p16、survivin、cyclin D1 在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义

刘俊江[1] 张蕴霞[2] 李瑾宜[1] 李连印[1] 李守宾[1] 高双友[1]

(1 河北省唐山市开滦矿务局总医院泌尿外科 河北 唐山 063006；
2 河北省唐山市开滦矿务局总医院妇产科 河北 唐山 063006)

摘要 目的：探讨抑癌基因 p16、细胞周期蛋白 cyclin D1 和凋亡抑制基因 survivin 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义。**方法：**膀胱移行细胞癌组 67 例，10 例正常正常膀胱粘膜作为对照，采用免疫组织化学方法检测 p16 和 cyclin D1、survivin 蛋白表达，然后分析上述三种蛋白在膀胱癌组织中的表达情况，以及随着不同临床分期和病理分级表达的变化。**结果：**所有膀胱癌患者平均年龄 58.16 岁，其中男性患者 38 例。免疫组织化学分析表明，p16 和 cyclin D1、survivin 蛋白均表达在细胞的细胞核。膀胱癌组织中 P16 表达明显低于正常对照组，而 cyclin D1 和 survivin 表达明显高于正常对照组。随着临床分期的进展，p16 表达明显下降，cyclinD1 表达明显上升；而随着膀胱癌病理分级升高，p16 表达明显下降，survivin 表达上升。此外，膀胱癌组织中，p16 与 cyclin D1p16 之间存在着明确的负相关。**结论：**p16、cyclin D1、survivin 在膀胱移行细胞癌的生物学行为中起重要作用，p16，cyclin D1 和 survivin 与膀胱移行细胞癌的恶性进展有关。

关键词：P16；Cyclin D1；Survivin

中图分类号：R737.14 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2012）07-1309-03

The Expression of p16, CyclinD1 and Survivin in Transitional Cell Carcinoma of Bladder(TCC) and their Implications

LIU Jun-jiang[1], ZHANG Yun-xia[2], LI Jin-yi[1], LI Lian-yin[1], LI Shou-bin[1], GAO Shuang-you[1]

(1 Dept. of Urology, Tangshan Kailuan Hospital , 063000, Tangshan, China;
2 Dept. of obstetrics and gynecology , Tangshan Kailuan Hospital , 063000, Tangshan, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of p16, cyclin D1 or survivin as well as the clinical significance in transitional cell carcinoma of bladder. Methods: 67 specimens were derived by surgical operation. p16 protein, cyclin D1 and survivin were investigated by immunohistochemical method. Results: 67 patients with transitional cell carcinoma of bladder were enrolled in the study, with mean age of 58.16 years. 38 cases were men. The expression of p16 was significant lower than the normal controls, and the expression of cyclin D1 and survivin were much higher than the normal controls. With the clinical stage progressed, the p16 expression level down-regulated, and cyclin D1 up-regulated; while with the tumor grade increased, the p16 expression down-regulated, and the survivin expression up-regulated. Moreover, the expression of p16 was negatively correlated to the expression of cyclin D1. Conclusions: p16, cyclin D1 and survivin play an important role in the behavior of biochemical in TCC. The expression of p16, cyclin D1 and survivin all involved in the progress of transitional cell carcinoma of bladder.

Key words: P16; Cyclin D1; Survivin

Chinese Library Classification: R737.14 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)07-1309-03

前言

膀胱移行细胞癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤，占到泌尿系统肿瘤的 55.03%[1]。目前已发现的膀胱癌基因近百种，其中涉及到重要的抑癌基因有 p53、p16、p15、RB 及 NF2 等；癌基因有生长因子及其受体基因等 7 大类，包括 VEGF、TGFα、survivin 及 CDK4 等[2,4]。尽管这些基因异常介导的生物信号分别干扰细胞增殖和凋亡调控网络的不同环节，但它们的作用是相互协同，密切相关的。从目前研究结果来看，膀胱癌既有癌基因的过度表达，又有抑癌基因的失活以及周期蛋白活性的改变，从多种基因着手研究膀胱肿瘤的侵袭性行为应该是一个有意义的工作。关于 p16、cyclin D1 和 survivin 在膀胱移行细胞癌中的表达已分别有相关性研究[5,6]，但将它们共同在膀胱癌中的表达相关性研究尚未见报道，值得探讨。

作者简介：刘俊江（1966-），男，硕士，主任医师，研究方向：泌尿系肿瘤。

（收稿日期：2011-08-01 接受日期：2011-08-25）

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱移行细胞癌组 67 例，取自 2008-2010 年在我院患者石蜡标本，均经病理病理检查证实为膀胱尿路上皮癌。对照组为 10 例，取自其他原因手术正常膀胱粘膜标本。p16、cyclin D1 和 survivin 抗体为鼠抗人单克隆抗体（Santa Cruz）。

