

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.025

PCNA、CDK4 及 p16^{INK4a} 在外阴上皮内非瘤样病变中的表达及意义*吴云飞¹, 钟丽君², 王霞³, 唐利⁴, 夏雪³, 李宗恒^{3△}

(1. 泸州医学院附属医院心胸外科, 四川泸州 646000; 2. 泸州医学院附属中医院妇产科, 四川泸州 646000; 3. 泸州医学院附属医院妇产科, 四川泸州 646000; 4. 泸州医学院附属医院医学实验中心, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期依赖性激酶(CDK4)及其抑制蛋白 p16^{INK4a} 在外阴上皮内非瘤样病变(NNEDV)发病中的作用及关系。方法 收集 NNEDV 患者外阴病变皮肤(病变组)及病变旁皮肤(病变旁组)标本各 52 例;同时收集行会阴修补术患者的外阴正常皮肤标本 25 例(对照组)。免疫组织化学法检测 PCNA、CDK4 及 p16^{INK4a} 在各组中的表达。结果 PCNA 的表达,病变组显著高于病变旁组和对照组($P < 0.05$),病变组 3 种组织学类型间表达差异无统计学意义($P > 0.05$);病变旁组略高于对照组($P > 0.05$)。CDK4 的表达,病变组和病变旁组均显著高于对照组($P < 0.05$),病变组 3 种组织学类型间表达差异无统计学意义($P > 0.05$);病变组略高于病变旁组($P > 0.05$)。p16^{INK4a} 的表达,病变组显著低于病变旁组和对照组($P < 0.05$),病变组 3 种组织学类型间表达差异无统计学意义($P > 0.05$);病变旁组略低于对照组($P > 0.05$)。PCNA 和 CDK4 的表达在病变组 3 种组织学类型中均呈正相关($P < 0.05$),在病变旁组和对照组中均无相关性($P > 0.05$);PCNA 和 p16^{INK4a} 的表达在病变组 3 种组织学类型中均呈负相关($P < 0.05$),在病变旁组及对照组中均无相关性($P > 0.05$);CDK4 和 p16^{INK4a} 的表达在各组中均呈不相关($P > 0.05$)。结论 PCNA、CDK4 及 p16^{INK4a} 的表达与 NNEDV 细胞增殖和细胞增殖周期的调控相关,很可能成为治疗 NNEDV 的分子靶点。

关键词:增殖细胞核抗原;外阴上皮内非瘤样病变;细胞周期依赖性激酶;p16^{INK4a}

中图分类号:R711.72

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)31-4193-04

The expression and significance of PCNA, CDK4 and p16^{INK4a} in nonneoplastic epithelial disorders of vulvar*Wu Yunfei¹, Zhong Lijun², Wang Xia³, Tang Li⁴, Xia Xue³, Li Zongheng^{3△}

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Obstetrics-Gynecology, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Department of Obstetrics-Gynecology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 4. Medical Research Center, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To study the expression and significance of proliferation cell nuclear antigen (PCNA), cyclin dependent kinase 4 (CDK4) and p16^{INK4a} in nonneoplastic epithelial disorders of vulvar (NNEDV) and explore the correlation of them. **Methods** Fifty-two vulvar lesion samples (lesion group) and 52 vulvar skin surrounding the lesions samples (lesion-adjacent group) were collected from NNEDV patients, and lesion group include 27 samples with squamous hyperplasia of vulvar (VSH), 15 samples with lichen sclerosus of vulvar (VLS) and 10 samples containing both lesions (mixed-lesion). 25 vulvar skin samples were collected from patients receiving perineal repair operation as control group. The expression of PCNA, CDK4 and p16^{INK4a} was detected by immunohistochemistry assay. **Results** The expression of PCNA in lesion group was significant higher than those in lesion-adjacent group and control group ($P < 0.05$), while there was no significant differences among VSH, VLS and mixed lesion, and there was no significant difference between lesion adjacent group and control group ($P > 0.05$). The expression of CDK4 in lesion group and lesion-adjacent group were significant higher than that in control group ($P < 0.05$), while there weren't significant differences among VSH, VLS and mixed-lesion ($P > 0.05$), and there was no significant difference between lesions group and lesion-adjacent group ($P > 0.05$). The expression of p16^{INK4a} in lesion group was significant lower than those in lesion-adjacent group and control group ($P < 0.05$), while there was no significant differences among VSH, VLS and mixed-lesion ($P > 0.05$), and there was no significant difference between lesion-adjacent group and control group ($P > 0.05$). About PCNA and CDK4, there was a positive correlation in lesion group ($P < 0.05$) and there were no correlations in other groups ($P > 0.05$). About PCNA and p16^{INK4a}, there was a negative correlation in lesion group ($P < 0.05$) and there were no correlations in other groups ($P > 0.05$). About CDK4 and p16^{INK4a}, there were no correlations in all groups ($P > 0.05$). **Conclusion** expression of PCNA, CDK4 and p16^{INK4a} may be related of abnormal increasing of cell proliferation and acceleration the process of cell cycle, which may be applied to molecular target for treatment.

