

非小细胞肺癌组织中 *FHIT* 和 *p16* 基因表达的研究

Expression of *FHIT* and *p16* in Non-small Cell Lung Cancers

王 萍¹/张 庆²/王祖义² /

承泽农¹/于东红¹/武士伍¹

(1. 蚌埠医学院病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 2. 蚌埠医学院附属医院中心实验室, 安徽 蚌埠 233004)

WANG Ping¹, ZHANG Qing², WANG Zu-yi²,

CHENG Ze-nong¹, YU Dong-hong¹, WU Shi-wu¹

(1. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, Anhui; 2. Central Laboratory, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 230004, Anhui, China)

【摘要】背景与目的: 探讨 *FHIT* 和 *p16* 基因在非小细胞肺癌(NSCLCs)中的表达及其与临床病理因素的关系。材料与方法: 采用免疫组化 SP 法检测 80 例 NSCLCs 组织中 *FHIT* 和 *p16* 的表达。结果: 在 80 例 NSCLCs 组织中, 54 例(67.5%)显示 *FHIT* 表达下降或缺失; 63 例(78.75%) *p16* 蛋白表达下降。*FHIT* 蛋白的表达异常与性别和组织学类型相关, 而 *p16* 蛋白表达下降与肿瘤的淋巴结转移之间有相关性。结论: *FHIT* 和 *p16* 蛋白异常表达分别与 NSCLCs 的性别、组织学类型及淋巴结转移相关, 提示可能对肺癌的演变和进展具有重要作用。

【关键词】肺肿瘤; *FHIT*; *p16*

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)03-0242-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To investigate the expression of fragile histidine triad (*FHIT*) and *p16* in non-small cell lung cancers (NSCLCs) and their relationships with clinicopathological factors. MATERIALS AND METHODS: Eighty cases of NSCLCs were examined for expression of *FHIT* and *p16* by immunohistochemical SP method. RESULTS: 54(67.5%) and 63(78.75%) of 80 patients revealed loss of or markedly reduced protein expression of *FHIT* and *p16*, respectively. Aberrant expression of *FHIT* was noted in most squamous (25 out of 55) and in a small fraction of adenocarcinomas (3 out of 23; $P < 0.01$), and more frequently in male patients than female patients. Notably, loss of *p16* expression was associated with lymph node metastasis. CONCLUSION: Our results suggested that abnormal expressions of *FHIT* and *p16* gene might occur early and play important roles in lung tumorigenesis and correlate with its prognosis. However, further studies are needed to confirm the influence of *FHIT* and *p16* in the biologic behavior of the tumor.

【KEY WORDS】lung cancer; *FHIT*; *p16*

肿瘤的发生是涉及原癌基因的激活和抑癌基因的失活的多步骤的结果。自 1996 年 Ohta 等^[1]于染色体 3p14.2 上克隆出脆性组氨酸三联体 (fragile histidine triad, *FHIT*) 基因以来, 有学者发现 *FHIT* 基因在肺癌组织或细胞株中存在缺失、异常转录或甲基化等现象^[2-5], 被认为是一个重要的肿瘤抑癌基因。*p16* 基因是细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)的抑制因子, 参与对细胞周期的调控, 其异常与多种肿瘤的形成和发生关系

密切。我们应用免疫组化 SP 法, 对 80 例非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancers, NSCLCs) 组织中 *FHIT* 和 *p16* 的表达进行研究, 探讨它们在肺癌发生发展中的意义及其与临床病理因素和预后的关系。

1 材料与方法

1.1 病例与材料 收集 2000~2001 年蚌埠医学院附属医院肺癌手术切除标本 80 例, 其中, 男 64 例, 女

收稿日期: 2006-10-16; 修订日期: 2006-12-19

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目(2002kj220)

作者简介: 王 萍(1966-)女, 江苏睢宁人, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤病理。Tel: 0552-3070209, E-mail: wangping8976@hotmail.com

16 例,平均年龄 56.5 岁(26~77 岁)。病例的基本情况
及肿瘤的部位、组织学类型、大小,大体类型、淋巴结转
移、临床分期等情况见表 1 内。F HIT 多克隆抗体为
Santacruz 公司产品,购自北京中山生物工程公司(使用
时 1:100 稀释)。单克隆抗体 p16(即用型)购自福州迈
新公司。SP 试剂盒为美国 MAXIM 公司产品。

1.2 方法 所有标本均经 10% 福尔马林固定,常
规石蜡包埋 4 μm 切片,HE 染色及免疫组化染色。采用
免疫组化 SP 法,微波抗原修复,PBS 代替一抗作为阴性
对照。非肿瘤性成分如支气管黏膜上皮及支气管腺体作
为 F HIT 阳性的内对照。结果由 2 位病理学专家分别观
察作出判断。

