

论著·基础研究

p57kip2 和 p27kip1 在水泡状胎块中的表达及对比研究^{*}陶玉梅¹,任晓燕^{1△},王婧²,朱国祥¹,顾丽丽¹,陈婷婷¹

(南通大学附属南通妇幼保健院:1. 病理科;2. 产前诊断中心,江苏南通 226006)

摘要:目的 观察父源性印迹基因 p57kip2 和细胞周期负性调控因子 p27kip1 在不同类型水泡状胎块中的表达情况,探讨 p57kip2 和 p27kip1 在水泡状胎块中的表达及两者对于鉴别不同类型水泡状胎块的意义。方法 采用免疫组织化学染色方法,检测 30 例完全性水泡状胎块、86 例部分性水泡状胎块及 30 例正常绒毛组织中 p57kip2 和 p27kip1 的表达情况,分析 p57kip2 和 p27kip1 在两种不同类型水泡状胎块中的表达及两者之间的差异和相关性。结果 p57kip2 和 p27kip1 在完全性水泡状胎块组的表达均低于部分性水泡状胎块组和正常流产绒毛组,差异有统计学意义($P < 0.05$),p57kip2 和 p27kip1 在完全性水泡状胎块中表达呈正相关($r = 0.750, P < 0.01$),在部分性水泡状胎块中表达呈负相关($r = -1.000, P < 0.01$)。结论 p57kip2 和 p27kip1 在完全性水泡状胎块和部分性水泡状胎块中的表达差异对鉴别不同临床类型的水泡状胎块有一定指导价值,联合检测 p57kip2 和 p27kip1 可以对水泡状胎块的诊断和分型起到有效的辅助作用。

关键词:p57kip2; p27kip1; 水泡状胎块; 免疫组织化学**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.002 **中图法分类号:**R737.33**文章编号:**1673-4130(2018)03-0260-04**文献标识码:**AThe expression and comparison of p57kip2 and p27kip1 in hydatidiform moles^{*}TAO Yumei¹, REN Xiaoyan^{1△}, WANG Jing², ZHU Guoxiang¹, GU Lili¹, CHEN Tingting¹

(1. Pathology Department; 2. Prenatal Diagnosis Center, Nantong Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong, Jiangsu 226006, China)

Abstract: Objective To observe the level of imprinting gene p57kip2 and p27kip1 expression in different hydatidiform moles. To investigate the value of combined detection of p57kip2 and p27kip1 in diagnosis and differential diagnosis of hydatidiform moles. **Methods** We examined the immunohistochemical staining of p57kip2 and p27kip1 in 30 cases of complete hydatidiform moles and 86 cases of partial hydatidiform moles and 30 cases normal placenta, and also analyze the differences and correlation between the two genes of p57kip2 and p27kip1 in two different patterns of hydatidiform moles. **Results** The rate of expression of p57kip2 and p27kip1 in complete hydatidiform moles was obviously lower than that in partial hydatidiform moles and normal placenta. There were significant differences in the expression of p57kip2 and p27kip1 among complete hydatidiform moles, partial hydatidiform moles and normal placenta($P < 0.05$). p57kip2 had positive correlation with p27kip1 in complete hydatidiform moles($r = 0.750, P < 0.01$), meanwhile there was negative correlation between p57kip2 and p27kip1 in partial hydatidiform moles($r = -1.000, P < 0.01$). **Conclusion** The differential expression of p57kip2 and p27kip1 in complete hydatidiform moles and partial hydatidiform moles can be of certain value in the differential diagnosis of hydatidiform moles. Meanwhile, the combined method is useful to the identification and classification of hydatidiform moles.

Key words:p57kip2; p27kip1; hydatidiform mole; immunohistochemistry

水泡状胎块(HM)又称葡萄胎,是胎盘绒毛的一种良性病变,以绒毛滋养叶细胞不同程度的异常增生及绒毛间质水肿为主要病理特征。其发病率有明显的地域差异,在亚洲的发病率为 1/1 000~2/1 000 次

妊娠,是欧美发病率的 3~10 倍,种族差异可能是导致 HM 发病率不同的原因^[1-2]。根据组织学和遗传学特点,可将其分为完全性水泡状胎块(CHM)和部分性水泡状胎块(PHM)。约 15%~20% 的 CHM 及 0.2%~

^{*} 基金项目:江苏省南通市卫生局青年科研基金项目(WQ2015071)。

作者简介:陶玉梅,女,主治医师,主要从事妇产科病理、肿瘤病理方面的研究。△ 通信作者,E-mail:ntrxy@hotmail.com。

本文引用格式:陶玉梅,任晓燕,王婧,等. p57kip2 和 p27kip1 在水泡状胎块中的表达及对比研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(3):260-263.

