

文章编号:1005-6947(2005)04-0260-05

· 实验研究 ·

乳腺癌细胞中 p16, p53, CDK4/cyclinD1 的表达和预后的关系

田兴松¹, 周文红²

(1. 山东省立医院 乳腺外科, 山东 济南 250021; 2. 山东大学临床学院 保健外科, 山东 济南 250021)

摘要:目的 探讨 p16, p53, CDK4/cyclinD1 在乳腺癌组织中的表达和与预后的关系。方法 检测 86 例术前均未作放化疗的乳腺癌组织中 p16, p53, CDK4, cyclinD1 的表达, 分析其与临床病理参数的关系。结果 (1) p16, p53, CDK4 在 I, II 级浸润性导管癌中 p16, p53, CDK4 的阳性表达存在差异, cyclinD1 无差异; 淋巴结阴性组与淋巴结阳性组中的阳性表达均存在差异; 年龄 ≤ 50 岁组和 > 50 岁组阳性表达无差异; ER 阴性和阳性组 p53 阳性表达存在差异, p16, CDK4, cyclinD1 表达无差异; PR 阴性和阳性组 p53 阳性表达存在差异, 余无差异。(2) p16 与 p53 表达、与 CDK4 表达、与 cyclinD1 表达相关 (P 均 < 0.01); CDK4 与 cyclinD1 表达相关 ($P < 0.05$), p53 和 CDK4 与 cyclinD1 不相关。(3) 单因素分析提示, 影响总生存率的因素有: 组织学分级, 淋巴结转移, ER, PR, p16, p53, CDK4/cyclinD1 的表达 ($P < 0.05$)。 (4) 多因素生存分析结果表明, p16 和淋巴结转移是影响乳腺癌患者总生存率的独立预后因素 ($P < 0.01$)。结论 p16, p53, CDK4/cyclinD1 与乳腺癌的发生, 发展密切相关, 可作为判断肿瘤浸润转移, 指导治疗和估计预后的参考指标, 特别是 p16 蛋白的表达水平及淋巴结转移可能是判断乳腺癌术后生存的独立有效指标, 而综合应用上述指标可能更有助于预后的判断。

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; 癌基因表达; 预后

中图分类号: R737.9; R730.23

文献标识码: A

The relation between expression of p16, p53, CDK4/cyclinD1 and prognosis in breast cancer

TIAN Xing-song¹, ZHOU Wen-hong²

(1. Department of Breast Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021; 2. Health Care Surgery, Clinical College of Shandong University, Jinan 250021)

Abstract: Objective To study the expression levels of p16, p53, CDK4/cyclinD1 protein in breast cancer and their relationship to prognosis. **Methods** The expression of p16, p53, CDK4 and cyclinD1 in breast cancer tissues of 86 patients who did not receive preoperative chemotherapy were examined, and the relationship of their expression to clinicopathological data were analyzed. **Results** (1) p16, p53, CDK4: The positive expression of p16, p53 and CDK4 were significantly different in stages I and II infiltrating ductal carcinoma, but cyclin D showed no difference; their positive expression in lymph node negative and lymph node positive groups were significantly different; their positive expression for patients' age ≤ 50 years and > 50 years showed no significant difference; there was significant difference of p53 expression between ER negative and ER positive groups, but p16, CDK4 and cyclin D expression showed no difference; p53 expression was significantly different in ER negative and PR positive groups, but the levels of the other proteins were not significantly different. (2) There were significant differences between the expression of p16 and p53 ($P <$

基金项目: 山东省卫生厅九五攻关课题(97-13)。

收稿日期: 2004-08-20; **修订日期:** 2005-01-31。

作者简介: 田兴松(1964-), 男, 山东龙口人, 山东省立医院副教授, 主要从事乳腺良、恶性疾病基础临床方面的研究。

通讯作者: 田兴松: 0231-7038076; E-mail: txs0509@163.com。

0.01), p16 and CDK4 ($P < 0.01$), p16 and cyclinD1 ($P < 0.01$). (3) Univariate survival analyses indicated that histological grade, axillary lymph node metastases, ER and PR status, expression of p16, CDK4 and cyclinD1 can affect the overall survival ($P < 0.05$). (4) Multivariate analyses showed that only p53 and axillary lymph node metastases were prognostic factors for survival ($P < 0.05$). **Conclusions** The gene products of p16, p53, CDK4/cyclinD1 play a significant role in the oncogenesis and development of cancer, and may be used as reference indicators to judge tumor invasion and metastasis, direction therapy and predict prognosis. p16 expression and axillary lymph node metastases may be independent prognostic indicators of postoperative survival in breast cancer patients. The combined use of the above markers may be helpful in making a better estimation of prognosis.

