

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.01.12

p16 基因及产物在原发性肺癌中的表达及其临床病理学意义

张莉 李应珍

【摘要】 目的 探讨 p16 基因及产物的异常表达与肺癌发生、发展的关系。方法 应用免疫组化检测 114 例原发性肺癌组织中 p16 蛋白的表达,应用 PCR 技术分析 62 例 p16 蛋白表达丢失的肺癌组织中 p16 外显子 2(E2) 的缺失情况,并以 14 例癌旁正常肺组织作对照。结果 p16 蛋白阳性表达率在鳞癌、腺癌和小细胞肺癌中分别为 43.2%、48.5%和 27.0%,各组间无显著差异 ($P > 0.05$);p16 蛋白表达水平与非小细胞肺癌(NSCLC)的组织学分级和淋巴结转移有密切关系。NSCLC 中 p16 E2 的缺失率为 45.2%,缺失水平与淋巴结转移和组织学分级密切相关 ($P < 0.05$)。小细胞肺癌(SCLC)和癌旁正常肺组织中无 p16 E2 的缺失。结论 p16 基因及产物的异常表达与 NSCLC 的组织学分级和转移相关,它可能参与 NSCLC 的发生、发展和转移过程。

【关键词】 原发性肺肿瘤 p16 基因 基因缺失

The clinicopathologic significance of the p16 gene expression in primary lung cancer ZHANG Li, LI Yingzhen. Department of Pulmonary Diseases, The First Hospital, Xingjiang Medical University, Urumqi 830054, P. R. China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between p16 gene expression and oncogenesis, and development of human lung cancer. **Methods** Immunohistochemistry was employed to detect the expression of p16 protein in 114 paraffin-embedded primary lung cancer tissues. Loss of p16 INK4 gene exon 2 (E2) was analyzed using PCR technique in 62 cancer samples with p16 protein-negative stain and 14 paracancerous lung tissues. **Results** The positive rates of p16 protein expression in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and small cell lung cancer (SCLC) were 43.3%, 48.2% and 27.0% respectively, and no significant difference was found among them ($P > 0.05$). The expression level of p16 protein was closely correlated with histological grade and lymph node metastasis of lung cancer. The deletion of p16 E2 was 45.2% in NSCLC and closely related to lymph node metastasis and histological grade ($P < 0.05$). No deletion was observed in 37 cases of SCLC and 14 paracancerous lung tissues. **Conclusion** Alteration of p16 gene and protein is closely related to the histological grade and lymph node metastasis of NSCLC. It may play an important role in the oncogenesis, development and lymph node metastasis of NSCLC.

【Key Words】 Primary lung neoplasms p16 gene Gene deletion

自 1993 年首次发现并报道了 p16 基因以来,人们对其结构、功能以及与肿瘤关系的研究逐步深入,并取得了一些突破性的进展^[1~4],但是免疫组化联合 PCR 技术同时检测 p16 基因及产物的异常表达及其与临床病理学联系的研究较少。我们应用以上两种技术同时检测 114 例原发性肺癌组织中 p16 蛋白表达和 p16 外显子(E2)的缺失情况,以探讨 p16 基因及产物与肺癌发生、发展的相关性,为临床判断预后及治疗提供分子病理学依据。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 收集我院自 1990~1998 年经手术切除和气管镜活检的肺癌组织石蜡包埋标本共 114 份,患者均为原发性肺癌,术前未作放化疗。全组鳞癌 44 例,其中 级(高分化)23 例, 级(中分化)10 例, 级(低分化)11 例,伴淋巴结转移 20 例;腺癌 33 例, 级 8 例, 级 11 例, 级 14 例,伴淋巴结转移 8 例;小细胞肺癌 37 例。取 14 例癌旁正常肺组织作对照。