4% 的 PHM,会进展为持续性滋养细胞疾病^[3-4]。超过 50% 的绒毛膜癌发生在 CHM 之后^[5],准确诊断并区分两种类型 HM 至关重要,直接关系到患者治疗方案的选择和预后判断等,具有十分重要的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集南通大学附属南通妇幼保健院 2005—2015 年存档 HM 石蜡标本 116 例,年龄 19~55 岁,中位年龄 28.3 岁,其中 CHM 30 例,年龄 21~55 岁,中位年龄 26.0 岁,PHM 86 例,年龄 18~52 岁,中位年龄 26.0 岁。另收集计划生育门诊 2015 年 7~9 月人工流产孕妇的正常绒毛组织(NP)30 例作为 NP 组,年龄 20~44 岁,中位年龄 27.5 岁,患者均无异常妊娠史,无感染性疾病及内、外科并发症。所有标本均由经验丰富的妇产科病理医师重新交叉阅片,综合分析做出诊断,重新石蜡切片,并有完整的临床、病理资料。

1.2 主要试剂 鼠抗人 p57kip2 单克隆抗体(即用型,克隆号:Kp10),兔抗人 p27kip1 单克隆抗体(即用型,克隆号:EP104),即用型 En Vision 试剂盒,柠檬酸钠抗原修复液(pH6.0),DAB 显色剂,PBS 缓冲液等均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 标本经 10% 中性甲醛缓冲溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,采用免疫组化 En Vision 两步法,实验操作步骤严格按照试剂说明书进行。p57kip2 以正常胎盘作为阳性对照,p27kip1 以扁桃体作为阳性对照,PBS 液代替一抗做阴性对照,HE 染色做组织学对照。

1.3.2 结果判定标准 p57kip2、p27kip1 表达的阳

性判断标准为良好的染色背景下绒毛滋养叶细胞的细胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒,并按 4 级半定量积分法进行结果判定^[6],即根据每张切片的显色强度结合阳性细胞的百分率法判读结果。每张切片在低倍镜下选取背景干净,组织结构良好的 5 个区域,每个区域在高倍镜视野(×400)下计算滋养叶细胞总数和阳性细胞个数,算出阳性百分率,阳性细胞百分率小于 5% 为 0 分;阳性细胞百分率 5%~10% 为 1 分;阳性细胞百分率大于 10%~50% 为 2 分;阳性细胞百分率大于 50%~80% 为 3 分;阳性细胞百分率大于 80% 为 4 分。着色强度:无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。根据二者乘积判断阳性等级,0 分为阴性(—),1~4 分为弱阳性(+),5~8 分为阳性(++) ,9~12 分为强阳性(++)。为了便于统计分析,将阴性和弱阳性合并为弱表达,将阳性和强阳性合并为强表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。计数资料采用卡方检验,两变量相关做 Spearman 等级相关检验,均做双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

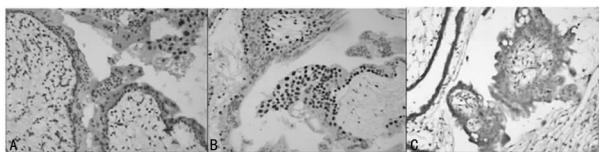
2 结 果

2.1 p57kip2 在不同类型 HM 及 NP 中的表达 p57kip2 在 PHM、CHM 及正常流产绒毛中的强表达阳性率分别为 41/86(47.67%)、2/30(6.67%)、19/30(63.33%),统计学分析表明,p57kip2 在 CHM 组和 PHM 组之间以及在 CHM 组和 NP 组之间的强表达阳性率,其差异具有统计学意义($P < 0.01$),而在 PHM 组和 NP 组之间强表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 p57kip2 和 p27kip1 在 CHM、PHM 及 NP 滋养层细胞中的表达情况

名称	组别	n	弱表达	强表达	阳性率(%)	χ^2	P
p57kip2	CHM 组	30	28	2	6.67	16.033 ^a	0.000
	PHM 组	86	45	41	47.67	2.184 ^b	0.139
	NP 组	30	11	19	63.33	21.172 ^c	0.000
p27kip1	CHM 组	30	16	14	46.67	20.471 ^a	0.000
	PHM 组	86	11	75	87.21	1.886 ^b	0.170
	NP 组	30	7	23	76.67	5.711 ^c	0.017

