

PCNA、Ki-67、CyclinD1、P53 在泪腺 上皮性肿瘤的表达及临床相关性研究

朱炎华 魏锐利 蔡季平 李由 何金 岳岩

【摘要】 目的 探讨 PCNA、Ki-67、CyclinD1、P53 的表达与泪腺上皮性肿瘤的发生、发展的关系及其临床病理意义。方法 应用 Envision 法检测 1985 年 1 月至 2005 年 10 月间存档的 45 例泪腺良、恶性上皮性肿瘤和 6 例正常泪腺组织中 PCNA、Ki-67、CyclinD1、P53 的表达, 并将检查结果结合临床进行比较。结果 在正常泪腺组织组、泪腺多形性腺瘤初次手术组、泪腺多形性腺瘤复发组、泪腺多形性腺瘤组、腺样囊性癌组中各免疫因子的阳性细胞比例分别为: PCNA: $34.83\% \pm 12.64\%$ 、 $52.19\% \pm 9.42\%$ 、 $56.20\% \pm 9.28\%$ 、 $82.0\% \pm 8.46\%$ 、 $89.29\% \pm 5.24\%$ 、Ki-67: $3.83\% \pm 4.62\%$ 、 $6.0\% \pm 6.51\%$ 、 $7.7\% \pm 8.35\%$ 、 $15.08\% \pm 11.41\%$ 、 $16.86\% \pm 12.27\%$ 、CyclinD1: $5.50\% \pm 5.96\%$ 、 $13.25\% \pm 12.69\%$ 、 $12.1\% \pm 10.95\%$ 、 $15.17\% \pm 11.92\%$ 、 $17.14\% \pm 11.49\%$ 、P53: $7.13\% \pm 7.57\%$ 、 $8.5\% \pm 7.11\%$ 、 $26.33\% \pm 9.44\%$ 、 $22.29\% \pm 6.05\%$ 。经统计学分析, 在泪腺良性上皮性肿瘤与恶性上皮性肿瘤之间比较均有统计学意义的有 PCNA、Ki-67、P53; 在正常泪腺与恶性上皮性肿瘤之间表达有统计学意义的有 PCNA、P53; PCNA、Ki-67、CyclinD1、P53 在初发和复发的泪腺多形性腺瘤中的表达差别无统计学意义。结论 PCNA、P53 可作为鉴别泪腺上皮性肿瘤良恶性的参考指标。

【关键词】 泪腺; 上皮性肿瘤; 免疫组化检查; 细胞周期相关蛋白

The expression and clinical significance of PCNA, Ki-67, CyclinD1 and P53 in epithelial tumors of lacrimal gland ZHU Yan-hua, WEI Rui-li, CAI Ji-ping, et al. Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship of PCNA, CyclinD1, Ki-67 and P53 protein expression in epithelial tumors of lacrimal gland with its clinical and pathological characteristics. Methods The tissue chips of 45 cases of lacrimal tumor tissues from 1985 to 2005 in Changzheng hospital were analyzed by the immunohistochemical method (Envision's) compared with 6 cases of normal lacrimal gland tissues. Result The ratios of positive cells of each immunity genes in the group of normal lacrimal tissues were: PCNA: $34.83\% \pm 12.64\%$, Ki-67: $3.83\% \pm 4.62\%$, CyclinD1: $5.50\% \pm 5.96\%$, P53: none; in the group of pleomorphic adenoma without recurrence were: PCNA: $52.19\% \pm 9.42\%$, Ki-67: $6.0\% \pm 6.51\%$, CyclinD1: $13.25\% \pm 12.69\%$, P53: $7.13\% \pm 7.57\%$; in the group of pleomorphic adenoma with recurrence were: PCNA: $56.20\% \pm 9.28\%$, Ki-67: $7.7\% \pm 8.35\%$, CyclinD1: $12.1\% \pm 10.95\%$, P53: $8.5\% \pm 7.11\%$; in the group of pleomorphic adenocarcinoma were: PCNA: $82.0\% \pm 8.46\%$, Ki-67: $15.08\% \pm 11.41\%$, CyclinD1: $15.17\% \pm 11.92\%$, P53: $26.33\% \pm 9.44\%$; in the group of adenoid cystic carcinoma were: PCNA: $89.29\% \pm 5.24\%$, Ki-67: $16.86\% \pm 12.27\%$, CyclinD1: $17.14\% \pm 11.49\%$, P53: $22.29\% \pm 6.05\%$. The expression of PCNA, Ki-67, and P53 were significantly different between benign lacrimal epithelial tumors and malignant epithelial tumors ($p < 0.01$), there were no statistic differences of PCNA, Ki-67, CyclinD1 and P53 expressions between the pleomorphic adenoma without recurrence group and pleomorphic adenoma with recurrence group. Conclusion the high expression of PCNA, Ki-67, CyclinD1 and P53 may be closely related to the occurrence, development and prognosis of epithelial tumors of lacrimal gland, the PCNA and P53 can be used as an index to identify malig-

