

p57^{kip2} LIMK-1 在胃癌组织中的表达及与肿瘤血管和淋巴管的关系*

王 龙, 于燕妮**, 贺晓燕

(贵阳医学院 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 探讨胃癌组织中细胞周期抑制因子 p57^{kip2}、LIMK-1 与临床病理的关系以及在胃癌浸润转移及肿瘤微淋巴管和微血管形成中的作用。方法: 用免疫组织化学方法(EnVision 法)检测 40 例胃癌组织和其对应癌旁组织(距癌灶缘 > 5 cm)中 p57^{kip2}、LIMK-1 的表达水平, 及检测微淋巴管和微血管密度。结果: p57^{kip2} 的表达与胃癌细胞的分化程度有相关性($P < 0.05$), 与临床分期、年龄、肿瘤大小及肿瘤侵犯转移无相关性($P > 0.05$); p57^{kip2} 在胃癌组织中的阳性率为 30%, 低于癌旁组织(45%)。LIMK-1 在胃癌组织中的表达与 p57^{kip2} 的表达有相关性($P < 0.05$); 淋巴管密度(LVD)和微血管密度(MVD)与 p57^{kip2} 和 LIMK-1 表达均呈正相关($P < 0.05$)。结论: p57^{kip2} 和 LIMK-1 与胃癌细胞的分化程度有关, 并参与胃癌组织中的微淋巴管和微血管的形成, 进而促进胃癌的发生发展和转移过程。

[关键词] 胃肿瘤; 癌基因蛋白质类; 免疫组织化学; 癌基因, p57^{kip2}; 癌基因, LIMK-1

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)01-0019-04

Expression of p57^{kip2} and LIMK-1 in Gastric Cancer and Their Relationships with Tumor Blood Vessel and Lymphatic Vessel

WANG Long, YU Yanni, HE Xiaoyan

(Department of Pathology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the relationship of cell cycle inhibitor, p57^{kip2}, and LIMK-1 to clinical pathology, and to study their roles in gastric cancer invasion, metastasis, and formation of tumor lymphatic vessels and microvessels. **Methods:** The expression levels of p57^{kip2} and LIMK-1 in tissues of 40 cases of gastric cancer and adjacent normal tissues (away from the foci edge more than 5 cm) were detected with immunohistochemistry method (Envision method). Lymphatic vessel density (LVD) and microvessel density (MVD) were detected as well. **Results:** The expression of p57^{kip2} was associated with gastric cancer cell differentiation ($P > 0.05$), but not associated with clinical stage, patient age, tumor size, tumor invasion and metastasis ($P > 0.05$). The positive rate of p57^{kip2} in gastric carcinoma was 30% which was lower than that in normal tissue (45%). The expression of LIMK-1 in gastric cancer tissue was correlated with the expression of p57^{kip2} ($P < 0.05$). LVD and MVD in gastric cancer were positively correlated with the expression of p57^{kip2} and LIMK-1 ($P < 0.05$). **Conclusions:** The expression of LIMK-1 and p57^{kip2} relates to differentiation of gastric cancer and participate in the formation of lymphatic vessels and microvessels, thus contributing to gastric cancer development and metastasis.

[Key words] stomach neoplasms; oncogene proteins; immunohistochemistry; gene, p57^{kip2}; gene, LIMK-1

*[基金项目] 贵州省优秀科技人才省长基金(编号:黔省专合字[2005]165号)

**通讯作者 E-mail: yuyanni@gmc.edu.cn

p57^{kip2} 基因是新近发现的 CDKIs 家族成员之一,为依赖 cyclin 激酶抑制剂的肿瘤抑制基因,其定位于 11P15.5。p57^{kip2} 主要通过对 LIMK-1 的调控来抑制癌细胞的迁移能力。2007 年 7 月~2009 年 10 月通过免疫组化标记胃癌组织中 p57^{kip2}、LIMK-1 的蛋白表达,研究它们在胃癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 标本来源

收集 2007 年 7 月~2009 年 10 月贵州省肿瘤医院、贵州省人民医院、贵阳市第一人民医院胃管状腺癌患者的石蜡组织标本 40 例,所有标本均为手术标本,均经 2 名病理医师诊断确定。40 例均以对应标本的癌旁(距癌灶缘 >5 cm)黏膜组织作为对照组。

1.2 试剂及方法

p57^{kip2} (即用型)鼠单克隆抗体(工作浓度 1:50),购自广州深达生物制品技术有限公司;LIMK-1 (浓缩型)兔单克隆抗体(工作浓度 1:100),购自成都基因有限公司;D2-40 (即用型)鼠单克隆抗体(工作浓度 1:500),购自广州深达生物制品技术有限公司;CD34 (即用型)兔单克隆抗体(工作浓度 1:100),购自广州深达生物制品技术有限公司;二抗、DAB 显色剂、PBS 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。所有试剂均按 Evison 法操作,严格按说明书操作,每次试验均设立阳性对照及用 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.3 结果判定

