

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00455

细胞周期相关蛋白 cyclin D1、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 在食管鳞癌中的表达改变及其病理学意义

林德晨¹, 史志周¹, 薛丽燕², 陈微¹, 徐昕¹, 韩亚玲¹, 吕宁², 王明荣¹

1. 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院 肿瘤研究所 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021;

2. 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科, 北京 100021

摘要: 食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是我国常见的恶性肿瘤之一, 虽然临床诊治手段正逐步改进, 但中晚期患者 5 年生存率仍然很低。目前认为细胞周期调控异常与肿瘤发生发展关系密切, 然而相关周期调节蛋白在食管癌患者中的表达改变、临床意义及其应用价值还没有明确结论。文章应用组织微阵列联合免疫组织化学技术(TMA-IHC), 对 148 例食管鳞癌组织标本中细胞 G₁/S 期调控蛋白 cyclin D1、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 的表达进行检测, 分析其与临床病理参数之间的相关性。结果显示, cyclin D1 与 p53 蛋白在食管癌细胞中表达升高, p53 表达阳性率与区域淋巴结转移显著相关($P = 0.001$)。p21^{WAF1/Cip1} 蛋白在肿瘤组织中表达降低, 且 p21^{WAF1/Cip1} 表达阴性患者的术后生存时间显著短于表达阳性的患者($P = 0.001$)。多因素生存分析显示 p21^{WAF1/Cip1} 是一个独立的预后因素(相对危险度为 0.418, $P < 0.001$)。微阵列比较基因组杂交(array-CGH)检测进一步表明 45.4% 的食管癌患者存在 cyclin D1 基因扩增。以上结果提示食管鳞癌中存在细胞周期 G₁/S 期调控异常, p21^{WAF1/Cip1} 蛋白可能是一个有应用价值的预后因子。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 细胞周期; 免疫组化; 组织微阵列; 预后判断

Expression of cell cycle related proteins cyclin D1, p53 and p21^{WAF1/Cip1} in esophageal squamous cell carcinoma

LIN De-Chen¹, SHI Zhi-Zhou¹, XUE Li-Yan², CHEN Wei¹, XU Xin¹, HAN Ya-Ling¹, LV Ning², WANG Ming-Rong¹

1. State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute (Hospital), Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;

2. Department of Pathology, Cancer Institute (Hospital), Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

Abstract: Dysregulation of cell cycle control, especially G₁/S phase transition, is implicated in the pathogenesis of most human cancers, including esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). However, the clinicopathological significance of aberrant expression of G₁/S phase-related proteins in ESCC remains unclear. In the present study, cyclin D1, p21^{WAF1/Cip1} and p53 protein expression were examined in 148 ESCC cases using immunohistochemistry combined with tissue microarray. We then analyzed the correlations between their expression and clinicopathological parameters and found that overexpression of p53 was associated with lymph node metastasis ($P = 0.001$). p21^{WAF1/Cip1} down-regulation was an independent

收稿日期: 2010-01-15; 修回日期: 2010-03-14

基金项目: 国家科技支撑计划(编号: 2006BAI02A14)和 863 计划重大专项(编号: 2006AA02A403)资助

作者简介: 林德晨(1983-), 男, 博士研究生, 专业方向: 细胞生物学。E-mail: fulva2004@163.com

通讯作者: 王明荣(1956-), 男, 研究员, 研究方向: 肿瘤细胞生物学。E-mail: wangmr04@126.com

prognostic factor by multivariate analysis ($RR = 0.418$, $P < 0.001$). Further more, array-CGH results revealed that *cyclin D1* gene was amplified in 45.4% of ESCC patients. This study confirms that dysregulation of G₁/S related genes is common in ESCC and reduced expression of p21^{WAF1/Cip1} protein can predict shorter overall survival time of patients with ESCC.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; cell cycle regulation; immunohistochemistry; tissue microarray; prognosis

