

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.12.017

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.12.017>

p27、Cyclin-E 在子宫内膜异位症中的表达及其临床意义

陈志刚, 符梅, 牡丹, 黄玺玥

(绵阳市第三人民医院·四川省精神卫生中心妇产科, 四川 绵阳 621000)

[摘要] 目的: 探讨p27、细胞周期蛋白-E(Cyclin-E)在子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)中的表达及其临床意义。方法: 选取2018年4月至2021年4月于绵阳市第三人民医院经手术病理证实为卵巢EMS的100例患者作为观察组, 收集子宫内膜异位病灶组织; 另选取同期因子宫肌瘤接受子宫切除手术的100例患者作为对照组, 收集正常子宫内膜组织。采用免疫组织化学检查两组p27和Cyclin-E的表达。结果: 观察组Cyclin-E阳性率(86.00%)显著高于对照组(11.00%), 差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组p27阳性率(57.00%)显著低于对照组(78.00%), 差异有统计学意义($P<0.05$)。p27和Cyclin-E表达与生长程度、囊肿大小及痛经有关($P<0.05$)。p27和Cyclin-E在EMS中的表达呈负相关($P<0.05$)。结论: p27和Cyclin-E水平的变化在EMS发生发展中起重要作用。

[关键词] p27; 细胞周期蛋白-E; 子宫内膜异位症; 临床意义

Expression and clinical significance of p27 and Cyclin-E in endometriosis

CHEN Zhigang, FU Mei, DU Dan, HUANG Xiyue

(Department of Obstetrics and Gynecology, Mianyang Third People's Hospital · Sichuan Mental Health Center, Mianyang Sichuan 621000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of p27 and Cyclin-E in endometriosis (EMS). **Methods:** A total of 100 patients with ovarian EMS confirmed by surgery and pathology in Mianyang Third People's Hospital from April 2018 to April 2021 were selected as an observation group to collect endometrial ectopic lesions. In addition, 100 patients with uterine fibroids undergoing hysterectomy at the same time were selected as a control group. The normal endometrial tissues were collected and the expressions of p27 and Cyclin-E in the 2 groups were examined by immunohistochemistry. **Results:** The positive rate of Cyclin-E in the observation group (86.00%) was significantly higher than that in the control group (11.00%) ($P<0.05$). The positive rate of p27 in the observation group (57.00%) was significantly lower than that in the control group (78.00%) ($P<0.05$). The expression of p27 and Cyclin-E was related to the degree of growth, cyst size, and dysmenorrhea ($P<0.05$).

收稿日期 (Date of reception): 2022-04-26

通信作者 (Corresponding author): 陈志刚, Email: chenzhigangdor@163.com

基金项目 (Foundation item): 新世纪人才计划 (NCET-12-0382). This work was supported by the New Century Excellent Talents Program, China (NCET-12-0382).

p27 and Cyclin-E were negatively correlated in EMS ($P<0.05$). **Conclusion:** The changes in p27 and Cyclin-E levels play an important role in the occurrence and development of EMS.

