

• 专栏论著 •

人类口腔粘膜癌前损害发生发展过程中 CDKN₂ 基因作用的研究

I. P16 蛋白表达水平的免疫组织化学的初步观察

陈谦明 李秉琦 罗 刚 程 斌 胡颖川 周红梅 段开文

摘要 新近发现, CDKN₂ 基因是第一个直接参与细胞周期调控的抑癌基因, 但 CDKN₂ 基因及其产物 P16 蛋白在口腔粘膜癌前损害发生、发展过程中的作用及变化尚未见公开报导。本研究采用 LSAB 免疫组织化学染色技术研究发现: 上皮单纯增生、上皮异常增生及无转移浸润性鳞状细胞癌中均有 P16 蛋白表达, 其阳性反应既可见于胞核, 也可见于胞浆; 随着细胞恶性程度的增高其阳性反应强度及阳性细胞数量呈递增趋势, 且阳性反应的异质性明显增加。至转移性浸润性鳞状细胞癌阶段, P16 蛋白的阳性反应强度稍弱于前几个阶段的结果; 转移浸润癌的原发灶及其转移淋巴结中的肿瘤上皮 P16 蛋白的阳性反应都仅限于胞浆。

关键词 P16 蛋白 CDKN₂ 基因 口腔癌前损害 免疫组织化学技术

CDKN₂ 基因, 又名多种肿瘤抑制基因 1/ 细胞周期依赖性蛋白激酶 4 抑制物 (MTS1/ Cdk4I), 是 1994 年确定的一个新的抑癌基因^[1]。业已查明, 它定位于人类 9 号染色体 9p21 区段, 由两个内含子加三个外显子组成, 其中由 307bp 组成的外显子 2 编码一个 16 千道尔顿的蛋白即 P16 蛋白。后者通过与细胞周期素 (Cyclin D) 竞争结合细胞周期依赖性蛋白激酶 4/6 (Cdk 4/6) 而调节正常细胞周期。由于这些发现, 使 CDKN₂ 基因作为第一个直接参与细胞周期调控的抑癌基因而受到广泛关注^[2~4]。但 CDKN₂ 及其产物 P16 蛋白在人类肿瘤发生、发展过程中的作用尚无定论^[5,6], 在口腔粘膜癌前损害衍进过程中的意义尚未见报导。本研究应用 LSAB 免疫组织化学染色技术检测正常口腔粘膜、口腔粘膜癌前损害到口腔粘膜鳞状细胞癌全过程中 P16 蛋白的表达水平, 以期初步了解口腔粘膜癌前损害发生、发展与 CDKN₂ 基因产物 P16 蛋白的关系。

1 材料和方法

1.1 病例选择

从 1990~1995 年华西医科大学口腔医院存档的石蜡标本中, 根据 WHO 1983 年标准, 由两位工作 5 年以上的病理医师双盲法确诊后, 分别选出正常口腔粘膜、上皮单纯增生、上皮轻度异常增生、上皮中度异常增生、上皮重度异常增生与原位癌、无转移浸润性鳞状细胞癌、伴转移的浸润性鳞状细胞癌及其淋巴结转移灶标本, 共计 65 例, 挑选标本时注意选择其大小可保证达到迅速完全固定者。

1.2 主要试剂

兔抗人 P16 蛋白多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, LSAB Kit、显色剂 DAB 购自 DAKO 公司。

1.3 对照设计

选取经研究证实有 P16 蛋白表达的纤维肉瘤 (细胞核阳性)、胰腺癌 (细胞浆阳性) 标本作为阳性对照, 并以 PBS 代替一抗作为替代对照。

1.4 染色过程

根据 LSAB Kit 说明进行。过程如下: 4 μ 组织切片, 系列脱蜡, 水化, 于柠檬酸缓冲液中微波处理脱交

本项目获国家自然科学基金、国家教委博士点专项基金、美国纽约中华医学基金会 (CMB) 部份资助

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院口腔粘膜病学研究室 (陈谦明, 李秉琦, 罗 刚, 程 斌, 周红梅, 段开文), 华西医科大学病理学教研室 (胡颖川)

联,滴加 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性;依次滴加一抗、桥抗、酶标 SA;DAB 显色;苏木素复染,梯度脱水,透明,封片,镜检。

1.5 结果判定

1.5.1 评分标准:采用定量评估法,以阳性片为基准,其核、浆阳性均定为 3 分。实验片与之对照,与阳性一致者为 3 分,染色深度强于阳性片者分别为 4,5 分,低于阳性片者,中等阳性 2 分,弱阳性为 1 分,阴性片为 0 分。