食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的死亡率位居我国恶性肿瘤死因的第四位, 虽然目前手术及放疗技术已较为成熟, 但中晚期 ESCC 患者的 5 年生存率仍不足 20%。食管鳞癌是一种侵袭性很强的恶性肿瘤, 早期即可侵入邻近组织, 并具有高频率的远处转移, 特别是淋巴结转移和肺转移。寻找可预测食管癌患者转移和预后的分子标志物, 将有助于提高临床诊断和个体化治疗水平。

恶性肿瘤是一类渐进性细胞周期异常的疾病, 绝大多数癌细胞中均存在细胞周期调控机制的破坏, 从而导致细胞生长失控以及分化受阻。目前研究提示细胞周期特别是 G₁/S 期相关调控通路在肿瘤发生发展中可能存在异常改变。如细胞周期素 cyclin D 和 cyclin E 在乳腺癌、淋巴瘤、原发性肝癌等多种肿瘤中过表达, 进而激活周期蛋白依赖性激酶(Cyclin-dependent kinase, CDK), 一定程度上降低细胞增殖对有丝分裂原的依赖, 加快 G₁/S 期进展^[1-3]。而细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(Cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)家族成员如 *p15^{INK4}*、*p16^{INK4}*、*p21^{WAF1/Cip1}* 及抑癌基因 *p53* 等在肿瘤细胞中常因突变、缺失或表观遗传改变而失活^[4-6], 无法抑制 CDKs 的活性, 造成细胞周期调节失控和细胞异常增殖。虽然这些重要 G₁/S 期调控蛋白在肿瘤发生发展中的作用机制均已明确, 但其在我国食管癌患者中的表达改变情况及临床病理意义还没有统一或确切的结论, 其潜在的临床应用价值有待进一步研究。

本文采用组织微阵列联合免疫组织化学技术, 对 148 例食管鳞癌组织标本中 G₁/S 期调控基因 cyclin D1、p53 以及 p21^{WAF1/Cip1} 的蛋白表达进行检测, 并分析其与临床病理参数以及患者预后之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 标本收集

148 例食管癌组织和对应手术切端病理学正常

组织标本取自 1999~2004 年中国医学科学院肿瘤医院胸外科手术病例, 所有病例均由病理科医师诊断为食管鳞状细胞癌。其中男性 108 例, 女性 40 例; 年龄 40~82 岁, 中位年龄 60 岁。肿瘤分期主要为 T2 期(27 例)和 T3 期(121 例); 淋巴结转移阳性和阴性病例为 76 例和 72 例; 肿瘤高中低分化病例数分别为 28、76、44。

本组病例中具有完整随访资料者为 90 例, 平均随访时间 46.8 月(4~73 月), 死亡 33 例。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片制备

组织首先进行常规石蜡包埋并切片, 显微镜阅片, 选取相应的石蜡块并采点标记。每例病例手术切端病理学正常组织取 3 个组织芯, 对应肿瘤组织取 5 个组织芯, 通过两次包埋完成组织芯片制作。

1.2.2 免疫组化试剂及实验步骤

石蜡切片经常规脱蜡和水化后, 滴加 3%过氧化氢溶液消除内源性过氧化物酶活性。经枸橼酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH6.0)抗原修复后滴加一抗(兔抗人 cyclin D1 单克隆抗体、鼠抗人 p21^{WAF1/Cip1} 单克隆抗体、鼠抗人 p53 单克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司), 37℃ 孵育 2 h。冲洗后依次滴加试剂 1 和试剂 2(PV9000 免疫组化试剂盒, 中杉金桥生物技术公司), DAB 显色(DAB 染色试剂盒, 中杉金桥生物技术公司), 苏木素复染, 梯度脱水, 透明后封片镜检。

1.2.3 免疫组化结果判断

以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性信号, 计数每例病例肿瘤组织 5 个组织区域中的所有肿瘤细胞, 当大于 10%的细胞核着色判断该病例为表达阳性^[7-9]。

1.2.4 Array-CGH 分析

运用 Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit (含 Human Genome CGH 4*44K 芯片) (Agilent, 美国)