Keywords p27; Cyclin-E; endometriosis; clinical significance

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)是一种雌激素依赖性病变,包括子宫内膜腺体和子宫基质^[1]。它具有与恶性肿瘤相似的生物学行为特征,如细胞增殖、转移和复发,使其成为妇科难治性疾病。据报道^[2-3],约80%的EMS患者患有慢性盆腔疼痛(chronic pelvic pain, CPP),主要表现为腹痛,月经前后的背痛甚至剧烈疼痛,严重影响患者的生活质量和身心健康。目前,关于EMS的致病原因尚不清楚。近年来,进一步研究^[4-5]表明EMS的发展与细胞周期调控抑制因子p27和细胞周期蛋白-E(Cyclin-E)有关。p27和Cyclin-E是与细胞增殖和肿瘤形成密切相关的2个主要细胞周期调节剂。在本研究中,使用免疫组织化学方法检测EMS中p27和Cyclin-E的表达,并分析其在卵巢EMS病理中的关系及其临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2018年4月至2021年4月100例于绵阳市第三人民医院经手术病理证实的卵巢EMS患者作为观察组,纳入标准:1)均符合中华医学会制定的EMS诊断标准^[6];2)手术前3个月未接受激素类或抗EMS药物治疗;3)无严重全身性疾病;4)未放置宫内节育器。排除标准:1)合并其他恶性肿瘤;2)存在免疫系统疾病;3)生殖系统畸形。对照组为同期因子宫肌瘤接受子宫切除手术的患者100例,均采集正常子宫内膜组织,术后均有病理切片证实。纳入标准:1)手术前3个月未接受激素类药物治疗;2)无严重全身性疾病;3)未放置宫内节育器。排除标准:1)合并其他恶性肿瘤;2)存在免疫系统疾病。其中,观察组年龄20~42(29.34±7.54)岁,体重51~72(58.21±8.38) kg,身高(1.60±0.09) m,所有患者均行腹腔镜手术,64例深层生长,36例异位内膜浅层生长,45例异位囊肿<3 cm,55例异位囊肿≥3 cm。依据修订后美国生育协会的修正分期法对患者进行分期^[7],其中I期11例,II期18例,III期49例,IV期22例。对照组年龄22~45(30.08±8.21)岁,体重50~75(58.21±8.86) kg,身高(1.62±0.10) m。本研究已通过绵阳市第三人民医

院医学伦理委员会批准(审批号:20190318),患者均自愿签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 腹腔镜手术

所有患者行腹腔镜手术。手术采用全身麻醉,在月经后3~7 d进行。根据手术过程中观察到的各种病变,选择透热、粘连分离、电凝、内部病变、输卵管修复、卵巢子宫内膜异位囊肿切除和子宫悬吊等手术方法。手术后,用生理盐水冲洗腹腔,涂抹医用透明质酸钠以防止盆腔粘连。所有患者均静脉注射抗生素48 h,以防止术后感染。腹腔镜检查后,将在手术过程中收集的样本送组织病理学检查。

1.2.2 免疫组织化学检查

即用型链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC; 过氧化物酶)试剂盒(博士德,中国,货号:SA1034); Masson染色试剂盒(索莱宝,中国,货号:G1340); 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB; 博士德,中国,货号:SR1047); 苏木素(博士德,中国,货号:AR1053); 无水乙醇、二甲苯、过氧化氢(H_2O_2)均为分析纯; 甲醇为色谱纯; 水为超纯水。

取所有对象子宫内膜及剥离的囊肿组织,将经甲醛固定的样本用常规梯度酒精进行脱水,浸入二甲苯进行透明化,石蜡包埋,用切片机做4 mm连续切片。将切片常规脱蜡,使用SABC法进行免疫组织化学染色,具体步骤如下:1)将切片脱蜡水化;2)将切片放入pH 7.3~7.5的磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)中洗涤5 min;3)切片置入常温3% H_2O_2 溶液中10 min后用PBS洗涤;4)抗原修复10 min后用PBS洗涤;5)滴加一抗(鼠抗人细胞周期素E单克隆抗体及鼠抗人p27蛋白单克隆抗体)并在4 °C下反应过夜;6)PBS洗涤5 min后滴加二抗在37 °C下反应30 min;7)PBS洗涤5 min后使用SABC试剂37 °C下反应30 min;8)PBS洗涤5 min后DAB室温显色,反应30 min后用蒸馏水洗涤;9)滴加苏木精轻度复染,蒸馏水洗涤,干燥后封片。结果判读:p27和Cyclin-E阳性产物都在细胞核上,当细胞核、细胞质或

细胞膜出现浅棕色或棕褐色及以上颗粒判定为阳性表达。根据染色范围和程度对阳性表达进行分析: 阴性(-), 0分(无着色); 弱阳性(+), 1分(着色浅, 与阴性对照片有明显区别或着色范围<25%); 阳性(++), 2分(中等着色, 染色强度在浅着色和强着色之间或着色范围25%~50%); 强阳性(+++), 3分(强着色, 着色与已知阳性片同样强或着色范围>50%)。所有结果均由2名高年资病理科医师进行判断, 意见有分歧时, 经协商获得一致意见。