Key words: proliferating cell nuclear antigen; nonneoplastic epithelial disorders of valvar; cycle dependent kinase 4; p16^{INK4a}

外阴上皮内非瘤样病变 (nonneoplastic epithelial disorders of vulvar, NNEDV) 是指女性外阴皮肤和黏膜组织色素改变和

变性的一组慢性疾病。将 NNEDV 分为 3 类:外阴鳞状上皮增生(VSH);外阴硬化性苔藓(VLS);混合组。有文献报道,该病患者外阴恶性病变风险增高^[1]。目前,其病因及发病机制尚不完全明确,PCNA 作为评价细胞增殖活性的客观指标,近年来研究还发现 PCNA 在细胞周期调控方面也发挥着重要作用,细胞周期受 Cyclin D1/CDK4/RB 途径的正向调节,p16^{INK4a} 又是 CDK4 的特异性抑制因子,说明 PCNA 和 p16^{INK4a} 通过 CDK4 可能存在某种联系^[2-4]。本研究检测了 PCNA、CDK4 和 p16^{INK4a} 在 NNEDV 中的表达情况,分析他们在细胞增殖和细胞周期调控过程中的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 7 月至 2013 年 2 月本院 NNEDV 患者外阴病变皮肤(病变组)及病变旁皮肤组织(病变旁组)标本各 52 例,将病变组依据不同组织类型分组,其中 VSH 27 例,VLS 15 例,混合病变 10 例,年龄 20~79 岁,平均 38.10 岁;病程 3 个月至 20 年,平均 5.15 年。同时,收集外阴正常皮肤组织标本 25 例作为对照组,年龄 18~65 岁,平均 32.25 岁。病变组患者符合 1987 年国际外阴病研究协会 NNEDV 诊断标准。

1.2 主要试剂 PCNA 多克隆抗体(兔抗人)来源于美国 Bioworld Technology, Inc;CDK4 多克隆抗体(兔抗人)、DAB 显色试剂盒和免疫组织化学试剂盒来源于北京中杉金桥生物技术有限公司;p16^{INK4a} 多克隆抗体(兔抗人)购于北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实验方法 所有标本经 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,连续切厚度切片为 4 μ m。应用过氧化物酶标记的兔二步法免疫组织化学染色试剂盒检测。

1.3.2 结果判定 PCNA 阳性表达于外阴鳞状上皮细胞胞核出现黄色或棕黄色颗粒,p16^{INK4a} 和 CDK4 阳性表达于细胞质和(或)细胞核,阳性染色呈黄色或棕褐色颗粒。随机抽取 5 个高倍镜视野($\times 400$)采集图像,分析测定阳性细胞 MOD 值,测

定 3 次取均值。

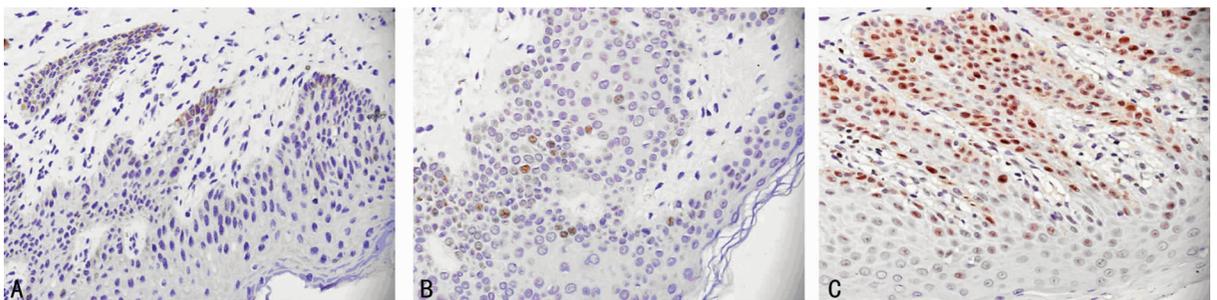
1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,运用最小差异显著法进行两两分析,应用 Pearson 分析相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCNA、CDK4 及 p16^{INK4a} 在各组外阴组织中的表达 PCNA 特异性表达于外阴组织上皮细胞核,以胞核出现颜色深浅不一的黄色或棕黄色颗粒为阳性表达。CDK4 及 p16^{INK4a} 均表达于外阴组织上皮细胞胞质和(或)胞核,以胞质和(或)胞核出现颜色深浅不一的黄色或棕黄色颗粒为阳性表达,见图 1~3。

