

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.01.17

# p16 和 Rb 基因产物在非小细胞肺癌的表达

王新允 李玉皓 秦建文 赵晖 赵天如

**【摘要】** 目的 研究非小细胞肺癌(NSCLC)中 p16、Rb 蛋白表达及二者的关系。方法 应用免疫组织化学技术(SP法)检测 74 例 NSCLC 和 10 例正常肺组织中 p16、Rb 蛋白的表达情况。结果 p16 蛋白在 NSCLC 的缺失率为 45.95%, 显著高于正常肺组织( $P < 0.01$ ), 并与淋巴结转移有密切关系( $P < 0.01$ )。Rb 蛋白在 NSCLC 的缺失率为 28.38%, 与正常肺组织差异无显著性( $P > 0.05$ )。p16 蛋白与 Rb 蛋白表达呈负相关( $P < 0.05$ )。结论 p16 缺失与可能 NSCLC 的发生、转移有密切关系。p16 与 Rb 可能通过负反馈机制相互调节。

**【关键词】** 非小细胞肺癌 p16 Rb 免疫组织化学

**【中图分类号】** R734.2

**The expression of p16 and Rb proteins in non-small cell lung cancer** WANG Xinyun\*, LI Yuhao, QIN Jianwen, ZHAO Hui, ZHAO Tianru. \* Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To study the expression of p16, Rb proteins and their relationship. **Methods** The expression of p16, Rb in 74 cases of NSCLC and 10 cases of normal lung tissues were studied by SP immunohistochemical technique. **Results** p16 protein deletion rate in NSCLC was 45.95%, which was higher than that in normal lung tissue ( $P < 0.01$ ). p16 protein deletion correlated remarkably with lymph node metastasis ( $P < 0.01$ ). Rb protein deletion rate in NSCLC was 28.38%. No significant correlation of Rb deletion rate was found between NSCLC and normal lung tissues ( $P > 0.05$ ). p16 expression showed negative correlation with Rb expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** p16 deletion may play an important role in the tumorigenesis and metastasis of NSCLC. There may be a negative feedback pathway between p16 and Rb.

**【Key words】** Non-small cell lung cancer p16 Rb Immunohistochemistry

This work was supported by a grant from Natural Sciences Foundation of Tianjin (to WANG Xinyun) (No. 983608111).

非小细胞肺癌(NSCLC)是最常见的恶性肿瘤之一。本研究通过免疫组化方法检测 74 例 NSCLC 标本中细胞周期调控因子 p16、Rb 蛋白的表达,旨在分析二者在 NSCLC 发生、发展中的作用,为 NSCLC 的基因诊断、基因治疗、评价预后等提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验组:收集天津医科大学总医院、第二医院病理科 1990 年~1997 年手术切除肺癌石蜡包埋标本 74 例,男性 55 例,女性 19 例。年龄 33~78 岁,平均 57.5 岁 ± 11.1 岁,所有病例术前均未行放疗和化疗。按 1981 年 WHO 标准分类:鳞癌 36 例,腺癌 38 例。按组织学分级:I 级 19 例,II 级 27 例,III 级 28 例。按 TNM 分期:I 期 25 例,II 期 27 例,III 期 22 例。

其中伴淋巴结转移者 31 例,不伴淋巴结转移者 43 例。对照组:正常肺组织取自同期手术切除的炎性假瘤标本之肺组织,共 10 例。全部标本均经 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋 5 μm 连续切片。

**1.2 方法** 采用链霉亲和素-生物素化过氧化物酶复合物(S-P)免疫组化方法,多克隆抗体 p16(C-20)、Rb(C-15)为美国 Santa Cruz 公司产品,工作浓度均为 1:150,抗原修复方法为电炉 92~98℃ 10 分钟,SP 试剂盒为美国 ZYMED 公司产品,所有产品均购自北京中山生物技术有限公司。以已知阳性片作为阳性对照,以 TBS 液代替一抗作为空白对照。

**1.3 结果判定** 染色阳性信号呈棕黄色,每张切片由两名医师双盲随机选择 10 个高倍视野(×400)观测肿瘤实质细胞 p16、Rb 蛋白表达,无阳性细胞为阴性(-),阳性细胞 < 1/3 肿瘤细胞为(+),1/3~2/3 为(++) ,弥漫着色为(+++)。

**1.4 统计学处理** SPSS(Ver 7.5)统计软件包,χ<sup>2</sup> 检

本研究受天津市自然科学基金(983608111)资助

作者单位:300070 天津医科大学病理学教研室(王新允、赵晖、赵天如),天津医科大学第二医院(李玉皓),天津市胸科医院(秦建文)