1.3 统计学处理

使用SPSS 23.0统计学分析软件进行数据分析。计数资料以例(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(F 检验); 采用Spearman相关分析p27和Cyclin-E表达的相关性。检验水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Cyclin-E 阳性表达比较

观察组Cyclin-E阳性率(86.00%)显著高于对照组(11.00%, $P<0.05$; 表1, 图1)。

2.2 两组 p27 阳性表达比较

观察组p27阳性率(57.00%)显著低于对照组(78.00%, $P<0.05$; 表2, 图2)。

2.3 不同临床病理特征 EMS 患者 p27 和 Cyclin-E 的表达情况

p27和Cyclin-E表达与生长程度、囊肿大小、痛经有关($P<0.05$), 而与临床分期无明显相关性($P>0.05$, 表3)。

2.4 p27 和 Cyclin-E 在 EMS 中相关性分析

p27和Cyclin-E在EMS中的表达呈负相关($r=-0.627$, $P<0.05$; 表4)。

表1 两组Cyclin-E阳性表达比较($n=100$)

Table 1 Comparison of Cyclin-E positive expression between the 2 groups ($n=100$)

组别	Cyclin-E表达/例				阳性细胞/[例(%)]
	-	+	++	+++	
对照组	89	7	4	0	11 (11.00)
观察组	14	32	37	17	86 (86.00)
χ^2					112.601
P					0.001

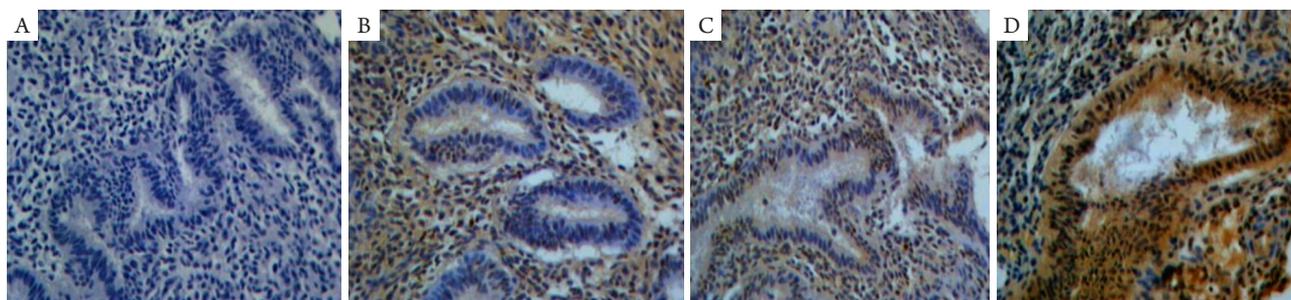


图1 观察组Cyclin-E阳性表达情况(HE染色, $\times 200$)

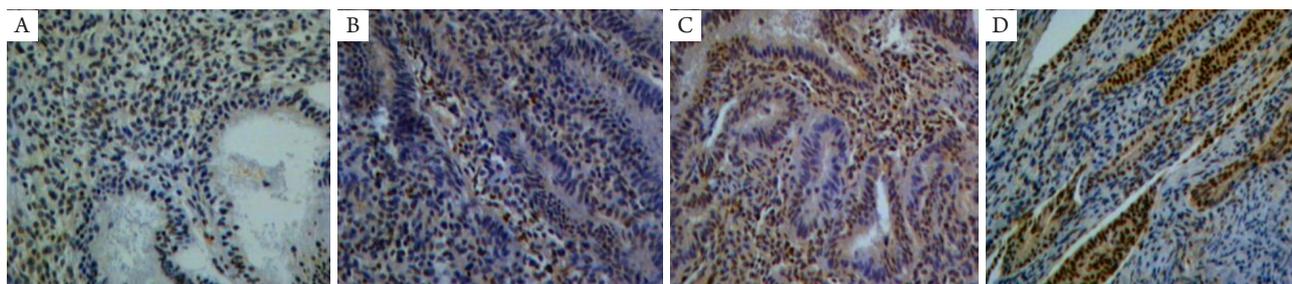
Figure 1 Positive expression of Cyclin-E in the observation group (HE staining, $\times 200$)