阳性染色呈黄色或棕褐色,p57^{kip2} 表达于细胞核,LIMK-1、CD34、D2-40 表达于细胞浆和胞膜。阳性结果判定根据两方面的综合评分进行判断。阳性细胞占视野细胞总数的百分率及其染色强度:阳性细胞所占百分比 <5% 计 0 分,5%~25% 计 1 分,26%~50% 计 2 分,>50% 计 3 分;按细胞染色强弱分:不着色计 0 分,黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,黄褐色计 3 分。两种评分相加:0~1 分为阴性,2 分为弱阳性,3~4 分为阳性,5~6 分为强阳性,其中 2 分以上视为阳性表达。

1.4 统计学处理

所得数据应用 SPSS 13.0 统计软件包处理。计量资料以均数 ± 标准差表示,采用方差分析,计数资料以频数表示,采用 χ^2 检验;相关性分析用

Spearman 等级相关性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床病理资料

40 例胃癌患者中男 22 例,女 18 例;患者年龄 30~65 岁,中位年龄 57.5 岁。高-中分化腺癌 21 例,低分化腺癌 19 例。有淋巴结转移的 25 例,无淋巴结转移的 15 例。临床分期:Ⅰ~Ⅱ期 14 例,Ⅲ~Ⅳ期 26 例。

2.2 p57^{kip2} 在胃癌组织中的表达

p57^{kip2} 在胃癌组织中的表达呈胞核棕黄色(图 1)。在 40 例原发胃癌组织中,p57^{kip2} 的表达 12 例,表达率为 30%,在癌旁组织中 p57^{kip2} 阳性表达 18 例,表达率为 45%,胃癌组织中 p57^{kip2} 的表达显著低于癌旁组织。p57^{kip2} 表达与胃癌的组织学分级呈负相关($P < 0.05$),与临床分期、生存期、患者年龄、最大瘤径及转移和局部侵犯无相关性(表 1)。

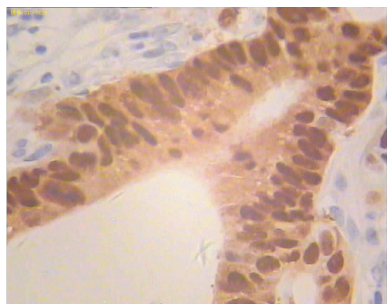


图 1 p57^{kip2} 在胃癌组织中的表达(Envision 法, ×40)

Fig.1 The expression of p57^{kip2} in gastric cancer issue

2.3 LIMK-1 在胃癌组织中的表达

在胃癌组织中,LIMK-1 阳性表达于细胞质(图 2),LIMK-1 阳性表达率 20%。LIMK-1 的表达与

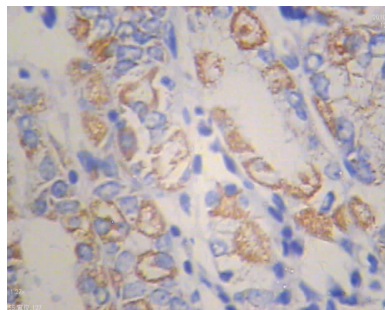


图 2 LIMK-1 在胃癌组织的表达(Envision 法, ×200)

Fig.2 The expression of LIMK-1 in gastric cancer issue

p57^{kip2}的表达关系呈正相关($P < 0.05$)。见表 1。平明显高于 p57^{kip2} 阴性者。而在 p57^{kip2} 表达阴性在 p57^{kip2} 表达阳性的癌旁组织中,LIMK-1 表达水病例中,有 4 例 LIMK-1 表达。

表 1 p57^{kip2} LIMK-1 的表达与临床病理特征的关系
Tab. 1 Relationship of the expression of p57^{kip2} and LIMK-1 to pathological indexes

		例数	p57 ^{kip2} 阳性情况					P	LIMK-1 阳性情况					P
			-	+	++	+++	rs		-	+	++	+++	rs	
性别	男	22	16	2	3	1			19	2	1			
	女	18	12	3	2	1	-0.110	0.500	12	3	2	1	-0.253	0.115
年龄	≥60	19	13	1	4	1			14	1	3	1		
	<60	21	15	4	1	1	0.134	0.410	17	2	1	1	-0.137	0.398
肿瘤最大直径	<4 cm	21	18	2	1	18			2	1				
	≥4 cm	19	10	3	4	2	0.027	0.876	13	1	3	2	0.068	0.677
组织学分级	高-中分化	21	12	4	4	1			15	1	3	2		
	低分化	19	16	1	1	1	-0.331	0.033	16	2	1		0.126	0.443
淋巴结转移	有	25	18	2	3	2			18	2	3	2		
	无	15	10	3	2		0.181	0.263	13	1	1		-0.255	0.133
临床病理分期	I ~ II	14	9	3	2	11			2	1				
	III ~ IV	26	19	2	3	2	-0.231	0.152	20	1	3	2	-0.175	0.295