1.3 结果判断 F HIT 以细胞浆中出现棕黄色颗
粒为阳性。对 p16 表达结果的判定:以细胞浆和(或)细
胞核染色呈棕黄色颗粒为阳性,根据细胞染色的强度和
阳性细胞数的百分数按以下等级评分综合判断。按阳性
细胞数 0、>0~25%、>25%~50%、>50% 分别记为 0、
1、2、3 分;染色强度从未着色到强阳性分为 4 个等级,分
别记 0、1、2、3 分。二者之和 4~6 分记为 ++,2~3 分记
为 +, <2 分为 -, 分别代表蛋白表达的正常、减弱和缺
失。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 11.5 软件包对数

据进行统计分析。F HIT 和 p16 的表达与临床病理因素
之间的关系分别用 *chi-square* 检验。

2 结果

2.1 F HIT 蛋白在 NSCLCs 的表达 在 80 例肺癌
组织中,28 例(35%)肺癌组织 F HIT 蛋白表达缺失,26
例细胞浆的阳性反应程度减弱,蛋白表达降低。F HIT
蛋白表达状况(图 1)与病例基本情况和肿瘤病理学特
征的关系见表 1。

56 例鳞癌标本中 26 例(46.4%)显示 F HIT 蛋白表达
缺失,19 例表达下降(33.9%),蛋白表达的减少甚至完全
缺失率达 80.3%。但在 13 例腺癌中,只有 1 例表达完全
缺失,6 例表达明显下降。蛋白的丢失频率在鳞癌和腺癌
之间差异显著($P < 0.01$)。男性患者蛋白的丢失率比女性
患者的高,两者之间存在显著性差异($P < 0.01$)。然而蛋
白表达在病人年龄、肿瘤大小、肿瘤的大体类型、淋巴结
转移和临床分期之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 p16 蛋白在 NSCLCs 的表达 80 例肿瘤标
本中 47 例(58.75%)免疫组化显示 p16 蛋白表达阴性,
16 例表达下降,33 例肿瘤组织显示强弱不等(图 2)。p16
蛋白过度的表达在有淋巴结转移的两组病例中存在
显著性差异($P < 0.05$),见表 1。

表 1 F HIT 和 p16 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及与临床病理因素的关系

Table 1 Relationships between expression of F HIT and p16 and clinicopathological variables

Factors	n	p16			χ^2	P	F HIT			χ^2	P
		-	+	++			-	+	++		
Sex male	64	39	13	12	1.217	0.544	25	24	15	12.057	0.002
Female	16	8	3	5			3	2	11		
Age(years)											
< 40	8	5	1	2	4.590	0.332	1	3	4	3.698	0.448
≥ 40 ~ < 60	32	15	7	10			14	8	10		
≥ 60	40	27	8	5			13	15	12		
Tumor size											
≤ 3 cm	18	9	5	4	2.065	0.724	4	7	7	1.670	0.796
> 3 ~ 5 cm	23	16	3	4			9	7	7		
> 5 cm	39	22	8	9			15	12	12		
Gross type location											
diffuse	3	1	1	1	2.311	0.679	1	1	1	1.540	0.820
Central	53	33	11	9			19	19	15		
Peripheral	24	13	4	7			8	6	10		
Histologic type											
SCC	56	38	10	8	7.805	0.099	26	19	11	17.215	0.002
AC	20	7	5	8			1	6	13		
SAC	4	2	1	1			1	1	2		
T stage											
T ₁	14	6	4	4	7.279	0.122	3	4	7	2.814	0.589
T ₂	39	24	10	5			14	14	11		
T ₃	27	17	2	8			11	8	8		
N stage											
N ₀	44	25	5	14	14.478	0.006	18	14	12	2.715	0.607
N ₁	17	10	7	0			4	7	6		
N ₂	19	12	4	3			6	5	8		
Clinical stage											
I	27	15	4	8	2.482	0.648	9	10	8		
II	30	17	6	6			11	9	10		
III ~ IV	23	15	5	3			8	7	8		
Lymph node metastasis presence											
presence	36	22	11	3	8.48	0.012	10	12	14	1.812	0.404
Absence	44	25	5	14			18	14	12		

SCC: squamous cell carcinoma; AC: adenocarcinoma; SAC: squamous-adenocarcinoma



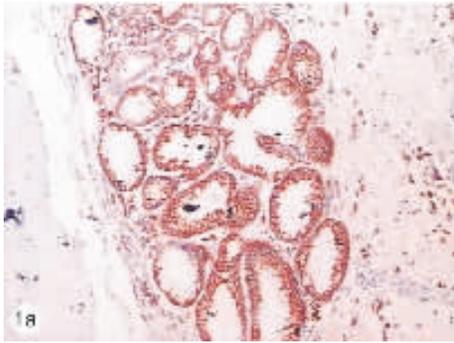


图 1a FHIT 蛋白在正常支气管粘膜腺体阳性表达 (×400)