进行 array-CGH 分析。Qiagen® DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 德国)提取食管癌组织基因组 DNA, 通过酶切使其片段化。以 BioPrime Array CGH Genomic Labeling Module 通过随机引物法对样本进行标记, 用 Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 分别标记食管癌组织和对照标本。纯化标记产物并检测标记效率, 将标记产物和 50 μ L Cot-1 DNA 混合、变性和预退火后, 放入杂交炉, 65 $^{\circ}$ C、20 r/min, 杂交 24 h。冲洗 2 次后, 用 Feature Extraction 10.5 从芯片扫描图片中提取各探针的信号值。采用 CGH Analytics 4.0(Agilent)软件进行数据分析。

1.2.5 统计学分析

使用统计分析软件 SPSS 15.0 进行数据统计, 采用双侧 χ^2 检验判断蛋白表达改变与临床病理参数的相关性, 采用 Kaplan-Meier 方法分析与患者术后生存率之间的关系, Cox 回归模型多因素分析检测不同因素(蛋白表达水平、年龄、pT、淋巴结转移状

况和病理分级程度)对患者生存时间的影响。 $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Cyclin D1、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 在食管手术切端及肿瘤组织中的表达情况

在手术切端病理学正常组织中, p53 蛋白表达阴性, 而 cyclin D1 及 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白在副基底层细胞核中表达。在食管癌组织中, p53 及 cyclin D1 蛋白在核中的表达比率与手术切端组织相比显著提高, 其阳性率分别为 54.0%(74/137)和 77.6%(111/143)。p21^{WAF1/Cip1} 在肿瘤细胞核中的表达比率低于手术切端组织, 其总体阳性率为 45.0%(45/100)(图 1)。

2.2 Cyclin D1、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 的表达与病理参数的关系

我们进一步分析了 Cyclin D1、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 的表达与肿瘤分期、区域淋巴结转移和肿瘤病理分级