2.4 D2-40 和 CD34 与 p57^{kip2}、LIMK-1 表达的相关性

D2-40 和 CD34 在胃癌组织中分别标记淋巴管内皮细胞和血管内皮细胞,阳性细胞细胞浆呈黄色。计算胃癌组织中其所标记的 LVD、MVD 数。p57^{kip2}、LIMK-1 表达阳性的组织中,LVD、MVD 计数平均值多在 30 ~ 70,并且 LVD、MVD 与 p57^{kip2}、LIMK-1 表达均呈正相关($P < 0.05$)。

3 讨论

在胃癌浸润转移的通路中,Rho-ROCK-LIMK-cofilin 通路是其中相关的重要信号通路之一,此通路受到 p57^{kip2} 基因的调控。p57^{kip2} 基因对肌动蛋白的调节是通过 Rho 蛋白的调控结合从细胞核转运到细胞质中的 LIMK-1 肌动蛋白来实现的,从而调控肌动蛋白纤维的重组,因而与肌动蛋白细胞骨架运动和动力的关键调节相关^[1~3]。并且,在 p57^{kip2} 基因的中部区域有一重要独特的功能,可以与 LIMK-1 的 N 端区域的交流调节细胞肌动蛋白的结构形态和功能。

p57^{kip2} 基因对肌动蛋白细胞骨架调节和癌细胞的迁移能力的调控是通过 p57^{kip2} 对 LIMK-1 的调控来实现的。在 Rho-ROCK-LIMK-cofilin 通路中,p57^{kip2} 与肌动蛋白细胞骨架修饰酶 LIMK-1 的相互作用增强了 LIMK-1 的活性,从而激活独立的 Rho 相关激酶,导致 cofilin 磷酸化增加并导致肌动蛋白解聚失活。p57^{kip2} 基因通过参与调解 LIMK-1 的活性表达最终影响细胞的流动性和癌细胞的迁移能

力^[4,5]。本实验检测癌灶组织和对照组的组织中 p57^{kip2} 和 LIMK-1 的蛋白表达水平,结果表明,癌旁组织中 p57^{kip2} 表达高于癌组织,这与国内外的实验结果相一致。并且 LIMK-1 的表达与 p57^{kip2} 的表达成正相关(rs = 0.726, $P = 0.01$),这说明 p57^{kip2} 在 Rho-ROCK-LIMK-cofilin 通路中对 LIMK-1 有着重要的调控作用,并且此作用是调节癌细胞运动能力和癌细胞浸润转移的重要因素,并且 p57^{kip2} 表达与肿瘤细胞的组织学分级成负相关。但在一些 p57^{kip2} 阳性表达的病例中,LIMK-1 不表达,这也说明 p57^{kip2} 可能不仅通过 Rho-ROCK-LIMK-cofilin 通路调节癌细胞的运动能力,还有其它的对癌细胞的调控机制,其作用的具体机制还有待进一步的研究。

p57^{kip2} 基因除了调控癌细胞的运动能力外还通过调控一些内外因子促进微脉管的形成,通过对微环境组成的调控影响癌细胞的浸润和转移^[6,7]。Reid^[8] 等通过实验研究证实,p57^{kip2} 阳性表达的细胞绝大部分为终末期分化的细胞,说明 p57^{kip2} 可能是通过 Rho-ROCK-LIMK-cofilin 通路调控内外因子而促进脉管形成进而影响癌细胞的浸润^[9~11]。本实验中,p57^{kip2}、LIMK-1 在胃癌组织及癌旁组织中的表达均与 LVD、MVD 呈正相关,说明此通路还具有促进肿瘤组织中的脉管生成作用。Vlecken DH 等^[12] 的研究中发现,LIMK-1 本就具有可以单独促进脉管生成的作用。因此本实验中,p57^{kip2} 表达阴性 LIMK-1 阳性表达的病例中,LVD、MVD 显著高于 p57^{kip2}、LIMK-1 表达均阴性者。

总之,胃癌的浸润转移机制是复杂的,具体机

理还不清楚。p57^{kip2} 和 LIMK-1 在 Rho-ROCK-LIMK-cofilin 通路中对胃癌浸润转移的具体作用机制还不清楚,并且与胃癌预后的关系等临床病理指标还不明确。从本实验结果推测,p57^{kip2}、LIMK-1 可能通过 Rho-ROCK-LIMK-cofilin 通路提高癌细胞运动能力和促进肿瘤微环境中脉管的生成而促进胃癌的浸润转移,尤其在高-中分化的胃癌中,因此通过对 p57^{kip2}、LIMK-1 表达的研究有助于以后对临床预后和胃癌转移的早期诊断。

