

食管癌中 P16 蛋白和 Rb 蛋白的表达及其意义^①

吴晓华^{1, ②} 徐小虎² 祝家镇¹ 沈忠英³

(1 中山医科大学法医系法医病理教研室, 广州, 510089 2 汕头大学医学院法医研究所;

3 汕头大学医学院病理教研室, 汕头, 515031)

摘要 目的: 探讨 P16 和 Rb 两种基因所表达的蛋白在食管癌形成中的作用。方法: 采用免疫组化法对 50 例粤东地区食管癌进行检测。结果: 在 50 例食管鳞癌标本中, 10 例表现 P16 蛋白阳性, 38 例表现为 Rb 蛋白阳性。在 38 例 Rb 蛋白阳性病例中, 有 31 例 P16 蛋白阴性, 另有 5 例呈现 P16 蛋白低表达。17 例 I 级食管鳞癌均表达 Rb 蛋白, 28 例 II 级食管鳞癌中有 19 例 Rb 蛋白表达阳性, 5 例 III 级食管鳞癌中有 2 例表达 Rb 蛋白。结论: P16 蛋白在食管癌中的异常是一经常发生的事件, P16 蛋白的表达与 Rb 蛋白的表达之间存在明显的负相关, P16 蛋白的异常在不同地区之间可能存在差异; Rb 蛋白的表达与食管癌的分化程度相关, 即分化越好, Rb 蛋白表达率越高。细胞周期调控的 Rb 路径异常, 可能参与食管癌的形成。

主题词 食管肿瘤; 视网膜母细胞瘤蛋白质; 蛋白质 P16

中图分类号 R 735.1

The Expression of Protein of P16 and Rb in Esophageal Cancer

Wu Xiaohua^{1, 2} Xu Xiaohu² Zhu Jiazhen¹ Shen Zhongying³

(1 Department of Forensic Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089

2 Research Institute of Forensic Medicine, Shantou University Medical College, Shantou,

3 Department to Pathology, Shantou University Medical College, Shantou, 515031)

Abstract Objective: To explore the role of protein of P16 and Rb genes in the carcinogenesis in human esophageal cancer. **Method:** 50 cases of esophageal squamous cell carcinoma (ESC) from east Guangdong were selected and immunohistochemistry method was applied. **Results:** The results show that 10 of 50 express P16 and 38 of 50 express Rb. No expression of P16 could be found in 31 of 38 Rb positive cases. 5 showed low expression of P16. 17 of 17 grade I esophageal squamous-cell carcinoma expressed Rb. 19 of 28 grade II ESC were Rb positive. 2 of 5 grade III ESC showed Rb expression. **Conclusions:** Results suggest that abnormality of P16 in ESC is a common event. Inactivations of P16 and Rb are inversely correlated in ESC. Abnormality of P16 may various among different area. Rb expression could be related to the differentiation of ESC. Abnormality of P16 and Rb in the regulatory pathway of cell cycle may be involved in the carcinogenesis of ESC.

Subject headings esophageal neoplasms; protein P16; retinoblastoma protein

肿瘤的形成是一个非常复杂的生物学过程, 许多人类肿瘤都以一种或多种细胞周期调控基因的异常为其部分特征, 这些包括 Rb、P53、P16 和 Cyclin D1。P16 蛋白是周期素依赖性激酶 4 (cyclin dependent kinases 4, CDK4) 和 CDK6 的特异抑制子, CDK4

和 CDK6 参与 Cyclin D1 依赖性的 Rb 磷酸化^[1], 有证据提示, P16 是一个肿瘤抑制基因。首先, 其基因定位于染色体 9p21, 该区域在多种人肿瘤中出现异常^[2]。其次, P16 在 Rb 保持野生型的肿瘤中常表现缺失、突变或高甲基化及转录静止, 而且 P16