作者单位: 200003 上海, 第二军医大学长征医院眼科 [朱炎华 (硕士研究生, 现湖北荆州市第一人民医院眼科) 魏锐利, 蔡季平, 李由, 岳岩]; 第二军医大学长征医院病理科 (何金)

通讯作者: 魏锐利, E-mail: ruili@sh163.net

nant epithelial tumor.

【Key words】 Lacrimal gland; Epithelial tumors; Immunohistochemistry; Cell cycles proteins

泪腺上皮性肿瘤在临床上比较常见, 无论良性还是恶性上皮性肿瘤, 术后复发率均很高, 良性上皮性肿瘤在复发中可能恶变, 最终可导致患者视力丧失、全身转移以至死亡。有关泪腺肿瘤的发生、发展及复发转移的分子机制还不清楚, 了解泪腺肿瘤增殖状态与其临床生物学行为的关系有利于临床鉴别良恶性肿瘤、早期发现良性肿瘤恶变及推测疾病预后。细胞周期相关蛋白PCNA (proliferating cell nuclear antigen)、Ki-67、CyclinD1 是调节细胞增殖、分化的信号, 在其他肿瘤中已被广泛研究, 但在泪腺上皮性肿瘤中尚未见报道。本文采用免疫组化Envision法回顾性检测45例泪腺良、恶性上皮性肿瘤和6例正常泪腺组织中PCNA、Ki-67、CyclinD1的表达, 并同时检测P53蛋白的表达, 结合临床进行相关比较, 现报告如下:

资料和方法

1. 资料

(1)标本: 选自上海长征医院病理科1985年1月~2005年10月间存档的具有完整临床病史资料的45例泪腺上皮性肿瘤患者石蜡标本, 其中男21例, 女24例; 年龄21.0~78.0岁, 平均47.5岁。按组织学类型分类: 泪腺多形性腺瘤26例, 其中初次手术者16例, 复发者10例(2例为我院手术后复发); 恶性肿瘤19例, 其中多形性腺癌12例, 腺样囊性癌7例。同时取泪腺脱垂手术活检的正常泪腺6例作为对照组。所有标本均HE染色, 经病理医生再次确诊(见图1~图4)。

