

[文章编号 1000-1182(2004)02-0155-03

p16 和 nm23 基因在唾液腺肿瘤中表达的研究

龚莉,陈照立,胡佳,贺红焰

(泸州医学院 病理学教研室,四川 泸州 646000)

[摘要] 目的 探讨 p16 和 nm23 基因在唾液腺良、恶性肿瘤中的表达情况及与唾液腺肿瘤发生之间的关系。方法 用免疫组织化学 SABC 法检测 39 例正常唾液腺和唾液腺肿瘤存档石蜡标本中 P16 蛋白和 nm23 蛋白的表达。结果 P16 和 nm23 蛋白阳性表达主要见于细胞浆及细胞核,呈棕黄色。在正常唾液腺中,二者阳性表达率均为 100% (4/4)。在良性和恶性唾液腺肿瘤中,P16 蛋白阳性表达率分别为 76.9% (10/13) 和 40.9% (9/22),良恶性之间 P16 蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$);nm23 蛋白阳性率分别为 84.6% (11/13) 和 45.5% (10/22),良恶性之间亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。唾液腺肿瘤中 P16 与 nm23 表达之间无相关性。结论 p16 和 nm23 基因在唾液腺肿瘤发生中可能分别起着不同的重要作用,其表达下降可能有利于唾液腺恶性肿瘤的形成。

[关键词] p16 基因; nm23 基因; 唾液腺肿瘤; 免疫组织化学

[中图分类号] R 739.87 **[文献标识码]** A

Expression of p16 and nm23 Genes in Salivary Gland Tumors GONG Li, CHEN Zhao-li, HU Jia, HUO Hong-yan.
(Dept. of Pathology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of p16 and nm23 genes in salivary gland tumors and the relation of P16 and nm23 proteins with tumorigenesis of salivary gland tumors. **Methods** Expression of P16 and nm23 proteins was examined by SABC immunohistochemical method in 39 cases of paraffin blocks of normal salivary gland tissues and salivary gland tumors. **Results** P16 and nm23 protein positive staining were mainly found in the cytoplasm and cytotblast of all salivary gland tissues. Positive rate of P16 protein expression was 76.9% (10/13) and 40.9% (9/22) in benign and malignant salivary gland tumors, respectively. There was significant difference between P16 protein expression of benign and malignant tumors by χ^2 test ($P < 0.05$). nm23 protein positive staining was found in 84.6% (11/13) and 45.5% (10/22) of benign and malignant tumors respectively. The expression of nm23 protein in benign and malignant tumors was significantly different ($P < 0.05$). There was no correlation of the expression of P16 and nm23 in salivary gland tumors was found ($P > 0.05$). **Conclusion** p16 and nm23 genes may play an important role in different sides in salivary gland tumorigenesis and the reduce of the expression of p16 and nm23 genes may contribute to the generation of malignant salivary gland tumors.

[Key words] p16 gene; nm23 gene; salivary gland tumors; immunohistochemistry

p16 基因是 Serrano 和 Kamb 发现的一个重要的多肿瘤抑制基因 (multiple tumor suppressor1, MTS1), 是目前发现的惟一一个直接作用于细胞周期的抑癌基因, 调控着细胞周期的演进及细胞的生长分化, p16 基因的缺失、突变等异常可导致细胞恶性转化而发生肿瘤^{1,2}。nm23 基因是一种转移抑制基因, 主要参与调节肿瘤的发生和转移, nm23 基因的表达下降不仅与肿瘤的高转移潜力及不良预后有关, 而且与肿瘤的发生也有一定关系³。有关唾液腺肿瘤中 p16 和 nm23 基因表达的研究文献目前较少。本研究采用免疫组化 SABC 法研究唾液腺肿瘤中 P16 和 nm23 癌基

因蛋白的表达情况, 以初步探讨 p16 和 nm23 基因与唾液腺肿瘤发生的关系。

1 材料和方法

1.1 标本收集

39 例标本来自泸州医学院 1997 ~ 2002 年的存档蜡块, 其中 4 例正常唾液腺, 13 例多形性腺瘤和 22 例恶性唾液腺肿瘤 (包括腺样囊性癌 9 例、粘液表皮样癌 11 例和腺癌 2 例)。所有病例均经两位有经验的病理医生再次复查确诊。

1.2 免疫组织化学染色

石蜡包埋组织作 5 μ m 连续切片, 常规苏木精—伊红和 SABC 免疫组织化学染色。鼠抗人 P16 单克隆抗体和 nm23 兔抗人红细胞二磷酸核苷激酶 (nucleoside diphosphste kinase, NDPK) 多克隆抗体均为北京

[收稿日期 2002-12-27; 修回日期 2003-11-20]

[基金项目] 四川省教委青年基金资助项目 (川教计 [1999] 164 号)

[作者简介] 龚莉 (1965-), 女, 四川人, 副教授, 硕士

[通讯作者] 龚莉, Tel: 0830-3160528

中山生物技术有限公司进口分装 Zymed 公司产品。染色过程为:切片脱蜡水化,3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶活性,依次滴加一抗、二抗、SABC 工作液,DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明、封片。同时,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 染色结果判断