Key words: BREAST NEOPLASMS/pathol; ONCOGENES EXPRESSION; PROGENOSIS

CLC number: R737.9; R730.23

Document code: A

研究表明,乳腺癌的发生,发展及转移与细胞周期调控异常密切相关,特别是G1期相关的各种因子,包括正向调节作用的细胞周期蛋白(cyclins);细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs);负向调节作用的细胞周期蛋白依赖性抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs);抑癌基因产物,如p16,这些蛋白可单独或协同促进或抑制恶性肿瘤的发生和发展。本研究通过检测p16,p53,CDK4/cyclinD1在乳腺癌组织中的表达,并分析其与临床病理特征和预后的关系,以探讨其在乳腺癌发生,发展中的作用,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 标本来源及资料

选取山东省立医院病理科1981~1991年乳腺癌的存档蜡块,复阅HE切片及临床病理资料,随机选择随访资料齐全且术前未作放化疗的86例的石蜡块进行切片。每个蜡块连续切片7张,厚4 μ m,其中1张用于常规HE染色,3张免疫组化染色,3张备用。按1982年WHO标准进行组织学分型,浸润性导管癌参考Scarff-Bloom-Richardson分级法,86例中浸润性导管癌83例,浸润性小叶癌2例,透明癌1例;无淋巴结转移48例,有淋巴结转移38例;ER阳性48例,PR阳性40例;临床分期I期48例,II期32例,III期6例。86例均为女性,年龄24~77岁,平均48岁。

86例乳腺癌患者进行了随访,其中10年以上52例(60.47%),5年以上10年以下34例(39.53%)。至随访结束时,32例(37.21%)因复发或转移死亡,死于其他疾病6例;随访结束时尚存活48例(55.81%)。

1.2 免疫组化方法

采用美国NewMark公司免疫组化药盒,按说明书行SABC法免疫组化染色。结果判定:标准染色阳性为癌细胞核呈明显的黄色或棕黄色颗粒,或偶伴细胞质的黄色或棕黄色表达。每张切片由2名高年资病理科医生用高倍镜双盲判断肿瘤细胞中4种肿瘤蛋白的表达情况,按阳性细胞率分:阳性细胞数无或<10%为(-);阳性细胞数10%~24%为(+),25%~49%为(++), $\geq 50%$ 为(+++)。

1.3 统计学处理方法

χ^2 检验,相关分析,Kaplan-Meier法log-rank检验进行单因素生存分析,多因素分析采用COX回归逐步前进法(Forward:LR)。统计软件为SPSS 10.0版。

2 结果

2.1 p16, p53, CDK4/cyclinD1 在乳腺癌组织中的表达阳性率

p16蛋白阳性表达率为58.1%,p53蛋白阳性表达率为29.1%,CDK4阳性表达率为36.0%,cyclinD1蛋白阳性表达率为39.5%。

2.2 p16 的表达及其与临床病理特征的关系

p16与组织学分级,淋巴结转移相关,与ER和PR,年龄无相关。p16在I级,II级浸润性导管癌中的阳性表达率分别为70.5%和45.2% ($P < 0.05$);淋巴结阴性组与淋巴结阳性组的表达率分别为79.2%和31.6% ($P < 0.01$); ≤ 50 岁组和 > 50 岁组分别为56.3%和60.5% ($P > 0.05$);ER阴性和阳性组分别为47.4%和66.7% ($P > 0.05$);PR阴性和阳性组分别是54.3%和62.5%

($P > 0.05$) (表1)。

2.3 p53 的表达与临床病理特征的关系

p53 的表达及其在年龄,肿瘤大小,病理类型分组间未见统计学差异($P > 0.05$)。p53 在 I 级,II 级浸润性导管癌组织中的阳性表达率分别为 15.9% 和 42.9% ($P < 0.01$);淋巴结阴性组与淋巴结阳性组为 12.5% 和 50.0% ($P < 0.01$); ≤ 50 岁组和 > 50 岁组为 27.1% 和 31.6% ($P > 0.05$);ER 阴性和阳性组为 42.1% 和 18.8% ($P < 0.05$);PR 阴性和阳性组为 39.1% 和 17.5% ($P < 0.05$) (表1)。