(2)试剂: 鼠抗人PCNA单克隆抗体(即用型), 克隆号: PC10; Ki-67单克隆抗体(即用型), 克

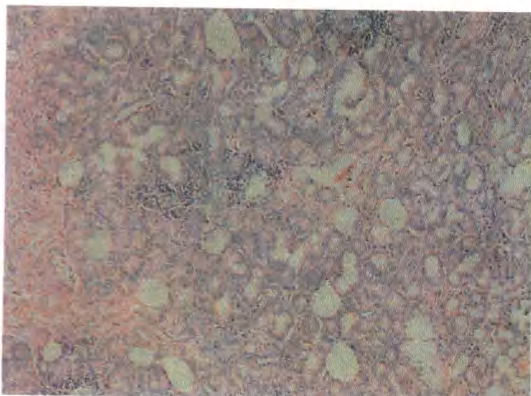


图1 正常泪腺 HE × 100

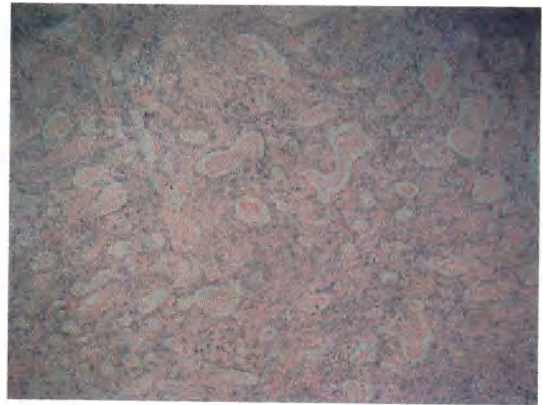


图2 泪腺多形性腺瘤 HE × 100

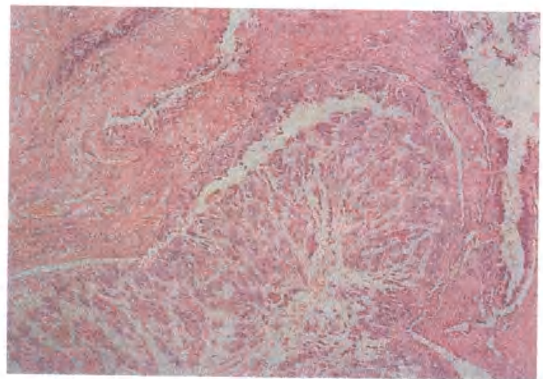


图3 泪腺多形性腺瘤 HE × 100



图4 泪腺腺样囊性癌 HE × 100

隆号: SP6; CyclinD1单克隆抗体(即用型), 克隆号: DCS/6; P53单克隆抗体(即用型), 克隆号DO-7; 显色剂: DAB-0031, 均为福州迈新生物技术开发公司产品。EnvisionTM+加强型试剂盒(鼠)为丹麦Dako公司产品, 编号: K400011。

2. 方法

(1)载玻片用防脱片剂 APES (amino propyl-triethoxy silane) 液(按1:50比例丙酮稀释)处

理, 4 μ m厚石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 乙醇梯度水化至蒸馏水, 根据一抗说明预处理组织切片; 3% H_2O_2 室温10min, 以灭活内源性酶; 微波炉修复抗原(温度92~98 $^{\circ}C$) 10min, 滴加抗原修复液, 置室温下10min; 加单克隆抗体(PCNA、Ki-67、CyclinD1、P53), 置湿盒内4 $^{\circ}C$ 过夜; 以上各步骤完成后, 均用PBS液洗3次, 每次3min; 滴加Envision^{TM+}试剂孵育30min, TBS洗3 \times 3min; DAB酶显色约5~10min; 苏木精复染, 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察。

(2) 对照: 用已知阳性对照片做阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照。

(3) 染色结果判断标准: PCNA、Ki-67、P53均定位于细胞核, 以背景清晰细胞核出现明显棕黄褐色颗粒为阳性反应(见图5~图10), CyclinD1在细胞核和部分细胞质中均有着色, 以细胞核出现棕黄褐色颗粒为阳性反应(见图11~图12)。在10 \times 40倍显微镜下随机连续观察1000个细胞, 阳性细胞比例 = 阳性细胞数/1000 \times 100%。

3. 统计学方法: 对本研究数据分别采用SAS 8.0统计软件以两样本t检验进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著意义标准。