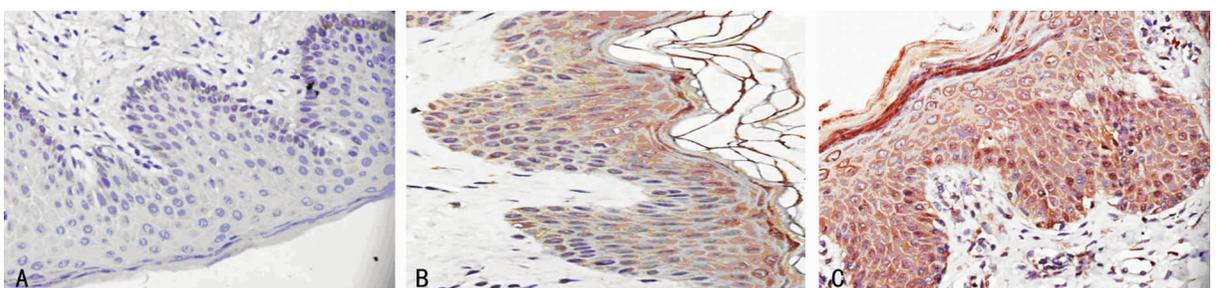
2.2 PCNA、CDK4、p16^{INK4a} 在病变组、病变旁组及对照组中的表达 (1)PCNA 在病变组中的表达均显著高于病变旁组和对照组($P < 0.05$);PCNA 在 VSH 组、VLS 组和混合病变组间表达差异无统计学意义($P > 0.05$);PCNA 在病变旁组和对照组间表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)CDK4 在病变组和病变旁组中的表达均显著高于对照组($P < 0.05$);CDK4 在 VSH 组、VLS 组和混合病变组之间的表达差异无统计学意义($P > 0.05$);CDK4 在病变组和病变旁组间表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。(3)p16^{INK4a} 在病变组中的表达均显著低于病变旁组和对照组($P < 0.05$);p16^{INK4a} 在 VSH 组、VLS 组和混合病变组间表达差异无统计学意义($P > 0.05$);p16^{INK4a} 在病变旁组和对照组间表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 1。

2.3 PCNA 和 CDK4 在各组外阴组织上皮细胞中表达强度的相关性 PCNA 和 CDK4 的表达在 VSH 组中呈正相关($r = 0.707, P < 0.05$);在 VLS 组中呈正相关($r = 0.594, P < 0.05$);在混合病变组中呈正相关($r = 0.604, P < 0.05$);在病变旁组中无相关性($r = 0.049, P > 0.05$);在对照组中无相关性($r = 0.341, P > 0.05$)。



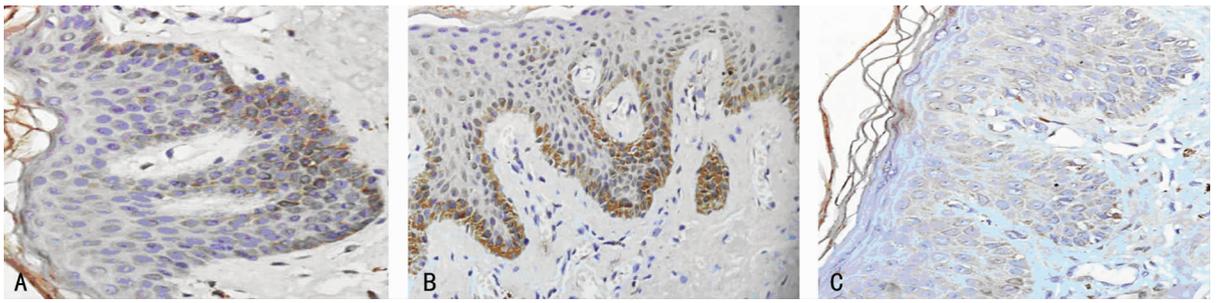
A: 对照组; B: 病变旁组; C: 病变组。

图 1 PCNA 在各组中的表达($\times 400$)