(A) Cyclin-E在异位内膜阴性(-)表达; (B) Cyclin-E在异位内膜弱阳性(+)表达; (C) Cyclin-E在异位内膜阳性(++)表达; (D) Cyclin-E在异位内膜强阳性(+++)表达。

(A) Negative (-) expression of Cyclin-E in ectopic endometrium; (B) Weakly positive (+) expression of Cyclin-E in ectopic endometrium; (C) Positive (++) expression of Cyclin-E in ectopic endometrium; (D) Strong positive (+++) expression of Cyclin-E in ectopic endometrium.

表2 两组p27阳性表达比较($n=100$)Table 2 Comparison of p27 positive expression between the 2 groups ($n=100$)

组别	p27表达/例				阳性细胞/[例(%)]
	-	+	++	+++	
对照组	22	28	31	20	78 (78.00)
观察组	43	16	30	11	57 (57.00)
χ^2					10.051
P					0.002

图2 观察组p27阳性表达情况(HE染色, $\times 200$)Figure 2 Positive expression of p27 in the observation group (HE staining, $\times 200$)

(A)p27在异位内膜阴性(-)表达; (B)Cyclin-E在异位内膜弱阳性(+)表达; (C)p27在异位内膜阳性(++)表达; (D)p27在异位内膜强阳性(+++)表达。

(A) Negative (-) expression of p27 in ectopic endometrium; (B) Weakly positive (+) expression of Cyclin-E in ectopic endometrium; (C) Positive (++) expression of p27 in ectopic endometrium; (D) Strong positive (+++) expression of p27 in ectopic endometrium.

表3 不同临床病理特征EMS患者p27和Cyclin-E的表达情况比较($n=100$)Table 3 Comparison of p27 and Cyclin-E expressions in EMS patients with different clinicopathological features ($n=100$)

组别	n	p27/例		χ^2	P	Cyclin-E/例		χ^2	P
		阴性	阳性			阴性	阳性		
临床分期				0.173	0.982			5.74	0.125
I	11	8	3			5	6		
II	18	14	4			6	12		
III	49	37	12			8	41		
IV	22	16	6			4	18		
生长程度				8.733	0.003			36.909	0.001
深层生长	64	41	23			2	62		
浅层生长	36	12	24			20	16		
囊肿情况				12.951	0.001			10.823	0.001
<3 cm	45	14	31			21	24		
≥ 3 cm	55	37	18			9	46		
痛经				19.252	0.001			25.073	0.001
有	76	56	20			13	63		
无	24	5	19			17	7		

表4 p27和Cyclin-E在EMS中相关性分析

Table 4 Correlation analysis of p27 and Cyclin-E in EMS

p27	Cyclin-E/例		r	P
	阳性	阴性		
阳性	55	6	-0.627	0.001
阴性	28	11		

3 讨论

EMS易发生于女性生殖年龄期, 是一种以子宫内膜腺体和基质出现在子宫腔外为特征性疾病^[8-9]。迄今为止EMS的确切病因尚不清楚, 尽管已经提出了许多关于其病理生理学的理论, 但目前尚无统一的定论, 且EMS临床表现呈多样性, 缺乏特定的体征或症状, 因此难以做出诊断^[10-11]。近几年, 有研究^[12-13]指出细胞周期调控抑制因子和细胞周期蛋白与EMS存在相关性。对此, 本研究探讨了p27和Cyclin-E在EMS中的表达及临床意义。

