

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 01. 021

子宫内膜样腺癌组织中 p27、MCM7 蛋白的表达及意义

任占平,石 喆,张 芃

Expression and Significance of p27 and MCM7 Proteins in Endometrioid Adenocarcinoma

REN Zhan-ping, SHI Zhe, ZHANG Yuan

Department of Pathology, The People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou 545006, China

Abstract: Objective To study the expression of p27 and MCM7 protein in endometrioid carcinoma and its clinical significance. **Methods** The expression of p27 and MCM7 proteins were tested by SP immunohistochemistry from normal endometrium(30 cases), endometrial hyperplasia(30 cases), atypical hyperplasia(30 cases) and endometrioid carcinoma(50 cases). **Results** The positive expression of p27 decreased gradually in different groups: normal endometrium > endometrial hyperplasia > endometrial dysplasia > endometrioid carcinoma. There was a significant difference among these groups ($P < 0.05$). But the positive expression of MCM7 in four groups showed an increased gradually. The expression of MCM7 in endometrioid carcinoma and endometrial dysplasia groups were significantly higher than those in normal endometrium and endometrial hyperplasia groups ($P < 0.05$). Negative correlation was found between the expression of p27 and MCM7 ($r = -0.3306, P < 0.02$). In endometrioid carcinoma group, the lower expression of p27 protein was significantly associated with histological grading ($P < 0.05$) and pathologic stage ($P < 0.05$). The overexpression of MCM7 protein was significantly correlated with histological grading, myometrial invasion, lymph node metastasis and pathologic stage ($P < 0.05$), respectively. The lower expression of p27 and higher expression of MCM7 were related with recurrence in endometrioid carcinoma ($P < 0.05$). **Conclusion** The results suggest that the low expression of p27 and the overexpression of MCM7 protein may be involved in carcinogenesis and development of endometrioid carcinoma. Combined examining of p27 and MCM7 protein may be used as a biomarker in the early diagnosis and for the prognosis judgement of endometrioid carcinoma.

Key words: Endometrioid adenocarcinoma; Immunohistochemistry; p27; MCM7

摘要:目的 探讨 p27、MCM7 蛋白在子宫内膜样腺癌及其癌前病变组织中的表达及意义。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 30 例正常子宫内膜、30 例内膜增生、30 例非典型增生和 50 例子宫内膜样腺癌组织中 p27 和 MCM7 蛋白的表达情况。**结果** p27 蛋白的阳性表达水平在正常子宫内膜、内膜增生、非典型性增生到子宫内膜样腺癌组织中呈逐渐下降趋势,组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);而 MCM7 阳性表达水平呈逐渐上升趋势,子宫内膜样腺癌组和非典型增生组均显著高于正常组和内膜增生组 ($P < 0.05$),子宫内膜样腺癌组中 p27 与 MCM7 的表达呈负相关 ($r = -0.3306, P < 0.02$),p27 蛋白低表达与组织学分级及手术病理分期有关 ($P < 0.05$),MCM7 蛋白的高表达与组织学分级、肌层浸润、淋巴结转移和手术病理分期有关 ($P < 0.05$);p27 低表达和 MCM7 的高表达与肿瘤的复发有关 ($P < 0.05$)。**结论** p27 蛋白的表达缺失和 MCM7 的高表达可能涉及了子宫内膜样腺癌的发生、发展过程,两者的联合检测可望作为临床早期诊断、评价预后的生物学指标。

关键词: 子宫内膜样腺癌;免疫组织化学;p27;MCM7

中图分类号:R737.33 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)01-0073-04

收稿日期:2009-11-11;修回日期:2010-03-29
基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科自 0991270)
作者单位:545006 广西柳州,柳州市人民医院病理科
作者简介:任占平(1959-),男,硕士,主任医师,主要从事病毒感染与肿瘤病理研究

0 引言

G₁/S 期限制点是细胞周期的一个重要的检测点,其在细胞周期调控机制和 DNA 复制起始调控两者之间相互融合。微小染色体维持蛋白 7(mini-chromosome maintenance proteins 7, MCM7)作为