① 广东省高教厅重点科研项目, 广东省医学科学技术基金资助项目, 李嘉诚汕头大学科研基金资助项目; ② 现在汕头大学医学院法医研究所工作

在这些细胞中以高水平异位表达(ectopic expression)时可导致G₁期终止。第三,P16缺陷小鼠对一些致癌因素敏感,在人肿瘤中P16的种系突变与恶性黑色素瘤和胰腺癌的家系综合征相关^[3]。Rb和其它Rb样蛋白(p130,p107)控制着由杂二聚体转录调节子(heterodimeric transcription regulator)介导的基因表达,总称为E2Fs,它们可反式激活那些基因产物对进入S期非常重要的基因,Rb蛋白以其去磷酸化形式与E2F复合体的亚群结合,并将其转变为抑制E2F靶基因表达的抑制子。Rb蛋白的磷酸化使这些E2Fs游离,使它们能反式激活同样的基因,这是一个最初由周期素依赖性激酶触发而后由Cyclin E-CDK2复合体改变的过程^[4]。

食管癌(esophageal cancer)在我国是高发癌,其死亡率在肿瘤死亡中处于第二位,已有报道P16和Rb在食管癌中有改变,粤东地区作为食管癌高发区,有必要对P16和Rb在食管癌中的表达情况作一研究,以探讨它们在食管癌发生中的作用和意义。为此,我们从粤东地区选择了50例食管鳞状上皮癌进行P16蛋白和Rb蛋白的免疫组化观察。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

50例食管鳞状上皮癌标本选自汕头大学医学院病理教研室1996~1997年活检存档蜡块,病例来源均为粤东沿海地区(食管癌高发区),其中I级17例,II级28例,III级5例,有淋巴结转移者30例,无转移者20例,取10例正常食管粘膜作为对照。

1.2 试剂

鼠抗人P16单克隆抗体(Ab-2,克隆号ZJ11)、Rb单克隆抗体(Ab-1,克隆号1F8)均购自美国NEOMARKERS公司,免疫组化试剂盒Ultravision Detection System Polyvalent(抗鼠和兔,HRP/DAB)购自美国LAB Vision Corporation。

1.3 免疫组化染色

按试剂盒提供的方法进行,用DAB显色,一抗的效价分别为P16 1:100、Rb 1:200。阴性对照用PBS替代,阳性对照采用中山医科大学病理教研室已知为P16、Rb阳性的骨肉瘤切片,阳性染色为棕褐色,阳性结果的判别采用双盲性,根据阳性细胞所占面积分为4个等级(-、+、++、+++),“-”为无明显阳性反应细胞,“+”阳性细胞的面积小于

25%，“++”阳性细胞的面积在25%~75%之间,“+++”阳性细胞的面积大于75%。

2 结 果

2.1 P16蛋白在正常食管及食管鳞状上皮癌中的表达

正常食管粘膜上皮细胞中可见部分细胞表达P16蛋白,主要分布于基底层,棘细胞层亦可见P16蛋白少量的表达。在50例食管鳞状上皮癌中仅见10例为P16蛋白阳性,其中弱阳性(+)者(图2)为5例,中等~强阳性(++~+++)者5例,阳性部位主要位于胞核(图2),亦可见胞浆者(图1),P16蛋白阴性40例。

2.2 Rb蛋白在正常食管及食管鳞状上皮癌中的表达

Rb蛋白阳性部位位于胞核,为浅至深棕褐色颗粒。在正常食管鳞状上皮Rb蛋白的表达与P16蛋白类似,主要分布于基底细胞层和棘细胞层,表达水平亦较低。在食管鳞状上皮癌中,38例Rb蛋白阳性,其中弱阳性者(+)8例,中等~强阳性者(图4)30例,Rb蛋白阴性12例,某些病例癌巢中核强阳性细胞清晰可见,且阳性细胞主要靠近癌巢周边,癌巢中央细胞弱阳性或不着色(图3)。经与上述10例P16蛋白阳性病例进行比较,4例Rb蛋白弱阳性和3例Rb蛋白阴性者呈现P16蛋白的表达,另有3例呈中等~强Rb蛋白阳性者有P16蛋白表达。在38例Rb蛋白阳性病例中,有31例不表达P16蛋白。

2.3 P16蛋白和Rb蛋白在不同级别和转移状态的食管癌中的表达

结果见表1及表2。

表1 P16、Rb蛋白在不同级别食管鳞状上皮癌中的表达

Table 1 Expression of P16 and Rb in different grade of ESC (50 cases)

Grade	Cases (n)	Positive cases	
		P16	Rb
I	17	3	17
II	28	7	19
III	5	0	2
Total	50	10	38

