

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.004

细胞周期调控因子 P16^{INK4}、P57^{kip2} 和 Ki67 在肝癌中的表达及意义*高 涵¹,周 涛^{2△},张春晶¹,李淑艳¹,王丽萍¹,刘哲丞¹

(1. 齐齐哈尔医学院生物化学与分子生物学教研室,黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 齐齐哈尔医院第一附属医院普通外科,黑龙江齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的** 探讨细胞周期调控因子 P16^{INK4}、P57^{kip2} 和 Ki67 在肝癌中的表达水平及其意义。**方法** 收集正常肝组织标本 21 例,肝细胞肝癌标本 48 例及对应的癌旁组织标本 48 例为研究对象,通过免疫组织化学和 Western blot 分析 P16^{INK4}、P57^{kip2} 和 Ki67 的表达水平。**结果** P16^{INK4} 及 P57^{kip2} 蛋白肝癌组织中的表达与癌旁组织及正常肝脏组织比较显著降低,阳性率分别为 49.3% 和 34.2%,Ki67 蛋白肝癌组织中的表达水平显著升高,其阳性率为 91.7%,与癌旁组织及正常肝脏组织比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),结果与 Western blot 结果一致;高、低分化组 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 的表达水平比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** P16^{INK4}、P57^{kip2} 表达降低及 Ki67 的高表达在肝细胞癌的发生、发展过程中可能有重要的作用。

[关键词] P16^{INK4};P57^{kip2};Ki67;肝癌**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)09-1165-03**Expression and significance of P16^{INK4}, P57^{kip2} and Ki67 in hepatocellular carcinoma***Gao Han¹, Zhou Tao^{2△}, Zhang Chunjing¹, Li Shuyan¹, Wang Liping¹, Liu Zhecheng¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology of Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China;

2. General Surgery of First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

[Abstract] **Objective** Analysis the expression and significance of P16^{INK4}, P57^{kip2} and Ki67 in hepatocellular carcinoma. **Methods** 21 normal liver tissue, 48 hepatocellular carcinoma tissues and 48 corresponding adjacent tissue were collected for this study. Immunohistochemical analysis the expression levels of P16^{INK4}, P57^{kip2} and Ki67. **Results** P16^{INK4} and P57^{kip2} in hepatocellular carcinoma tissue were significantly lower, the positive rates were 49.3% and 34.2% respectively, Ki67 was significantly higher than the normal liver tissue and corresponding adjacent tissue, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), the results were consistent with the Western blot; different differentiated group p57^{kip2}, Ki67 expression and P16^{INK4} were significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Low expression of P16^{INK4} and P57^{kip2}, the higher expression of Ki67 play an important role in the development of hepatocellular carcinoma.

[Key words] P16^{INK4};P57^{kip2};Ki67;hepatocellular carcinoma

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是目前中国最常见的肿瘤之一,其恶性程度高,居中国癌症死因的第 2 位。肿瘤基因水平的不断探索发现肿瘤是多基因变化引起细胞周期紊乱从而导致细胞生长失控的一类疾病^[1]。P16^{INK4} 基因是人类肿瘤中最常见的抑癌基因之一,其翻译产物通过抑制细胞周期素依赖蛋白激酶(CDK4/6)参与细胞周期调控,抑制细胞的增殖和分化^[2]。P57^{kip2} 是新发现的广谱 CDK 抑制剂,研究发现 P57^{kip2} 的失活与多种人类恶性肿瘤的发生、发展相关,可以作为肿瘤预后的独立指标^[3],而 Ki67 作为反映肿瘤细胞增殖活性的标记物,常用于即时反映肿瘤增殖细胞的数量,判断肿瘤的恶性程度^[4]。本研究通过观察 P16^{INK4}、P57^{kip2} 及 Ki67 在肝癌中的表达水平,探讨其在肝癌发生、发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究收集 2010 年 7 月至 2014 年 7 月在齐齐哈尔医学院第一附属医院手术切除、肝脏穿刺及尸体解剖标本,其中,正常肝组织标本 21 例,肝细胞肝癌标本 48 例,根据 Edmondson 分级法^[5]分为一级 6 例,二级 23 例,三级 12 例,四级 7 例;与肝癌组织对应的癌旁组织标本 48 例。以上标本由本校病理中心专业人员确认。