图5 泪腺多形性腺瘤 P53 \times 100



图6 泪腺多形性腺瘤 PCNA \times 100

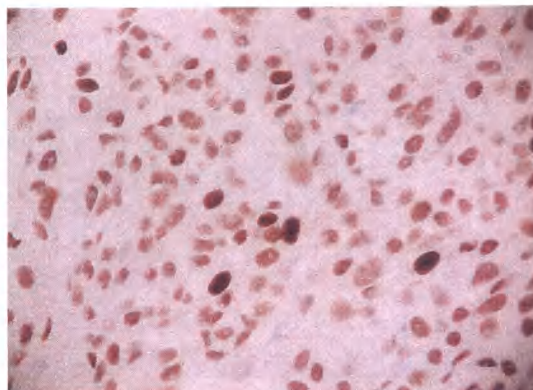


图7 泪腺多形性腺瘤 PCNA \times 400

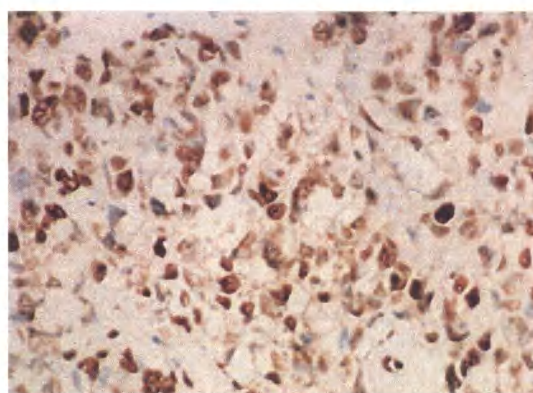


图8 泪腺腺样囊性癌 PCNA \times 400



图9 泪腺多形性腺瘤 P53 \times 400

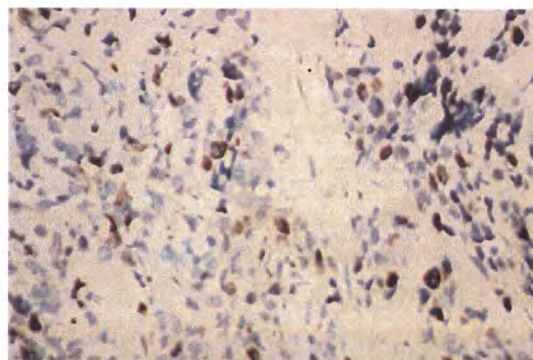


图10 泪腺腺样囊性癌 P53 \times 200

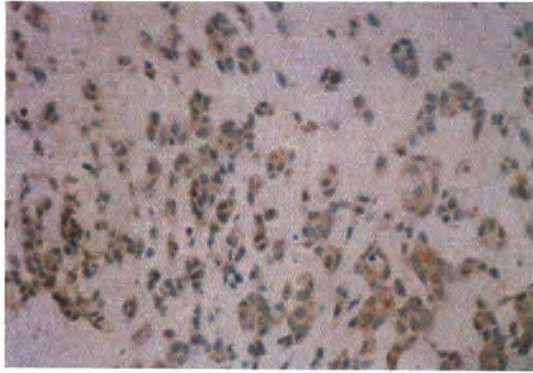


图 11 泪腺多形性腺瘤 CyclinD1 × 200

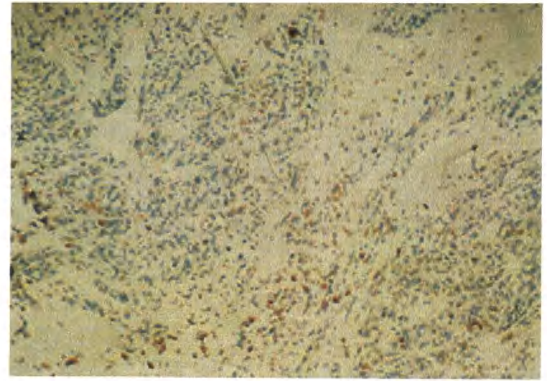


图 12 泪腺腺样囊性癌 CyclinD1 × 100

结 果

6 例正常泪腺组织中未见 P53 阳性表达, 其他免疫因子在泪腺各组织中的表达及统计学检查见表 1, 泪腺多形性腺瘤中初次手术组与复发组之间 PCNA、Ki-67、CyclinD1、P53 的表达均无差异

(p 值分别为 0.055、0.08、0.73、0.32); 将良性肿瘤和恶性肿瘤分别合并进行统计学检验, 结果见表 2, 在泪腺良恶性肿瘤之间表达有差异的因子有 PCNA、Ki-67、P53; 在正常泪腺与良性肿瘤间有差异的是 PCNA、P53; 在正常泪腺与恶性肿瘤间有差异的是 PCNA、Ki67、CyclinD1、P53。

表 1 PCNA、Ki-67、P53 在各组的表达及统计分析 ($\bar{x} \pm SD$) %

	正常泪腺 (NLG n=6)		多型性腺瘤初发组 (PANR n=16)			多型性腺瘤复发组 (PAR n=10)			多型性腺瘤 (PAC n=12)			腺样囊性癌 (ACC n=10)		
	t	p	t	t	p	t	t	p	t	t	p	t*	p*	
PCNA	34.83 ± 12.64	3.51 0.002	52.19 ± 9.42	1.06	0.29	56.20 ± 9.28	6.81	< 0.0001	82.0 ± 8.46	2.06	0.055	89.29 ± 5.24	11.57	< 0.0001
Ki-67	3.83 ± 4.62	0.92 0.37	6.0 ± 6.51	0.58	0.57	7.7 ± 8.35	1.71	0.10	15.08 ± 11.41	1.84	0.08	16.86 ± 12.27	2.60	0.032
CyclinD1	5.50 ± 5.96	1.42 0.17	13.25 ± 12.69	0.24	0.81	12.1 ± 10.95	0.62	0.54	15.17 ± 11.92	0.35	0.73	17.14 ± 11.49	2.23	0.048
P53	(-)		7.13 ± 7.57	0.46	0.65	8.5 ± 7.11	4.92	< 0.0001	26.33 ± 9.44	1.01	0.32	22.29 ± 6.05		