表2 P16、Rb 蛋白的表达与食管鳞状上皮癌转移的关系

Table 2 Relations between expression of P16 and Rb and metastasis of ESC (50 cases)

State of metastasis	Cases (n)	Positive cases	
		P16	Rb
Metastasis	30	5	23
Unmetastasis	20	5	15
Total	50	10	38

3 讨论

抑癌基因的失活或癌基因的扩增在肿瘤的形成和发生过程中起着重要作用。P16 和 Rb 是两个肿瘤抑制基因, 它们主要是作为细胞周期的调控基因来抑制细胞的增殖, 其失活或突变常导致转录因子的活化, 从而使得细胞增殖不可调控, 以至最终形成肿瘤^[5~7]。一般认为, 正常细胞中存在着这一个负反馈网络, 即磷酸化 Rb 蛋白增加时, 可引起 P16 基因表达增强, 增加的 P16 蛋白与 Cyclin D 蛋白竞争结合 CDK4 而抑制 CDK4 的激酶活性, 使 Rb 蛋白磷酸化减少, 从而阻断 Cyclin D 蛋白、Rb 蛋白等介导的转录因子 E2F 的活化, 也影响了众多其它癌基因的转录, 最终抑制细胞增殖^[4]。为了解 P16 蛋白和 Rb 蛋白在食管癌中的分布状态及探讨其可能的作用, 本文选用粤东地区的食管鳞癌作为研究对象, 其结果表明, P16 蛋白仅在 20% 的病例中表达, 且有一半(5 例)为弱阳性, 这提示 P16 可能存在失活或丢失, 其在粤东地区的食管癌形成中有着重要意义, 且是一经常发生的事件。同时我们注意到, 这一结果与郑杰等^[8]的研究存在差异, 他们的结果表明仅有 31.7% 的病例中检测不到 P16 蛋白。这似乎可以认为 P16 蛋白在不同地区人群的食管癌中的表达亦不相同。进一步的比较研究有助于解决这一问题。Rb 蛋白的表达不同学者有不同的看法, 有的学者认为, Rb 蛋白与 P16 蛋白的表达之间存在着一种负相关^[9], 但近来有学者将 P16 转染至 P16 缺乏而 Rb 正常的细胞系中发现, P16 可降低 Rb 的表达水平, 因此, 它们之间的关系可能不是一种单纯的负相关。本文观察到 Rb 蛋白的高表达率与 P16 蛋白的低表达率形成一个对照, 这从侧面反映出尽管存在功能正常的 Rb, 但由于 P16 的缺失与失活, 同样可以使细胞周期进入 S 期。

P16 仅能抑制表达正常功能 Rb 的细胞的增殖意味着 P16 的丢失与 Rb 的丢失一样, 可能促进细胞的恶性转化。近年的研究发现, P16 在多种人类肿瘤中出现纯合缺失、无义错义突变或移码突变。目前 P16 作为一种肿瘤抑制基因已被研究者所认同。因此, 从本文的结果来看, P16 蛋白的低表达率正好说明其与食管癌形成的关系密切。众所周知, Rb 和 P16 肿瘤抑制基因是在细胞周期调控的路径上起作用。以往的研究认为 P16 基因是由 Rb 的基因产物 Rb 蛋白转录性抑制。最近, Fang X 等^[10]用人卵巢癌细胞株研究发现, Rb 蛋白及 mRNA 在缺乏 P16 的细胞株中比那些 P16 正常的细胞株中表达更高。进一步用野生型 P16 转染 P16 缺乏的细胞株可显著降低 Rb 蛋白及 mRNA 的表达。这些结果提示 Rb 的表达可被 P16 反调。从表 1 可知, Rb 蛋白的表达与食管鳞癌的分化程度相关, 即分化越好, Rb 蛋白表达率越高。此外, 在 10 例 P16 蛋白阳性的食管癌中, 竟无 1 例出现在 II 级食管鳞癌, 这进一步说明了 P16 蛋白与食管癌的形成密切相关, 而且是一较晚的分子事件。至于 P16 蛋白和 Rb 蛋白的表达与食管癌转移的关系, 从本文的结果似乎看不出有明确的关系。