4 参考文献

- [1] Poúha ST, Shum MS, Goebel A, et al. LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs [J]. *Oncogene*, 2009 (4): 597 – 607.
 - [2] P Vlachos, B Joseph. The Cdk inhibitor p57^{kip2} controls LIM-kinase-1 activity and regulates actin cytoskeleton dynamics[J]. *Oncogene*, 2009(28): 4175 – 4188.
 - [3] Atsushi Tsugu, Keiichi Sakai, Peter B Dirks, et al. Expression of p57^{kip2} Potently Blocks the Growth of Human Astrocytomas and Induces Cell Senescence[J]. *American Journal of Pathology*, 2000 (157): 919 – 932.
 - [4] Liang Bin, Wang Shan, YangXiaodong. Expressions of cyclin E cyclin depende kinase 2 and p57^{kip2} in human gastric cancer[J]. *Chinese Medical Journal*, 2003 (1): 20 – 23.
 - [5] Agaimy A, Carney JA. Lymphatics and D2-40/podoplanin expression in gastrointestinal stromal tumours of the stomach with and without lymph node metastasis: an immunohistochemical study with special reference to the Carney triad[J]. *J Clin Pathol*, 2010 (3): 229 – 234.
 - [6] M Yashiro, O Shinto, K Nakamura, et al. Effects of VEGFR-3 phosphor -ylation inhibitor on lymph node metastasis in an orthotopic diffuse-type gastric carcinoma model [J]. *British Journal of Cancer*, 2009(101):1100 – 1106.
 - [7] Kyoungbun Lee, Do Joong Park, Gheeyoung Choe, et al. Increased Intratumoral Lymphatic Vessel Density Correlates with Lymph Node Metastasis in Early Gastric Carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2009(17):73 – 80.
 - [8] Reid LH, Crider miller SJ, West A, et al. Genomic organization of the human p57^{kip2} gene and its analysis in the G401 Wilms, tumor assay [J]. *Cancer Res*, 1996 (6): 1214 – 1218.
 - [9] Min KO, Seo EJ, Kwon HJ. Methylation of p16(INK4A) and p57^{kip2} are involved in the development and progression of gastric MALT lymphomas[J]. *Mod Pathol*, 2006 (1): 141 – 148.
 - [10] Poúha ST, Shum MS, Goebel A, et al. LIM-kinase a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs [J]. *Oncogene*, 2010 (4): 597 – 607.
 - [11] Kotaro Akaishi, Jun Nakayama, Keiichi Sakai, et al. Antigen p57^{kip2} as a potential negative regulator of human astrocytoma growth [J]. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2009(16):1615 – 1618.
 - [12] Vlecken DH, Bagowski CP. LIMK1 and LIMK2 are important for metastatic behavior and tumor cell-induced angiogenesis of pancreatic cancer cells [J]. *Zebrafish*, 2009 (4): 433 – 439.
 - [13] Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis [J]. *Gastric Cancer*, 2010 (1):11 – 24.
 - [14] Robert, Becher, Perryshen, et al. Sentinel Lymph Node Mapping for Gastric Adeno carcinoma[J]. *The American surgeon*, 2009(79): 710 – 714.
(2010 – 11 – 30 收稿,2010 – 12 – 28 修回)
- (上接第 18 页)
- [2] 陈振斌,闫梅,雷箴,等. 利用孕妇血浆 DNA 检测胎儿性别的研究[J]. *遗传*,2004(1):18 – 22.
 - [3] 鹿亚超,朱斌,姜海燕,等. 孕妇血浆 Amelogenin 基因 6 bp 差异检测对产前胎儿性别的鉴定价值[J]. *苏州大学学报医学版*,2005(3):416 – 418.
 - [4] 刘福民,冯霞,王秀英,等. 荧光定量 PCR 检测孕妇血浆中胎儿 DNA 的研究[J]. *中华围产医学杂志*,2005 (6):380 – 382.
 - [5] Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, et al. Replicate realtime PCR testing of DNA in maternal plasma increase the sensitivity of non-invasive fetal sex determination[J]. *Prenat Diagn*,2003(23):235 – 238.
 - [6] 吕德坚,李建金,刘秋玲. 中国汉族群体 DXS101 位点的多态性[J]. *中山医科大学学报*, 2001(22):1222 – 1241.
 - [7] Lo YM, Lau TK, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis [J]. *Am J Hum Genet*, 1998(4):768 – 775.
 - [8] 易萍,李力,颜耀华,等. 应用母亲血浆常规 PCR 技术进行胎儿性别鉴定[J]. *中国妇幼保健*,2006(21):836 – 837.
(2010 – 11 – 06 收稿,2010 – 12 – 06 修回)