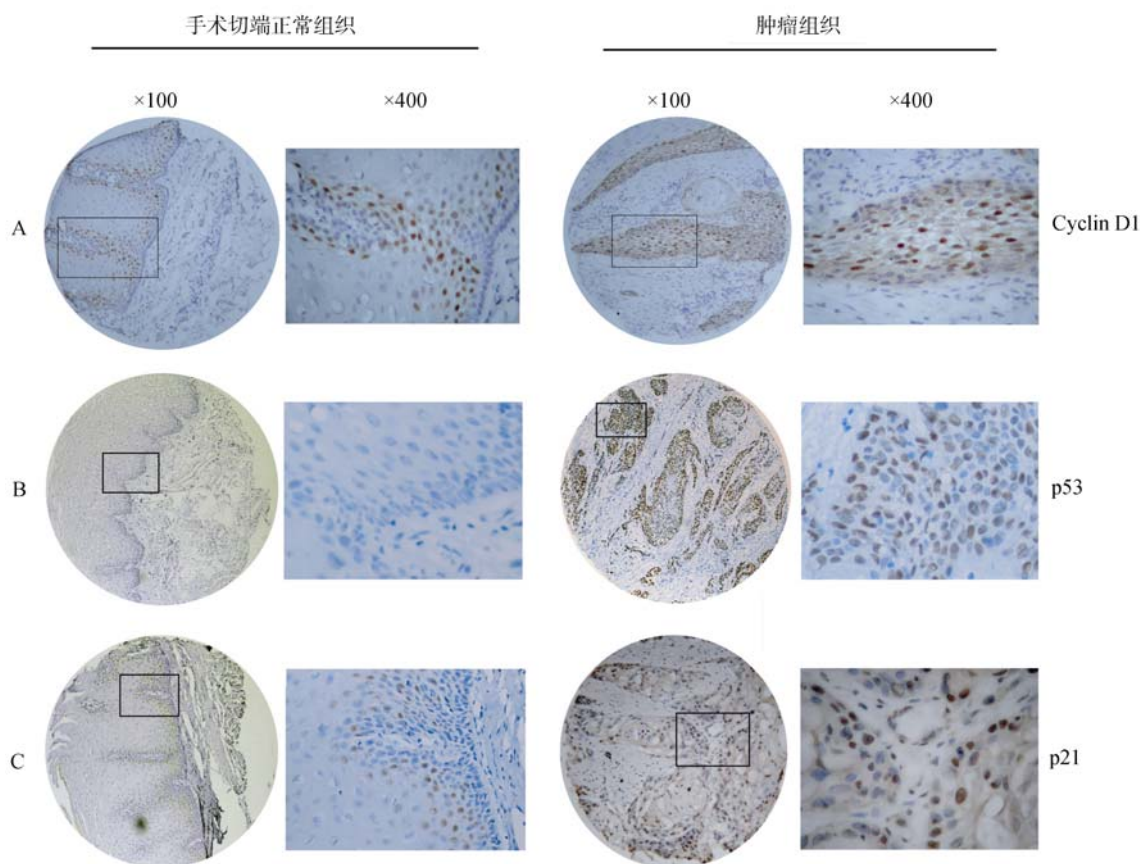


图 1 Cyclin D1、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 在手术切端正常组织和食管癌组织中的表达情况

A、B 和 C 分别为 cyclin D1、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 在同一例患者的手术切端正常组织和食管癌组织的免疫组化代表性照片。其中“ $\times 400$ ”为“ $\times 100$ ”黑色方框内的放大照片。

之间的相关性。其中,食管癌组织中 p53 蛋白阳性者发生淋巴结转移的比例显著高于阴性者($P=0.016$)。而 cyclin D1 和 p21^{WAF1/Cip1} 的蛋白表达阳性与阴性患者的比例与以上临床病理参数没有显著相关性。

2.3 p21^{WAF1/Cip1} 的表达与患者术后生存时间的关系

p21^{WAF1/Cip1} 表达阴性病例的中位生存期为 24 个月,而其表达阳性病例为 48 个月。Kaplan-Meier 分析表明,该蛋白的表达与食管癌患者术后生存时间显著相关(图 2),而 cyclin D1 和 p53 的蛋白表达与食管癌患者预后无相关性。多因素分析结果显示, p21^{WAF1/Cip1} 蛋白表达是一个独立的预后因子(表 2)。

根据 p21^{WAF1/Cip1} 表达水平将食管鳞癌患者分成 p21^{WAF1/Cip1} 表达阴性和 p21^{WAF1/Cip1} 表达阳性两组。p21^{WAF1/Cip1} 表达阴性患者的术后生存时间显著短于 p21^{WAF1/Cip1} 表达阳性患者($P=0.001$)。

2.4 cyclin D1 基因在食管肿瘤组织中的扩增

本课题组前期通过比较基因组杂交技术发现食管癌组织染色体 11q13 存在较高频率的扩增^[10],由于 cyclin D1 基因位于染色体 11q13,我们推测其蛋白过表达可能与其基因扩增有关。对 44 例食管癌组织进行 array-CGH 分析后发现,包含 cyclin D1 基因的探针在 20 例食管癌患者中存在扩增(45.4%) (图 3)。

表 1 食管癌组织中 cyclin D1、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 的蛋白表达情况及其与临床病理参数的关系

| 病理学特征 | 阳性病例数(百分比) | | |
|-------|------------|--------------|--------------------------|
| | cyclin D1 | p53 | p21 ^{WAF1/Cip1} |
| 肿瘤分期 | | | |
| T1/T2 | 21(84.0%) | 12(48.0%) | 8(42.1%) |
| T3/T4 | 89(77.3%) | 61(55.9%) | 36(46.1%) |
| P 值 | 0.465 | 0.471 | 0.751 |
| 淋巴结转移 | | | |
| 无 | 53(76.8%) | 29(43.9%) | 21(43.8%) |
| 有 | 57(80.2%) | 44(64.7%) | 23(46.9%) |
| P 值 | 0.617 | 0.016 | 0.752 |
| 病理分级 | | | |
| 高分化 | 42(84.0%) | 26(56.5%) | 15(44.1%) |
| 中分化 | 50(73.5%) | 35(52.2%) | 22(45.8%) |
| 低分化 | 16(76.2%) | 12(60.0%) | 7(46.6%) |
| P 值 | 0.395 | 0.798 | 0.982 |