本研究仅就 P16 及 Rb 蛋白的表达情况进行了观察, P16 蛋白的低表达率虽然从一定程度上说明了其与食管癌形成的关系, 但对粤东地区这一食管癌高发区来说, P16 基因是否存在缺失、突变, 或 P16 基因正常而转录后调控及修饰是否存在问题? 这都是值得探讨的问题, 作者也将另外进行一些报道。再者, Rb 蛋白虽然有高的表达率, 但也存在表达功能异常的蛋白的问题, 因为突变的 Rb 基因同样可表达出 Rb 蛋白, 此外, Rb 蛋白的磷酸化状态也是细胞周期调控路径中不可忽视的问题。细胞周期调节路径中其它蛋白如 Cyclin D1 和 CDK4 等在食管癌中的表达也是值得研究的问题。

(本文图见插页 3)

参 考 文 献

- 1 Serrano M, Hannon G J, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993, 366: 704
- 2 Kamb A, Gruis N A, Weaver-Feldhaus J, *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994, 264: 436

(下转第 193 页)

区变异株感染^[4]。目前认为,肝炎的活动与免疫发病机制关系密切,HBeAg的阴转或抗-HBe的出现可能会引起更多的细胞毒性T细胞对HBV感染的肝细胞进行攻击,导致肝损害加重^[8]。而持续的肝炎活动可诱发或促进肝纤维化的发生。本组病例中出现的抗-HBe阳性率高而肝损害和肝纤维化程度加重的现象可能与此有关。

近年来,HA已被公认为诊断肝纤维化最有价值的血清学指标。本组结果显示,HA随着肝组织病理的分级、分期的升高而升高,G₄、S₄的HA血清值分别比G₁、S₁显著性升高($P < 0.001$),证实了HA是反映肝炎活动及肝纤维化的一个敏感的血清学指标,结果与张永刚等^[9]报道相符。张氏^[10]报道血清HA值和抗-HBe阳性率随着肝硬化的发生而显著增高,本组资料显示,在抗-HBe阳性病人中HA平均值显著高于抗-HBe阴性者($P < 0.001$),证实了抗-HBe与HA两者有一定的关联性。HA的增高可能与抗-HBe阳转时肝炎活动及肝纤维化加重有关。如在抗-HBe阳性的慢性乙型肝炎病人出现HA显著增高时,可能提示其肝组织的炎症、坏死及肝纤维化的程度均较重,值得引起重视。

参 考 文 献

1 Omata M, Ehata T, Yokosuka O, *et al*. Mutations in the

pre-core region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Eng J Med*, 1991, 324: 1699

2 Caman W F, Thursz M, Hadziyannis S, *et al*. Hepatitis Be antigen negative chronic active hepatitis; hepatitis B virus core mutations occur predominantly in antigenic determinants. *J Viral Hepat*, 1995, 2: 77

3 陈金国,柴明胜,纪徐淮,等. ROC曲线评价肝纤维化血清标志物的临床价值. *上海医学检验杂志*, 1998, 13(1): 7

4 赖菁,崇雨田. 血清HA、HPC III、IV-C对肝纤维化评估的意义. *临床荟萃*, 1998, 13(12): 534

5 病毒性肝炎防治方案(试行). *中华传染病杂志*. 1995, 13(4): 241~247

6 Fattovich G, Rugge M, Brouo L, *et al*. Clinical virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to anti-HBe in chronic hepatitis type B. *Hepatology*, 1986; 6(2): 167

7 张常然,骆名其,杨自成,等. 慢性肝病患者血清和肝组织乙、丙型肝炎标志物的检测及意义. *中西医结合肝病杂志*, 1997, 7(1): 15

8 骆抗先. 病毒蛋白. 见: 骆抗先. 乙型肝炎—基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 28~38

9 张永刚,王家鑫,孙文英,等. 血清透明质酸定量分析及肝病应用探讨. *中华预防医学杂志*, 1995, 29(1): 21

10 张蔚,张世兰,张明华,等. 慢性活动性肝炎患者血清透明质酸与e系统相关性研究. *天津医药*, 1996, 24(7): 398

(1999-04-06收稿 1999-05-20修回)

(上接第184页)

3 Medema R H, Herrera R E, Lam F, *et al*. Growth Suppression by p16^{ink4} requires functional retinoblastoma protein. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6289