本研究结果显示观察组Cyclin-E阳性率显著高于对照组, 表明Cyclin-E的高表达与异位子宫内膜增殖有关。细胞周期由细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)控制, CDK与特定细胞周期蛋白形成复合物, 周期性激活并将其激酶活性导向具有时间和空间选择性的特定底物。不同的细胞周期蛋白促进不同的细胞周期事件^[11]。细胞周期蛋白家族成员之一的Cyclin-E与CDK2形成复合物, 在G₁/S过渡期发挥作用。Cyclin-E-CDK2活性在静止细胞中最低, 在G₁-S细胞中最高。这种周期性是由许多因素引起的, 包括对Cyclin-E的转录和蛋白质水解控制、通过抑制和激活磷酸化来调节CDK2活性, 以及与Cip/Kip CDK抑制剂的结合等^[14-15]。这些多层控制确保了细胞周期进程中Cyclin-E/CDK2的活性得到微调。相比之下, Cyclin-E在肿瘤细胞中经常失调, 这可能导致各种类型癌症的发展, 包括肾上腺皮质肿瘤和癌(乳腺癌、肺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌和胃肠道癌)、淋巴瘤、白血病和肉瘤。此外, Cyclin-E的过度表达会导致非整倍性、基因组不稳定, 或通过减少G₁/S的过渡来驱动细胞周期进程, 从而加速细胞增殖和肿瘤发生。

p27是一种肿瘤抑制因子, 通过使蛋白质水解、降解和从细胞核中排除等欺骗性机制来促进细胞增殖。本研究结果表明观察组p27阳性率显著低于对照组, 提示p27水平的降低在EMS发生发

展中起重要作用。有研究^[16-17]表明: p27表达阴性的患者死亡风险增加, p27表达的低水平使卵巢细胞更具生长性, 提示EMS患者不良预后。

本研究结果表明: p27和Cyclin-E表达与生长程度、囊肿大小与痛经有关, 且p27和Cyclin-E在EMS中表达呈负相关, 提示p27和Cyclin-E在EMS中的表达和临床特征存在相关性。p27是一种内在无序蛋白(intrinsically disordered protein, IDP), 可抑制CDK细胞周期蛋白复合物(例如CDK2/Cyclin-E), 导致细胞周期停滞。当CDK2/Cyclin-E结合的p27在一个或两个结构封闭的酪氨酸残基和一个远端苏氨酸残基(T187)上被磷酸化时, 细胞分裂会进行, 从而引发p27的降解^[18]。这些影响细胞周期进程的细胞因子必须处于相对稳定的动态平衡, 一旦这种平衡被打破, 极易引发细胞增殖异常。

综上所述, p27和Cyclin-E与EMS发生发展联系密切, 它们与EMS之间的关联与其和相关肿瘤发生发展类似, 因此, 若EMS患者p27和Cyclin-E表达异常, 则病情存在恶化的风险, 应引起足够重视。然而本研究病例数量有限, 在后续的工作中, 将采用多中心大样本的研究, 进一步深入探究p27和Cyclin-E与EMS相互作用的机制。

参考文献

1. Symons LK, Miller JE, Kay VR, et al. The Immunopathophysiology of Endometriosis[J]. Trends Mol Med, 2018, 24(9): 748-762.
2. 李梅, 高丹, 封婷, 等. 2例特殊类型子宫内膜异位症相关性病变引发的思考[J]. 诊断病理学杂志, 2020, 27(5): 295-299.
LI Mei, GAO Dan, FENG Ting, et al. Lesions learned from two cases of endometriosis associated neoplasms[J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2020, 27(5): 295-299.
3. 封又荣, 魏嘉, 付方方, 等. 子宫内膜异位症及其临床治疗策略对育龄期女性卵巢功能的影响[J]. 中国妇产科临床杂志, 2019, 20(5): 471-473.