如组织阳性反应强度不均匀,则选择无组织折叠、无边效应等影响读片结果的典型部位,随机选取 5

个高倍视野(400 \times),求得其各自计分后,以其平均数作为最后评定分值。

1.5.2 分别由两位研究者独立阅片后再进行核对,不一致者共同读片后确定。

1.6 统计处理

将组织染色强度经上述转换成为计量资料后采用 t 检验或方差分析,检验水准取双侧 $\alpha=0.05$,所有处理在 SPSS 软件上进行。

2 结 果

各组量化后进行统计分析的结果见附表。

附表 P16 蛋白免疫组织化学染色结果(单位:分值)

阳性染色定位	正常口腔粘膜组	上皮单纯性增生组	上皮异常增生组				鳞癌组			淋巴结转移灶
	n=8	n=7	轻度 n=8	中度 n=8	重度 n=9	合计 n=25	无转移 n=9	有转移 n=8	合计 n=17	n=8
胞核 \bar{x}	1.625	3.286	2.125	2.000	2.111	2.080	2.444	0.000	1.294	0.000
$\pm s$	1.408	1.604	1.641	1.414	1.364	1.412	1.130	0.000	1.490	0.000
胞浆 \bar{x}	2.625	3.714	3.000	3.750	3.222	3.320	4.000	2.875	3.471	3.375
$\pm s$	1.506	0.756	1.609	1.035	1.302	1.145	0.886	1.7271	1.419	0.774

从镜下观察可见,P16 蛋白在各组组织的细胞浆中均出现阳性反应。在正常口腔粘膜、上皮单纯性增生、上皮异常增生各组和无转移的浸润性鳞状细胞癌的细胞核中亦为阳性,而在有转移的浸润性鳞状细胞癌及其转移淋巴结中细胞核为阴性反应(0/16)。

正常口腔粘膜组织中,阳性反应可见于上皮全层,但以上皮表层 2/3 的细胞为主,越近上皮表层,阳性反应越强。基底层细胞及基底上层细胞亦为阳性反应,但其强度较上皮表层 2/3 细胞为弱。整个阳性反应均定位于胞浆和胞核,并有少量细胞的阳性产物聚集于胞膜而形成清晰的细胞轮廓。

上皮单纯性增生组中的阳性反应类似于正常粘膜组织。胞浆阳性反应较正常粘膜组增强,且胞浆阳性强度大于胞核,胞核阳性细胞数较正常粘膜组增多,过度正角化与过度不全角化的角化层均为弱阳性反应。

口腔粘膜上皮异常增生各组胞浆阳性反应较正常粘膜组和上皮单纯性增生组普遍增强,尤以增生的上皮钉突明显。细胞核阳性数量明显增多,表达亦见增强。但大部分组织出现阳性反应的无规律性异质性,表现为部份组织出现上述反应性增强的同时,部分细胞为阴性反应(见图 1)。量化后进行比较,不同程度上皮

异常增生之间,P16 蛋白的阳性表达强度差异无统计学意义($P>0.05$)。

浸润性鳞状细胞癌组织中,P16 蛋白阳性反应强度异质性更为明显,部分区域较各异常增生组明显增强(见图 2);而且该组的阳性反应定位与分化程度有关。高分化的口腔粘膜鳞状细胞癌中,P16 蛋白的阳性细胞多位于浸润上皮岛外周的基底样细胞,向中央逐渐减弱,在癌巢中央多为阴性;分化不良者阳性细胞散在分布,阳性反应普遍减弱,部分细胞完全为阴性。

伴淋巴结转移的浸润性鳞状细胞癌组织中,原发灶的异质性反应与无转移浸润性鳞状细胞癌组类似,但阳性反应强度弱于无淋巴结转移组,且仅见于胞浆,胞核均为阴性反应,与无转移的鳞状细胞癌差异具有显著性($P<0.01$)。转移灶的反应与原发灶类似,但染色强度稍弱,且无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨 论

3.1 P16 蛋白在细胞周期调节中的作用

正常细胞生长周期的调控依赖于细胞周期依赖性蛋白激酶(Cdks)的活化物(如细胞周期

蛋白 Cyclin)与抑制物(如 P15, P16, P18, P21, P27 等蛋白)之间的平衡。如果上述过程的失衡如活化物的过度表达或抑制物的表达不足都会促使细胞增殖失控,继而表现为细胞癌变^[2,7,8]。P16 蛋白通过与 Cyclin D1 竞争结合 Cdk 4/6,抑制 Cdk 4/6 活性,从而阻止视网膜母细胞瘤易感基因的蛋白产物 PRb 的磷酸化,PRb 结合的转录因子(transcriptional factor, TF)不能被释放活化,使细胞停滞于 G₀, G₁ 期^[2~4]。在此过程中,P16 等蛋白起着负反馈调控作用。因此,当在 P16 蛋白的生物合成及发挥功能的过程中,CDKN₂ 基因缺失或突变等异常改变,其 mRNA 转录水平障碍,蛋白表达异常或其它因子使蛋白构象发生改变等多种因素均可使其功能出现异常,失去上述负调节作用使细胞迅速通过 G₁ 期进入 G₂, S, M 期,过度增殖生长,导致肿瘤形成^[9]。