验和确切概率法,显著性水准为 0.05。

## 2 结果

**2.1 p16 蛋白表达** p16 蛋白阳性产物主要分布于细胞核,少数位于细胞浆内。对照组 10 例正常肺组织中均可见 p16 表达,位于支气管上皮和肺泡上皮,缺失率为 0;在 NSCLC 40 例有 p16 蛋白表达(图 1),缺失率为 45.95%。NSCLC p16 蛋白缺失率明显高于正常肺组织( $\chi^2 = 7.72, P < 0.05$ )。NSCLC p16 蛋白缺失率与组织学类型、组织学分级、临床分期无明显关系( $P > 0.05$ )。不伴淋巴结转移的 NSCLC p16 蛋白缺失率明显低于伴淋巴结转移者( $P < 0.05$ ) (表 1)。

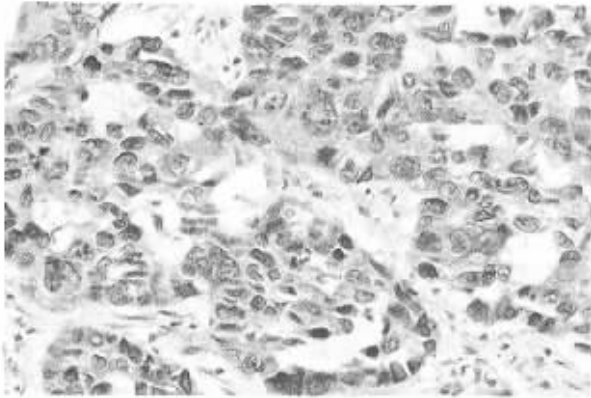


图 1 低分化腺癌 p16 免疫组化染色胞浆阳性 SP×200

Fig 1 p16 positive staining in poor-differentiated adenocarcinoma by immunohistochemistry SP×200

**2.2 Rb 蛋白表达** Rb 蛋白阳性产物主要位于细胞核,部分位于细胞浆。对照组 10 例正常肺组织中均可见 Rb 蛋白的表达,位于支气管上皮和肺泡上皮,缺失率为 0;实验组 74 例 NSCLC 中 53 例有 Rb 蛋白表达(图 2),缺失率为 28.38%,与正常肺组织比较差异无显著性( $\chi^2 = 2.42, P > 0.05$ )。NSCLC Rb 蛋白缺失率与组织学类型、组织学分级、临床分期、淋巴结转移无明显关系( $P > 0.05$ ) (表 2)。

**2.3 p16、Rb 蛋白表达的关系** 74 例 NSCLC 中,p16 (+)/Rb (+)者 20 例,p16 (+)/Rb (-)者 20 例,p16 (-)/Rb (+)者 33 例,p16 (-)/Rb (-)者 1 例,p16 与 Rb 蛋白表达呈负相关关系( $\chi^2 = 20.02, P < 0.05$ )。

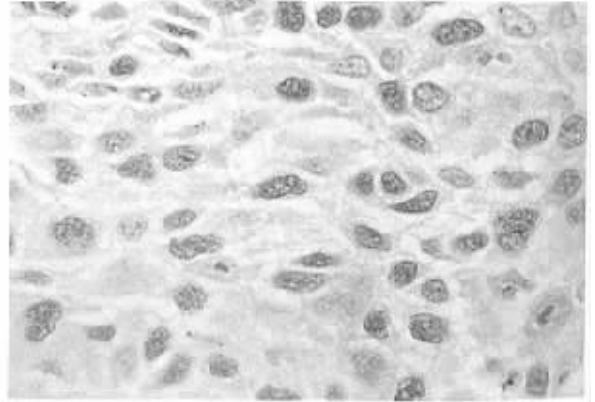


图 2 高分化鳞癌 Rb 免疫组化染色胞核阳性 SP×400

Fig 2 Rb positive staining in well-differentiated squamous cell carcinoma by immunohistochemistry SP×400

表 1 p16 蛋白在 NSCLC 的表达

Tab 1 Expression of p16 protein in patients with NSCLC

Characteristic	n	Negative	Positive			Deletion rate (%)	$\chi^2$	P value
			+	++	+++			
Histology								
Squamous cell carcinoma	36	17	10	5	4	47.22	0.05	> 0.05
Adenocarcinoma	38	17	8	7	6	44.74		
Grade								
G <sub>1</sub>	19	5	6	3	5	26.32	5.43	> 0.05
G <sub>2</sub>	27	12	9	4	2	44.44		
G <sub>3</sub>	28	17	3	5	3	60.71		
Stage								
I	25	9	7	5	4	36	1.70	> 0.05
II	27	13	6	4	4	48.15		
III	22	12	5	3	2	54.55		
Lymph node metastasis								
Negative	43	10	14	10	9	23.26	21.28	< 0.05
Positive	31	24	4	2	1	77.42		