1.2 LSAB - 免疫组化染色

1.2.1 主要试剂 抗 p16 蛋白多克隆抗体(Santa Cruz 公司);生物素标记的羊抗兔抗体(Dako 公司);SP 复合物(Dako 公司)。

1.2.2 LSAB 法 将 4 μm 厚的石蜡切片常规脱蜡,逐

级水化。先经 0.3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,枸橼酸缓冲液行抗原修复;然后依次加入正常小牛血清(1:100),一抗(1:40),二抗(1:400),三抗(1:400),以上各步均经微波低中火孵育 5 min, PBS 冲洗(除小牛血清)。最后 AEC 显色,苏木素复染,甘油明胶封片。选用已知阳性乳腺癌组织为阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 PCR

1.3.1 主要试剂 琼脂糖;DNA 提取液;p16 E2 反应液(分子量为 244 bp);Taq 酶;正常模板;电泳指示剂(以上由中山医科大学达安基因诊断中心提供);PCR Marker 是 Dako 公司产品。

1.3.2 标本处理 将石蜡包埋的组织切成 4 μm 厚,3 或 4 张装于小管中,然后用二甲苯、无水乙醇脱蜡。68 温箱干化 2 h,加入 DNA 提取液 100 μl,于 37 温箱过夜,100 加热 10 min 后离心。

1.3.3 PCR 扩增 取 p16 E2 反应液 26.5 μl,依次加入样本 DNA 2 μl(或直接加 2 μl 正常模板做正常对照),Taq 酶 1.5 μl,石蜡油 20 μl,按下述条件立即扩增:94 3 min 预变性,然后 94 45 s → 55 45 s → 72 60 s,共行 35 个循环。

1.3.4 PCR 扩增产物电泳 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,以阳性模板为对照,观察结果。

1.4 p16 蛋白染色结果的判定 每张切片选 5 个高倍视野,每个视野计数 200 个肿瘤细胞,按胞核或胞质染成棕红色的数目占计数细胞的百分比判定结果:+, < 30%;#, 30% ~ 75%;##, > 75%;-, 无胞核或胞浆染色。

1.5 数据处理 用卡方检验或确切概率法行显著性检验, P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 阳性细胞和阳性反应带表达的特征 图 1 示肺腺癌 p16 蛋白免疫染色阳性,胞浆呈棕红色。图 2 示 SCLC p16 蛋白免疫染色,胞核着色。在紫外线检测上,p16 E2 阳性反应带清晰、粗细均匀,为与正常对照处于同一位置的橙黄色条带,在 Marker 的 150 ~ 300 bp 之间(图 3)。

2.2 p16 蛋白表达与肺癌相关指标的关系 从表 1 可见正常组织 p16 蛋白阳性表达率明显低于肺癌组织,但各肺癌组织学类型组 p16 蛋白阳性表达率差别无显著性 (P > 0.05)。随着细胞分化程度的降低和淋巴结转移,p16 表达水平亦下降 (P < 0.05)。

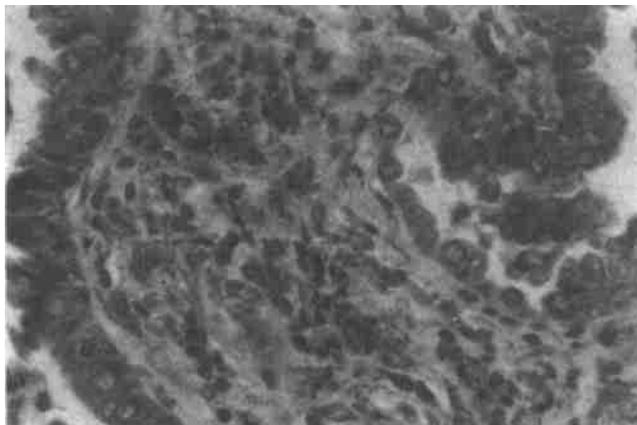


图 1 肺腺癌 p16 蛋白免疫染色,胞浆棕红色(抗多克隆 p16 蛋白 1:40, LSAB 染色 ×400)

Fig 1 Expression of p16 gene products was detected in adenocarcinoma of the lung by immunohistochemical staining (Anti-p16 polyclonal antibody 1:40, LSAB staining ×400. The cytoplasm was in brown red.)

