

膀胱肿瘤患者外周血淋巴细胞 p16 和 cyclinD₁ 的表达及其临床意义

吴天鹏¹, 张孝斌¹, 熊治国², 张杰¹, 程帆¹, 陈立新³

Expression of p16 and cyclinD₁ protein in peripheral blood of patients with bladder cancer

WU Tian-peng, ZHANG Xiao-bin, XIONG Zhi-guo, et al

Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: Objective To investigate the expression of p16 and cyclinD₁ protein in peripheral blood of bladder cancer. **Methods** p16 and cyclinD₁ protein were determined with flow cytometry in 47 cases bladder cancer and 20 cases normal control. **Results** The level of p16 were (2.48 ± 0.91) % in cancer group and (7.49 ± 5.22) % in control group. While the level of cyclinD₁ were (12.48 ± 9.27) % and (0.66 ± 0.5) %. Mean value of p16 in the cancers were lower than that in the controls ($P < 0.01$), but cyclinD₁ had higher expression in the cancers. **Conclusion** p16 and cyclinD₁ expression in human peripheral blood monocytes may be used as an index of surveillance and screening for cancer in high risk population.

Keywords: Protein p16; cyclinD₁; Bladder cancer; Peripheral blood

摘要:目的 研究膀胱肿瘤患者外周血中淋巴细胞 p16 和 cyclinD₁ 的表达及其临床意义。方法 应用 FCM 检测 47 例膀胱癌及 20 例对照组的外周血淋巴细胞中 p16 和 cyclinD₁ 的表达。结果 膀胱癌患者 p16 和 cyclinD₁ 基因蛋白的平均表达率分别为 (2.48 ± 0.91) %、(12.48 ± 9.27) % 与正常人群的表达率 (7.49 ± 5.22) %、(0.66 ± 0.5) % 比较有显著差异 ($P < 0.01$) ; 治愈 37 例中 p16 和 cyclinD₁ 的表达率正常, 而复发性 p16 和 cyclinD₁ 无一例在正常值以内。结论 外周血淋巴细胞 p16 和 cyclinD₁ 的异常表达与肿瘤状况有密切关系, 有望为分子诊断与筛选提供依据, 并可作为膀胱癌复发的监测指标。

关键词: 蛋白 p16、cyclinD₁; 膀胱肿瘤; 外周血

中图分类号: R737.14 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2003)05-0380-02

0 引言

p16 基因是位于人染色体 9P²¹ 的抑癌基因, 基因编码的 p16 蛋白作用于 G₁ 期参与对节点的调控, 阻止因 cyclinD 和 CDK₄、CDK₆ 结合导致 Rb 蛋白磷酸化, 从而干扰细胞周期从 G₁ 期进入 S 期, 以往研究多侧重于肿瘤细胞或组织中 p16 和 cyclinD₁ 的改变, 本文报道膀胱肿瘤患者外周血中淋巴细胞 p16 和 cyclinD₁ 的表达, 并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本为临床膀胱癌患者肝素抗凝血。男性 28 例、女性 19 例; 年龄 47 ~ 79 岁, 平均 58 岁。按 WHO 和 UICC 评定标准: 肿瘤 G₁ 期 18 例、G₂ 期 16 例、G₃ 期 13 例; P_{Tis} 3 例、P_{Ta} 10 例、P_{T2} 19 例、P_{T3-4} 15 例, 术后 3 月复发 10 例。正常人对照组 20 例。

1.2 方法 使用鼠抗人 p16 和 cyclinD₁ 单克隆抗体直标法进行流式细胞仪 (FCM) 检测。1ml 抗凝外周血用国产淋巴细胞分层液分离人抗凝血外周血中单个核细胞, PBS 洗涤, 洗涤后用 70% 酒精固定过液。离心去除乙醇, 用 PBS 洗涤, 调节细胞浓度为 1×10^6 /ml, 按试剂说明书加入鼠抗人 p16 和 cyclinD₁ 单抗 (晶美公司产品), 并设同型阴性对照管, 暗处反应 30min, PBS 洗涤后上机。流式细胞仪为美国 BD 公司 FACS Calibur。15mW 氩离子激光, 激光波长 488nm。用 cellquest 软件自动取 10^4 个细胞/样品并分析结果, 记录 p16、cyclinD₁ 细胞阳性百分率。

1.3 统计学处理 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用 t 检验。

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞 p16 和 cyclinD₁ 基因蛋白的表达 肿瘤组 p16 基因蛋白的平均表达率为 (2.48 ± 0.91) % 与正常人 p16 平均表达率 (7.49 ±

收稿日期: 2003-01-22; 修回日期: 2003-04-03

作者单位: 1. 430060 武汉大学人民医院泌尿外科; 2. 湖北省肿瘤医院腹泌外科; 3. 十堰市太和医院泌外

5.22) %相比有显著差异 ($P < 0.01$), cyclinD₁ 蛋白表达率为 (12.48 ± 9.27) %, 与正常人群 cyclinD₁ 表达率 (0.66 ± 0.5) % 相比亦有显著差异 ($P < 0.01$)。肿瘤组中 40 例 p16 表达低于正常人群, 占受检者 85.1%, 而 cyclinD₁ 的高表达占受检者的 80.8% ; p16 和 cyclinD₁ 表达均异常病例为 36 例, 占受检者 76.6% 。