表 2 Rb 蛋白在 NSCLC 的表达

Tab 2 Expression of Rb protein in patients with NSCLC

Characteristic	n	Negative	Positive			Deletion rate (%)	$\chi^2$	P value
			+	++	+++			
Histology								
Squamous cell carcinoma	36	11	11	8	6	30.56	0.16	> 0.05
Adenocarcinoma	38	10	12	9	7	26.32		
Grade								
G <sub>1</sub>	19	3	6	5	5	15.79	3.20	> 0.05
G <sub>2</sub>	27	7	8	8	4	25.93		
G <sub>3</sub>	28	11	9	4	4	39.29		
Stage								
I	25	6	9	7	3	24	0.38	> 0.05
II	27	8	8	6	5	29.63		
III	22	7	6	4	5	31.82		
Lymph node metastasis								
Negative	43	12	13	12	6	27.91	1.59	> 0.05
Positive	31	9	10	5	7	41.94		

### 3 讨论

p16 基因也称为 CDKN2、MTS1 基因, p16 基因的主要异常形式有缺失、突变及 5' CpG 岛甲基化等, 在人恶性肿瘤中普遍存在, 如胶质瘤、白血病、黑色素瘤、肺癌、间皮瘤、膀胱癌等, 与肿瘤的发生、发展关系密切。本研究中, p16 蛋白在 NSCLC 缺失率显著低于正常肺组织 ( $\chi^2 = 7.72, P < 0.05$ ), 与文献报道一致<sup>[1]</sup>, 提示 p16 缺失参与了 NSCLC 的发生。本研究发现, 伴淋巴结转移的 NSCLC p16 蛋白缺失率显著高于不伴淋巴结转移者 ( $\chi^2 = 21.28, P < 0.05$ ), 提示 p16 基因的失活可能与肺癌的转移有关, p16 基因失活参与了肺癌的进展, 支持 Sanchez-Cespedes 等<sup>[2]</sup>和 Kinoshita 等<sup>[3]</sup>的观点。有实验表明, p16 可作为判断肿瘤细胞恶性程度的标志。本研究中, p16 蛋白缺失率有随组织学分级升高而递减的趋势, 但统计学分析无相关性。因此, 对这一观点还有待证实。

Rb 基因( retinoblastoma )是第一个被分离、鉴定的抑癌基因。现已发现, 在所有视网膜母细胞瘤、部分肺癌、膀胱癌、食管癌等组织中均存在 Rb 基因缺陷。视网膜母细胞瘤患者, 亦容易罹患第二恶性肿瘤, 如骨肉瘤、软组织肉瘤。本研究中, 正常肺组织与 NSCLC 中的 Rb 蛋白缺失率差别无显著性 ( $\chi^2 = 2.42, P = 0.1197$ ), 提示 Rb 蛋白缺失在 NSCLC 中不是普遍发生的, 在 NSCLC 发生中的作用有待进一步研究。此外, NSCLC Rb 蛋白表达与组织学分级、临床分期、淋巴结转移均未见相关性, 支持 Higashiyama 等<sup>[4]</sup>的观点。

在本研究中, NSCLC 的 p16 与 Rb 蛋白表达呈负相关 ( $\chi^2 = 20.02, P < 0.05$ ), 与应用 Western 印迹法和

Northern 印迹法研究 p16 和 Rb 所得结论是一致的<sup>[5]</sup>, 证实了 p16 和 Rb 彼此通过负反馈机制调节<sup>[6,7]</sup>。在本实验中, p16 + /Rb + 的比例略高于文献报道<sup>[8]</sup>, 其原因可能是所用 p16 抗体亦可与突变的 Rb 蛋白反应所致。至于 1 例 p16 - /Rb - 的出现, 其原因不明。

### 参 考 文 献

- Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, et al. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res*, 1995, 55(3):505-509.
- Sanchez-Cespedes M, Reed AL, Buta M, et al. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with wtp53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 1999, 18(43):5843-5849.
- Kinoshita I, Akita HD, Mishina T, et al. Altered p16 INK4 and Retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: Potential synergistic effect which altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res*, 1996, 56(24):5557-5562.
- Higashiyama M, Doi O, Kodama K, et al. Retinoblastoma protein expression in lung cancer: an immunochemical analysis. *Oncology*, 1994, 51(6):544-551.
- Yeager T, Stadler W, Belair C, et al. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. *Cancer Res*, 1995, 55(3):493-497.
- Yuan J, Knorr J, Altmannberger M, et al. Expression of p16 and lack of pRB in primary small cell lung cancer. *J Pathol*, 1999, 189(3):358-362.
- Mack PC, Gandara DR, Bowen C, et al. RB status as a determinant of response to UCN-01 in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(9):2596-2604.
- Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(4):791-800.

(收稿 2000-07-26 修回 2000-11-20)

(本文编辑 李蓓兰)