Figure 1a Expression of FHIT in normal bronchial glands (×400)

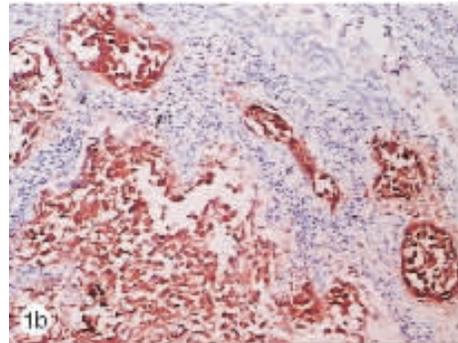


图 1b FHIT 基因在非小细胞肺癌中的阳性表达 (×400)

Figure 1b Expression of FHIT in NSCLC (×400)

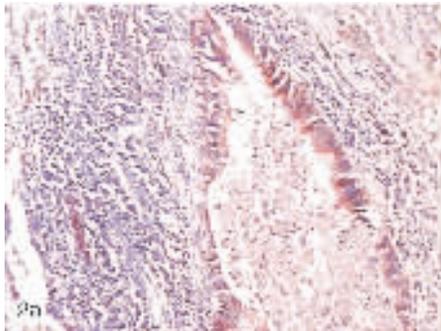


图 2a p16 蛋白在正常支气管粘膜阳性表达 (×400)

Figure 2a Expression of p16 in normal bronchial epithelium (×400)



图 2b p16 在非小细胞肺癌中的表达 (×400)

Figure 2b Expression of p16 in NSCLC (×400)

2.3 NSCLCs 中 FHIT 和 p16 蛋白表达的相互关系 80 例 NSCLCs 标本中, 71 例 (88.75%) 显示至少有 p16 或 FHIT 之一染色异常, 19 例 (23.75%) 两者同时完全丢失。两种基因蛋白异常表达之间无相关性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 非小细胞肺癌中 FHIT 和 p16 蛋白表达之间的关系

Table 2 Correlation of FHIT and p16 proteins expression

	FHIT (-)	FHIT (+)	FHIT (++)	Total
p16 (-)	19	17	11	47
p16 (+)	4	6	6	16
p16 (++)	3	3	9	17
Total	28	26	26	80

3 讨论

文献显示, 肿瘤细胞中特定基因的改变及基因表达的异常可以影响它的生物学行为。FHIT 基因的异常表现杂合性缺失 (LOH) 和异常转录本缺失, 但很少有点突变^[2-3,6]。关于 FHIT 蛋白的表达下降已经在一些常见肿瘤中有报道, 包括肺癌^[7-8]; 胃癌^[9]; 乳腺癌^[10]; 肝癌^[11]等。

在我们研究的 80 例 NSCLCs 中, 28 例未见 FHIT 蛋白的表达, 26 例表达下降, 此频率 (67.5%) 介于以前

报道的各种结果之间^[7, 12-14]。尽管一些研究发现 FHIT 的丢失率在鳞癌和腺癌中相近^[15], 但大多数的数据显示在腺癌组织中较少丢失^[7-8, 16]。我们的结果是肺鳞状细胞癌有较高 FHIT 蛋白丢失率的又一佐证。同时本组研究证实 FHIT 蛋白的丢失与男性患者关系密切, 其原因尚不十分清楚, 可能的解释是肺鳞状细胞癌在男性吸烟患者中占绝对高比例, 因此这些结果提示在肺癌形成过程中, FHIT 可能是烟草作用的分子靶, FHIT 基因含有人类基因组中最常见的脆性部位 -FRA3B, 因而易在烟草及环境中其他致癌物作用下发生断裂、外显子缺失, 导致 FHIT 蛋白表达缺失或减少。FHIT 基因的变化与吸烟的关系各家报道不尽相同^[13-14, 17], 仍需做更多的研究工作来了解烟草对 FHIT 基因的影响。

p16 基因是迄今为止所发现的第 1 个直接抑制肿瘤发生的细胞固有成分, 其编码产物 p16 蛋白是细胞周期素依赖激酶 (CDK) 抑制剂, 能与细胞周期素 D1 (Cyclin D1) 竞争性结合 CDK4 而抑制 CDK4 活性, 从而阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期, 抑制 DNA 合成和细胞增殖。若 p16 基因缺失、突变或过度甲基化等异常造成基因失活而不能表达 p16 蛋白时, 细胞增殖失控而形成肿瘤。p16 基因异常表达率在 NSCLCs 中为 27% ~ 62.1%,