1.2 方法

石蜡标本切片并经脱蜡水化后，抗原修复，常规 SP 法，应用美国 Zymed 公司即用型 SP 试剂盒进行免疫组织化学染色。染色步骤如下：(1) 石蜡切片常规脱蜡至水，(2) 3%H_2O_2 室温孵

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

育 5-10 分钟，以消除内源性过氧化物酶的活性。(3) 蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟，微波抗原修复。(4) 10%正常山羊血清封闭，室温孵育 10 分钟。倾去血清，勿洗，依次加入一抗(鼠抗人 p16、cyclin D1、survivin 单克隆抗体)，4℃过夜。(5)PBS 冲洗，5 分钟× 3 次。(6)滴加二抗 (生物素化羊抗兔 IgG，37℃孵育 30 分钟) 。(7) PBS 冲洗，5 分钟× 3 次。(8) 滴加 PBS 稀释的辣根酶标记的链霉素卵白素，37℃孵育 30 分钟。(9) DAB 显色。(10)自来水充分冲洗，复染，封片。以胞浆或胞核中出现棕黄色颗粒为阳性反应，p16、cyclin D1 及 survivin 的免疫反应产物定位于胞核中。

1.3 判定标准

呈棕黄色染色为阳性信号，依染色细胞数分类：(1) 阴性 (－) 阳性细胞数 <25%；(2) 阳性 (＋) 阳性细胞数≥ 25%。

1.4 统计学方法

以 SPSS11.5 进行 X^2 检验及相关性分析，P<0.05 有统计学意义。

2 结果

本研究共纳入膀胱尿路上皮癌 67 例，其中男 38 例，女 29 例，平均年龄 58.16 岁。根据 WHO 病理分级标准：I 级 19 例，II 级 30 例，III 级 18 例；根据 UICC 临床分期：浅表性肿瘤 (Ta～T1)39 例，浸润性肿瘤(T2～T4)28 例。其中 49 例为肿瘤初发，18 例为肿瘤复发；44 例为肿瘤单发，23 例为肿瘤多发。

P16、cyclinD1 和 survivin 均表达在细胞核 (见图 1)，67 例膀胱移行细胞癌，27 例 p16 表达阳性，阳性率 40.3%。10 例正常膀胱粘膜 p16 表达均为阳性(图 1)，阳性率为 100%，二者之间有明显差异 (P<0.05) 组织学分级 I 级与 II 级＋III 级之间有显著差异 (68.4% VS 29.2%，P<0.05)；临床分期 Ta～T1 与 T2～T4 之间有显著差异 (53.8% VS 21.4%，P<0.05)；复发组与未复发组之间有显著差异 (16.7% VS 49%，P<0.05)。详见表 1。

正常膀胱粘膜 cyclin D1 表达均为阴性，阳性率为 0；膀胱移行细胞癌组阳性 cyclin D133 例，阳性率 49.3%，明显高于正常对照组 (P<0.05)。组织学分级 I 级膀胱癌组织 cyclin D1 阳性表达率为 42.1%，而在 II 级＋III 级膀胱癌阳性表达率为 52.1%，二者之间没有明显统计学差异 (P>0.05)，此外临床分期 Ta～T1 膀胱癌与 T2～T4 膀胱癌之间有显著差异 (30.8% VS 75%，P<0.05)，复发组与未复发组之间有显著差异 (72.2% VS 40.8%，P<0.05)。相关性分析，p16 与 cyclin D1 之间存在着明确的负相关 (P＝0.002) 详见表 2。

67 例膀胱移行细胞癌中，survivin 阳性 27 例 (40.3%)，而 10 例正常膀胱粘膜 survivin 表达均为阴性，二者之间表达具有明显统计学意义 (P<0.05) 组织学分级 I 级与 II 级＋III 级之间有显著差异 (15.8% VS 50%，P<0.05)，临床分期 Ta～T1 与 T2～T4 之间无显著差异 (30.8% VS 53.4%，P>0.05)，复发组与未复发组有显著差异 (66.7% VS 30.6%，P<0.05)。

