

舌鳞癌组织中 p15 蛋白表达与其生物学行为及预后的关系

曾融生¹, 刘习强¹, 黄洪章², 杨小平¹

(中山大学 1. 光华口腔医学院·附属口腔医院口腔颌面外科, 广东 广州 510060;

2. 附属第二医院口腔科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】检测 p15 蛋白在舌鳞状细胞癌(TSCC)中的表达,探讨其与临床病理及预后的关系。【方法】应用免疫组化超敏 S-P 法检测 45 例 TSCC 和 10 例正常舌组织中 p15 蛋白的表达,染色结果进一步用图像分析仪定量测定。【结果】TSCC 中 p15 表达缺失率为 46.7% (21/45);临床 I、II 期 p15 表达水平(54.25 ± 21.14)明显高于 III、IV 期(29.62 ± 9.28),无颈淋巴结转移组(59.05 ± 18.03)明显高于有转移组(26.83 ± 8.58),各组间差异显著 ($P < 0.05$);Cox 模型分析表明 p15 缺失与预后不良有关 ($P < 0.05$)。【结论】p15 蛋白表达缺失是 TSCC 发生发展中较常见分子事件,对准确评估 TSCC 的生物学行为和预后有重要的临床意义。

关键词: 癌,鳞状细胞;舌肿瘤;p15 蛋白**中图分类号:** R739.86**文献标识码:** A**文章编号:** 1672-3554(2003)04-0344-03

Relationship Between Expression of p15 Protein and the Biological Behaviors and Prognosis of Tongue Squamous Cell Carcinoma

ZENG Rong-sheng¹, LIU Xi-qiang¹, HUANG Hong-zhang², YANG Xiao-ping¹

(1. Guanghua Stomatological College; 2. Department of Stomatology,

The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University Guangzhou, 510060, China)

Abstract: 【Objective】To determine the expression of p15 protein and to investigate its correlation with the pathology and prognosis of tongue squamous cell carcinoma (TSCC). 【Methods】Ultra-sensitive S-P method was used to investigate the expression of p15 in 45 cases of TSCC and 10 cases of normal tongue tissues. The staining results were analyzed quantitatively by image cytometry. 【Results】The negative expression rate of p15 protein in TSCC was 46.7% (21/45); The positive expression level of p15 in I, II stages of TSCC was significantly higher than that in III, IV stages (54.25 ± 21.14 vs 29.62 ± 9.28 , $P < 0.05$). p15 positive expression level in patients with lymph node metastasis was also higher than those without lymph node metastasis (59.05 ± 18.03 vs 26.83 ± 8.58 , $P < 0.01$). Cox model showed that p15 deletion had a close relationship with poor prognosis of TSCC ($P < 0.05$). 【Conclusion】p15 deletion is a common molecular event in the carcinogenesis and plays a vital role in evaluating the biological behaviors and prognosis of TSCC.

Key words: carcinoma, squamous cell; tongue neoplasm; p15 protein

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(4):344~346]

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC, 下简称舌鳞癌)患病率居口腔癌首位,在人群中的发病率有上升的趋势,患病年龄亦趋向年轻化。舌鳞癌容易局部复发且早期即可发生颈淋巴结转移,预后较差。如何准确评估舌鳞癌的生物学特

性及预后一直是广大临床医生极为关注的问题。肿瘤发生发展的关键是细胞周期调节失控。p15 在 G₁/S 转换时起着十分重要的负调节作用,它作为抑癌基因的事实已被大量研究证实。头颈鳞癌中 p15 蛋白缺失率在 10%~53% 之间^[1-3]。由于各研

收稿日期: 2003-01-22**作者简介:** 曾融生(1958-),男,福建莆田人,硕士,教授。

究人员采用的检测技术、研究的肿瘤类型以及病例选择等方面的不同,结果有所不同。p15 在舌鳞癌中的表达情况、与临床病理及预后的关系如何仍不清楚。本实验利用免疫组化和图像分析技术对 45 例 TSCC 组织标本的 p15 蛋白进行检测,以探讨其表达与 TSCC 生物学行为和预后的关系。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选 1993 年 1 月~1999 年 11 月间在本院确诊为 TSCC 后行根治术的患者 45 例,男性 22 例,女性 23 例,中位年龄 52 岁(24~73 岁)。按 UICC(1997)标准分期:Ⅰ期 9 例,Ⅱ期 6 例,Ⅲ期 5 例,Ⅳ期 25 例;24 例无颈淋巴结转移,21 例有同侧和/或对侧颈淋巴结转移;组织病理学分级:高分化 33 例,中分化 9 例,低分化 3 例。取良性肿物周围的正常舌组织 10 例作为对照。所有病例有完整临床病理资料和术后随访结果,中位随访时间为 37 个月(1~104 个月)。全部标本均为术中切除的原发灶组织块,经 100 mL/L 福尔马林固定后常规石蜡包埋,5 μ m 厚连续切片。