2.4 CDK4 的表达及其与临床病理特征的关系

CDK4 的表达与组织学分级,淋巴结转移相关,与 ER 和 PR,年龄不相关。CDK4 在 I 级,II 级浸润性导管癌组织中的阳性表达率分别为 25.0% 和

47.6% ($P < 0.05$);淋巴结阴性和阳性的乳腺癌组为 20.8% 和 55.3% ($P < 0.001$);ER 阴性和阳性组为 44.7% 和 29.2% ($P > 0.05$);PR 阴性和阳性组为 39.1% 和 32.5% ($P > 0.05$); ≤ 50 岁组和 > 50 岁组为 37.5% 和 34.2% ($P > 0.05$) (表1)。

2.5 cyclinD1 的表达及其与临床病理特征的关系

cyclinD1 与淋巴结转移相关,与年龄,组织学分级,ER 和 PR 均未见相关。在 I,II 级浸润性导管癌组织中的阳性表达率分别为 34.1% 和 45.2% ($P > 0.05$);淋巴结阴性和阳性组为 25.0% 和 57.9% ($P < 0.02$);ER 阴性和阳性组为 44.7% 和 35.4% ($P > 0.05$);PR 阴性和阳性组为 37.0% 和 42.5% ($P > 0.05$); ≤ 50 岁组和 > 50 岁组为 43.8% 和 34.2% ($P > 0.05$) (表1)。

表1 各指标与临床病理特征(年龄,组织学分级,淋巴结转移,ER,PR)的关系(n)

项目	n	p16 蛋白			p53 蛋白			CDK4 蛋白			cyclinD1		
		阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)
年龄(岁)													
≤ 50	48	27	21	56.3	35	13	27.1	27	21	56.3	21	27	43.8
> 50	38	23	15	60.5	26	12	31.6	20	18	52.6	13	25	34.2
浸润性导管癌													
I	44	31	13	70.5	37	7	15.9	11	33	25.0	15	29	34.1
II	42	19	23	45.2	24	18	42.9	20	22	47.6	19	23	45.2
淋巴结转移													
无	48	38	10	79.2	42	6	12.5	10	38	20.8	12	36	25.0
有	38	12	26	31.6	19	19	50.0	21	17	55.3	22	16	57.9
ER													
阴性	38	18	20	47.4	22	16	42.1	17	21	44.7	17	21	44.7
阳性	48	32	16	66.7	39	9	18.8	14	34	29.2	17	31	35.4
PR													
阴性	46	25	21	54.3	28	18	17.5	18	28	39.1	17	29	37.0
阳性	40	25	15	62.5	33	7	39.1	13	27	32.5	17	23	42.0

2.6 p16, p53, CDK4/cyclinD1 之间的相关关系

p16 与 p53 表达、与 CDK4 表达、与 cyclinD1 表达相关(均 $P < 0.01$);CDK4 与 cyclinD1 表达相关

($P < 0.05$);p53 和 CDK4 与 cyclinD1 不相关(表2~4)。

表2 p16 与 cyclinD1, p53, CDK4 的关系

p16	cyclinD1		P	p53		P	CDK4		P
	(-)	(+)		(-)	(+)		(-)	(+)	
p16 (-)	10(27.8%)	26(72.2%)		19(22.1%)	17(19.8%)		12(33.3%)	24(66.7%)	
p16 (+)	42(84.0%)	8(16.0%)	0.068	42(48.8%)	8(9.3%)	0.002	43(86.0%)	7(14.0%)	0.027
合计	52(60.5%)	34(39.5%)		61(70.9%)	25(29.1%)		55(64.0%)	31(36.0%)	

表3 p53 与 cyclinD1, CDK4 的关系

p53	cyclinD1		P	CDK4		P
	(-)	(+)		(-)	(+)	
P53 (-)	39(45.3%)	22(25.6%)		42(48.8%)	19(22.1%)	
P53 (+)	13(15.1%)	12(14.0%)	0.338	13(15.1%)	12(14.0%)	0.377
合计	52(60.5%)	34(39.5%)		55(64.0%)	31(36.0%)	