1.2 主要仪器与试剂 LEICA RM2165 切片机、JLT-A 型包埋专用冷台、YT-7F 烤片机、Olympus 全自动显微照相系统、OLYMPUS 显微镜、UVP 凝胶成像系统、羊抗人多克隆抗体 P57^{kip2}、鼠抗人单克隆抗体 Ki67、鼠抗人单克隆抗体 P16^{INK4}、SP-900 免疫组织化学染色试剂盒、Bradford 蛋白测定试剂。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 组织块经 10% 甲醛溶液固定后,采用常规石蜡包埋切片,采用通用型二步法免疫组织化学染色方法,经柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复,分别检测肝癌组织、癌旁组织及正常肝癌组织中 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 的表达水平。每批染色均采用 PBS 液替代一抗为阴性对照,采用已知切片做阳性对照。结果判定组织中 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 免疫阳性物质定位于胞浆,胞浆凡出现明显的棕黄色颗粒为阳性细胞,在每个切片上下左右及中间随机选取高倍视野计算阳性细胞数,计算总细胞数不少于 1 000 个。阳性判定标准:阳性细胞大于或等于 10% 为阳性、小于 10% 为阴性。

1.3.2 蛋白样品制备 从 -80 ℃ 冰箱取出收集肝癌、癌旁组织及正常肝黏膜组织,称取 0.2 g 组织加 200 μL 组织裂解液(50 mmol/mL Tris-Hcl pH 8.0, 150 mmol/mL PMSF, 0.1%

NP-40,蛋白酶抑制剂)冰浴匀浆。将匀浆液 4 ℃以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用 Bradford 法检测蛋白浓度;取上述制备的蛋白样品 50 μg 上样到 15% 聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,电泳后将蛋白电转至 NC 膜,用 5% 脱脂奶粉封闭,分别加一抗(P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4}),37 ℃ 孵育 2 h,经 0.1% TBST 漂洗后加二抗(1:2 000)室温孵育 2 h, TBST 洗膜后加 ECL, X 光胶片定影,扫描后用 IPP6.0 进行图像分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,率的比较采用 χ^2 检验,均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 在各组肝组织中的表达水平 免疫组织化学染色结果显示 P57^{kip2} 蛋白在肝癌组织、癌旁组织及正常肝脏组织中阳性率分别为 34.2%、57.1% 及 72.6%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1A~C;Ki67 蛋白在肝癌组织、癌旁组织及正常肝脏组织中阳性率分别为 91.7%、84.9% 及 6.4%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1D~F;P16^{INK4} 在肝癌组织、癌旁组织及正常肝脏组织中的阳性率分别为 49.3%、68.1% 及 98.6%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1G~I,与 Western blot 结果一致,见图 2。