1.2 主要试剂和仪器

小鼠抗人 p15 单克隆抗体和超敏 S-P 免疫组化试剂盒(迈新生物技术开发公司),KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统(德国)。

1.3 方法

超敏 S-P 法免疫组化染色(高温高压抗原修复),按说明书步骤操作并通过预实验调整抗体的工作浓度、反应温度和反应时间。新鲜配制的 DAB 显色,苏木素复染。每批次均设立对照,其中阳性对照为已知阳性反应的胃癌组织;阴性对照则分别用 PBS 和非免疫小鼠血清代替一抗;以同一张切片中的间质细胞(淋巴细胞和成纤维细胞)核染色作为阳性内对照。阳性染色切片进一步行图像分析定量测定。

1.4 结果判定

根据 Geradts 确立的免疫组化判断标准^[4],以背景清晰,细胞核内出现明显棕黄/棕褐色颗粒作为阳性染色。以同一张切片中的间质细胞核染色作为阳性内对照。双盲法、10×40 倍光镜下选取 5 个典型视野,微测量网格计数 300 个上皮细胞,计数阳性细胞并计算其所占比例作为阳性率,据此对染色结果分级:阳性率 $\leq 5\%$ 为(-),6%~30%为(+),31%~50%为(++), $> 50\%$ 为(+++)。选

取阳性率 $> 5\%$ 的切片,在 10×20 倍显微镜下,每张切片中选取 3 个背景清晰、染色明确的部位进行图像分析,计算出平均灰度值。

1.5 统计学处理

采用 χ^2 检验和单因素方差分析(one-way ANOVA),乘积限法(product-limit method)估计生存率,Cox 模型进行多因素预后分析。统计学处理软件为 SPSS 10.0 软件包。

2 结果

2.1 p15 蛋白的表达

舌鳞癌中 p15 蛋白的表达特点主要表现为细胞核的均匀浅染(图 1A),中到强阳性染色共 7 例;4 例阳性染色切片中部分癌细胞无着色或染色深浅不一(图 1B)。本组中 p15 蛋白的表达缺失率为 46.7%(21/45)。

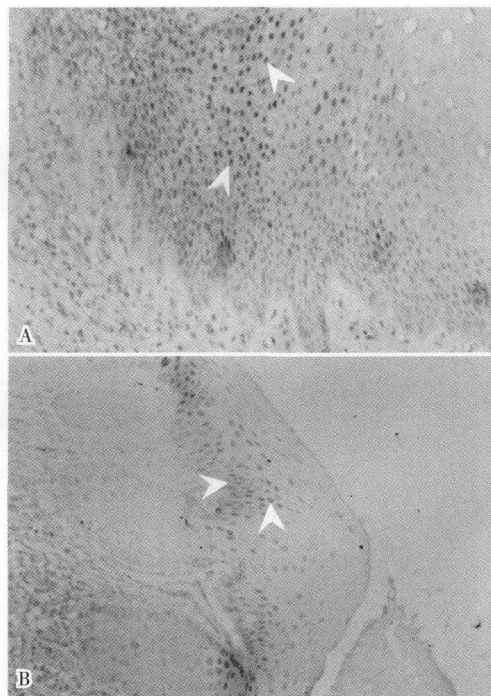


图 1 舌鳞癌中 p15 蛋白阳性表达

Fig. 1 Expression of p15 protein in tongue squamous cell carcinoma

A: The positive signals were marked in cell nucleus; B: Inhomogeneous expression of p15 protein in some tumor cells, but negative staining in some other tumor cells (SP method $\times 100$)

2.2 p15 蛋白表达与舌鳞癌临床病理的关系

p15 蛋白表达水平与患者的性别、年龄、原发灶部位及病理学分级无关。临床Ⅰ、Ⅱ期 p15 表达水平(平均灰度值)明显高于Ⅲ、Ⅳ期($P < 0.05$)。有颈淋巴结转移组 p15 蛋白表达水平显著低于无