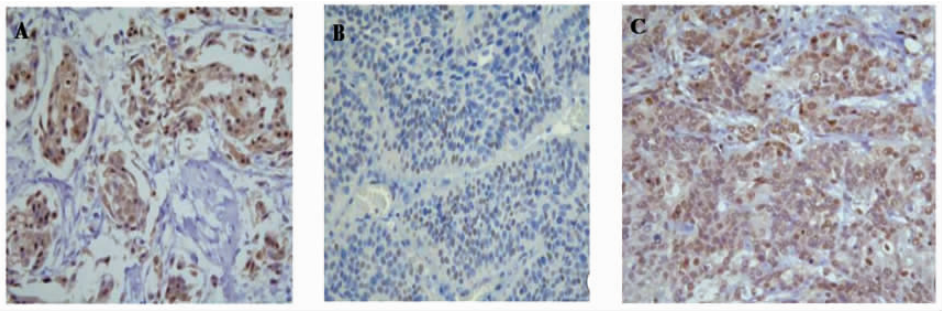

图 1 膀胱尿路上皮癌细胞中 p16，cyclinD1 和 survivin 表达结果
(A) 16 蛋白表达；(B) cyclinD1 蛋白表达；(C) survivin 蛋白表达
Figure1 The expression of p16, cyclin D1and survivin in the bladder cancer (A)p16 protein; (B)cyclinD1protein; (C) survivin protein

3 讨论

膀胱移行细胞癌具有复杂的生物学行为，总体 5 年死亡率为 26%，而且复发率高，临床上任何保留膀胱的手术治疗，术后不进一步治疗的病人，2 年内复发率达 13%-70%[7,8]。所以，深入了解膀胱移行细胞癌的复发及浸润性行为，为临床治疗提供新的手段很有必要。

Survivin 是一种原癌基因，它作为细胞凋亡的抑制剂调节细胞死亡。survivin 即是一种凋亡抑制基因，它的表达能延长肿瘤细胞生存期，就有可能促进肿瘤向恶性转化[9]。而 cyclin D1 亦被认为是一种原癌基因，与细胞周期素依赖激酶 (CDK4) 结合形成 cyclin D1/ CDK4 复合物后，CDK4 被激活，通过调节底物 Rb 蛋白的磷酸化，释放转录因子 E2F，促进细胞 G1/S 期转换，从而促进细胞增殖。p16 是一种抑癌基因，其通过与 cyclin D1 竞争结合 CDK4，阻止 G1/S 期转换，从而抑制细胞的增殖，抑制肿瘤向恶性转化[10,11]。

研究表明，基因的缺失是 p16 基因在人类多种肿瘤中失活的主要机制，在许多肿瘤细胞株研究中发现 p16 基因的缺失和突变率为 75%，超过了 p53 基因 50%的突变率。因此认为 p16 基因在肿瘤的发生、发展过程中扮演非常重要的角色。国内何杰[12]等报道 p16 基因在膀胱肿瘤中阳性表达率为 52.23%，谢庆祥[13]等报道为 58.3%。本组资料正常膀胱粘膜 p16 表达均为阳性，阳性率为 100%；表明 p16 蛋白的表达与膀胱癌的恶性程度和自然病程密切相关。随着肿瘤恶性程度的上升，p16 表达阳性率逐渐下降。复发组 p16 阳性表达较未复发组低。因此我们认为 p16 低表达是膀胱癌高度恶性和预后不良的重要指标之

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 膀胱癌和正常膀胱粘膜中 p16 蛋白表达结果

Table 1 The expression of p16 in the bladder cancer and normal bladder tissues

	Cases(n)	Expression positive (n)	P-value
Bladder cancer	10	10 (100%)	0.000
Normal bladder tissues	67	27 (40.3%)	
Histopathology grades			
Grade I	19	13 (68.4%)	0.003
Grade II＋III	48	14 (29.2%)	
Clinical stage			
T_a～T_1	39	21 (53.8%)	0.008
T_2～T_4	28	6 (21.4%)	
Recurrence or not			
Recurrence	18	3 (16.7%)	0.023
No recurrence	49	24 (49%)	

表 2 膀胱癌和正常膀胱粘膜中 cyclinD1 蛋白表达结果

Table 2 The expression of cyclinD1 in the bladder cancer and normal bladder tissues

	Cases(n)	Expression positive (n)	P-value
Bladder cancer	10	0 (0)	0.000
Normal bladder tissues	67	33 (49.3%)	
Histopathology grades			
Grade I	19	8 (42.1%)	0.4620
Grade II＋III	48	25 (52.1%)	
Clinical stage			
T_a～T_1	39	12 (30.8%)	0.000
T_2～T_4	28	21 (75.0%)	
Recurrence or not			
Recurrence	18	13 (72.2%)	0.000
No recurrence	49	20 (40.8%)	