3.2 P16 蛋白与口腔粘膜癌前损害及鳞状细胞癌的关系

早期的研究显示,在神经胶质瘤、非小细胞性肺癌、恶性黑色素瘤等多种肿瘤细胞系中频繁出现人类 9p21 区段的染色体转位、杂合性缺失、纯合性缺失等多种遗传标志改变,提示 9p21 中含有可能导致多种肿瘤发生的抑癌基因^[10]。Kamb 等^[11,12]认为该基因即为 CDKN₂ 基因,并发现在包括发生于全身各部位的 200 余个肿瘤细胞系或原发肿瘤组织中出现 CDKN₂ 的缺失或突变。有文献报导其在恶性黑色素细胞系中缺失与突变率之和高达 75%^[11,12],因此认为 CDKN₂ 基因及其产物在肿瘤的发生、发展过程中起着十分重要的作用。

本研究首次报导了 P16 蛋白在正常口腔粘膜、癌前损害及鳞状细胞癌中的表达,并发现:①镜下观察整体印象,上皮单纯增生、上皮异常增生及无转移浸润性鳞状细胞癌中均有 P16 蛋白表达,随着细胞恶性程度的增高其阳性反应强度及阳性细胞数量具有递增趋势,且阳性反应的异质性明显增加;至转移性浸润性鳞状细胞癌阶段,P16 蛋白的阳性反应强度稍

弱于前几个阶段的结果,但经量化后统计分析无统计学意义;②在癌前损害的发生、发展及形成原发性浸润癌的过程中,各阶段组织中细胞核、细胞浆均见 P16 蛋白阳性表达,但至转移浸润癌阶段其原发灶及其转移淋巴结中的肿瘤上皮 P16 蛋白的阳性反应都仅限于胞浆。这些结果提示:P16 蛋白在口腔粘膜癌前损害的发生、发展过程中的作用和变化较为复杂。一方面,由于 P16 蛋白是一种细胞周期的负性调节因子,因此,在癌前损害阶段,P16 蛋白染色阳性反应强度及阳性细胞数量的递增,可能是对细胞所接受到的内外增殖信号的一种代偿性反应,试图维持细胞周期的调控平衡,使病变组织细胞恢复至正常;而至浸润癌阶段 P16 蛋白染色反应强度的增加则是不同因素影响的结果。一方面是由于细胞本身的代偿反应,使野生型 P16 蛋白的表达强度增加;另一方面可能由于致癌因子的继续作用,使 CDKN₂ 基因出现突变、缺失等异常,其产物 P16 蛋白构象发生改变、降解速度减缓,使 P16 蛋白积聚;至转移癌阶段,CDKN₂ 基因异常改变频率的增加和(或) P16 蛋白生物合成过程中受其它因素的影响,使此期表达的 P16 蛋白主要是变异型蛋白,而野生型蛋白成分处于次要地位,从而使此阶段的反应强度较癌前损害和无转移阶段为弱。由于变异型 P16 蛋白的构象发生改变,使其在蛋白合成系统的细胞器中合成后不能转运进入细胞核,因此表现为胞浆反应阳性而细胞核反应阴性。这与 Reed 等^[12]报导不同阶段黑色素细胞病变(melanocytic lesion)中 P16 蛋白的表达相似,而且,也与 CDKN₂ 的突变仅存在于口腔粘膜鳞状细胞癌组织中而口腔癌前损害阶段均无改变的报导相符^[13]。至于统计学处理后未得到有意义的结果,可能主要是由于肿瘤细胞反应的异质性的增加所致。由于本实验所使用的 P16 蛋白多克隆抗体不能识别野生型与变异型 P16 蛋白,所以还有待于应用针对两种不同蛋白的抗体进一步研究。

(本文图见中心插页 4)

