, Cyclin D1 蛋白目前是不宜作为诊断 EIN 病变和子宫内膜样腺癌的肿瘤性标志物。

COX-2(cyclooxygenase-2, 环氧合酶-2)在人体结直肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中呈现高表达,说明 COX-2 可能参与了肿瘤的发生、发展甚至肿瘤的浸润和转移^[22]。Kilic 等^[23]报道了 36 例子宫内膜癌病例,其中 13 例呈 COX-2 阳性表达,阳性表达率为 36.1%。Nasir 等^[24]报告的 22 例子宫内膜样腺癌中则有 18 例呈 COX-2 阳性表达,阳性表达率高达 88%。COX-2 在正常子宫内膜组织中仅微弱表达或不表达,但在子宫内膜增生和非典型增生组织中其表达显著增加且常呈高表达状态。Nasir 等^[24]报道的子宫内膜增生组织中 COX-2 的阳性表达率为 44%,而复杂型非典型性增生子宫内膜组织中的阳性表达率则为 80%,与子宫内膜样腺癌中 COX-2 的阳性表达率(88%)没有明显差异。在我们的研究中,良性子宫内膜增生中 COX-2 的阳性表达率及高表达率均较低,但进入 EIN 阶段后,其阳性表达率和高表达率均显著升高,基本上接近子宫内膜样腺癌的表达水平。文献中的相关报道及我们的研究结果表明,在子宫内膜样腺癌的发生过程中,COX-2 的表达不仅是一个早期分子事件,而且在区别良性子宫内膜增生与 EIN、子宫内膜样腺癌方面是一个具有诊断价值的肿瘤标志物。有鉴于此,针对 COX-2 在子宫内膜癌发生、发展中的作用,近有学者认为 COX-2 抑制剂的开发可能在子宫内膜癌的标准化治疗方面具有潜在的应用价值^[23-24]。

参考文献:

- [1] Silverberg SG, Mutter GL, Kurman RJ, et al. Tumors of the uterine corpus: epithelial tumors and related lesions [M]. Tavassol FA, Stratton MR, eds. WHO classification of tumors: pathology and genetics, tumors of the breast and female genital organs. France: IARC, Press, 2003; 221-232.
- [2] Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): Will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group [J]. Gynecol Oncol, 2000, 76(3): 287-290.
- [3] Mutter GL, Ince TA, Baak JPA, et al. Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium [J]. Cancer Res, 2001, 61(11): 4311-4314.
- [4] Franz M. The premalignant disease of the endometrium: endometrial intra-epithelial neoplasia [J]. Magy Onkol, 2008, 52(1): 35-40.
- [5] Mutter GL, Zaino RJ, Baak JP, et al. Binnign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia [J]. Int J Gynecol Pathol, 2007, 26(2): 103-114.
- [6] Yemelyanova A, Vang R, Seidman JD, et al. Endocervical adenocarcinomas with prominent endometrial or endomyometrial involvement simulating primary endometrial carcinomas. Utility of HPV DNA detection and immunohistochemical expression of p16 and hormone receptors to confirm the cervical origin of the corpus tumor [J]. Am J Surg Pathol, 2009, 33(6): 914-924.
- [7] Semczuk A, Miturski R, Skomra D, et al. Expression of the cell-cycle regulatory proteins (pRb, cyclin D1, p16INK4A and cdk4) in human endometrial cancer: correlation with clinicopathological feature [J]. Arch Gynecol Obstet, 2004, 269(2): 104-110.
- [8] Ruhul Quddus M, Latkovich P, Castellani WJ, et al. Expression of cyclin D1 in normal, metaplastic, hyperplastic endometrium and endometrioid carcinoma suggests a role in endometrial carcinogenesis [J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 126(4): 459-463.
- [9] Ryu HS, Chang KH, Yang HW, et al. High cyclooxygenase-2 expression in stage 1B cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion [J]. Gynecol Oncol, 2000, 76(3): 320-325.
- [10] Baak JPA, Mutter GL. EIN and WHO94 [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(1): 1-6.
- [11] Zaino RJ, Kauderer J, Trimble CL, et al. Reproducibility of the diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study [J]. Cancer, 2006, 106(4): 804-811.
- [12] Ohtani N, Yamakoshi K, Takashi A, et al. The p16INK4a-Rb pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression [J]. J Med Invest, 2004, 51(3-4): 146-153.
- [13] O'Neill CJ, McCluggage WG. P16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis [J]. Adv Anat Pathol, 2006, 13(1): 8-15.
- [14] Ignatov A, Bischoff J, Schwarzenau C, et al. P16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 2008, 111(2): 365-371.
- [15] Gao P, Zhou GY, Liu Y, et al. Alteration of cyclin D1 in gastric carcinoma and its clinicopathologic significance [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(20): 2936-2939.
- [16] Yan KX, Liu BC, Shi XL, et al. Role of cyclin D1 and CDK4 in the carcinogenesis induced by silica [J]. Biomed Environ Sci, 2005, 18(5): 286-294.
- [17] Reddy HK, Mettus RV, Rane SG, et al. Cyclin-dependent kinase4 expression is essential for neu-induced breast tumorigenesis [J]. Cancer Res, 2005, 65(22): 10174-10178.
- [18] 陈爱军, 刘文明, 孟庆华, 等. 蛋白激酶 C- α , cyclin D1 和 cdk4 在大肠癌中表达的相关性及临床意义 [J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(1): 27-29.
- [19] Nikaido T, Li SF, Shiozawa T, et al. Coabnormal expression of cyclin D1 and p53 protein in human uterine endometrial carcinomas [J]. Cancer, 1996, 78(6): 1248-1253.
- [20] Ito K, Sasano H, Yoshida Y, et al. Immunohistochemical study of cyclin D1 and E and cyclin dependent kinase (cdk) 2 and 4 in human endometrial carcinoma [J]. Anticancer Res, 1998, 18(3A): 1161-1164.
- [21] Mitselou A, Ioachin E, Iagorianakou N, et al. Expressions of the cell-cycle regulatory proteins (cyclin D1 and E) in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status, proliferating indices, tumor suppressor genes products (p53 and pRb) and clinicopathological parameters [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2004, 25(6): 719-724.
- [22] Zhang H, San XF. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlated with advanced stages of colorectal cancer [J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(4): 1037-1042.
- [23] Kilic G, Gurates B, Garon J, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in endometrial adenocarcinoma [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2005, 26(3): 271-274.
- [24] Nasir A, Boulware D, Kaiser HE, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human endometrial carcinoma and precursor lesions and its possible use in cancer chemoprevention and therapy [J]. In Vivo, 2007, 21(1): 35-43.