转移组($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 舌鳞癌临床病理指标与 p15 蛋白表达的关系

Table 1 Relationship between p15 protein expression and clinicopathological parameters of tongue squamous cell carcinoma (mean grey value)

Clinicopathological parameters	Case number	Expression of p15
Clinical stage		
I、II	15	54.25 ± 21.14 ¹⁾
III、IV	30	29.62 ± 9.28
Differentiation		
well	33	42.81 ± 14.60
moderate or poor	12	35.20 ± 11.92
Lymph node metastasis		
positive	21	26.83 ± 8.58 ²⁾
negative	24	59.05 ± 18.03

1) Compared with III、IV stage, $P < 0.05$; 2) Compared with patients without lymph node metastasis, $P < 0.01$

2.3 p15 蛋白表达与舌鳞癌预后的关系

24 例 p15 表达阳性患者中 4 例死亡, 病死率为 16.7%, 死亡患者的中位生存时间为 10 个月。21 例 p15 表达阴性者中, 10 例死亡, 病死率为 47.6%, 其中位生存时间为 11 个月。通过估计生存率并经 Log-rank 检验表明: p15 阳性组病死率与阴性组的相比有统计学差异 ($P = 0.0409$, 图 2)。多因素 Cox 模型分析显示 p15 表达水平与舌鳞癌预后不良有关 ($P < 0.05$)。

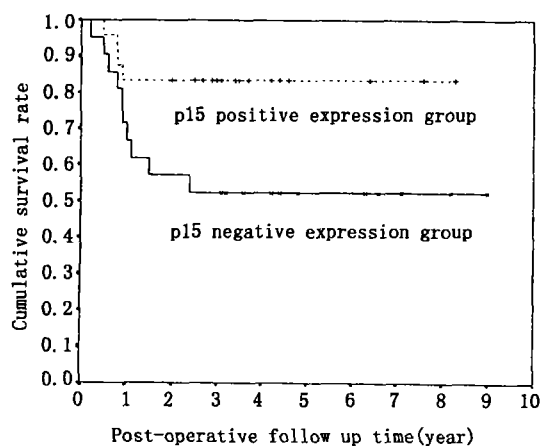


图 2 p15 蛋白阳性组和阴性组累积生存率的比较

Fig. 2 Comparison of cumulative survival rate between p15 protein negative and positive expression group with tongue squamous cell carcinoma

3 讨论

p15 基因定位于人染色体 9p21 区域邻近 p16 基因的部位, 含 2 个外显子, 编码的 p15 蛋白分子质量为 14.7 ku, 具有 4 个锚蛋白重复序列。目前已有越来越多的研究结果支持 p15 是一种新型的抑癌基因, 它在多种人类原发性肿瘤及肿瘤细胞株中异常表达, 被认为与这些肿瘤的发生和发展有关。

本研究中 p15 蛋白缺失率为 46.7%, 是舌鳞癌发生发展中较常见的分子事件。舌鳞癌组织中 p15 蛋白主要表现为细胞核的均匀浅染。4 例标本中部分癌细胞染色不均匀和/或部分肿瘤细胞无着色, 其原因可能与舌鳞癌的异质性及病人的遗传背景有关; 另外还与 p15 表达受多种细胞内外信号的调控有关。实验表明: 经 TGF- β 处理后 HaCaT 细胞中 p15 mRNA 和蛋白水平增加 30 倍, 蛋白稳定性亦显著增加, 且 p15 与 CDK4/6 结合明显增多。多位学者的研究显示 p15 不仅阻抑 G₁/S 过渡, 其过表达亦作用于 G₂/M 期, 并与 c-myc 及 Smad4/DpC4、EGFR 等表达受抑密切相关^[5-8]。Staller 等^[9]还发现 Miz1 和 myc 结合锌指蛋白 1 (myc-interacting zinc finger protein1) 可通过与启动子特异性结合来上调 p15 mRNA 的表达水平。此外, 本研究中还观察到 1 例 p15 强阳性染色切片中肿瘤细胞的胞浆亦有较明显着色, 这可能是由于该标本在手术切除后未能及时甲醛固定造成, 也可能与免疫组化高温高压抗原修复导致抗原弥散有关。

p15 与血液系统恶性肿瘤、神经胶质瘤、非小细胞肺癌、甲状腺癌以及头颈部鳞癌等的发生发展和预后不良相关, 但目前有关它与口腔癌关系的研究报道极少。本研究中, p15 表达水平与患者的年龄、性别、原发灶部位及肿瘤分化程度无关, 但与临床分期和颈淋巴结转移呈正相关 ($P < 0.05$), 这表明 p15 表达缺失与舌鳞癌的进展和转移有关。考虑到中、低分化病例较少, p15 与细胞分化程度的关系仍有待进一步证实。