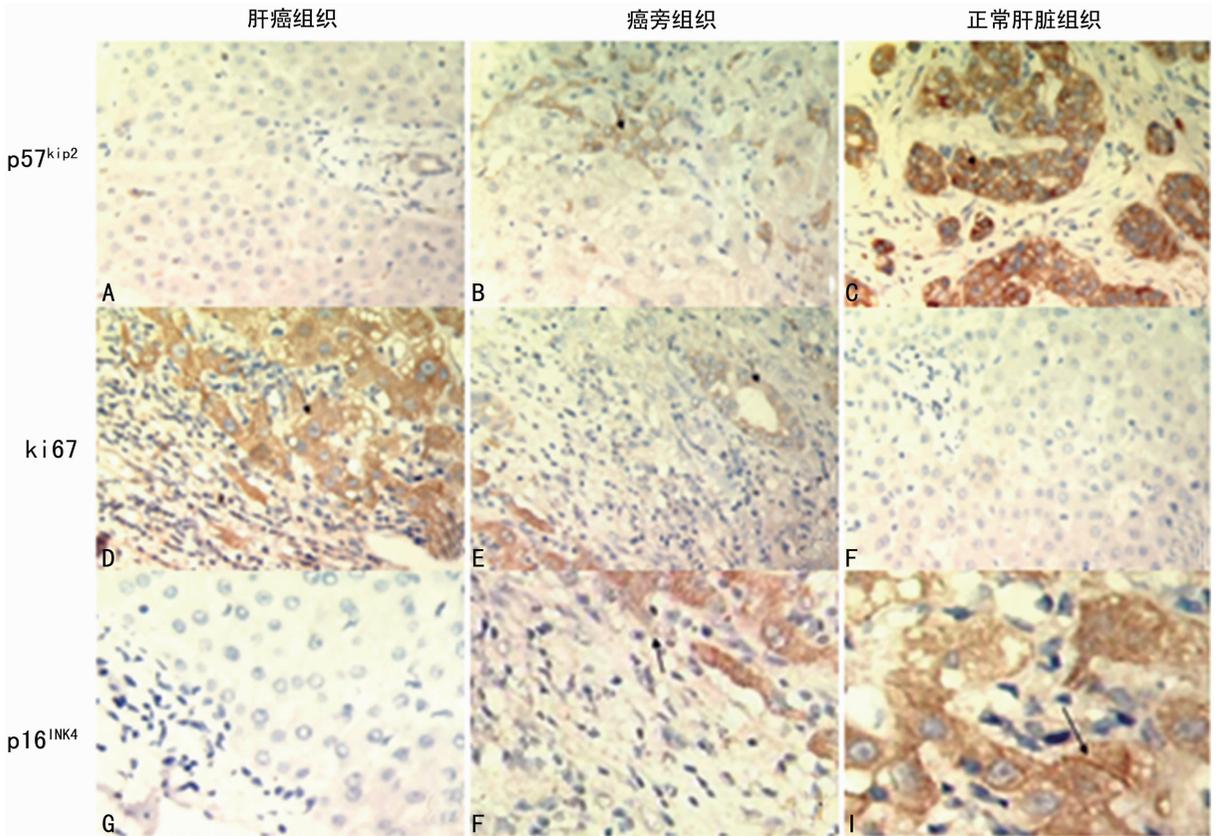


图 1 肝癌组织、癌旁组织及正常肝脏组织中 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 免疫组织化学染色结果(×400)

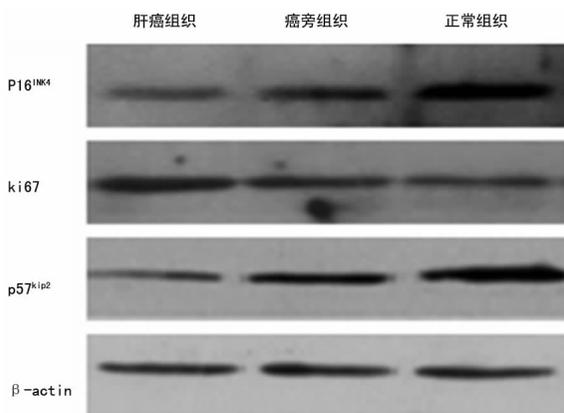


图 2 肝癌组织、癌旁组织及正常肝脏组织中 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} Western blot 结果

2.2 不同分化程度肝癌中 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 的表达 根据 Edmondson 分级,将一、二级作为低分化组,三、四级作为高

分化组,分析结果显示在不同分化组 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 的表达水平比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同分化程度肝癌中 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 的表达水平比较[n(%)]

组别	n	P57 ^{kip2} 阳性	Ki67 阳性	P16 ^{INK4} 阳性
低分化组	29	13(44.83)	23(79.31)	19(65.52)
高分化组	19	3(15.79)	19(100.00)	4(21.05)
χ^2		4.36	4.49	9.09
P		<0.05	<0.05	<0.05

3 讨 论

乙型肝炎或丙肝病毒感染导致肝炎、肝硬化到腺瘤样增生结节转化为早期肝癌、晚期肝癌最终肝癌转移的多阶段发生、发展过程中抑癌基因的突变、失活及癌基因的过度表达共同促使正常的肝细胞增生、癌变^[6-7]。近年研究结果显示癌基因及

抑癌基因多数作用聚集在细胞周期的调控机制上,通过直接参与肝细胞的周期调控^[8],促使肝细胞呈现失控性增殖,最终导致肿瘤的发生。

P16 蛋白能通过抑制 CDK4 的活性使细胞分裂停滞于 G₁/S 期阻止细胞的异常增生,是一种重要的抑癌基因,大量研究显示在肝细胞癌组织中 P16 基因常出现表达缺失或异常,进展期肝细胞癌组织中其异常率高达 60%,被认为是致病机制中的重要环节^[9]。P57 位于染色体 11p15.1,该区域的缺失常与肿瘤相关。研究显示 P57 在前列腺癌、膀胱癌及胰腺癌等恶性肿瘤中表达降低^[10-12]。P57 基因敲除小鼠出现增长过度,呈现高频率的肿瘤转向,研究主要认为其通过抑制细胞周期来实现抑制肿瘤发生^[13]。有研究显示 P57 在细胞核中能通过抑制 cyclinD1 及 CDK2 的表达,降低 CDK4/cyclinD1 及 CDK2/cyclinE 的活性抑制肿瘤细胞的增殖^[14]。Ki67 被广泛用于反映癌症及肺癌细胞的增殖活性^[15-16]。为了研究 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 在肝癌发生、发展过程中的作用,本研究通过免疫组织化学染色和 Western blot 法分析其在肝癌组织、对应的癌旁组织及正常肝癌组织中的表达水平,结果显示 p57kip2 蛋白在肝癌组织中的表达水平显著低于癌旁组织及正常肝脏组织,Ki67 蛋白在肝癌组织中呈现高表达,P16^{INK4} 在肝癌组织中表达显著降低,差异有统计学意义,提示 P16^{INK4} 及 P57^{kip2} 表达可能降低参与细胞周期 G₁/S 调控,促使正常肝细胞的增殖发生紊乱,增长过度,导致肿瘤的发生,在此过程中作为肿瘤细胞增殖的指标之一,Ki67 的表达显著增加。根据 Edmondson 分级,高分化组中 P57^{kip2}、P16^{INK4} 呈现低表达,Ki67 表达较低分化组增加,提示 P57^{kip2}、P16^{INK4} 及 Ki67 在肝癌的发展过程中可能有重要的作用。