与预后的关系尚有争议^[18-20]，本研究结果 p16 蛋白在 NSCLCs 表达下降或丢失率达 78.75%，之所以获得较高的异常表达率，可能是由于是在判断标准上，我们把表达下降者归类于异常表达的范畴。p16 蛋白在肺癌组织中的表达明显下降，表明肺癌组织中存在 p16 基因的异常，提示肺癌的发生可能与 p16 基因表达产物缺失有关。p16 的异常表达与淋巴结转移相关，提示其可能作为一重要的预后因子为临床服务。

尽管 FHIT 与 p16 蛋白在 NSCLCs 中均有表达下降或缺失，然而两者之间无明显相关性，说明 2 种基因异常是 NSCLCs 发生过程中 2 个独立事件，但能否就此认为 FHIT 基因抑制肿瘤不是通过细胞凋亡通路，尚需同时对多种细胞凋亡相关蛋白进行研究才能得知。本实验用免疫组织化学法证实：FHIT 和 p16 基因的异常表达是 NSCLCs 中独立的常见事件，在肺癌的发生发展中起重要作用；FHIT 基因表达的异常与性别、组织学类型有关而与肿瘤大小、大体类型、淋巴结转移和临床分期不相关，这提示，FHIT 可能为一个重要的肿瘤抑制基因，其异常可能发生在肿瘤发生的早期阶段，在肺癌的发生和演变中起着重要的作用；p16 基因表达异常可能作为临床的预后指标之一。仍需进行大规模的更深层次研究，以证明 FHIT 和 p16 基因在肺癌中的重要作用。

参考文献:

[1] Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3:8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. *Cell*, 1996, 84(4):587-597.

[2] Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, et al. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(11):2256-2267.

[3] Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer [J]. *Cell*, 1996, 85(1):17-26.

[4] Sasaki H, Haneda H, Yukiue H, et al. Decreased fragile histidine triad gene messenger RNA expression in lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2006, 7(6):412-416.

[5] Wali A, Srinivasan R, Shabnam MS, et al. Loss of fragile histidine triad gene expression in advanced lung cancer is consequent to allelic loss at 3p14 locus and promoter methylation [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(2):93-99.

[6] Nelson HH, Wiencke JK, Gunn L, et al. Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos [J]. *Cancer Res*,

1998, 58(9):1804-1807.

[7] Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(22):5032-5037.

[8] Tomizawa Y, Nakajima T, Kohno T, et al. Clinicopathological significance of FHIT protein expression in stage I non-small cell lung carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23):5478-5483.

[9] Zhao P, Liu W, Lu YL, et al. Clinicopathological significance of FHIT protein expression in gastric adenocarcinoma patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(36):5735-5738.

[10] Arun B, Kilic G, Yen C. Loss of FHIT expression in breast cancer is correlated with poor prognostic markers [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(7):1681-1685.

[11] Kannangai R, Sahin F, Adegbola O, et al. FHIT mRNA and protein expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17(6):653-659.

[12] Mascaux C, Martin B, Verdebout JM, et al. Fragile histidine triad protein expression in non-small cell lung cancer and correlation with Ki-67 and with p53 [J]. *Eur Respir J*, 2003, 21(5):753-758.

[13] Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, et al. Loss of FHIT expression in non-small cell lung cancer: correlation with molecular genetic abnormalities and clinicopathological features [J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(6):1191-1197.

[14] Chang YL, Wu CT, Shih JY, et al. Roles of FHIT and p53 in Taiwanese surgically treated non-small cell lung cancers [J]. *Br J Cancer*, 2003, 21;89(2):320-326.

[15] Garinis GA, Gorgoulis VG, Mariatos G, et al. Association of allelic loss at the FHIT locus and p53 alterations with tumour kinetics and chromosomal instability in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs) [J]. *J Pathol*, 2001, 193(1):55-65.

[16] 赵坡, 吕亚莉, 钟梅, 等. 肺癌中脆性三联组氨酸 FHIT 蛋白表达缺失的临床病理分析 [J]. *中国肺癌杂志*, 2002, 10(5):345-48.

[17] 王兴元, 孙燕, 李卫东, 等. 肺癌组织和转移性肺门淋巴结中 FHIT 基因和 p16 基因的变化 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1999, 3(2):108-111.

[18] Tanaka R, Wang D, Morishita Y, et al. Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 103(3):608-615.

[19] Esposito V, Baldi A, De Luca A, et al. Cell cycle related proteins as prognostic parameters in radically resected non-small cell lung cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(7):734-739.

[20] Cheng YL, Lee SC, Harn HJ, et al. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 23(2):221-228.