一。

目前国内外关于 cyclin D1 在膀胱移行细胞癌中的表达已做了大量的工作，它控制着细胞周期的 G1/S 转换，过度表达促进细胞增殖，从而促进肿瘤的发生及浸润。Moonen[14]等在 2001 年的研究结果表明，cyclin D1 在浸润性膀胱移行细胞癌中的表达明显增高，高表达提示肿瘤高度恶性。我们研究结果发现，cyclin D1 阴性表达的 TCC 可能具有较高的恶性程度和较强的侵袭力，且易于复发，表明 cyclin D1 可作为一种判断膀胱移行细胞癌复发及浸润性的指标。从 p16 与 cyclin D1 相关性分析看，p16 与 cyclin D1 的表达呈负相关，p16 缺失和 cyclin D1 的过表达，是 TCC 获得浸袭性和恶性度增高的重要指标，具有更强的侵袭性、转移能力，预后较差。p16 阳性而 cyclin D1 阴性表达者则有相反结果。在预后关系上，复发组 p16 阳性表达率明显低于未复发组，cyclin D1 阳性表达率则明显高于未复发组，说明 p16 和 cyclin D1 基因的表达与自然病程密切相关，p16 低表达、cyclin D1 高表达可能是膀胱肿瘤复发的因素。因此 p16、cyclinD1 联合检测对 TCC 诊断及预后判断有重要价值。

我们还发现，survivin 表达随着膀胱癌组织学分级的上升而降低，各级间阳性表达率有显著性差异，表明 survivin 表达与肿瘤自然病程有关。同时发现，浅表性肿瘤的 survivin 阳性率低于浸润性肿瘤，但无显著性差异，提示 survivin 蛋白表达与肿瘤的浸润无关。复发组显著高于未复发组，说明其参与了肿瘤的复发过程。

因此，我们认为 p16、cyclin D1 及 survivin 均与膀胱移行细胞癌的产生及复发有关，p16 及 cyclin D1 与膀胱移行细胞癌的浸润性行为有关，有必要进行深入研究。

膀胱移行细胞癌的复发及浸润性行为是一个复杂的过程，寻找并确定特异性的相关因子和研究抑癌基因的作用是两个重要的环节，可以用来确定肿瘤的生物学行为、判断预后、指导临床医生制定治疗方案。 （下转第 1305 页）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

床应用中有良好的成骨活性、骨传导、骨诱导特性及组织兼容性，用于治疗骨不连材料充足、愈合率高，是一种可广泛应用于临床的良好植骨材料。

参考文献(References)

[1] Chen CM, Su YP, Hung SH, et al. Dynamic compression plate and cancellous bone graft for aseptic nonunion after intramedullary nailing of femoral fracture[J]. Orthopedics, 2010, 33 (6): 393

[2] Taitsman LA, Lynch JR, Agel J, et al. Risk factors for femoral nonunion after femoral shaft fracture [J]. J Trauma, 2009, 67 (6): 1389-1392

[3] Neto PF, Dos Reis FB, Filho JL, et al. Nonunion of fractures of the femoral neck in children[J]. J Child Orthop, 2008, 2 (2): 97-103

[4] Ovalioglu AO, Kilincer C, Ovalioglu TC, et al. Avulsion fracture of the anterior iliac crest after bone graft harvest: case report and review of techniques, risk factors and treatment[J]. Turk Neurosurg, 2011, 21 (3): 423-426

[5] Ya'ish F, Nanu AM, Cross AT. Percutaneous management of ununited femoral fracture[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2011, 93 (6): e83-86

[6] Singh AP, Dhammi IK, Vaishya R, et al. Nonunion of coronal shear fracture of femoral condyle[J]. Chin J Traumatol, 2011, 14 (3): 143-146

[7] Westacott D, Bould M. Outcome in 36 elderly patients treated with the Gamma3 Long Nail for unstable proximal femoral fracture [J]. Acta Orthop Belg, 2011, 77 (1): 68-72

[8] Yukata, K.Kubo, T.Matsui, Y, et al. Nonunion of capital femoral physeal fracture with a large metaphyseal fragment [J]. J Orthop Trauma,2011, 24(8): e75-77

[9] Jones, C.B. and K.A. Mayo, Nonunion treatment: iliac crest bone graft techniques[J]. J Orthop Trauma, 2005, 19(10 Suppl): S11-13

[10] Giori NJ, Beaupre GS. Femoral fracture after harvesting of autologous bone graft using a reamer irrigator aspirator [J]. J Orthop Trauma, 2011, 25 (2): e12-14

[11] Liao JC, Fan KF, Keorochana G, et al. Transpedicular grafting after short-segment pedicle instrumentation for thoracolumbar burst fracture: calcium sulfate cement versus autogenous iliac bone graft[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2010, 35 (15): 1482-1488