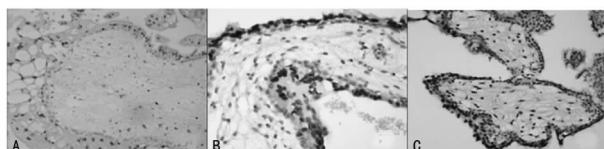
注:^a 表示与 PHM 组比较;^b 表示与 NP 组比较;^c 表示与 CHM 组比较。



注:A 表示 p57kip2 在 CHM 中绒毛滋养叶细胞和绒毛间质细胞胞核中均阴性表达;B 表示 p57kip2 在 PHM 中阳性表达于细胞滋养叶细胞和绒毛间质细胞的胞核,在合体滋养叶细胞中阴性表达;C 表示 p57kip2 在 NP 中阳性表达于绒毛滋养叶细胞和绒毛间质细胞的胞核。

2.2 p27kip1 在不同类型 HM 及 NP 中的表达 p27kip1 在 PHM、CHM 和正常流产绒毛中的强表达率分别为 75/86(87.21%)、14/30(46.67%)、23/30(76.67%),统计学分析表明,p27kip1 在 CHM 组和 PHM 组之间其差异具有统计学意义($P < 0.01$),在 CHM 组和 NP 组之间的强表达率,其差异具有统计学意义($P < 0.05$),而在 PHM 组和 NP 组之间强表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、图 2。

图 1 p57kip2 在不同类型 HM 及 NP 中的表达



注: A 表示 p57kip2 在 CHM 中阳性表达于合体滋养叶细胞和少量绒毛间质细胞的胞核, 染色强度以棕黄色为主; B 表示 p57kip2 在 PHM 中阳性表达于合体滋养叶细胞和绒毛间质细胞的胞核, 染色强度以棕褐色为主; C 表示 p57kip2 在 NP 中阳性表达于合体滋养叶细胞和绒毛间质细胞的胞核, 染色强度以棕褐色为主。

图 2 p57kip2 在不同类型 HM 及 NP 中的表达

2.3 p57kip2 和 p27kip1 在 HM 不同类型中表达的相关性 经 Spearman 等级相关检验, p57kip2 和 p27kip1 在 CHM 中的表达呈正相关($r=0.750, P<0.01$), p57kip2 和 p27kip1 在 PHM 中的表达呈负相关($r=-1.000, P<0.01$)。

3 讨 论

HM 是一种以绒毛滋养叶细胞不同程度的异常增生及绒毛间质水肿为主要病理特征的良性滋养细胞病变, 分为 CHM 和 PHM。虽然 WHO 将 HM 列为一种良性妊娠滋养细胞病变, 但其具有恶性潜能, 清除病变组织后仍有部分患者转变为恶性 HM 甚至转变为绒毛膜癌, 恶变率高达 14.5%。CHM 比 PHM 更容易发展为持续性滋养细胞疾病^[7]。因此准确的区分两种类型的 HM 对临床诊断、治疗以及预后判断都至关重要。

目前诊断 HM 主要依靠患者的临床表现、标本大体特点以及镜下组织学特点, 而前两者只起到辅助诊断作用, 最终确诊仍依赖组织病理学诊断报告。经典的 CHM 镜下组织学特征包括水肿绒毛有大量空腔; 滋养细胞的增生环绕绒毛分布、增殖且具有细胞学的非典型性; 见不到妊娠囊、羊膜、脐带以及胚胎等。经典的 PHM 镜下组织学特征则包括: 具有两种绒毛: 一种水肿, 另一种“正常”; 涉及合体滋养细胞在内的轻度滋养细胞增生; 增大的有空腔的绒毛; 其他具有扇贝形边界的绒毛经常含有滋养细胞包涵体等。间质血管中经常含有有核的胎儿红细胞; 常常见到提示胚胎发育的证据: 包括羊膜囊壁、羊膜及胚胎/胎儿组织。而经典的 HM 镜下图像一般出现于孕中期。随着声像图的问世和胎块的早期诊断与排空, 日益增多的孕龄较小的标本被送作病理的评估。当早期 CHM 的病理特征尚未发育好时, 诊断就有更大的难度。因此与部分性胎块以及水肿流产儿的鉴别就更困难^[8]。倍体分析虽具有方法简单、价格低廉、准确性和重复性较好的优点, 但也有其局限性: (1) 不易区分二倍体的 CHM 和 HA; (2) 不能区分双雄三倍体的 PHM 和双雌三倍体的异常受精^[9]。基因遗传学分析因其价格昂贵, 检验步骤繁琐, 难以在临床工作中普遍开展。免疫组化是病理科常规开展的检查项目, 寻找可靠的免疫组化检测项目用于不同类型 HM 的诊断和鉴别

