

· 临床研究 ·

P14(INK4a/ARF)蛋白在非小细胞肺癌组织中表达的意义

陈乾坤 丁嘉安 高文

【摘要】 目的 检测非小细胞肺癌组织中 P14 蛋白的表达,研究其预后价值。方法 以 P14 抗体 FL-132 蛋白对 39 例患者肺癌组织进行免疫组化染色。结果 39 例患者中 25 例(64.1%)P14 蛋白表达阳性;临床 I~II 期患者的 P14 蛋白表达率显著高于 III~IV 期患者(78.0% 比 43.8%, $P=0.043$);有、无远处转移患者的 P14 蛋白表达率分别为 78.3% 和 43.8%, $P=0.043$;无 P14 蛋白表达者的 3 年生存率明显低于有 P14 蛋白表达者,中位生存期分别为 17 月和 45 月, $P=0.0235$ 。结论 肺癌组织中 P14 蛋白表达阳性的患者有较好的预后,检测肺癌组织中 P14 蛋白表达有助于预测肺癌预后。

【关键词】 非小细胞肺癌 P14 免疫组化 预后

【中图分类号】 R734.2

Immunohistochemical analysis of P14ARF protein expression in non-small cell lung cancer: its prognostic significance CHEN Qiankun, DING Jiaan, GAO Wen. Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonology Hospital, Shanghai 200433, P. R. China

【Abstract】 **Objective** To investigate immunoexpression of P14ARF protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) and to evaluate the prognostic significance. **Methods** Thirty-nine tumor specimens were immunohistochemically examined with FL-132 antibody against P14ARF protein. **Results** P14 nuclei immunoexpression was found in 25 tumor specimens (64.1%). The patients in stage I and II had a much higher P14 expression rate than the patients in stage III and IV [78.0% (18/23) vs 43.8% (7/16) $P=0.043$]. The P14 expression rate in patients with and without metastasis was 78.3% (18/23) and 43.8% (7/16) respectively ($P=0.043$). The mean survival time of patients without P14-immunopositive staining was significantly shorter than that of patients with P14-immunopositive staining (17 months vs 45 months, $P=0.0235$). **Conclusion** Patients with the expression of P14ARF protein have a better prognosis. Detection of P14ARF protein in lung cancer tissues may be helpful to predict the prognosis of NSCLC.

【Key words】 Non-small cell lung cancer P14 protein Immunohistochemistry Prognosis

癌基因的异常表达,抑癌基因缺失或功能异常在肿瘤的发生和发展中起着至关重要的作用,如 K-ras、p53、p16、存活素(survivin)等。目前与 p16 同属于选择性阅读框架(alternative reading frame, ARF)家族的抑癌基因 p14(INK4a/ARF)的研究正处于热点,p14(INK4a/ARF)在许多肿瘤(如胃肠道、中枢系统和血液系统肿瘤)中的表达已有较多的研究,而在肺癌组织中表达的研究较少,因此本课题就此进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究以我科 1996 年 3 月至 1998 年 5 月期间行肺癌根治术的 39 名非小细胞肺癌患者为对象,其中男性 32 例,女性 7 例;腺癌 14 例,鳞癌 25 例;

I~II 期 23 例,III~IV 期 16 例。采用经常规病理学检查证实为肺癌的甲醛固定、石蜡包埋的手术切除标本,每个标本均制 2 张 5 μm 厚的连续切片,一张行普通 HE 染色,另一张行 p14(INK4a/ARF)蛋白免疫组化染色。

1.2 免疫组织化学方法

1.2.1 操作过程 预置石蜡切片于 56℃ 烤箱过夜;置石蜡切片于二甲苯溶液中常规脱蜡,再予梯度酒精水化;抗原修复:先置于 95℃ 微波炉中加热 10 min 后,再置于 0.01 mmol/L Tris 缓冲盐溶液(TBS,含 50 mmol/L NaCl 及 0.001% 皂甙碱的缓冲液)中洗涤至冷却;第一抗体孵育:将兔抗 p14ARF 蛋白多克隆抗体 FL-132(1:200;Santa Cruz Biotechnology;产品目录号 No. sc8340)滴加后在室温孵育 60 min,置于 4℃ 冰箱过夜;TBS 缓冲液洗涤;二抗孵育:滴加 Envi-

sonTM-HRP(鼠, DAKO 公司)室温孵育 60 min; TBS 缓冲液洗涤; 滴加 0.05% DAB-H₂O₂ 溶液显色 10 min; 流水洗涤; 苏木素复染、酒精脱水、二甲苯透明, 切片干燥后予中性树胶封固。

1.2.2 染色结果评判标准 随机选择切片上染色区域, 计算该区域染色阳性肿瘤细胞数目占所有肿瘤细胞的百分比(the labeling indices, LIs), 如果大于 10% 则认为 p14 蛋白染色阳性^[1]。