DNA 复制准许因子介导 DNA 合成,而 p27 可负调控 MCM7 的作用。两者在 G₁/S 检测点上相互作用并涉及了参与细胞生长调控过程中多个信号通路的整合,其表达异常均可导致细胞恶性转化。我们采用免疫组织化学技术检测子宫内膜样腺癌及其癌前病变组织中 p27 和 MCM7 蛋白的表达,以探讨 DNA 复制调控异常在子宫内膜样腺癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取柳州市人民医院 2003 年 1 月—2005 年 12 月间经手术切除的子宫标本,病理诊断、分级参照 2003 年 WHO 的分类标准进行,全部病例均经病理诊断证实。其中子宫内膜增生组 30 例(15 例为单纯性、15 例为复杂性)、年龄(44.2±4.5)岁,子宫内膜非典型性增生组 30 例(中度 15 例,重度 15 例)、年龄(46.3±5.3)岁,子宫内膜样腺癌组 50 例、年龄(52.6±7.8)岁。另取同期因非肿瘤行子宫切除术的正常子宫内膜组织 30 例(20 例为增殖期,10 例为分泌期)为对照组、年龄(46.5±4.7)岁,四组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。选择的对象均无术前激素替代治疗及放、化疗史。子宫内膜样腺癌组手术病理分期按 FIGO(1988)标准,Ⅰ期 26 例,Ⅱ期 11 例,Ⅲ~Ⅳ期 13 例。子宫内膜样腺癌组病例随访 3 年,5 例失访,其余 45 例中 9 例(18.0%)有肿瘤复发。

1.2 试剂与方法

免疫组织化学染色采用 SP 法。MCM7 (47DC141)单克隆抗体购自 Neo Markers 公司, p27(DCS-72. F6)单克隆抗体和 SP 试剂盒 (Kit-9710)购自福州迈新生物技术公司。免疫组织化学染色操作步骤按文献^[1]进行,MCM7 和 p27 切片均经 EDTA(pH9.0)作微波抗原修复,分别用已知人乳腺癌 MCM7 和 p27 阳性切片作阳性对照,以 PBS 取代一抗作阴性对照。

1.3 结果判断标准

MCM7 和 p27 蛋白检测以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性标志,MCM7、p27 染色的判断参照 Bukholm 等^[2]提出的标准。计数≥500 个肿瘤细胞,以细胞核内出现棕黄色颗粒且阳性细胞数<10%为(-),10%~30%为(+),>30%~70%为(++),>70%为(+++)。以(+)为低表达,(++)~(+++)为高表达。

1.4 统计学方法

应用 SPSS11.0 统计学软件对所得数据进行秩和检验,Spearman 等级相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫内膜良、恶性病变和正常组中 p27、MCM7 的表达

p27 和 MCM7 蛋白阳性表达定位于正常、增生的腺上皮细胞核或癌细胞核内,呈灶状或弥漫分布。正常组中 p27 表达均为阳性且(++)~(+++)达 83.33%(25/30)。MCM7 蛋白在各组中的表达显示多样化,在正常组中表达取决于其所处月经周期的阶段,20 例处于增殖期均显示 MCM7(+)~(++)阳性表达,而 10 例分泌期中 5 例为(+)表达,余 5 例阳性细胞数均<10%而入(-),非典型增生组和子宫内膜样腺癌组中以(+++)~(++++)表达为主。p27 蛋白的阳性表达水平从正常组、内膜增生组、非典型增生组、子宫内膜样腺癌组呈逐级下降的趋势,组间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),与之相反,MCM7 蛋白的阳性表达水平逐渐升高,组间两两比较,子宫内膜样腺癌组和非典型性增生组均显著高于正常组和增生组($P<0.05$),见表 1。

表 1 p27 和 MCM7 在各组中的表达
Table 1 Expression of p27 and MCM7 in different endometrial groups

Groups	n	p27				MCM7			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Normal endometrium	30	0	5	15	10	5	21	4	0
Endometrial hyperplasia	30	2	10	14	4	4	9	17	0
Endometrial dysplasia	30	5	15	10	0	0	5	15	10
Endometrial carcinoma	50	27	16	7	0	5	8	16	21

2.2 p27、MCM7 表达与子宫内膜样腺癌临床病理特征之间的关系

p27 的阳性表达在组织学分级 G1 组中显著高于 G3 组($P<0.05$),在手术病理分期中,Ⅲ~Ⅳ期组显著低于Ⅰ期组($P<0.05$),但与子宫肌层浸润、淋巴结转移无关($P>0.05$)。MCM7 蛋白的阳性表达在组织学分级 G2、G3 与 G1 组之间、无和≤1/2 肌层浸润与>1/2 组之间、有淋巴结转移与无淋巴结转移组之间差异均具有统计学意义($P<0.05$),临床病理分期中Ⅲ~Ⅳ期组显著高于Ⅰ期组($P<0.05$),见表 2。

