

非小细胞肺癌中 CDK4I 的表达及其与预后关系的探讨

陈晓峰,丁嘉安,王律,王海峰

(上海市肺科医院胸外科,上海 200433)

[摘要] 目的 探讨 CDK4I 基因产物在人非小细胞肺癌中的表达及其与预后之间的关系。方法 应用免疫组化法对 146 例人非小细胞肺癌中的 CDK4I 基因产物表达进行了研究,并以 20 例正常肺组织作对照。结果 肺癌 CDK4I 表达水平(58.82%)明显低于正常肺组织(82.06%) ($P < 0.05$)。CDK4I 表达水平降低的程度与肺癌的转移有密切关系 ($P < 0.05$),而与肺癌的原发肿瘤大小,组织学类型,肿瘤部位和患者年龄均无明显关系 ($P > 0.05$)。CDK4I 高表达组术后 3 年及 5 年生存率明显高于低表达组 ($P < 0.05$)。结论 CDK4I 基因可能参与人非小细胞癌的发生、发展和转移过程。

[关键词] 肺肿瘤;CDK4I; 基因表达; 预后

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-8664(2002)02-0025-03

The expression of CDK4I gene product and its relationship with prognosis in non-small cell lung cancer

CHEN Xiao-feng, DING Jia-an, WANG Lu, et al.

Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pneumology Hospital, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** In order to explore the expression level of CDK4I gene and its relationship with the metastasis and prognosis in human non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Expression level of CDK4I gene product was detected in 146 non-small cell lung cancer samples and in 20 normal lung tissues as control by immunohistochemistry. **Results** The expression level in lung cancer (58.82%) was significantly lower than that in control group (82.06%) ($P < 0.05$). The degree of decreased expression of CDK4I gene product in lung cancer was closely related to cell differentiation, stages and metastasis of the cancer ($P < 0.05$), but not to the size, histological classification and location of the cancer and ages of patients ($P > 0.05$). The 3- and 5-year survival rates of patients with high CDK4I expression were significantly higher than those with low CDK4I expression ($P < 0.05$). **Conclusion** CDK4I gene may be involved in the oncogenesis, development and metastasis of human non-small cell lung cancer.

[Key words] pulmonary neoplasms; CDK4I; gene expression; prognosis

本研究应用免疫组织化学法研究了 CDK4I/p16 基因产物的表达及其存在的状态,以及与肺癌的转移和预后之间的关系,现将结果报告如下。

材料与方 法

一、组织标本 随机收集 1993~1994 年胸外科手术切除的非小细胞肺癌标本 146 例,所有患者术前均未接受过化疗和放疗,其中鳞癌 59 例,腺癌 57 例,腺鳞癌 30 例。取同期切除的肺良性疾病标本 20 例。术前常规行胸、头颅 CT、全身骨扫描检查、B 超或 CT 检查腹部。手术中所有患者均打开纵隔胸膜清扫上、下纵隔及肺门淋巴结,所有淋巴结均按组分装送验。标本用福尔马林固定,石蜡包埋,制成 5 μ m 厚切片,经 HE 染色观察,病理学分级和 TNM 分期按 1997 年最新国际抗癌联盟标准。I 期 40 例、II 期 10 例、III 期 82 例、IV 期 14 例。

二、免疫组化染色 (LSAB 法) 免疫组化试剂盒购于美国 vector 公司,CDK4I 多克隆抗体为美国 Santa cruibioleology Inc 原装产品。病理切片先经微波炉

处理,具体方法按说明书进行。每批染色设立阴性空白对照。(以 PBS 代替一抗),同时用已知阳性表达的肺癌组织切片作阳性对照。以细胞呈清晰棕黄色颗粒染色为阳性,在 400 倍光镜下找 5~10 个视野,每个视野数 100~200 细胞共计 1000 个癌细胞,再计算出每张切片上 CDK4I 阳性染色的百分数。

三、统计学处理 所有病例生存以手术之日算起。随访到 1999 年 3 月。共随访 134 例,随访率 91.78%。按寿命表计算 1~5 年累积生存率,用 kaplan-Meier 生存曲线表示。实验数据及随访资料采用 t 检验、F 检验、对数秩和检验。

结 果

一、CDK4I 基因的表达:肺癌组织 CDK4I 表达阳性率为 58.82%,癌旁组织为 71.15%,正常肺组织为 82.06%。三组之间比较有显著性差异 ($P < 0.05$); 两两比较发现,肺癌组与癌旁组和正常肺组织之间有显著差异 ($P > 0.05$),癌旁组与正常肺组织之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

二、CDK4I 的表达与肺癌的临床及病理间关系: CDK4I 的表达与患者的性别、年龄、吸烟无明显关系 ($P > 0.05$)。在肺癌原发灶大小之间,在中央型与周

收稿日期:2001-02-20

作者简介:陈晓峰(1964-),男,河北人,硕士,副主任医师。主要从事肺癌的临床外科与分子生物学研究。

围型肺癌之间比较 CDK4I 表达水平均无显著差异 ($P > 0.05$)。在肺癌原发灶与肺癌转移灶之间,在肺癌的组织学类型之间、TNM 分期之间、有无淋巴结转移以及肺癌细胞分化程度之间 CDK4I 的表达见表 1。