2.2 治疗后外周血淋巴细胞中 p16 和 cyclinD₁ 表达 在无复发 37 例中, p16 和 cyclinD₁ 平均表达率分别为 (7.35 ± 5.40) %、(0.71 ± 0.42) %, 与正常对照比较无差异 ($P > 0.05$) ; 10 例复发者 p16 和 cyclinD₁ 表达率分别为 (1.32 ± 0.98) %、(14.27 ± 10.11) %, 无一例 p16 和 cyclinD₁ 同时表达正常。

3 讨论

目前研究发现肿瘤抑制基因有十几种, 诸如 p16、p53、p15、Rb 基因等。在多种组织来源的肿瘤细胞中往往可以检测到同一肿瘤抑制基因的突变、缺失或表达异常, 说明其有相同的抑癌或致瘤途径, 且最终都归结为对细胞周期的调控^[1]。细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 细胞周期调控异常与肿瘤的发生有密切关系, 只有 p16 和 cyclinD₁ 蛋白保持正负调节平衡, 才能协调细胞的正常分化和增殖。Kamb^[2] 报告原发膀胱癌和膀胱癌细胞株 p16 基因变异率为 56%, 包括基因突变和纯合缺失; 国内研究发现膀胱癌组织中 p16 阳性率明显低于正常粘膜, 并随着恶性程度增加和临床分期的进展呈下降趋势^[3,4]。我们先期研究亦表明 p16 失活和 cyclinD₁ 基因过表达与膀胱移行细胞癌的恶性程度、肿瘤浸润及预后密切相关, 并证实 p16 基因失活和 cyclinD₁ 基因过表达在膀胱癌发展中的协同作用^[5]。本文在对膀胱癌组织研究的基础上, 进一步探讨人膀胱癌外周血淋巴细胞的 p16 和 cyclinD₁ 的表达情况及其临床意义。结果发现: 膀胱癌患者外周血淋巴细胞 p16 和 cyclinD₁ 基因蛋白的表达情况与组织中的表达水平一致, p16 的低表达率为 85.1%, 而 cyclinD₁ 的高表达率为 80.8% ; 经手术治疗后, 37 例未复发者中, p16 和 cyclinD₁ 表达无一例在正常值以内, 推测外周血淋巴细胞 p16 和 cy-

clinD₁ 的异常表达与患者荷瘤状态极其相关, 并提示 p16 和 cyclinD₁ 的异常表达可能是膀胱癌发生发展的较早期信息, 有望成为分子诊断与筛选的有效指标。

外周血淋巴细胞的遗传特性何以与膀胱癌组织这般一致, 推测的机理有二: 其一, 外周血中 p16 和 cyclinD₁ 的异常表达, 说明受检者自身细胞周期调控异常, DNA 修复能力下降, 去除突变细胞的能力下降, 此时其体内已具备一定的 p16 突变细胞, 这部分细胞潜伏着向肿瘤细胞演进的危险, 在外界理化因素刺激及体内其它癌基因激活或抑癌基因失活的相互作用下, 它们就有可能进入肿瘤的启动阶段^[6]; 另一种可能机制是外周血淋巴细胞接受到受体基因突变的遗传信息。淋巴细胞对肿瘤细胞有较强的防御功能和监视功能, 一方面肿瘤抗原可能刺激淋巴细胞使其产生免疫反应从而杀伤肿瘤细胞; 另一方面淋巴细胞通过对抗原信息的提呈和处理, 获得肿瘤细胞的生物遗传信息。淋巴细胞产生的免疫球蛋白类物质通过作用于癌基因, 抑癌基因直接或间接影响肿瘤的发生、发生过程, 癌基因、抑癌基因的突变引起的细胞抗原信息的变化必定为淋巴细胞所捕捉。p16 和 cyclinD₁ 基因突变所引起的细胞遗传学特性的改变同样会呈递给过客淋巴细胞。以上思考仅是一些假说, 仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Koh J, Enders GH, D ynlacht BD, et al. Tumor -derived p16alleles encoding proteins defective in cell -cycle inhibition[J]. Nature, 1995, 375 (6536) : 506-510.
- [2] Kamb A, Gruis NA, Feldhans W, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 264 (5157) : 436-440.
- [3] 缪思满, 罗义麟, 王向宇, 等. p16 和 cyclinD₁ 在膀胱癌中的表达及其相关性研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 1999, 20 (7) : 419-421.
- [4] 陈戈明, 蔡松良, 沈周俊, 等. 膀胱癌中抑癌基因 p53、Rb、p16 及 p15 表达的研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2000, 21 (12) : 737.
- [5] 张孝斌, 陈立新, 程帆, 等. p16 和 cyclinD₁ 蛋白在膀胱移行细胞癌中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2002, 29 (1) : 32-33.
- [6] 沈宗丽, 周振英, 朱月清. 肿瘤患者外周血淋巴细胞 p53 高表达的临床意义[J]. 肿瘤学杂志, 2002, 8 (2) : 92-93.

(刘红武校对)