诊断, 具有十分重要的临床意义。

有丝分裂抑制因子 p57kip2(CDKN1C) 为一种依赖 Cyclin 激酶(CDK)抑制蛋白的肿瘤抑制基因, 属于 cip/kip 家族, 定位于 11p15.5, 通过阻断细胞周期 G₁/S 期的转换, 实现对细胞周期的负调控, 进而阻止细胞增殖和肿瘤的形成。该基因是一种父系基因印迹, 需母系等位基因甲基化修饰后方可表达。在妊娠宫内膜中, p57kip2 表达阳性, 但是分泌腺体中阴性。正常胎盘中, >30% 滋养叶细胞、绒毛间质及绒毛中央滋养层细胞岛细胞核表达该抗体, 合体滋养层阴性。CHM 均由父系 DNA 产生, 遗传学上为空卵受精, 为二倍体, p57kip2 不表达; PHM 遗传学上为三倍体, 由一个母源性及两个父源性单体基因构成, 表达 p57kip2, 故 p57kip2 可以用于完全性和 PHM 的鉴别诊断。研究显示^[10], CHM39 例, PHM33 例及正常绒毛 10 例中, 免疫组化检测 p57kip2 的阳性表达率分别为 5%、93%、90%。这一研究结果显示, p57kip2 在 PHM 和正常绒毛中呈阳性表达, 并且阳性率显著高于 CHM, 其差异具有统计学意义($P<0.01$)。本实验研究结果显示, 在 PHM 组和 NP 组中, p57kip2 主要阳性表达于细胞滋养叶细胞、绒毛间质细胞的细胞核, 合体滋养叶细胞中基本不表达或低表达, 在 CHM 组中, p57kip2 基本呈阴性表达(图 1)。为了便于分析, 将阴性表达组和弱阳性组合并为弱表达组, 将阳性组和强阳性组合并为强表达组, 结果发现, 在 86 例 PHM, 30 例 CHM 及 30 例 NP 中, p57kip2 的强表达率分别为 47.67%, 6.67%, 63.33%。p57kip2 在 PHM 和 NP 组中呈阳性表达, 在 CHM 组中有少量表达。CHM 组的阳性率低于 PHM 组和 NP 组, 其差异具有统计学意义($P<0.01$)。PHM 组和 NP 组之间阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。这一结果和文献报道相符。对于 CHM 组中有少量病例表达 p57kip2, 有研究者分析可能和细胞中母体传递的胞质线粒体 DNA 有关, 或者是 CHM 组中有双亲来源的 CHM 病例, 含有父方和母方的 DNA, 这需要通过遗传学方法进一步验证。

在病理外检工作中, 单一依靠一种免疫组化指标鉴别 HM 的类型存在困难和风险, 因为免疫组化的结果受到组织处理、抗原保存、技术人员操作等因素的影响, 通过在临床病理诊断过程中的应用观察, 发现 p57kip2 在有些 PHM 中表达较弱或不表达, 因此寻找能够和 p57kip2 配合应用的抗体, 用于辅助 HM 的诊断分型, 十分必要。

p27kip1(CDKN1B) 定位于人 12 号染色体的 12p12.0~12p13.1 交界处, 含有 2 个参与编码的外显子和 2 个内含子, 其中一个外显子能编码 198 氨基酸的多肽。p27kip1 和 p57kip2 同属于 cip/kip 家族, 是 cip/kip 家族的重要成员之一, 能够抑制 cyclinD-CDK4、cyclinE-CDK2 和 cyclinA-CDK2, 主要调控 G₁

~S 期的转化,使细胞周期停滞在静止期,发挥在细胞增殖、分化、凋亡及细胞间黏附等方面的重要作用^[11]。本研究发现,p27kip1 在正常早孕流产绒毛及 HM 中表达于合体滋养叶细胞和绒毛间质细胞的细胞核,不表达于细胞滋养叶细胞的细胞核。在 CHM 中,p27kip1 呈细胞核黄色或棕黄色着色,而在正常早孕流产绒毛和 PHM 中,p27kip1 呈细胞核棕褐色着色(图 2)。运用和 p57kip2 同样的分析方法将阴性组和弱阳性组以及阳性组和强阳性组分别合并为弱表达组和强表达组,结果发现,在 PHM 组、CHM 组和 NP 组中,p27kip1 的强阳性表达率分别为 87.21%,46.67%,76.67%,p27kip1 在 CHM 组中阳性率低于 PHM 组和 NP 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而在 PHM 组和 NP 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。在 HM 发展过程中,可能也伴随着 p27kip1 向细胞质迁移并降解,而致细胞核中表达减少^[12],p27kip1 调节细胞周期作用减弱,细胞周期转化加速,滋养细胞过度增殖。p27kip1 被认为是一种新型的抑癌基因,它在细胞核中的表达减少可能同时调控着其他因子参与 HM 恶变的发生,具体机制仍需要进一步的研究。p27kip1 的丢失可能在 CHM 的发生发展中起到了重要作用,p27kip1 可能成为对鉴别 PHM 和 CHM 较有用的一项新指标。