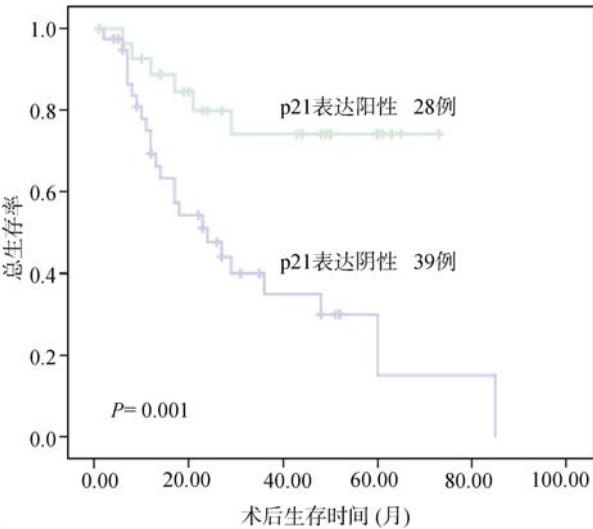


图 2 p21^{WAF1/Cip1} 存活曲线

3 讨论

我国是全世界食管癌发病和死亡人数最高的国家,占全球食管癌发病和死亡人数的 53.86%和 49.26%^[11]。目前食管癌患者的预后评价主要依赖传统的 TNM 系统,但即使同一临床分期、同一病理类型、采用同一治疗方案进行治疗的患者,其转归也往往存在很大差异。因此,探索一些与 ESCC 相关的分子改变,寻找敏感性、特异性较高的预后指标,提供个体化的预后信息,将对提高临床诊断水平和改善患者预后产生重要影响。

cyclin D1 是与许多肿瘤的发生关系极为密切的原癌基因,其表达升高可激活 CDK4 和 CDK6 并缩短 G₁ 期,造成细胞周期调节失控和细胞异常增殖。在甲状腺肿瘤^[12]和乳腺癌^[13]等多种肿瘤中均发现存

表2 Cox回归模型多因素分析不同危险因素对67例食管癌患者预后的影响

| 危险因素 | 相对危险度 | 95% 置信区间 | P 值 |
|-------------------------------|-------|--------------|--------------|
| 年龄 | 0.875 | 0.374~2.051 | 0.759 |
| 肿瘤分期 | 1.256 | 0.416~3.792 | 0.686 |
| 区域淋巴结转移 | 4.893 | 2.069~11.573 | 0.001 |
| 病理分级 | 1.150 | 0.650~2.032 | 0.631 |
| 临床分期 | 1.542 | 0.145~16.452 | 0.720 |
| p21 ^{WAF1/Cip1} 蛋白表达 | 0.417 | 0.256~0.677 | 0.000 |

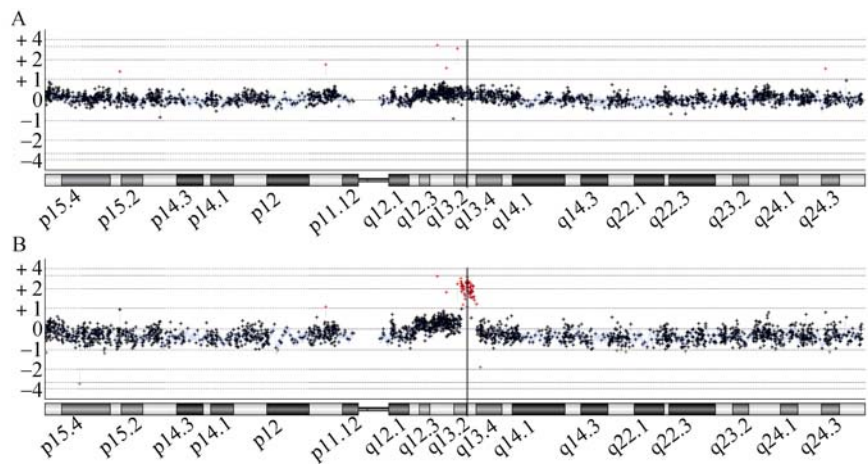


图3 11号染色体 array-CGH 示意图

A: *cyclin D1* 基因未发生扩增的病例; B: *cyclin D1* 基因发生扩增的病例(Log₂ ratio>1.0)。图中竖线指示 *cyclin D1* 基因所在位置。