4 参考文献

- 1 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994; 264 : 436
- 2 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin kinase. *Nature*, 1993; 366 : 704
- 3 Parry D, Bates S, Mann DJ, et al. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of P16 in k4/MTS1 tumor suppressor gene product. *EMBO J*, 1995; 14 : 503
- 4 Serrano M, Gomez-Lahoz E, Depinho R, et al. Inhibition of ras-induced proliferation of cellular transformation by P16 in k4. *Science*, 1995; 267 : 249
- 5 Cairns P, Li M, Merlo A, et al. Rates of P16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science*, 1994; 265 : 415
- 6 Spruck CH, Gonzalez-Zulueta M, Shibata A, et al. P16 gene in uncultured tumors. *Nature*, 1994; 370 : 183
- 7 Sherr CJ. G1 phase progression: cyclin on cue. *Cell*, 1994; 79 : 551
- 8 Peter M, Herskowitz I. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*, 1994; 79 : 181
- 9 Marx J. New tumor suppressor may rival P53. *Science*, 1994; 264 : 344
- 10 van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, et al. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Can Res*, 1994; 54 : 3396
- 11 Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, et al. Analysis of the P16 gene (CDKN₂) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genet*, 1994; 8 : 22
- 12 Jon A, Reed, Frank Loganzo, Christopher R, Shea, et al. The loss of expression of the P16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Can Res*, 1995; 55 : 2713
- 13 Matsuda H, Konishi N, Tao M, et al. Analyses of p16/CDKN₂ and p53 gene mutations with cell-proliferative activities in oral squamous cell carcinomas and the premalignant lesions. In: *Book of Abstract: 4th International Congress on Oral Cancer*. Ojaki City, Gifu, Japan. 1995, Sep, p88

(1995-12-27 收稿)

The Research of the Roles of CDKN₂ Gene in the Carcinogenesis of Human Oral Mucosa(I). A Preliminary Observation of P16 Expression Level by Immunohistochemical Method

Chen Qianming, Li Bingqi, Luo Gang, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

CDKN₂ is a newly-reported tumor suppressor gene that controls cell cycle in direct pathway. But the report on the roles of CDKN₂ gene and its product, P16 protein, in the process of oral carcinogenesis is scarce. The results of this research showed immunohistochemically that the tissues of hyperkeratosis, premalignant lesions and invasive but non-metastatic squamous cell carcinomas had P16 expression. The positive staining appeared in cell nuclei and cytoplasm. And the positive degree and the heterogeneity of positive reactions trended to increase gradually with the development of cell malignancy. On the other hand, the positive degree in the tissues from patients with metastatic invasive squamous cell carcinomas was slightly lower than that of the other tissues and the positive staining only located in the cytoplasm of the primary lesions and their metastatic lymph nodes. It indicates that the P16 protein plays some roles in the carcinogenesis of human oral mucosa.

Key words: P16 CDKN₂ premalignant lesion immunohistochemistry

人类口腔粘膜癌前损害发生发展过程中CDKN₂基因作用的研究 I. P16 蛋白表达水平的免疫组织化学的初步观察

(正文见第53页)

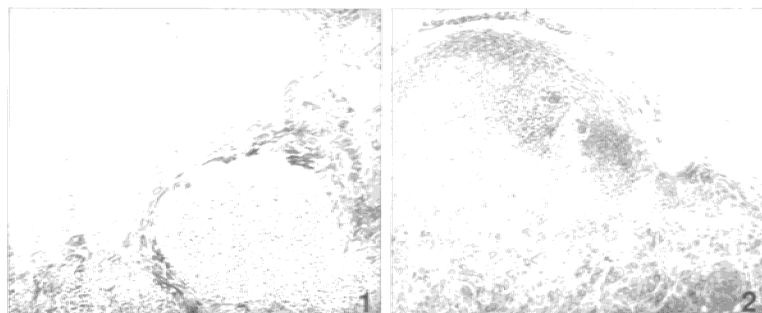
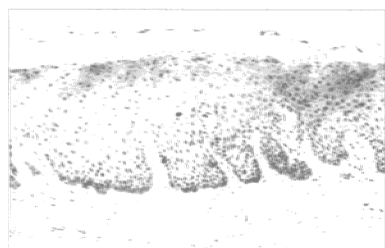


图1 异常增生上皮可见P16阳性表达,以胞浆阳性为主,并见少数散在核阳性,增生上皮钉突处阳性表达明显加强,并出现表达异质性 LSAB法 × 400

图2 无转移浸润癌上皮及癌巢均见P16强阳性表达,以胞浆阳性表达为主 LSAB法 × 100



人类口腔粘膜癌前损害发生发展过程中CDKN₂基因作用的研究 II. P16蛋白表达与抑癌基因Rb蛋白表达的相互关系

(正文见第57页)

附图 异常增生上皮可见Rb阳性表达,以胞核阳性为主,复层化的基底细胞可见核浆均呈强阳性表达 LSAB法 × 100

颞颌关节盘穿孔的诊断与手术治疗

(正文见第32页)



图2 关节上腔造影 示上、下腔交通

图3 关节盘大穿孔 示穿孔边缘粗糙

图4 示关节节的纤维化及髁状突的骨质不平