综上所述,尽管在临床工作中 HM 及其分型容易发生误诊,但通过根据患者病史,形态学特征结合 p57kip2、p27kip1 等免疫表型综合判断,可以较准确地对 HM 做出诊断并分型,从而为临床诊治疾病和指导随访提供依据。

参考文献

- [1] MARISA R N, ESTHER O. Gynecologic pathology[M]. Amsterdam: Elsevier Inc, 2009: 645.
- [2] 向阳, 宋鸿钊. 滋养细胞肿瘤学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 25-33.
- [3] MCCONNELL T G, MURPHY K M, HAFIZ M A, et al. Diagnosis and subclassification of hydatidiform moles using p57 immunohistochemistry and molecular genotyping: validation and prospective analysis in routine and consultation practice settings with development of an algorithmic approach[J]. Am J Surg Pathol, 2009, 33(6): 805-817.
- [4] KIPP B R, KETTERLING R P, OBERG T N, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization, p57 immunostaining, flow cytometry, and digital image analysis for diagnosing molar and nonmolar products of conception [J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(2): 196-204.
- [5] SECKL M J, FISHER R A, SALERNO G, et al. Choriocarcinoma and partial hydatidiform moles [J]. Lancet, 2000, 356(9223): 36-39.
- [6] 厉霞玲, 钱建华, 周彩云, 等. KCNQ1, p57kip2 蛋白在水泡状胎块中的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(2): 131-135.
- [7] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 201-208.
- [8] 刘伯宁, 范娜娣. 人类胎盘病理学手册[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2008: 273.
- [9] 卢立霞, 陶林, 常彬. 葡萄胎的分子诊断研究进展[J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(12): 859-862.
- [10] 任晓燕, 陶玉梅. 水泡状胎块中 p57kip2 的表达及其意义[J]. 医学临床研究, 2012, 29(3): 422-424.
- [11] 管晓翔, 陈巍巍, 陈龙邦. p27kip1 基因启动子区的生物信息学分析[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(10): 1029-1032.
- [12] BLAIN S W, MASSAGU J. Breast cancer banishes p27 from nucleus[J]. Nat Med, 2002, 8(10): 1076-1078.

(收稿日期: 2017-07-22 修回日期: 2017-09-28)

(上接第 259 页)

- [7] 王贵强, 王福生, 成军, 等. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12): 1941-1960.
- [8] 陈永兵, 王琼, 沈小青, 等. IDO 在肝癌细胞复发转移中的作用探讨[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(23): 41-44.
- [9] CHEN Y B, LI S D, HE Y P, et al. Immunosuppressive effect of IDO on T cells in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology Research, 2009, 39(5): 463-468.
- [10] 卜晓倩, 张瑞, 申慧琴, 等. 吲哚胺 2,3-双加氧酶基因转染对肝癌细胞凋亡的影响及相关机制研究[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(5): 22-27.
- [11] 杨洁, 王琦. 吲哚胺 2,3 双加氧酶对肝癌细胞的作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6): 1117-1119.
- [12] 蒋艳萍, 曹来英, 洛若愚. Treg 细胞和 IDO 在 HPV 感染

相关宫颈疾病组织中表达及意义[J]. 实用癌症杂志, 2012, 27(1): 32-35.

- [13] CHENG J T, DENG Y N, YI H M, et al. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts induce IDO-producing regulatory dendritic cells through IL-6-mediated STAT3 activation[J]. Oncogenesis, 2016, 5(5): 198.
- [14] VACCHELLI E, ARANDA F, EGGERMONT A A, et al. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy[J]. Oncoimmunology, 2014, 3(10): e957994.
- [15] THUERE C, ZENCLUSSEN M L, SCHUMACHER A, et al. Kinetics of regulatory T cell during murine pregnancy[J]. Am J Reprod Immunol, 2007, 58(6): 514.

(收稿日期: 2017-07-23 修回日期: 2017-09-29)