A: 对照组; B: 病变旁组; C: 病变组。

图 2 CDK4 在各组中的表达($\times 400$)



A: 对照组; B: 病变旁组; C: 病变组。

图 3 p16^{INK4a} 在各组中的表达 (×400)

表 1 PCNA、CDK4 及 p16^{INK4a} 在各组中的 MOD 值(±s)

组别	n	PCNA	CDK4	p16 ^{INK4a}
VSH 组	27	0.337±0.061*#	0.341±0.044*	0.140±0.061*#
VLS 组	14	0.331±0.064*#	0.354±0.029*	0.137±0.042*#
混合病变组	11	0.330±0.082*#	0.339±0.062*	0.125±0.055*#
病变旁组	52	0.147±0.034	0.336±0.076*	0.337±0.056
对照组	25	0.133±0.029	0.120±0.030	0.345±0.062
F		118.851	73.438	99.780
P		0.000	0.000	0.000

*: P<0.05, 与对照组比较; #: P<0.05, 与病变旁组比较。

2.4 PCNA 和 p16^{INK4a} 在各组外阴组织上皮细胞中表达强度的相关性 PCNA 和 p16^{INK4a} 的表达在 VSH 组中呈负相关 ($r = -0.406, P < 0.05$); 在 VLS 组中呈负相关 ($r = -0.757, P < 0.05$), 在混合病变组中呈负相关 ($r = -0.855, P < 0.05$); 在病变旁组中无相关性 ($r = 0.006, P > 0.05$); 在对照组中无相关性 ($r = 0.192, P > 0.05$)。

2.5 CDK4 和 p16^{INK4a} 在各组外阴组织上皮细胞中表达强度的相关性 CDK4 和 p16^{INK4a} 的表达在 VSH 组中无相关性 ($r = -0.335, P > 0.05$); 在 VLS 组中无相关性 ($r = -0.207, P > 0.05$); 在混合病变组中无相关性 ($r = -0.375, P > 0.05$); 在病变旁组中无相关性 ($r = -0.042, P > 0.05$); 在对照组中无相关性 ($r = -0.315, P > 0.05$)。

3 讨论

VLS 病变进展可以导致外阴鳞状细胞癌 (VSCC) 的发生^[5]。此外, 也有研究报道外阴浸润癌周围皮肤常见 VLS 改变。可见, NNEDV 具有往 VSCC 方向癌变的倾向, 而 VSCC 等恶性肿瘤的发生、发展常伴随细胞增殖能力的异常增强和细胞周期调控的失衡, 已有学者认为 NNEDV 发生可能与细胞增殖异常关系密切^[6]。

3.1 PCNA 在 NNEDV 中的表达及意义 PCNA 作为反映细胞增殖状态的客观指标。研究发现 PCNA 在细胞周期调控方面也发挥着重要作用^[7]。本实验结果显示, PCNA 在病变组中的表达均显著高于病变旁组和对照组 ($P < 0.05$), 提示 NNEDV 为一种上皮增生性病变, 病变部位上皮细胞具有较强的增殖活性, 细胞异常增殖可能是 NNEDV 形成的重要因素。而 PCNA 在病变组 3 种组织学类型中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 PCNA 可能促进病变组细胞增殖, 对不同组织学分型的形成关系不大。此外, 病变旁组 PCNA 的表达虽略高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。韦立蓓

等^[8-9] 在对外阴癌、外阴癌前病变及外阴上皮非瘤样增生病变的研究中也发现了 PCNA 的局限性过表达, 与本实验结果相似。这说明 NNEDV 虽为良性病变, 但病变部位 PCNA 高表达, 细胞正常周期逐渐失控, 进入细胞增殖活跃状态, 最终导致癌变的发生, 若 PCNA 过度表达, 临床上则应高度警惕 NNEDV 恶变的可能。因此, NNEDV 中 PCNA 高表达可能是 PCNA 参与 NNEDV 形成的一个重要因素, 测量其蛋白表达可作为区分病变组织与正常组织的一个分子标志, 在治疗上给予相应的处理。