4 Sherr C J. Cancer cell cycle. *Science*, 1996, 274: 1672

5 Shiozwa T, Nikaido T, Shimizu M, *et al*. Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and p16INK4 in human endometrioid type endometrial carcinoma. *Cancer*, 1997, 80(12): 2250

6 Hirabayashi H, Fujii Y, Sakaguchi M, *et al*. p16INK4, pRB, p53 and cyclin D1 expression and hypemethylation of CDKN2 gene in thymoma and thymic carcinoma. *Int J Cancer*, 1997, 73(5): 639

7 Cohen J A and Geradts J. Loss of R B and MST1/CDKN2

(p16) expression in human sarcomas. *Hum Pathol* 1977, 28(8): 893

8 Zheng J, Zhou C, and Xiao F. The expression of Rb, p16 and cyclin D1 in 41 esophageal cancers. *Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih*, 1996, 25(6): 336

9 Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, *et al*. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers; an immunohistochemical study. *Int J Cancer*, 1996, 65(4): 442

10 Fang X, Jin X, Xu H J, *et al*. Expression of p16 induces transcriptional downregulation of the R B gene. *Oncogene*, 1998, 16(1): 1

(1999-01-20收稿 1999-04-10修回)

uPA 系统在 4 株非小细胞性肺癌细胞中的表达 (正文见第 174 页)

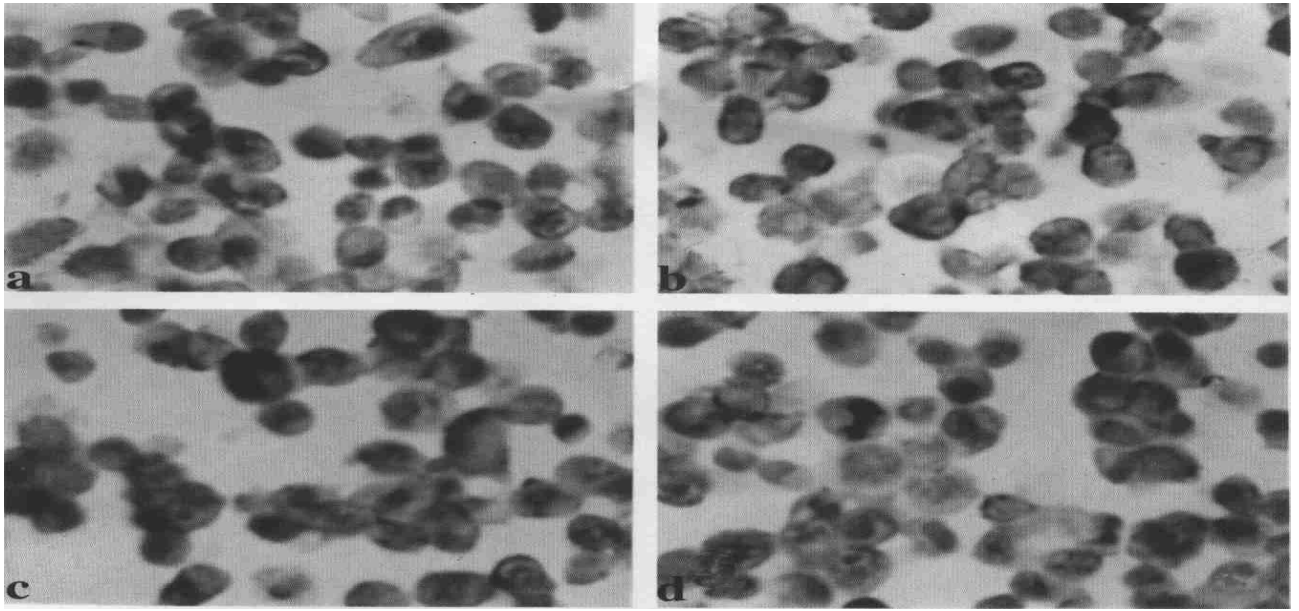


图 1 4 株非小细胞性肺癌细胞株 PAL-801 中 uPA(a)、PAI-1(b)、PAI-2(c)、uPAR(d) 的表达

Fig. 1 The expression of uPA(1)、PAI-1(2)、PAI-2(3)、uPAR(4) in the non small cell line PAL-801 (LSAB× 200)