※ ACC vs NLG, P<0.05

表 2 PCNA、Ki-67、P53 在正常泪腺组织、良性肿瘤和恶性肿瘤中表达的统计分析 ($\bar{x} \pm SD$) %

	正常泪腺 (n=6)	t	p	良性肿瘤 (n=26)	t	p	恶性肿瘤 (n=19)	t*	p*
PCNA	34.83 ± 12.64	4.17	0.0002	53.73 ± 9.39	11.57	< 0.0001	84.68 ± 8.08	11.49	< 0.0001
Ki-67	3.83 ± 4.62	0.92	0.37	6.65 ± 7.16	3.27	0.0002	15.74 ± 11.43	2.39	0.025
CyclinD1	5.50 ± 5.96	1.46	0.16	12.81 ± 11.84	0.87	0.39	15.89 ± 11.48	2.11	0.046
P53	(-)			7.56 ± 7.28	7.33	< 0.0001	24.84 ± 8.41		

※恶性肿瘤与正常泪腺比较

讨 论

细胞周期调控因子为一组调节细胞增殖、分化的信号, 它们通过相互促进和抑制作用维持细胞周期的正常进程。在恶性肿瘤细胞中, 这些调控因子常发生突变或失活, 致使正常调节紊乱, 促进肿瘤形成与发展。近来有关细胞周期及其调控机制研究已取得了较大进展, 且愈来愈多的证据表明, 细胞周期调节失控是肿瘤发生发展的重要机制。本实验利用免疫组化技术检测细胞周期蛋白 PCNA、Ki-

67、CyclinD1 及抑癌基因 P53 在泪腺多形性腺瘤、泪腺多形性腺瘤、腺样囊性癌及正常泪腺组织中的表达。

PCNA 是 DNA 多聚酶的辅助因子, 是 DNA 复制中 δ -DNA 聚合酶所必需的蛋白质, 在整个细胞周期中均有表达, 在 G1/S 期中表达达到高峰, 在细胞停止分裂 24~48 小时也能检测到。PCNA 在众多肿瘤中能被检测到并与肿瘤恶性程度相关^[1], 在肝癌细胞中 PCNA 不仅参与 DNA 复制, 还协同 P21 蛋白持续参与 DNA 修复^[2], 近来研究表明在原发乳

腺癌中PCNA、Ki-67高表达预示术后早期高复发^[3]。本研究表明PCNA在泪腺上皮性肿瘤中高表达,在恶性上皮性肿瘤中阳性细胞比例为84.68%±8.08%,明显高于良性肿瘤中53.75%±9.39%的表达,与肿瘤的良恶性明显相关,与在其他肿瘤中的研究结论相似,也从分子生物学角度上佐证了泪腺恶性上皮性肿瘤高复发的临床特点,同时表明PCNA可作为泪腺上皮性肿瘤良恶性鉴别的重要参考指标。

Ki-67抗体在细胞周期G₁, S, G₂, M中均有表达,在G₀期不表达,Ki-67和PCNA表达与中枢神经系统肿瘤的分级正相关,与肿瘤的复发与恶变有关^[4],有研究表明Ki-67在神经系统肿瘤增殖指标中比PCNA更有特异性^[5],本研究表明Ki-67在正常泪腺与恶性上皮性肿瘤间及良恶性肿瘤间表达均有统计学意义,与在其他肿瘤中的研究结论相似,但Ki-67在正常泪腺与良性上皮性肿瘤间表达无差别,说明泪腺良性上皮性肿瘤中以G₀期细胞为主,临床上泪腺多形性腺瘤复发多在手术后8~10年,也说明复发的多形性腺瘤增殖并不活跃,同时我们检测到在初次手术和复发的泪腺多形性腺瘤中PCNA、Ki-67、CyclinD1和P53表达没有差异,与在脑膜瘤中的研究相似^[6],表明泪腺多形性腺瘤虽然容易复发,但性质相对稳定,与其临床恶变几率不高的特征相一致。