表4 cyclinD1 与 CDK4 的关系

cyclinD1	CDK4		P
	(-)	(+)	
cyclinD1 (-)	38(73.1%)	14(26.9%)	
cyclinD1 (+)	17(50.0%)	17(50.0%)	0.720
合计	55(64.0%)	31(36.0%)	

2.7 p16, p53, CDK4 / cyclinD1 与预后的关系

单因素分析提示影响总生存率的因素有:组织学分级,淋巴结转移,ER,PR,p16,p53,CDK4/cyclinD1 ($P < 0.05$)。多因素分析显示:p16 是一个保护因素 ($RR = 0.4759$, RR 的 95% 可信区间为 $0.2854 \sim 0.7933$, $P = 0.0044$),淋巴结转移是一个危险因素 ($RR = 3.3099$, RR 的 95% 可信区间为 $1.9756 \sim 5.5454$, 为 $P < 0.0001$),其它因素在多因素分析中没有显著意义。

3 讨论

研究表明,p16 基因及其产物在大多数人类原发性肿瘤和细胞系中都有改变。p16 基因失活的主要机制是基因的纯合性缺失,点突变和 DNA 原位高度甲基化,基因失活可导致 p16 蛋白表达缺如,抑制肿瘤增生的能力降低^[1]。本研究中 p16 蛋白阳性表达率与组织学分级,淋巴结转移相关,与 ER, PR 及年龄未见相关。肿瘤分级越高,p16 的阳性表

达率越低;有淋巴结转移的 p16 蛋白表达率低。单因素生存分析表明,p16 蛋白阳性组患者与 p16 蛋白阴性组患者的 5 年生存率分别为 46.67%, 85.37% ($P < 0.0001$)。因此,p16 蛋白的表达可以看作一个判断肿瘤恶性程度,淋巴转移及预后的有效指标。

正常的 p53 蛋白在细胞周期中充当“分子警察”的作用,在 p53 基因缺失或突变的细胞,最终可以发展成恶性肿瘤^[2]。p53 基因失活的主要机制是点突变,基因缺失和基因重组较少见,几乎在所有的人类肿瘤细胞中都可见到异常,尤其在结肠癌,乳腺癌,肺癌和胰腺癌中的突变更为多见。用免疫组化法检测乳腺癌组织中 p53 基因的突变率约为 17% ~ 40%,主要分布在 5 ~ 8 外显子,且大多数为错义突变^[3]。野生型 p53 蛋白在细胞中含量很少,半衰期短,通常用免疫组化方法检测到的蛋白实际上是半衰期长的突变型 p53 蛋白。Tan 等^[4]报道 p53 蛋白在乳腺癌中的表达率为 53%,与肿瘤大小,临床分期不相关,但与组织学分级密切相关。大量研究表明,p53 蛋白与乳腺癌一些不良预后因素,如淋巴结转移,肿瘤分化差,瘤细胞增殖活力有关。p53 蛋白高表达的乳腺癌患者易发生转移,生存期短。本组资料中 p53 蛋白阳性表达率与年龄,肿瘤大小,病理类型不相关 ($P > 0.05$),与 ER,PR 呈负相关 (Spearman 相关系数 r 分别为

-0.255, -0.238; $P < 0.05$)。与肿瘤的浸润淋巴转移密切相关;与组织学分级呈正相关(Spearman 相关系数 $r = 0.297$; $P < 0.01$)^[5]。p53 蛋白在乳腺癌组织中的高表达,说明 p53 基因突变参与了乳腺癌的发生与发展,可能是乳腺组织癌变的一个早期分子事件。因此,突变型 p53 蛋白的出现,不仅是乳腺浸润性导管癌细胞癌变的特异性指标,而且可作为判断乳腺浸润性导管癌患者淋巴结转移及预后不良的一个非常重要的参考指标。