3.2 CDK4 在 NNEDV 中的表达及意义 CDK 是细胞周期的推动力, 属于丝/苏氨酸激酶家族。CDK4 特异性控制 G₁ 期, 启动了一系列进入 S 期所必需的基因的表达, 推动细胞进入 S 期。研究表明, 在多种肿瘤细胞中有 CDK4 基因的扩增、突变或高表达。当肿瘤细胞被诱导分化时, 常有 CDK4 表达下调, 其活性及稳定性也随之降低^[10]。本实验结果中, CDK4 在病变组和病变旁组中的表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 表明 NNEDV 的发生可能是高表达的 CDK4 通过调节细胞周期事件, 加速细胞增殖周期进程, 从而使得病变部位细胞迅速增殖。而病变组 VSH、VLS 和混合型 3 种组织学分型中 CDK4 的表达无差异性 ($P > 0.05$), 这说明 CDK4 在 NNEDV 发病过程中, 可能仅对细胞周期调控起作用, 对不同组织学类型的形成不起作用。研究发现, 把 VLS 患者其他部位正常皮肤移植到反复受到创伤和刺激的外阴, 该处皮肤也会逐渐发生苔藓样病变, 说明病变皮肤某些蛋白因子可直接或间接影响病变旁正常皮肤, 使其具有细胞增殖活性增强的倾向^[11]。本实验结果中, 病变组 CDK4 的表达略高于病变旁组但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示病变部位高表达的 CDK4 可能对病变旁组织有直接或间接的诱导效应, 使得病变旁组织相对正常皮肤组织, 处于细胞增殖活性逐渐增强的病变前状态, 可能会引起病变部位范围的扩大。有研究也得出与笔者相似的结果, 这些都说明高表达的 CDK4 推动了细胞周期的进展, 打破了正常的细胞周期平衡, 从而导致 NNEDV 的发生^[12-13]。因此, NNEDV 中 CDK4 高表达可能是 CDK4 参与 NNEDV 形成的又一个重要因素, 测量其蛋白表达可作为区分病变组织与正常组织的又一个分子标志, 在治疗上给予区别化对待, 以免损伤正常皮肤的微环境。

3.3 p16^{INK4a} 在 NNEDV 中的表达及意义 p16^{INK4a} 属于 CKI 两大家族中的锚蛋白家族, 如果 p16^{INK4a} 蛋白减少或功能丧失, 无法竞争 CDK4 与 Cyclin D 结合, 会导致细胞异常增殖。研究人员已从多种癌症中检测出 50% 以上的 p16^{INK4a} 基因纯合子缺失, p16^{INK4a} 参与了各种组织的肿瘤形成^[14]。总之, 检测

p16^{INK4a} 的缺失,是判断疾病性质及预后的一项重要指标。本实验结果中,p16^{INK4a} 在病变组中的表达均显著低于病变旁组 and 对照组($P < 0.05$),提示病变组 p16^{INK4a} 低表达可能直接或间接导致了细胞周期负调控机制的失灵,导致细胞出现异常增殖,诱发了 NNEDV 的发生、发展。病变组中 3 种组织学类型中 p16^{INK4a} 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),可能表明其对 NNEDV 不同组织学类型的形成不起作用。病变旁组 and 对照组之间 p16^{INK4a} 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),表明病变部位 p16^{INK4a} 的低表达可能有一定局限性,对邻近相对正常皮肤组织中 p16^{INK4a} 表达的影响较小。Tringler 等^[15] 研究发现,随着 NNEDV 发展成 VSCC,p16^{INK4a} 的表达缺失现象逐步显著,说明 p16^{INK4a} 的异常低表达是外阴疾病恶变的一个早期事件。因此,NNEDV 中 p16^{INK4a} 低表达可能是 p16^{INK4a} 参与 NNEDV 形成的又一个重要因素,测量其蛋白表达可作为区分病变组织与正常组织的又一个分子标志,在治疗上给予不同的处理,避免对正常皮肤的损伤。