通过对生存率估计并利用多因素 Cox 模型分析, 结果发现除临床分期及淋巴结转移状况明显影响舌鳞癌预后外, p15 表达缺失还与患者预后不良有关, p15 表达阳性患者预后明显较阴性患者好, 说明 p15 有可能作为独立的舌鳞癌预后风险评估

(下转第 385 页 to page 385)

致命损伤时,LIUS的促增殖作用减弱。同时LIUS还可显著提高KDR在VEC的表达,即使细胞受到一定的辐射损伤时,此作用也不会完全消失。这为我们进一步的体内实验和临床治疗研究提供了理论基础和实验依据。

(本文图3~8见封4. Fig. 3~8 shown in back cover)

参考文献:

- [1] Maier A, Gaggl A, Klemen H, *et al.* Review of devre osteoradionecrosis treated by surgery alone or surgery with postoperative hyperbaric oxygenation[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2000, 38(3): 173
- [2] Bertrand O F, Mongrain R, Thorin E, *et al.* *In vitro* response of human and porcine vascular cells exposed to high dose-rate γ -irradiation[J]. *Int J Radiat Biol*, 2000, 76(7): 999.
- [3] DeDeyne P G, Kirsch-Volders M. *In vitro* effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts [J]. *Physical Therapy*, 1995, 75(7): 629.
- [4] Reher P, Doan N, Brandnock B, *et al.* Therapeutic ultrasound for osteoradionecrosis; an *in vitro* comparison between 1mHz and 45kHz machines[J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(12): 1962.
- [5] Robertson V J, Ward A R. Subaqueous ultrasound: 45kHz and 1MHz machines compared[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 1995, 76(6): 569.
- [6] 夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京:军事医学科学出版社,1998. 58.
- [7] Asahara T, Krasinski K, Chen D. Circulating endothelial progenitor cells in perpheral blood incorporate into re-endothelialization after vascular injury[J]. *Circulation*, 1997, 96 I: 725.
- [8] Rose R W, Grant D S, O'Hara M D, *et al.* The role of laminin-1 in the modulation of radiation damage in endothelial cells and differentiation[J]. *Radiat Res*, 1999, 152(1): 14.
- [9] Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, *et al.* Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(23): 5687.

(编辑 刘清海)

(上接第346页 from page 346)

指标,并可为临床治疗措施的制定提供参考。

参考文献:

- [1] Roesler J M, Livingston E H, Srivatsan E, *et al.* Deletion of p15 (MTS2) in the head and neck squamous cell carcinomas [J]. *J Surg Res*, 1998, 77 (1): 50.
- [2] Zhao Y, Zhang S, Fu B, *et al.* Abnormalities of tumor suppressor gene p16 and p15 in primary maxillofacial squamous cell carcinomas [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999, 112 (1): 26.
- [3] 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.
- [4] Geradts J, Kratzke R A, Niehans G A, *et al.* Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2 / multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (24): 6006.
- [5] Warner B J, Blain S W, Seoane J, *et al.* Myc down-regulation by transforming growth factor-beta required for activation of the p15 (INK4b) G (1) arrest pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19 (9): 5913.
- [6] Kiyota A, Shintani S, Mihara M, *et al.* Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates p27(KIP1) and p15(INK4B) and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell lines[J]. *Oncology*, 2002, 63 (1): 92.
- [7] Peng B, Fleming J B, Breslin T, *et al.* Suppression of tumorigenesis and induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (11): 3628.
- [8] 张 弘,柳惠图,石法武. p15^{INK4b}/MTS2 对人肝癌细胞增殖的影响及其机理的初步分析 [J]. *科学通报*, 2000, 45(5):521.
- [9] Staller P, Peukert K, Kiermaier A, *et al.* Repression of p15^{INK4b} expression by Myc through association with Miz-1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(4): 392.

(编辑 刘清海)