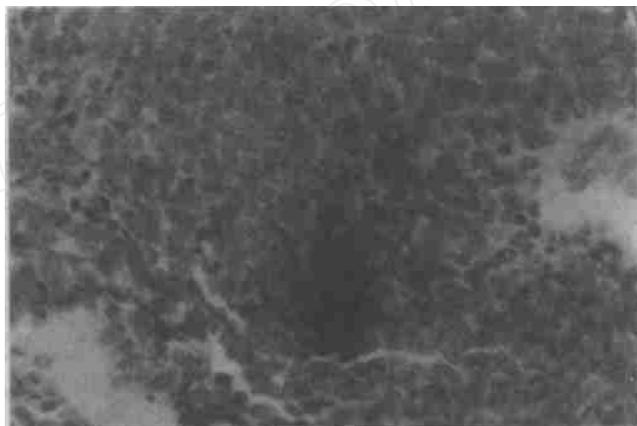


图 2 肺小细胞肺癌 p16 蛋白免疫染色,胞核着色(抗多克隆 p16 蛋白 1:40, LSAB 染色 ×400)

Fig 2 Expression of p16 gene products was detected in small cell lung cancer by immunohistochemical staining (Anti-p16 polyclonal antibody 1:40, LSAB staining ×400. The nucleus was in brown.)

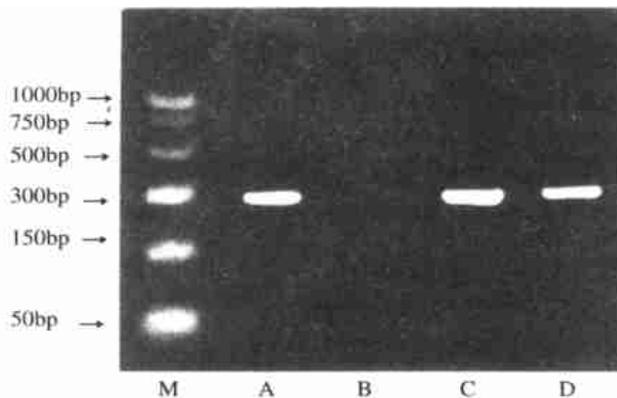


图 3 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

M: PCR Marker; A: 正常模板; B, C, D: NSCLC 组织样本; B 样本中 E2 丢失
Fig 3 Amplification product of p16 gene product was detected in exon 2 by PCR technique

M: PCR marker; A: Normal template; B, C, D: NSCLC tissues samples; Deletion of p16 E2 in sample B

2.3 PCR 扩增产物电泳结果 NSCLC 中 p16 E2 的缺失率为 45.2%, 20 例 SCLC 和 14 例癌旁正常肺组织中无 E2 缺失。高、中分化肺癌组织中 E2 的缺失率

(31%) 显著低于低分化的缺失率 (76.9%) ($P < 0.05$)。有淋巴结转移组的缺失率显著高于无淋巴结转移组 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 1 p16 蛋白表达与肺癌病理生理特征的关系

Tab 1 Relationship between p16 protein expression and pathophysiological characteristics of lung cancer

Characteristics	Total cases (N)	Positive cases (n)	Positive rate (%)
Histological types			
Paracancerous lung tissue	14	2	14.3
Squamous cell carcinoma	44	19	43.2
Adenocarcinoma	33	16	48.5
Small cell lung cancer	37	10	27.0
Histological grades			
+	52	29	55.8
-	25	6	24
Lymph node metastasis			
+	28	6	21.4
-	49	29	59.2

表 2 p16 E2 缺失与肺癌病理生理特征的关系

Tab 2 Relationship between deletion of p16 E2 and pathophysiological characteristics of lung cancer

Characteristics	Total cases (N)	Positive cases (n)	Positive rate (%)
Histological types			
Paracancerous lung tissue	14	0	0
Non-small cell lung cancer	42	19	45.2
Small cell lung cancer	20	0	0
Histological grades			
+	29	9	31.0
-	13	10	76.9
Lymph node metastasis			
+	14	11	78.6
-	24	8	33.3