- FENG Yourong, WEI Jia, FU Fangfang, et al. Effects of endometriosis and its clinical treatment strategies on ovarian function of women of childbearing age[J]. Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology, 2019, 20(5): 471-473.
4. 黄艳, 彭超, 宋晗, 等. 腹直肌内子宫内异位症腹腔镜切除二例[J]. 中华妇产科杂志, 2020, 55(10): 720-723.
HUANG Yan, PENG Chao, SONG Han, et al. Two cases of laparoscopic resection of endometriosis in rectus abdominis[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2020, 55(10): 720-723.
 5. 陈思凯, 谷智越, 戴毅, 等. 子宫内异位症患者阴道菌群特征性研究与功能预测[J]. 现代妇产科进展, 2020, 29(4): 281-285.
CHEN Sikai, GU Zhiyue, DAI Yi, et al. The study of vaginal microbiota in endometriosis patients and functional prediction[J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2020, 29(4): 281-285.
 6. 杨媛, 马晓玲, 石馨, 等. DUSP1/p38/MAPK通路在子宫内异位症中的表达及意义[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(7): 1654-1656.
YANG Yuan, MA Xiaoling, SHI Xin, et al. Expression and significance of DUSP1/p38/MAPK pathway in endometriosis[J]. Maternal & Child Health Care of China, 2019, 34(7): 1654-1656.
 7. Chapron C, Marcellin L, Borghese B, et al. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(11): 666-682.
 8. Laganà AS, Garzon S, Götte M, et al. The pathogenesis of endometriosis: molecular and cell biology insights[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5615.
 9. 冷金花, 戴毅, 李晓燕. 子宫内异位症诊治新理念[J]. 中华妇产科杂志, 2021, 56(12): 831-835.
LENG Jinhua, DAI Yi, LI Xiaoyan. New concept of diagnosis and treatment of endometriosis[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2021, 56(12): 831-835.
 10. Agarwal SK, Chapron C, Giudice LC, et al. Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action[J]. Am J Obstet Gynecol, 2019, 220(4): 354.e1-354.e12.
 11. 蒋梦雨, 李留霞, 朱迎. 腹壁子宫内异位症231例临床特点及诊治预后分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(4): 361-364.
JIANG Mengyu, LI Liuxia, ZHU Ying. Clinical features, diagnosis, treatment and prognosis of 231 cases of abdominal wall endometriosis[J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2020, 36(4): 361-364.
 12. 王荣国, 宋晓飞, 陈红耀. 黏蛋白1、细胞周期调节蛋白p16和高迁移率族蛋白B1在原发性喉癌临床诊断效能分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2020, 27(2): 108-110.
WANG Rongguo, SONG Xiaofei, CHEN Hongyao. Clinical diagnostic efficacy of mucin 1, cell cycle regulator p16 and high mobility group B1 in primary laryngeal carcinoma[J]. Chinese Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2020, 27(2): 108-110.
 13. 严必红, 曾为红. Bcl2相互作用蛋白3在子宫内异位组织中的表达及其在子宫内异位症发病中的意义[J]. 安徽医药, 2020, 24(1): 136-140.
YAN Bihong, ZENG Weihong. The significance of BNIP3 in the pathogenesis of endometriosis analyzing through the methods of molecular biology and bioinformatics[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2020, 24(1): 136-140.
 14. 陈思凯, 郑萍, 冷金花. 子宫内异位症相关疼痛的免疫学研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2019, 35(11): 828-831.
CHEN Sikai, ZHENG Ping, LENG Jinhua. Immunological research progress on endometriosis-related pain[J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2019, 35(11): 828-831.
 15. Abbastabar M, Kheyrollah M, Azizian K, et al. Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: a double-edged sword protein[J]. DNA Repair (Amst), 2018, 69: 63-72.
 16. Filipits M, Dafni U, Gnani M, et al. Association of p27 and cyclin D1 expression and benefit from adjuvant trastuzumab treatment in HER2-positive early breast cancer: a TransHERA study[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(13): 3079-3086.
 17. Patel P, Tshiperson V, Gottesman SRS, et al. Dual inhibition of CDK4 and CDK2 via targeting p27 tyrosine phosphorylation induces a potent and durable response in breast cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(3): 361-377.
 18. García-Gutiérrez L, Bretones G, Molina E, et al. Myc stimulates cell cycle progression through the activation of Cdk1 and phosphorylation of p27[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18693.

本文引用: 陈志刚, 符梅, 牡丹, 黄玺玥. p27、Cyclin-E在子宫内异位症中的表达及其临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(12): 2971-2976. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.12.017

Cite this article as: CHEN Zhigang, FU Mei, DU Dan, HUANG Xiyue. Expression and clinical significance of p27 and Cyclin-E in endometriosis[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2022, 42(12): 2971-2976. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.12.017