2.3 肿瘤预后与 p27、MCM7 蛋白表达的关系

p27 在 9 例肿瘤复发组中(-)8 例,(+)1 例。而无复发组(-)17 例,(++),(+++)分别为 13、6 例,组间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$); MCM7 在复发组中(++),(+++)分别为 2、7 例,无复发组(-)4 例,(+),(++)和(+++)表达分别为 7、11 和 14 例,组间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 癌组中 p27、MCM7 表达与临床病理特征的关系

Table 2 Correlation of the expression of p27 and MCM7 with clinicopathologic features

Item	Case	p27				Z	P	MCM7				Z	P
		-	+	++	+++			-	+	++	+++		
Pathologic grade													
G1	13	5	3	5	0			3	4	5	1		
G2	28	14	12	2	0	2.42*	<0.05	2	3	10	13	3.02	<0.05
G3	9	8	1	0	0			0	1	1			
Myometrial invasion													
None and ≤1/2	35	18	12	5	0			5	8	11	11		
>1/2	15	9	4	2	0	0.48	>0.05	0	0	5	10	2.80	<0.05
Lymph node metastasis													
No	38	21	15	2	0			5	7	13	13		
Yes	12	6	1	5	0	1.23	>0.05	0	1	3	8	2.12	<0.05
FIGO stage													
I	26	9	12	5	0			5	7	7	7		
II	11	7	3	1	0	2.65	<0.05	0	1	4	6	2.17	<0.05
III~IV	13	11	1	1	0			0	0	5	8		
Tumor recurrence													
No	36	17	13	6	0			4	7	11	14		
Yes	9	8	1	0	0	2.24	<0.05	0	0	2	7	2.25	<0.05

2.4 子宫内膜样腺癌组中 p27 与 MCM7 蛋白表达的相关性

癌组中 p27 与 MCM7 蛋白表达的关系见表 3。经 Spearman 等级相关分析,结果显示,50 例子宫内膜样腺癌中 p27 与 MCM7 蛋白表达水平之间呈显著性负相关($r = -0.3306, P < 0.02$),见表 3。

表 3 癌组中 p27 与 MCM7 蛋白表达的关系

Table 3 Relationship between the expression of p27 and MCM7

p27 expression	MCM7 expression				Total
	-	+	++	+++	
-	0	4	10	13	27
+	1	3	5	7	16
++	4	1	1	1	7
+++	0	0	0	0	0
Total	5	8	16	21	50

3 讨论

在所有真核细胞中,DNA 复制合成起始于一个特定的起始复制点(origins of replication),此位点是严格限制并确保基因组在每一个细胞周期仅复制一次以维护基因组的完整性,作为启动此起始点的关键复制准许因子包括了微小染色体维持蛋白家族、起始识别复合物(origin recognenition comlex, ORC)、细胞分裂蛋白 6(Cell Division Cycle 6, Cdc6)和细胞周期依赖转录因子 1(CDC10 depengent transcript 1,CDT1)。ORC 作用如同一个停泊

点,在细胞周期的 M 期晚期到 G₁ 早期与 Cdc6、CDT1 等复制调节因子结合成 ORC-CDC-CDT1 复合体,MCM2-7 继之参与其中并完成与染色体的结合,共同组合装配成前复制复合物(pre-Rc),从而在复制的起始点构建 S 期 DNA 复制的能力。活化的 Cdc/Dbf4 激酶 S 期促进 CDK 启动 pre-RC,松开复制起始点和构建双向复制叉,同时 S-CDK 可将某些 MCM 磷酸化,使其被输出细胞核,阻止 DNA 再次进行复制。MCM 表达调控功能的失调结果导致染色体的缺损有助于肿瘤的发生^[3-4]。本研究结果显示,正常子宫内膜组中 20 例处于增殖期均显示 MCM7(+)~(++) ,其中仅 13.33%(4/30)为(++) ,而 10 例分泌期中 5 例为(+),显示正常细胞处于正常生长周期的状态。在子宫内膜增生组,(++) 为 56.67%(17/30),而在非典型增生组中 MCM7 蛋白(++)~(+++) 为 83.33%(25/30)且与子宫内膜样腺癌组阳性表达无显著性差异,显示 MCM7 蛋白的阳性表达与细胞异常增殖活跃水平一致并逐级上升。

p27kip1 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin - dependent kinase inhibitor,CKIs)家族中的一个重要成员,研究发现, p27kip1 以其羧基末端结构域与 MCM7 的保守结构域结合并相互作用,抑制 DNA 的复制。p27kip1 负调控 MCM7 的功能,可以防止在 S 期之前 DNA 复制不适当的启动^[5]。此外,p27kip1 还能抑制 CyclinE-CDK2 的活性,从