染色阳性表达为棕黄色,主要位于细胞浆及细胞核中。以肿瘤细胞细胞浆和/或细胞核着棕黄色为阳性细胞,并按阳性细胞所占比例分为阴性(-):无明显细胞着色;弱阳性(+):阳性细胞数小于25%;阳性(++):阳性细胞数达25%~75%;强阳性(+++):阳性细胞数大于75%。

1.4 统计学处理

用²检验比较各组间阳性表达率有无统计学意义。

2 结果

39例标本中 P16 和 nm23 蛋白的表达情况见表 1。从表 1 可看出,P16 蛋白在正常唾液腺中有高表达(100.0%),在 35 例唾液腺肿瘤中,P16 蛋白阳性表达率为 54.3%(19/35);13 例良性肿瘤中阳性率为 76.9%(10/13);22 例恶性肿瘤中阳性率为 40.9%(9/22)。随着肿瘤恶性程度的增加,P16 阳性表达率逐渐下降,良恶性之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。nm23 基因其蛋白表达水平亦有随肿瘤恶性度增加而降低的倾向。nm23 在正常唾液腺和良性肿瘤中有较高表达,阳性率分别为 100%和 84.6%(11/13),在 22 例恶性肿瘤中阳性率为 45.5%(10/22),良恶性之间差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。P16 与 nm23 在唾液腺良恶性肿瘤中的表达无相关性($P > 0.05$)。

表 1 P16 和 nm23 在 39 例正常唾液腺及唾液腺肿瘤中的表达情况

Tab 1 The expression of P16 and nm23 proteins in 39 cases of normal salivary gland and salivary gland tumors

病理学类型	例数	P16				阳性率(%)	nm23				阳性率(%)
		+++	++	+	-		+++	++	+	-	
正常唾液腺	4	1	2	1	0	100.0	1	2	1	0	100.0
多形性腺瘤	13	1	5	4	3	76.9	2	6	3	2	84.6
腺样囊性癌	9	0	2	2	5	44.4	1	1	3	4	55.6
粘液表皮样癌	11	0	1	2	8	27.3	1	1	2	7	36.4
腺癌	2	1	1	0	0	100.0	0	1	0	1	50.0

3 讨论

唾液腺肿瘤是口腔颌面部常见肿瘤,约占人体全部肿瘤的 2.3%,目前对唾液腺肿瘤的发生所知仍甚少。研究发现,恶性肿瘤的发生受多种基因调控,且常有两种以上抑癌基因的失活。癌基因的活化和抑癌基因的失活使细胞周期调节失控是肿瘤发生发展中的重要事件,对细胞周期及其调节因子的研究,已受到众多学者的重视。

p16 基因定位于人类染色体 9p21 区,全长 8.5 kb,含有 2 个内含子及 3 个外显子,编码 P16 蛋白。P16 蛋白是具有 4 个锚蛋白样(ankyrin)重复序列的空间构型蛋白质结构,可和细胞周期素 D1(cyclinD1)竞争性与细胞周期素依赖性激酶 CDK4/6 结合,抑制 pRb 的磷酸化,抑制细胞分裂,使细胞的生长分化协调进行。p16 基因的失活可使 cyclinD1-CDK4/6 复合物形成较多,细胞周期调节失控,导致细胞恶性转化而发生肿瘤^{1,2}。研究发现,p16 基因失活在口腔鳞癌发生中可能起重要作用。Shintani 等⁴分析了 32 例口腔鳞癌中 p16 基因的失活发现,纯合

性缺失 22 例(56.3%),突变 3 例,异常甲基化 16 例(50%),表明 p16 基因失活是口腔鳞癌中的常见事件。Kim 等⁵报道 17 例原发口腔鳞癌中 P16 蛋白缺失率高达 88.2%(15/17)。Tsai 等⁶在 48 例口腔鳞癌的研究中发现 p16 改变率随肿瘤分化程度的降低而升高,p16 基因改变可能与肿瘤的转移行为或组织学分级有关。本研究发现,p16 基因在正常唾液腺和良性肿瘤中有较高表达率分别为 100.0%(4/4)和 76.9%(10/13),而在恶性肿瘤中的表达率则明显下降,为 40.9%(9/22),良性肿瘤与恶性肿瘤之间的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),p16 基因的表达率随肿瘤分化程度的降低而降低,提示 p16 基因失活可能与唾液腺肿瘤的发生或组织学分级有关,并可能有利于唾液腺恶性肿瘤的形成。在研究中还发现,在正常唾液腺和唾液腺肿瘤中,P16 蛋白阳性表达主要位于唾液腺导管上皮和有导管形成趋势的腺上皮中,呈阳性或强阳性表达,而在其他成分中则呈阴性或弱阳性表达。本研究中的唾液腺恶性肿瘤 P16 阳性表达率普遍较低,但 2 例腺癌却表现出 P16 蛋白阳性或强阳性表达。这与杜启涛等⁷的研究结果相符。提示