3 讨论

人 p16 基因又称 MTS₁ 或 CDK_i, 位于 9p21, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 编码分子量 15.845×10^3 u 的蛋白质^[5]。p16 是细胞周期素依赖性激酶 (CDK) 的抑制蛋白, 它和细胞周期素 (cyclin) 竞争与 CDK_i 结合组成一个反馈调节圈, 直接参与细胞周期调控, 控制细胞由 G1 期进入 S 期, 对细胞的生长呈负性调节作用^[6]。它与许多恶性肿瘤的发生、发展相关^[1]。

我们的研究结果显示, p16 蛋白的表达与肺癌的组织学类型无关, SCLC 中也有部分表达。14 例正常癌旁肺组织只有 2 例 p16 蛋白阳性, 该结果与 Shapiro 等^[6]的结果相近。产生此现象的原因可能是: 分化的正常肺组织中 p16 蛋白不表达或很低的表达; 或正常组织中 Rb 基因抑制了 p16 蛋白的表达。由此可见,

p16 蛋白的表达调控较复杂。p16 蛋白丢失主要是由于 p16 外显子缺失所致, 其中以 E2 最多见^[7], 本组中 p16 E2 的缺失率为 45.2%, 该结果高于文献报道的 30% 左右缺失率^[8], 这可能与石蜡包埋的组织中提取的 DNA 含量相对低, 或正常细胞对 p16 基因缺失的污染有关。SCLC 中无 p16 E2 的缺失表达可能是它与 SCLC 的形成无关, 或由于 Rb 基因对 p16 的拮抗作用^[9]。

在所检测的 NSCLC 中, 伴有淋巴结转移的肺癌组织 p16 蛋白阳性表达率 (21.4%) 显著低于无转移的 59.2% ($P < 0.05$), p16 E2 的缺失率以前者为高。淋巴结转移在临床上多属晚期。综上, 我们认为 p16 失活参与 NSCLC 的发展过程, 但它是 NSCLC 发展过程中的一个继发事件, 还是一个恒定的事件, 这有待于进一步研究。本资料结果还显示, p16 基因及产物状态与 NSCLC 的肺癌细胞分化程度相关, 因此, 它可以作为临

床判断 NSCLC 患者预后的参考指标。

参 考 文 献

- 1 Tam SW, Shay JW. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16 INK4. *Cancer Res*, 1994, 54 (5) 5816-5820.
- 2 Okamoto A, Hussain SP, Hagiwar K, et al. Mutation in the p16 INK4/ MTS1/ CDKN2, p15 INK4b/ MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res*, 1995, 55 (1) 1448-1456.
- 3 Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, et al. Multiple mechanisms of p16 INK4 inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 1995, 55 (15) 6200-6209.
- 4 Washimi O, Nagatatake M, Osada H, et al. In vivo occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alterations preferentially in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*, 1995, 55 (1) 515-517.

- 5 Kamb A, Grusiv NA, Tartiqian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in the genesis of many tumor types. *Science*, 1994, 264 (15) 436.
- 6 Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, et al. Reciprocal Rb inactivation and p16 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res*, 1995, 55 (3) 505-509.
- 7 Aikou Okamoto, Elisa A, Market R. Mutation in the p16 INK4, p15 INK4 in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res*, 1995, 55 (4) 1448-1451.
- 8 Xiao S, Li DZ, Corson JM, et al. Codeletion of p15 and p16 genes in primary non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*, 1995, 55 (15) 2968-2971.
- 9 黄学胜,刘锟,王云杰,等. 抑癌基因 p16 在肺癌中的表达及其临床意义. *中国胸心血管外科临床杂志*, 1997, 4 (2) 70-72.