而在保证细胞 DNA 精确复制调控和正常细胞周期运转中起到重要的作用。MCM 蛋白和 p27kip1 表达异常结果将导致 DNA 复制调节紊乱, G₁ 期阻滞、凋亡、修复和 S 期复制起始准许精确调控功能的丧失使得增殖的细胞获得了准许连续和延长重复复制的能力而不管是否有 DNA 的损伤, 结果将导致基因组的不稳定性, 从而在细胞的恶性转化起着关键的作用。

本组研究结果表明: 伴随着子宫内膜增生、非典型增生到宫内膜样腺癌病变演变过程中, p27kip1 蛋白的阳性表达水平呈逐渐下降趋势, 子宫内膜样腺癌组中 p27kip1 的阳性表达均显著低于正常组和增生组 ($P < 0.05$)。而 MCM7 蛋白的阳性表达逐渐上升, 非典型增生和子宫内膜样腺癌组中 MCM7 蛋白的阳性表达均显著高于正常组和增生组 ($P < 0.05$), 这种表达模式提示 p27kip1 的正常表达是内膜腺上皮细胞正常分化调控中的关键负调控因子之一, 而低表达的 MCM7 显示细胞处于正常增殖状态, 高表达的 MCM7 水平提示处于癌前病变的细胞活跃增殖和肿瘤细胞的异常增殖。MCM7 蛋白的高表达及其负调控因子 p27kip1 表达缺失所致的 S 期复制精确调控异常可能涉及了子宫内膜样腺癌的发生^[5-6]。

在 Spearman 等级相关分析中显示子宫内膜样腺癌组中 p27kip1 和 MCM7 表达呈显著负相关关系 ($r = -0.3306, P < 0.02$), 子宫内膜样腺癌组中 p27kip1 蛋白的表达缺失与肿瘤的组织学分级和手术病理分期有关, MCM7 蛋白的高表达与病理组织学分级、肿瘤的浸润、淋巴结转移和临床分期相关, p27 低表达和 MCM7 的高表达与肿瘤的复发有关, 提示 p27kip1 表达的缺失和 MCM7 蛋白的高表达可能在宫内膜样腺癌发生、发展过程中起到协同作用。

MCM 蛋白是正常表达在所有处于细胞周期中的细胞中, 他们并不表达在已经离开细胞周期处于

终末分化和静止的细胞内, 在人恶性肿瘤细胞和经历恶性转化的癌前病变细胞中 MCM7 显示高表达状态。本研究结果表明, 在子宫内膜样腺癌中的发生过程中 p27kip1 蛋白表达的缺失和 MCM7 蛋白的高表达是一个早期的事件并可在癌前病变中被检测出, 两者联合检测可望作为临床早期诊断和评价预后的生物学标志物^[7]。此外, 鉴于 MCM 蛋白在细胞增殖、静止状态调控中的关键作用, 研究 MCM 表达调控细胞增殖以利于抗癌药物作用以及以其作为抗癌药物的作用的靶标将为子宫内膜样腺癌的基因治疗提供新的思路^[8]。

参考文献:

[1] 任占平, 石喆, 杜娟, 等. 乳腺浸润性导管癌组织中 HPV16DNA 与 P53 蛋白表达的研究[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(8): 479-480.

[2] Bukholm IR, Bukholm G, Holm R, et al. Association between histology grade, expression of Hs MCM2, and Cyclin A in human invasive breast carcinoma [J]. J Clin Pathol, 2003, 56(5): 368-373.

[3] 任占平. 微小染色体维持蛋白与肿瘤[J]. 诊断病理学杂志, 2004, 11(6): 427-429.

[4] Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M. MCM protein and DNA replication[J]. Cuur Opin Cell Biol, 2006, 18(2): 130-136.

[5] Nallamshetty S, Crook M, Boehm M, et al. The cell cycle regulator p27kip1 interacts with MCM7, a DNA replication licensing factor, to inhibit initiation of DNA replication[J]. FEBS Lett, 2005, 579(29): 6529-6536.

[6] Murphy N, Ring M, Heffron CC, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(5): 525-534.

[7] Li SS, Xue WC, Khoo US, et al. Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis[J]. Histopathology, 2005, 46(3): 307-313.

[8] Lei M. The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5(5): 365-380.

[编辑: 刘红武; 校对: 周永红]