1.3 统计学方法 本研究所有数据均采用 SPSS10.0 软件包进行处理, 其中百分比(率)差异性的比较采用 Fisher's 精确卡方检验; Kaplan-Meier 乘积限法计算生存率, 并绘制生存曲线; Log-rank 法比较生存时间(生存期)。所有数据统计结果若 *P* 值小于 0.05, 则认为差别有显著的统计学意义。

2 结果

本研究结果显示 39 名非小细胞肺癌患者中 25 名(64.1%) P14 蛋白表达阳性(表 1), 显微镜下可见肿瘤组织中阳性细胞的胞浆均被染成棕黄色, 其中临床 I~II 期患者的 P14 蛋白表达率显著高于 III~IV 期患者(78.0% 比 43.8%, *P*=0.043), 有、无远处转移患者的 P14 蛋白表达率各为 78.3% 和 43.8%, *P*=0.043。有、无 P14 蛋白表达者的 3 年生存率的差异有显著的统计学意义, 中位生存期各为 45 月和 17 月, *P*=0.023 5(图 1)。

表 1 患者临床资料及 P14 免疫组化染色情况

Tab 1 Clinical characteristics of the patients and the results of P14 immunohistochemical staining in resected lung cancer tissues

Clinical characteristic	No. of patients	No. of P14 positive	<i>P</i> value
Gender			0.068
Female	7	4(57.1%)	
Male	32	21(65.6%)	
Age			0.073
≤60	14	5(35.7%)	
>60	25	20(80.0%)	
Histology			0.187
Adenocarcinoma	14	11(78.6%)	
Squamous cell carcinoma	25	14(56.0%)	
Differentiation			0.457
Poor	14	10(71.4%)	
Moderate	24	14(58.3%)	
Well	1	1(100.0%)	
Clinical stage			0.043
I+II	23	18(78.0%)	
III+IV	16	7(43.8%)	
Tumor size			1.000
≤3 cm	12	8(66.7%)	
>3 cm	27	17(63.0%)	
Metastasis			0.043
No	23	18(78.3%)	
Yes	16	7(43.8%)	

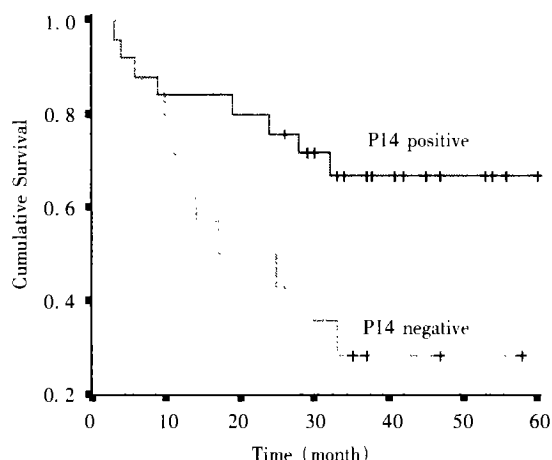


图 1 有、无 P14 蛋白表达肺癌患者的生存曲线

Fig 1 Survival curves of patients with and without the expression of P14 protein

3 讨论

本文通过免疫组织化学的方法, 以特异性抗体 FL-132 对 P14 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达进行了研究, 研究表明 I~II 期非小细胞肺癌患者的 P14 蛋白表达率明显高于 III~IV 期患者, 无远处转移患者的 P14 表达率也明显高于有远处转移的患者, P14 蛋白表达阳性患者的 3 年生存率显著高于阴性表达者, 显而易见, P14 蛋白表达的下调与肿瘤的高侵袭性有密切的关系, 提示较差的预后。许多肿瘤如骨肉瘤^[2]、脑室管膜瘤^[1]和淋巴瘤^[3]等的相关研究也都证实了这一点, 但是目前 P14 行使其肿瘤抑制功能的机制尚未完全明了。有研究显示人染色体 9p21 上的 CDKN2A 编码着 2 个不同的蛋白质, 其中 α 转录产物为众所周知的肿瘤抑制因子 P16INK4a, 其肿瘤抑制功能的实现依赖于经典的 P16-CDK-Rb 途径, 即 P16 与 CDK4 和 CDK6 结合, 通过 Rb 蛋白磷酸化引起细胞循环在 G₁ 期停滞^[4]。而 Francesca 等^[5]的研究表明作为 β 产物的 P14 有着与 P16 截然不同的肿瘤抑制途径, P14 可以使 P21CIP1 和 MDM2 的表达显著增高以及细胞循环 G₁ 和 G₂/M 期的停滞, 并且能明显提升 P53 的肿瘤抑制作用; Benassi 等的研究还显示 P14 的表达缺失可引起 P53 转录活性下调^[6]。因为 P21 本身就有细胞循环 G₁ 和 G₂ 期停滞作用^[6], 还可作用于 G₁ 期和 S 期的 cyclin-CDK 复合物并抑制其活性^[7], 所以 P21 机制的介入可从一方面解释 P14 不同于 P16 的肿瘤抑制作用。在细胞高增殖信号的刺激下, P14 与 MDM2 发生一系列构象变化后直接结合, 抑制泛酸化作用以及蛋白酶对 P53 的降解作用从而稳定 P53, P53 的肿瘤抑制功能也因此而增强^[8]。此