P16^{INK4}、P57^{kip2} 表达降低及 Ki67 的高表达在肝细胞癌的发生、发展过程中可能有着重要的作用,P16^{INK4}、P57^{kip2} 参与的细胞周期 G₁/S 期转化异常,可能是肝癌发生的机制之一,三者联合检测可能对于肝细胞癌的诊断有重要的价值。

参考文献

- [1] Elkablawy MA, Maxwell P. Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: relationship to tumour stage and patient survival[J]. J Pathol, 2001, 194(4): 436-443.
- [2] Naqshe Zahra S, Khattak NA, Mir A. Comparative modeling and docking studies of p16ink4/cyclin D1/Rb pathway genes in lung cancer revealed functionally interactive residue of RB1 and its functional partner E2F1[J]. Theor Biol Med Model, 2013, 10: 1.
- [3] 罗祖强,周正平,格桑志玛,等. 子宫内膜癌及不同子宫内
(上接第 1164 页)
agents[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2006, 231(4): 366-377.
- [14] Coulter LB, McLean RJ, Rohde RE, et al. Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa biofilms [J]. Viruses, 2014, 6(10): 3778-3786.
- [15] Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their Enzymes in Biofilm Control[J]. Curr Pharm Des, 2014, 21(1): 85-99.
(收稿日期:2014-10-09 修回日期:2014-12-03)
- [4] Raghunandhakumar S, Paramasivam A. Thymoquinone inhibits cell proliferation through regulation of G₁/S phase cell cycle transition in N-nitrosodiethylamine-induced experimental rat hepatocellular carcinoma[J]. Toxicol Lett, 2013, 223(1): 60-72.
- [5] 庄利萍,于璐,杨倩,等. 肝癌组织晚期糖基化终产物的表达及其与病理因素的关系[J]. 广东医学, 2013, 34(8): 1205-1207.
- [6] Wang B, Ding YM. Expression and significance of MMP2 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2014, 8(2): 539-546.
- [7] 李巍,叶研硕,刘宏宇,等. 调节性 T 细胞在肝癌发生、发展中的作用及机理[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(12): 2223-2226.
- [8] 李明,薛慧琴,朱镭,等. 细胞周期检测点激酶 1 在原发性肝癌中的表达及其与肝癌的相关性[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(4): 502.
- [9] Dickson MA. Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(13): 3379-3383.
- [10] 孙凯,曾俊杰,王伟,等. 微小 RNA-221 对结直肠癌中 CDKN1C/P57 表达调控的研究[J]. 中华胃肠外科杂志, 2011, 14(4): 279-283.
- [11] 易晓佳,申丽娟,章宗籍,等. 人肝癌 P57~(kip2) 基因失表达的遗传不稳定性[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(3): 272-274.
- [12] 赵亚男,孙冬霞,王蕾,等. 三阴乳腺癌组织中 p57 和 ki67 的表达意义及相关性研究[J]. 西部医学, 2013, 25(5): 654-656.
- [13] Jin RJ, Lho Y. Down-regulation of p57Kip2 induces prostate cancer in the mouse[J]. Cancer Res, 2008, 68(10): 3601-3608.
- [14] 林荣志. Cyclin D1、CDK4、p57<'KIP2> 在喉鳞状细胞癌中的表达和意义[D]. 福州: 福建医科大学, 2010.
- [15] 王宝娜,王翔,王靖,等. Ki67 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(4): 273-275.
- [16] 曾祥,李岩,裴冬梅,等. DOG1、CD117 和 Ki67 在胃肠道间质瘤中的表达及其与临床病理因素和危险度的相关性[J]. 中国医科大学学报, 2014, 43(5): 449-453.
(收稿日期:2014-10-31 修回日期:2014-12-22)
- [15] Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their Enzymes in Biofilm Control[J]. Curr Pharm Des, 2014, 21(1): 85-99.
(收稿日期:2014-10-09 修回日期:2014-12-03)