CDK4 是目前发现的 7 种细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)之一。有人认为,CDK4 可能是一些细胞中 TGF- β 介导的靶蛋白,用 TGF- β 处理人焦化细胞时可抑制 CDK4 mRNA 的表达。在人类一些肿瘤细胞中已发现 CDK4 和 CDK6 的高表达,但没有发现基因突变^[6]。本组标本中 CDK4 的阳性表达率为 36.0%,阳性产物主要位于细胞质和细胞核中。在 I, II 级浸润性导管癌中 CDK4 的阳性表达率为 25.0% 和 47.6% ($P < 0.05$)。;在淋巴结阴性,阳性组 CDK4 阳性表达率为 20.8% 和 55.3% ($P < 0.001$),提示 CDK4 与肿瘤的分化程度和淋巴结转移有密切关系。CDK4 与年龄,ER,PR 均未见相关。单因素生存分析表明,CDK4 蛋白阳性组患者与阴性组患者的 5 年生存率分别为 61.90%,79.31% ($P < 0.05$)。因此,CDK4 可以看作一个判断肿瘤恶性程度和预后的客观指标。

cyclinD1 在细胞周期的 G₁ 期发挥着重要的调节作用。研究发现,在人类 B 细胞淋巴瘤,乳腺癌,胃肠癌等肿瘤细胞中有 cyclinD1 的过表达^[7]。本组标本中 cyclinD1 阳性率仅为 39.5%,阳性产物定位于细胞核。cyclinD1 的表达与淋巴转移相关,与年龄,组织学分级,ER,PR 均未见相关。说明 cyclinD1 与肿瘤的浸润转移有着密切关系。单因素生存分析表明 cyclinD1 蛋白阳性组患者与阴性组患者的 5 年生存率分别为 57.14% 和 76.74% ($P < 0.05$)。因此,cyclinD1 可以看作一个判断肿瘤浸润转移和预后的客观指标。

在多因素生存分析中,发现 p16 和淋巴结转移

是影响乳腺癌患者总生存率的独立预后指标。其中 p16 是一个保护因子(RR = 0.4759,RR 的 95% 可信区间为 0.2854 - 0.7933, $P = 0.0044$),淋巴结转移是一个危险因子(RR = 3.3099,RR 的 95% 可信区间为 1.9756 - 5.5454, $P < 0.0001$),其它指标在多因素分析中没有显著意义。其中,p16 表达在有淋巴结转移比无淋巴结转移危险度高达 3.3099 倍。因此,p16 蛋白的表达水平和淋巴结转移可能是判断乳腺癌术后生存的有效指标。本研究发现,p16 与 p53,CDK4,cyclinD1 均呈相关关系(均 $P < 0.01$),CDK4 与 cyclinD1 亦呈相关关系($P < 0.05$)。可见,在细胞周期调节中各正负调节因子共同构成一个复杂的调控网络,通过协同、竞争或反馈的复杂途径共同发挥调节作用。要想进一步阐明 G₁ 期细胞调节因子之间的关系,还尚需从分子水平上进一步探讨和研究。

参考文献:

- [1] 郭山春,廖松林,孟振行,等. 乳腺癌 p16 基因的纯合缺失、高甲基化、突变及其表达[J]. 中华病理学杂志, 1999,28(2):86-89.
- [2] 陈艺华,董敬明,张素娟,等. 用非同位素 PCR-SSCP 方法检测石蜡包埋乳腺癌 p53 基因点突变[J]. 中华病理学杂志,1994,23(6):327-329.
- [3] 朱明华. 乳腺癌 p53 蛋白表达和雌激素受体免疫组化检测及意义[J]. 中国组织学与细胞化学杂志,1995,4(1):80-82.
- [4] Tan - p, Ho - G, Ji - C, *et al.* Immunohistochemical expression of p53 protein in invasive breast carcinoma: clinicopathologic correlations[J]. *Oncol - Rep*, 1999,6(5):1159-1163.
- [5] 石军,熊华淇,邹桂华. p53 和 bcl-2 在乳腺肿瘤中的表达及其与病理指标相关性分析[J]. 浙江肿瘤,1996,2(4):206-207.
- [6] Khatib ZA, Matsushine H, Valentine M, *et al.* Coamplification of the CDK4 gene with MDM₂ and GLI in human sarcomas[J]. *Cancer Res*. 1993,53:5535-5541.
- [7] 桑建新,王永潮,周清源. 利用原位杂交分析几种 cyclin 和 CDK 基因在人乳腺癌中的异常表达[J]. 解剖学报, 1999,30(3):224-226.