在高频率的 *cyclin D1* 基因扩增和蛋白的过表达。本研究中 *cyclin D1* 蛋白过表达率为 77.6%而其基因扩增率为 45.4%，提示基因扩增可能是导致其蛋白表达升高的重要原因。有研究认为 *cyclin D1* 蛋白过表达与食管癌患者预后不良相关^[9, 14, 15]。本实验证实了 *cyclin D1* 在食管癌组织中表达升高，但并未发现其与患者预后之间存在相关性($P=0.213$)。

已有许多研究报道了 p53 蛋白在恶性肿瘤中的表达改变情况。p53 点突变在很多肿瘤中均有发现，突变 p53 蛋白的一个重要特点是半衰期比野生型 p53 蛋白长，故可用免疫组化方法在石蜡切片中检测到。本文发现所有手术切端病理学正常组织中 p53 蛋白染色阴性，而半数以上的食管癌患者癌细胞中 p53 异常累积，提示可能存在 p53 蛋白突变，并且 p53 异常累积与局部淋巴结转移风险增高相关。在其他恶性肿瘤如结直肠癌^[16]和口腔鳞癌^[17, 18]中也有报道 p53 的表达升高或突变与区域淋巴结转移有关，并且动物模型实验结果也支持这一现象^[19]。

p21^{WAF1/Cip1} 是最先发现的 CKI 基因，其作用主要是调控 CDKs 的活性，并参与由 p53 介导的细胞

DNA 损伤反应。当细胞损伤时，p53 启动 p21^{WAF1/Cip1} 的表达，使其抑制 *cyclinE-CDK2* 活性，导致 RB 磷酸化水平降低，细胞停滞于 G₁ 期。p21^{WAF1/Cip1} 蛋白在多数人类肿瘤中表达降低，但其具体机制却研究不多。有报道认为 p21^{WAF1/Cip1} 基因启动子区甲基化或染色质中组蛋白去乙酰化异常可能是导致该基因转录受抑制的重要原因^[20, 21]。在 Matsumoto 等^[22]的研究中，p21^{WAF1/Cip1} 与食管癌患者术后生存时间无关。但 Natsugoe 等^[8]检测了 111 例食管癌患者中的 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白表达情况后发现，其在 p53 阴性病例中的阳性表达与预后良好相关，提示其发挥功能是 p53 蛋白依赖性的。本文对有完整随访资料的 67 例食管癌患者进行 Cox 回归模型分析后提示，在食管癌中表达降低的 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白为独立的预后保护因素，其高表达与长生存期正相关。

本研究发现 *cyclin D1*、p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 3 个重要细胞周期调控蛋白在食管癌细胞中存在较高频率的表达异常，提示食管癌中 G₁/S 期调控紊乱，这可能是导致肿瘤细胞恶性增殖的重要原因之一。同时本文结果还提示 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白可能是一个有应用

价值的预后因子, 上调其表达可抑制肿瘤组织 CDKs 的活性, 从而阻止肿瘤细胞的异常增殖。

参考文献(References):