外, Sato 等的研究提示 P14 甲基化可致 P14 的表达下调,而在癌前期病变——溃疡性结肠炎 P14 甲基化率高达 60%^[8]。近来还有研究表明 E2F1^[9] 以及 TOPO-I^[10] 也参与 P14 的肿瘤抑制功能。尽管其作用机制还有很大的争议,但是目前 P14-MDM2-P53 这一肿瘤抑制途径已得到了广泛的证实和认可, P14 被公认为是一个新的肿瘤抑制基因。值得注意的是,本研究发现低分化肺癌患者的蛋白表达率高于高分化肺癌患者,虽然两者差别没有统计学意义,但是在理论上很难单纯用 P14 的作用机制解释,可能还有其他的机制参与了这部分肺癌患者的肿瘤发生和发展,这还有待于深入研究。

总之, P14ARF 作为一个新的肿瘤抑制基因,在肿瘤的发生和发展过程中起着至关重要的作用。肺癌组织中 P14 蛋白表达的检测可以作为一个新的重要的预后生物学指标,对临床工作有重要的参考价值,对于 P14 蛋白表达阴性的患者应该加强随访,并给予积极的治疗。

参 考 文 献

- 1 Korshunov A, Golanov A, Timirguz V. p14ARF protein (F1-132) immunoreactivity in intracranial ependymomas and its prognostic significance; an analysis of 103 cases. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2001, 102(3): 271-277.
- 2 Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, et al. Involvement of INK4A gene products in the pathogenesis and development of human osteosarcoma. *Cancer*, 2001, 92(12): 3062-3067.
- 3 Sanchez-Aguilera A, Sanchez-Beato M, Garcia JF, et al. p14 (ARF) nuclear overexpression in aggressive B-cell lymphomas is a sensor of malfunction of the common tumor suppressor pathways. *Blood*, 2002, 99(4): 1411-1418.
- 4 Ruas M, Peters G. The p16INK4a, CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1378(2): F115-177.
- 5 Stott FJ, Bates S, James MC, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*, 1998, 17(17): 5001-5014.
- 6 Bates S, Ryan KM, Phillips AC, et al. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene*, 1998, 17(13): 1691-1703.
- 7 Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, et al. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 1996, 271(5256): 1744-1747.
- 8 Sato F, Harpaz N, Shibata D, et al. Hypermethylation of the p14 (ARF) gene in ulcerative colitis-associated colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*, 2002, 62(4): 1148-1151.
- 9 Dimri GP, Itahana K, Acosta M, et al. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14 (ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(1): 273-285.
- 10 Karayan L, Riou JF, Seitz P, et al. Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity. *Oncogene*, 2001, 20(7): 836-848.

(收稿:2002-08-14 修回 2002-12-21)

(本文编辑 张世雯)

• 会议消息 •

2003 年中国上海国际肺癌论坛会讯

受中国抗癌协会肺癌专业委员会委托,由上海市胸科医院、上海市肺部肿瘤临床医学中心主办的 2003 年国际肺癌论坛会,因故改于 2003 年 11 月 10、11 日在上海召开,主要内容为肺癌多学科治疗,特别是手术多学科治疗。大会专题包括:1)手术为主多学科治疗肺癌的动向和趋势;2)CT 在肺癌临床分期中的应用和评价(包括图象融合技术);3)PET 在肺癌临床分期中的应用和评价;4)肺癌分子病理学期在辅助治疗中的探索;5)化疗后分子生物学的改变及其对预后的影响;6)肺癌放射治疗在 NSCLC 多学科治疗中的作用和前景;7)肺癌围手术期生物治疗的研究动向;8)非小细胞肺癌手术规范;9)肺癌扩大性手术的应用指征及进展;10)肺癌手术为主多学科治疗中外科有关问题探讨;11)化疗对肺癌患者手术的影响及外科处理特点;12)荧光支气管镜及支气管腔内超声对肺癌的术前评估及术后随访;13)小病灶肺癌的外科处理及纵隔淋巴结规范清扫;14)肺癌术中呼吸道处理新进展;15)围手术期化疗的临床随机研究等。本次会议将有北美、欧洲、日本学者以及中国著名肺癌专家廖美琳、周允中、周清华、吴一龙、张汝刚等作精彩报告。同时有全国各大医院有关肺癌专业同道 200 余名参加,专题讲座目的为抛砖引玉,集思广益,通过争议,取得共识,推动发展。相信本次会议是一次高水平的学术交流。