3.4 PCNA、CDK4 及 p16^{INK4a} 在 NNEDV 中表达的相关性及其意义 本实验中,PCNA 和 CDK4 在病变组各分型中均呈正相关,提示在 NNEDV 发病过程中 PCNA 的高表达促使 CDK4 进一步扩增,加速细胞增殖及细胞周期进程,促进 NNEDV 的发生。PCNA 和 p16^{INK4a} 在病变组各分型中均成负相关,韦立蓓^[8] 等研究 PCNA 和 p16^{INK4a} 在角化型外阴鳞癌中的表达及其意义时也得出与本研究相似的结果,提示 PCNA 和 p16^{INK4a} 可能具有相互拮抗或负反馈调节作用,二者的这种相互作用使得细胞增殖更为活跃,从而进一步促进细胞增殖及细胞周期进展,加速 NNEDV 的发生及恶变的可能。对于 CDK4 与 p16^{INK4a},二者在各组中的相关系数都为负数,但差异不明显,提示在 NNEDV 发病过程中,CDK4 与 p16^{INK4a} 可能具有一定负反馈调节关系,但二者间可能还存在其他因子直接或间接的影响,使得这种负反馈调节关系不明显,具体影响机制还需进一步研究。可以设想通过同时抑制 PCNA、CDK4 并激活 p16^{INK4a} 的活性,从而在细胞增殖和细胞增殖周期的调控过程中阻断病变皮肤增殖,很可能成为治疗 NNEDV 的分子靶点。可以达到治疗效果。

总之,NNEDV 的发生、发展可能与细胞增殖异常增高,细胞增殖周期加速相关,PCNA、CDK4 及 p16^{INK4a} 参与了细胞增殖和细胞增殖周期的调控。具体确切机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] van de Nieuwenhof HP, van der Avoort A, de Hulu JA. Review of squamous premalignant vulvar lesions[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 68(10): 131-156.
- [2] Mahler M, Miyachi K. The clinical significance of autoanti-

bodies to the proliferating cell nuclear antigen [J]. Autoimmun Rev, 2012, 11(10): 771-775.

- [3] 刘宏. P16^{INK4a} 及 PCNA 在子宫内膜样腺癌中的表达及临床意义[D]. 吉林: 吉林大学, 2012.
- [4] Stoimenov I, Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(2): 605-613.
- [5] Brodrick B, Belkin ZR, Goldstein AT, et al. Influence of treatments on prognosis for vulvar lichen sclerosus: facts and controversies[J]. Clin Dermatol, 2013, 31(6): 780-786.
- [6] 郝烁月, 武昕. Cyclin D1 在外阴癌变中的表达及意义[J]. 中国现代医生, 2009, 47(3): 15-16.
- [7] Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen: a key factor in DNA replication and cell cycle regulation [J]. Ann Bot, 2011, 107(7): 1127-1140.
- [8] 韦立蓓, 濮德敏, 尹伶. p16 蛋白和 PCNA 在角化型外阴鳞癌中的表达及其意义[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(22): 3168-3170.
- [9] 韦立蓓, 濮德敏, 尹伶. 角化型外阴鳞癌与上皮内非瘤样变组织中 DNA 倍体及其与细胞增殖关系的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(5): 378-380.
- [10] Paternot S, Bockstaele L, Bistesu X, et al. Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK-activating kinase[J]. Cell Cycle, 2010, 9(4): 689-699.
- [11] 王爱芹, 董慧娟. 实用中西医结合妇产科学[M]. 北京: 北京出版社, 1996: 330-331.
- [12] 刘华梅, 李世宁, 李燕, 等. 外阴上皮内非瘤样病变 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达及临床意义[J]. 现代预防医学, 2009, 36(24): 261-264.
- [13] 吴艺佳, 胡丽娜, 袁小莉, 等. 聚焦超声对外阴白色病变组织周期的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(12): 1502-1504.
- [14] Yang DG, Liu L, Zheng XY. Cyclin-dependent kinase inhibitor P16INK4a and telomerase may co-modulate the lial progenitor cells senescence [J]. Age Res Rev, 2008, 7(2): 137-146.
- [15] Tringler B, Grimm C, Dudek G, et al. P16INK4a expression in invasive vulvar squamous cell carcinoma[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(3): 279-283.

(收稿日期: 2014-02-15 修回日期: 2014-04-22)

2014 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者, 本刊一律接受网上投稿, 不再接受纸质和电子邮箱投稿! 请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话: 023-63604477。

来稿须将审稿费 50 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部, 编辑部若未收到审稿费, 稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!