CyclinD1在G₁期表达,与CDK4/6结合后,引起PRb磷酸化,促使细胞通过G₁-S关卡。在乳腺癌中过表达CyclinD1,提示预后良好^[7],而在头颈部鳞癌和食道癌中CyclinD1过表达提示预后不良,有报道CyclinD1在宫颈鳞癌中表达很低^[8],Pignataro于1998年首次报道腮腺癌(腺样囊性癌等)中CyclinD1基因的改变,21.4%(6/28)的腮腺癌出现CyclinD1过度表达,但并未检测CyclinD1在多形性腺瘤癌变(CPA)中的表达。在本研究中CyclinD1在泪腺上皮性肿瘤的表达很低,在良恶性肿瘤间表达无差异,只在正常泪腺与恶性肿瘤间表达有差异,可能和CyclinD1只在细胞周期中短暂表达,只参与肿瘤发生的早期阶段有关。

野生型P53基因是一种抑癌基因,位于17号染色体短臂上,其产物是一种53KD的核磷蛋白,参与细胞的增殖调节,被称为“染色体卫士”^[9]。野生型P53基因的缺失、突变和灭活与人类很多肿瘤发

生有关,可导致MDM2表达升高,MDM2的产物是多种肿瘤的致癌基因,突变型P53则促进肿瘤细胞生长^[10]。国内郭素珍曾报道P53在泪腺上皮性肿瘤中表达增高^[11],在恶性肿瘤中表达率达48.6%。本研究也有类似发现,P53在泪腺恶性上皮性肿瘤中表达为24.8%±8.41%,明显高于良性肿瘤中的7.56%±7.28%,而在正常泪腺中没有表达。提示P53基因参与了泪腺上皮性肿瘤的发生,P53基因突变是泪腺上皮性肿瘤发生的重要因素。

总之,通过研究,我们发现PCNA、KI-67、P53和CyclinD1参与了泪腺上皮性肿瘤发生、发展,其中PCNA、P53在泪腺上皮性良、恶性肿瘤中表达差异十分明显,可以作为肿瘤鉴别诊断的参考指标。

参 考 文 献

- Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *Pathol*, 1990, 162: 285-294
- Laura Gramantieril, Davide Trere, Pasquale Chieco, et al. In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair. *Journal of Hepatology*, 2003, 39: 997-1003
- Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp cell res*, 1986, 163: 287-293
- Fazilet Kayaseluck, Suzan Zorludemir, Derya Gumurdulu, et al. PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. *Neuro-oncol*, 2002, 57: 115-121
- N. E. Kushilinskii, M. B. Drinovskii, L. E. Gurevich, et al. Expression of biomolecular markers (KI-67, PCNA, Bcl-2, Bax, Bclx, VEGF) in breast tumors. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2004, 137: 182-185
- Maj Lis Moller, Otto Brandstrup. No prediction of recurrence of meningiomas by PCNA and Ki-67 immunohistochemistry. *Neuro-oncology*, 1997, 34: 241-246
- Barnes DM. CyclinD1 in mammary carcinoma. *Pathol*, 1997, 181: 267-269, 17: 197-199
- Shigeki Shiohara, Tanri Shiozawa, Tsutomu Miyamoto, et al. Expression of cyclins, p53, and Ki-67 in cervical squamous cell carcinomas: overexpression of cyclin A is a poor prognostic factor in stage Ib and II disease. *Virchows Arch*, 2005, 466: 626-633
- Janus N, Albrechtsen I, Domreiter L, et al. The udral role model for P53 in maintaining genomic integrity. *Celluar and Molecular Life Sciences*, 1999, 55: 12-27
- Oren M, Rotter V. Introduction: p53-the first twenty years. *Celluar and Molecular Life Sciences*, 1999, 55: 9-11
- 郭素珍, 宋国祥, 田文芳, 等. 泪腺肿瘤中p53蛋白表达的意义. *眼科新进展*, 1997, 17, 197-199

(收稿时间: 2006-11)