在唾液腺肿瘤中, P16 蛋白的表达可作为区分腺上皮的标志物。

nm23 基因是一种与恶性肿瘤转移表型抑制相关的基因, 编码相对分子质量 1.7×10^4 的蛋白质, 该蛋白与 NDPK 的结构相同。NDPK 是仅有的一类参与三磷酸核苷生物合成及微管聚合、G 蛋白介导的信号传递有关的酶。nm23 蛋白可使微管蛋白上的 GTP 转换为 GDP, 导致肿瘤细胞微管系统解聚, 阻碍纺锤体形成, 并抑制肿瘤细胞移动; nm23 蛋白还可直接与肿瘤细胞膜上的 G 蛋白结合, 阻断细胞生长信号的传导, 抑制其生长。可见, nm23 主要在细胞的增生、分化和信号传递中发挥调节作用⁸。Nakayama 等⁹ 研究了 30 例肝癌患者发现, 伴有远处转移的原发灶的 nm23 表达明显低于没有转移者 ($P = 0.018$), 转移灶比原发灶表达水平更低, nm23 的过低表达可能诱导了肿瘤的高转移潜力。Leone 等¹⁰ 用鼠的 nm23cDNA 转染高转移能力的 TK 黑色素瘤细胞系, 将转化细胞接种于动物皮下, 不仅转移能力降低, 其成瘤率也下降, 说明 nm23 不仅参与肿瘤转移过程的调节, 而且也参与肿瘤形成过程的调节。本研究发现, nm23 在正常唾液腺中阳性表达率为 100%, 在良性肿瘤中阳性率为 84.6%, 而在恶性肿瘤中阳性率明显下降, 为 45.5%, 良恶性之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。nm23 蛋白表达水平亦有随肿瘤恶性程度增高而降低的倾向, 说明 nm23 表达缺失可能有利于唾液腺恶性肿瘤的形成, nm23 蛋白表达水平可作为判断唾液腺肿瘤恶化进展的一个指标。

本研究中, P16 和 nm23 在唾液腺良性和恶性肿瘤中的表达无相关性 ($P > 0.05$), 提示 p16 和 nm23 基因可能以不同的机制、从不同的方面影响唾液腺肿瘤的发生和发展。

对唾液腺肿瘤中 P16 和 nm23 表达的研究仅取得

了一些初步认识, 有关二者在唾液腺肿瘤发生中的具体作用及与唾液腺肿瘤临床预后的关系等仍需今后作进一步研究。

[参考文献]

- 1] Serrano M, Hannon G, Beach D, et al. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 J. Nature, 1993, 366(6456): 704-707.
- 2] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types J. Science, 1994, 264(5157): 436-440.
- 3] Nakayama H, Yasai W, Yokoaki H, et al. Reduced expression of nm23 associated with metastasis of human gastric carcinoma J. Jpn J Cancer Res, 1993, 84(4): 184-190.
- 4] Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, et al. Inactivation of the p14 (ARF), p15 (INK4B) and p16 (INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas J. Oral Oncol, 2001, 37(6): 498-504.
- 5] Kim HS, Chung WB, Hong SH, et al. Inactivation of p16INK4a in primary tumors and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma J. Mol Cells, 2000, 10(5): 557-565.
- 6] Tsai CH, Yang CC, Chou LS, et al. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma J. J Oral Pathol Med, 2001, 30(9): 527-531.
- 7] 杜启涛, 马卫东, 李翠英, 等. p16 基因在唾液腺肿瘤中表达的研究 J. 北京口腔医学, 2000, 8(1): 17-20.
- 8] Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Sterenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation J. Cell, 1991, 64(2): 327-336.
- 9] Nakayama T, Ohtsuru A, Nakao K, et al. Expression in human hepatocellular carcinoma of nucleoside diphosphste kinase, a homologue of nm23 gene product J. Nat Cancer Inst, 1992, 84(17): 1349-1354.
- 10] Leone A, Flatow U, King CR, et al. Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells J. Cell, 1991, 65(1): 25-35.

(本文编辑 汤亚玲)

国家级继续医学教育项目“口腔颌面部缺损修复学习班”通知

经国家卫生部继续教育委员会批准, 国家级继续医学教育项目“口腔颌面部缺损修复学习班”将于 2004 年 6 月 1 日 ~ 3 日在武汉大学口腔医学院举行。学习班以介绍、推广近年来国内外颌面部骨缺损及软组织缺损修复重建的新成果、新技术和新理论为主要内容。参会学员将授予中华医学会继续教育 类学分 6 学分。本期学习班特邀张志愿、俞光岩、顾晓明、张念光等全国知名教授作专题报告。学习班期间恰逢“ IADR 中国分会第五届年会暨国际口腔医学学术研讨会”同时举行, 学员可参观这一年度、规模空前的口腔盛会。请参加者于 2004 年 4 月底之前与武汉市珞喻路 237 号武汉大学口腔医学院口腔颌面外科余世斌联系。邮政编码: 430079, 电话: 027-87646313, Email: yushibin@public.wh.hb.cn。