- [1] Roncalli M, Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Bossi P, Graziani D, Peracchia A, Bonavina L, Viale G, Coggi G. Cell cycle-related gene abnormalities and product expression in esophageal carcinoma. *Lab Invest*, 1998, 78(9): 1049–1057.
- [2] Shao L, Hittelman WN, Lin J, Yang H, Ajani JA, Wu X. Deficiency of cell cycle checkpoints and DNA repair system predispose individuals to esophageal cancer. *Mutat Res*, 2006, 602(1–2): 143–150.
- [3] Shinohara M, Aoki T, Sato S, Takagi Y, Osaka Y, Koyanagi Y, Hatooka S, Shinoda M. Cell cycle-regulated factors in esophageal cancer. *Dis Esophagus*, 2002, 15(2): 149–154.
- [4] Paulson TG, Galipeau PC, Xu L, Kissel HD, Li X, Blount PL, Sanchez CA, Odze RD, Reid BJ. p16 mutation spectrum in the premalignant condition Barrett's esophagus. *PloS One*, 2008, 3(11): e3809.
- [5] Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21(WAF1) regulation. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 400–405.
- [6] Amanullah A, Hoffman B, Liebermann DA. Deregulated E2F-1 blocks terminal differentiation and loss of leukemogenicity of M1 myeloblastic leukemia cells without abrogating induction of p15(INK4B) and p16(INK4A). *Blood*, 2000, 96(2): 475–482.
- [7] Zhang G, Zhou X, Xue L, Quan L, Wang Y, Zhou C, Lu N, Wang Q, Zhu H, Xu N. Accumulation of cytoplasmic beta-catenin correlates with reduced expression of E-cadherin, but not with phosphorylated Akt in esophageal squamous cell carcinoma: immunohistochemical study. *Pathol Int*, 2005, 55(6): 310–317.
- [8] Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Xiangming C, Okumura H, Kijima F, Ishigami S, Takebayashi Y, Baba M, Takao S, Aikou T. Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(9): 2445–2449.
- [9] Mega S, Miyamoto M, Ebihara Y, Takahashi R, Hase R, Li L, Shichinohe T, Kawarada Y, Uehara H, Kaneko H, Hashimoto H, Murakami Y, Itoh T, Morikawa T, Kondo S. Cyclin D1, E2F1 expression levels are associated with characteristics and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*, 2005, 18(2): 109–113.
- [10] Wei F, Ni J, Wu SS, Liu H, Xu X, Han YL, Cai Y, Zhang JW, Chen XJ, Pang H, Lu N, Ji L, Wu M, Wang MR. Cytogenetic studies of esophageal squamous cell carcinomas in the northern Chinese population by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002, 138(1): 38–43.
- [11] He YT, Hou J, Qiao CY, Chen ZF, Song GH, Li SS, Meng FS, Jin HX, Chen C. An analysis of esophageal cancer incidence in Cixian county from 1974 to 1996. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(2): 209–213.
- [12] Pesutic-Pisac V, Punda A, Gluncic I, Bedekovic V, Pranik-Kragic A, Kunac N. Cyclin D1 and p27 expression as prognostic factor in papillary carcinoma of thyroid: association with clinicopathological parameters. *Croat Med J*, 2008, 49(5): 643–649.
- [13] Aaltonen K, Amini RM, Landberg G, Eerola H, Aittomaki K, Heikkila P, Nevanlinna H, Blomqvist C. Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 113(1): 75–82.
- [14] Ikeguchi M, Sakatani T, Ueta T, Kaibara N. Cyclin D1 expression and retinoblastoma gene protein (pRB) expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127(9): 531–536.
- [15] Nakamura T, Ide H, Eguchi R, Hayashi K, Takasaki K. Concomitant analysis of p16/INK4, cyclin D1, and retinoblastoma protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50(53): 1321–1326.
- [16] Jang KT, Chae SW, Sohn JH, Park HR, Shin HS. Coexpression of MUC1 with p53 or MUC2 correlates with lymph node metastasis in colorectal carcinomas. *J Korean Med Sci*, 2002, 17(1): 29–33.
- [17] Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Prognostic significance of p53 and p63 immunolocalisation in primary and matched lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Acta Histochem*, 2007, 109(5): 388–396.
- [18] Hoekstra JW, Kummer JA, van Es RJ. Late (> 5 years) regional lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma (SCC), proven by p53 mutation analysis. *J Craniofac Surg*, 2008, 36(7): 415–418.
- [19] Ruddell A, Kelly-Spratt KS, Furuya M, Parghi SS, Kemp CJ. p19/Arf and p53 suppress sentinel lymph node lymphangiogenesis and carcinoma metastasis. *Oncogene*, 2008, 27(22): 3145–3155.
- [20] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(6): 400–414.
- [21] Shin JY, Kim HS, Park J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Res*, 2000, 60(2): 262–265.
- [22] Matsumoto M, Natsugoe S, Nakashima S, Okumura H, Sakita H, Baba M, Takao S, Aikou T. Clinical significance and prognostic value of apoptosis related proteins in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2001, 8(7): 598–604.