(收稿:1999-02-25 修回:1999-11-19)

(本文编辑 张世雯)

· 病例报告 ·

肺瘢痕癌三例报告

田辉 范月波 王善政

1985 年 3 月至 1996 年 5 月我们先后收治了 3 例肺瘢痕癌,现报告如下。

例 1 男,56 岁。因刺激性咳嗽伴痰中带血 1 个月入院。胸部 X 线片示右肺上叶 3 cm × 3 cm 肿块,胸部 CT 示右肺上叶尖后段 4 cm × 4 cm 灰白色肿块,质硬,肺门淋巴结肿大。最后病理诊断:肺瘢痕癌(鳞癌型)。

例 2 男,48 岁。因胸闷憋气 20 天入院。胸部 X 线片示右肺下叶 8 cm × 6 cm 肿块,胸部 CT 示右下肺癌伴胸腔积液。既往无结核病史。1995 年 12 月全麻下行剖胸探查术。术中见右肺下叶背段 3 cm × 3 cm 灰白色肿块,质硬,右肺门固定,肺门转移灶 8 cm × 8 cm。行原发病灶切除。最后病理诊断:肺瘢痕癌(腺癌型)。

例 3 女,62 岁。因咳嗽、左胸痛 2 个月入院。胸部 X 线片示左肺下叶 6 cm × 5

cm 肿块,胸部 CT 示左下肺癌。30 年前曾患肺结核,已治愈。1996 年 5 月全麻下行左肺下叶切除术。术中见左肺下叶背段与后基底段交界处肿块 7 cm × 6 cm,灰白色,质硬,肺门淋巴结肿大。最后病理诊断:肺瘢痕癌(鳞癌型)。

讨论 肺瘢痕癌(pulmonary scar cancer, PSC)是在肺结核、肺梗死和肺部慢性炎症等病变所致肺瘢痕的基础上,瘢痕组织内及其周围的细支气管-肺泡上皮异型增生和癌变的一种特殊类型的周围型肺癌。本病临床上很少见,文献报道其发生率为 0.19%^[1]。

本病术前诊断困难,主要依靠术后病理确诊。在放射学方面以下特点有助于诊断^[2]:胸部 X 线片中发现上叶肺周边较小块影时,注意胸膜凹陷征、集束征、尾巴征或兔耳征;陈旧结核病灶出现模糊影时,勿简单断定结核复发,应警惕瘢痕癌;断层片发现血管影伸入肿块内时,肺瘢痕癌的可能性大。

一般文献认为肺瘢痕癌多位于肺上叶的周边部^[1]。本组 3 例均为周围型,1 例位于肺上叶。肺瘢痕癌一般较小,灰白

色,较硬,常紧靠胸膜。肿瘤表面的胸膜增厚,并与之紧密粘连。中央为瘢痕组织收缩引起的脐样凹陷。肿瘤中央为黑色碳末的硬性瘢痕,周围为放射状排列的瘤组织。光镜下观察^[3],见由致密缔结组织构成大小不等的瘢痕结节,内有异常弹力纤维增生,大量碳末沉着,致密胶原纤维,闭塞或机化的血管;瘢痕结节内或其周围可见到细支气管上皮细胞或肺泡细胞发生异常增生或癌变。肿瘤组织学分型以腺癌为主,鳞癌少见,小细胞癌罕见。本组 3 例中,2 例鳞癌,1 例腺癌。

肺瘢痕癌对化疗和放疗不敏感,首选手术治疗,但预后较差。

参 考 文 献

- 1 张逊,宋玉忱,姚计文,等. 肺瘢痕癌. *中华外科杂志*, 1993, 31 (6) :369-370.
- 2 吴怀申. 肺瘢痕癌的研究现状. *肿瘤通讯*, 1983, 3 (4) :1-2.
- 3 吴怀申,顾恺时,黄偶麟,等. 肺瘢痕癌 38 例临床分析. *中华肿瘤杂志*, 1985, 7 (2) :133-134.

(收稿:1997-12-18 修回:1998-01-05)

(本文编辑 李蓓兰)

作者单位:250012 济南,山东医科大学附属医院胸外科(田辉,王善政);日照市东港区人民医院胸外科(范月波)