[12] Ozcelik, I. B.Kabakas, F.Mersa, B., et al. Treatment of nonunions of the distal phalanx with olecranon bone graft [J]. Journal of Hand Surgery, 2009, 34(5): 638-642

[13] 胡蕴玉, 陆裕朴, 刘玮. 重组合异种骨的实验研究与临床应用[J]. 中华骨科杂志, 1993, 31(12): 709-713
Hu Yun-yu, Lu Yu-pu, Liu Wei, et al. Experimental studies on reconstituted xenograft and its clinical application [J] . Chinese Journal of surgery, 1993, 31(12): 709-713 (In Chinese)

[14] Maniar RN, Baviskar JV, Singhi T, et al. To Use or Not to Use Continuous Passive Motion Post-Total Knee Arthroplasty Presenting Functional Assessment Results in Early Recovery [J].J Arthroplasty, 2012, Feb, 27(2):193-200.e1. Epub 2011 Jul 12

[15] Kim YH, Kim K, Park WM, et al. Reduction of knee range of motion during continuous passive motion due to misaligned hip joint centre [J]. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 2011 Apr 1:1 [Epub ahead of print

(上接第 1311 页)

参考文献(References)

[1] 黄耀庭，李秀霞，程伟. 泌尿外科肿瘤发病情况的变化[J]. 临床泌尿外科杂志, 1997,12:47-48
Huang Yao-ting, Li Xiu-xia, Cheng Wei. The incidence of urological tumor. The journal of clinical urology, 1997,12:47-48

[2] Lee R, Drodler MG. Natural history of bladder cancer [J]. Urol clin N Am, 2000,27 :1-13

[3] Rabbani F, Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer [J]. Urol Clin N Am, 2000,27:83-102

[4] Hsich JT, Dinny CPN, Chung LWF. The potential role of gene therapy in the treatment of bladder cancer [J]. Urol Clin N Am, 2000, 27:103-113

[5] Fuessel S, Herrmann J, Ning S, et al. Chemosensitization of bladder cancer cell by survivin-directed antisense oligodeoxy. Nueleotides and siRNA[J]. Cancer Lett, 2006, 232(1): 243 -254

[6] Hausladen DA, W heeler MA, Ahieri DC, et a1. Effect of Intravesical Treatment of Transitional Cell Carcinoma With Bacillus Calmette Guerin and Mitomycin C on Urinary Survivin Levels and Outcome [J]. J Urol, 2003,170: 230-234

[7] Dhar NB, Campbell SC, Zippe CD, et al. Outcomes in patients with urothelial carcinoma of the bladder with limited pelvic lymph node dissection[J]. BJU Int, 2006, 98(6):1172-1175

[8] Stein JP, Penson DF, Lee C, et al. Long-term oncological outcomes in women undergoing radical cystectomy and orthotopic diversion for bladder cancer [J]. J Urol, 2009,181 (5):2052-2058; discussion 2058-2059

[9] Horstmann M, Bontrup H, Hennenlotter J, et al. Clinical experience with survivin as a biomarker for urothelial bladder cancer[J]. World J Urol, 2010 Jun，28(3): 399-404

[10] Lee K, Jung ES, Choi YJ, et al. Expression of pRb, p53, p16 and cyclin D1 and their clinical implications in urothelial carcinoma [J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(10):1449-1455

[11] Brunner A, Verdorfer I, Prelog M, et al. Large-scale analysis of cell cycle regulators in urothelial bladder cancer identifies p16 and p27 as potentially useful prognostic markers [J]. Pathobiology, 2008,75(1): 25-33

[12] 何杰, 汪万英, 朱应葆, 等. P16 和 bcl-2 基因在膀胱癌肿的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2001,7:81-83
He Jie, Wang Wan-ying, Zhu Ying-bao, et al. The expression of p16, bcl-2 in the bladder cancer and its clinical outcomes [J]. Journal of Oncology, 2001,7:81-83(In Chinese)

[13] 谢庆祥, 林福地, 韩聪祥, 等. 细胞周期调控因子 P16、Rb 和 cyclin D1 在膀胱癌中表达的意义[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 20: 25-31
Xie Qing-xiang, Lin Fu-di, Han Cong-xiang, et al. The expression of cell cycle related protein P16、Rb and cyclin D1 in bladder cancer[J]. Chinese modern medicine, 2003, 20: 25-31(In Chinese)

[14] Moonen L, Ong F. Apoptosis, proliferation and p 53, cyclinD1, and retinoblastom a gene expression in relation to radiation response in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. Int J Radiat Onco l Bio Phys, 2001, 49 (5): 1305-1310

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net