食管癌中 P16 蛋白和 Rb 蛋白的表达及其意义(正文见第 182 页)

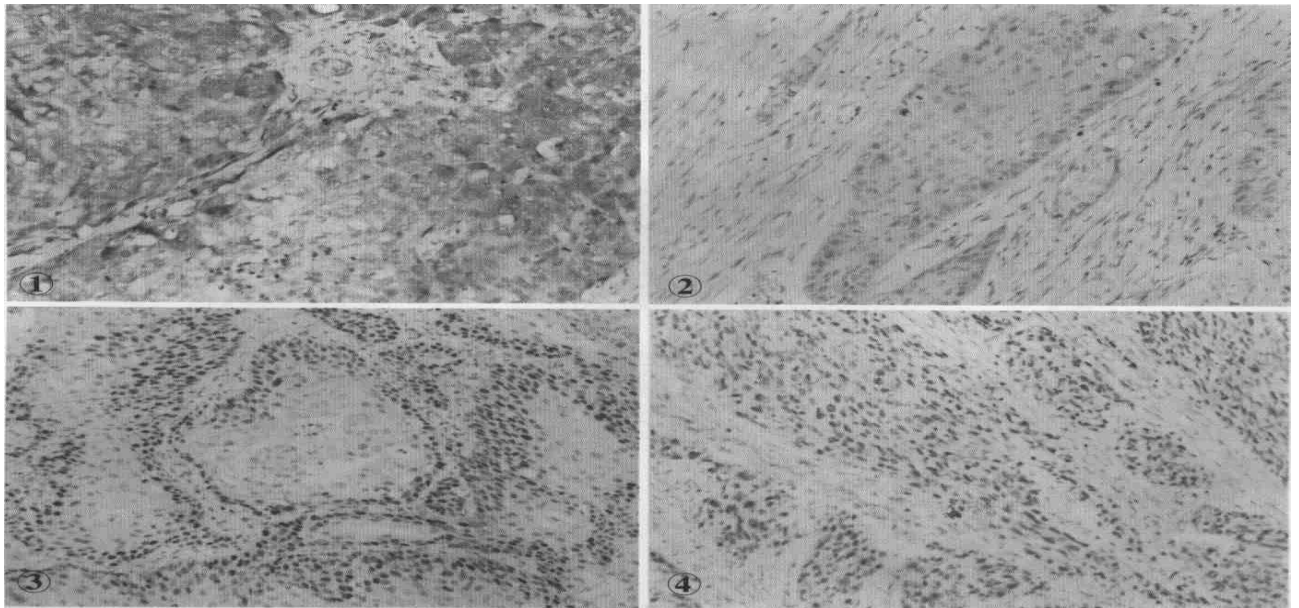


图 1 食管鳞状上皮癌(II 级), P16 阳性, 可见癌巢中癌细胞胞浆着色, 免疫组化染色, 100×

图 2 食管鳞状上皮癌(II 级), P16 阳性, 可见癌巢中癌细胞核呈弱阳性表达, 免疫组化染色, 100×

图 3 食管鳞状上皮癌(I 级), 癌巢中核强阳性细胞清晰可见, 阳性细胞主要靠近癌巢周边, 癌巢中央细胞, 弱阳性或不着色, Rb 免疫组化染色, 100×

图 4 食管鳞状上皮癌(II 级), 癌巢中大量 Rb 阳性细胞, 阳性部位位于核内, 免疫组化染色, 100×

Fig. 1 Esophageal squamous cell carcinoma (grade II). P16 positive reactivity can be seen in the cytoplasm of tumor cells. Immunohistochemical staining. 100×

Fig. 2 Esophageal squamous cell carcinoma (grade II). P16 shows weak reactivity in the nucleus of tumor cells. Immunohistochemical staining. 100×

Fig. 3 Esophageal squamous cell carcinoma (grade I). Extensive nuclear positive cells present in the nest clearly. Positive cells are mainly locate near the boundary of nest while cells in the center show weak reactivity. Rb immunohistochemical staining. 100×

Fig. 4 Esophageal squamous cell carcinoma (grade II). A large amount of Rb positive cells can be seen in nests. The positive reactivity was located in nucleus. Immunohistochemical staining. 100×