表 1 CDK4I 基因产物表达情况

项 目	例数	CDK4I 蛋白表达		P 值
		均数(%)	标准差(%)	
淋巴结转移状态				
N ₀	40	65.45	4.92	P<0.05
N ₁₋₃	98	53.33	3.87	
TNM 分期				
I	40	69.34	3.60	P<0.05
II	10	64.46	5.61	
III	82	56.87	4.90	
IV	14	49.12	3.18	
细胞分化程度				
中-高分化	87	64.72	3.99	P<0.05
低分化	59	51.40	4.03	
不同肺组织				
正常肺组织	20	82.06	0.42	P<0.05
癌旁组织	146	71.15	1.61	
肺癌组织	146	58.82	4.89	
原发灶与转移灶				
原发癌	98	60.41	3.88	P<0.05
转移癌	98	41.88	6.47	
肿瘤大小(T)				
T ₁ + T ₂	71	62.67	3.74	P>0.05
T ₃ + T ₄	75	56.28	4.90	

表 2 10 个临床病理指标对肺癌术后预后影响的多因素分析

变 量	风险比	95%的可信区间	P 值
CDK4I 表达	-2.455	[-2.701 -0.274]	0.031
TNM 分期	-1.843	[-2.343 0.275]	0.075
淋巴结转移(有、无)	-0.342	[-2.317 1.579]	0.724
年龄	1.618	[-0.028 0.101]	0.145
肿瘤部位	1.237	[0.173 2.623]	0.183
吸烟(有、无)	0.613	[0.987 1.012]	0.591
远处转移(有、无)	-0.365	[-2.416 1.581]	0.737
肺癌细胞分化程度	-1.082	[-1.618 0.464]	0.281
性别(男、女)	0.536	[1.737 1.014]	0.618
手术方式(根治、姑息)	-1.831	[-2.334 0.281]	0.043

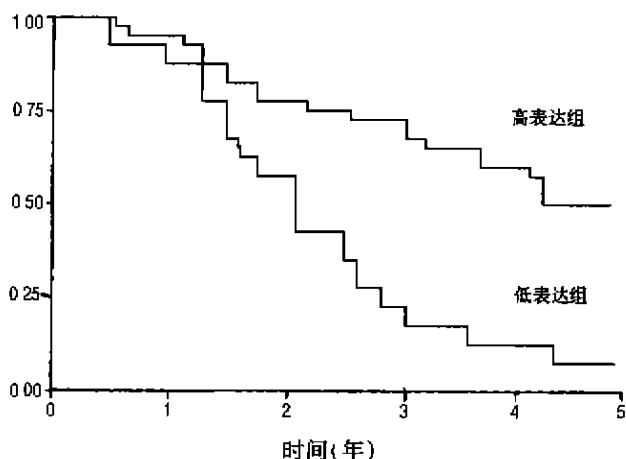


图 两组总生存率 Kaplan-Meier 曲线

三、CDK4I 在肺癌术后预后中的作用:本研究将 CDK4I 表达水平分为高表达组(阳性率 $> 55\%$)和低

表达组(阳性率 $\leq 55\%$)。高表达组术后 3 年生存率为 70.13%,5 年生存率为 54.18% 而低表达组 3 年为 31.26%,5 年生存率为 19.43%,两组 3 年及 5 年生存率之间比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)Kaplan-Meier 生存曲线见图。

四、COX 比例风险模型分析:本研究应用 COX 比例风险模型对 CDK4I 的表达情况、TNM 分期、淋巴结有无转移、原发肿瘤大小(T)、患者年龄、肺癌细胞分化程度、吸烟与否、患者性别、肿瘤部位、手术方式 10 个临床病理指标做多因素分析,以决定每个因素单独对预后的影响;结果如表 2。从表中可知 CDK4I 与手术方式(根治、姑息)是独立的与预后相关的因素。

讨 论

CDK4I 基因也称 p16 基因是一种抑癌基因,其编码的蛋白产物为细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4I)抑制因子,CDK4I 基因定位于人类第 9 号染色短臂。cDNA 全长为 444bp,含有 3 个外显子和 2 个内含子,是一个编码 148 个氨基酸的开放阅读框架,其中 5'端 126bp 区域为第 1 外显子,中间 307bp 为第 2 外显子,3'端 11bp 区域为第 3 外显子。第 2 外显子代表编码区的主要部份。CDK4I 基因的改变也常发生在该区域,它的表达产物能与 CDK4 结合,抑制 CDK4-CyclinD 复合物的催化活性,从而抑制了细胞分裂和恶性转化^[1]。当 CDK4I 基因突变或缺失时 CDK4I 蛋白则不能正常表达,不能结合 CDK4,从而不能阻止细胞分裂,导致细胞增生失去控制。用 CDK4I 转染有 CDK4I 缺失的肿瘤细胞株,则使肿瘤细胞的生长受到抑制^[2]。Reed 等^[3]应用免疫组化法研究发现分化程度高的恶性黑色素瘤 CDK4I 蛋白表达低。Kelley 等^[4]应用 PCR 分析人肺癌细胞株发生非小细胞肺癌 CDK4I 基因缺失率为 1%。本研究结果表明,CDK4I 蛋白表达水平与肺癌的组织学类型、肺癌发生的部位、原发肿瘤的大小,患者年龄及性别之间比较,均无显著差异 ($P > 0.05$);而 CDK4I 蛋白表达越低肺癌细胞分化程度越低,TNM 分期越晚,越容易出现淋巴结转移,肺癌转移灶中的 CDK4I 蛋白表达明显低于原发灶 ($P < 0.05$)。最近的研究,认为 CDK4I 蛋白是真核细胞增殖的强烈抑制,是真核细胞生长周期的“闸门”,对维持增殖分化平衡起重要作用。与 p53 不同的是,CDK4I 特异性作用于 CDK4 而不影响其它激酶系列^[1,2]。

我们的研究表明:肺癌组织 CDK4I 表达阳性率为 58.32%,癌旁组织为 71.15%,正常肺组织为 82.06%。三组之间比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。CDK4I 的表达与患者的性别、年龄、吸烟与否无明显关系 ($P > 0.05$)。在肺癌原发灶大小之间,在中央区

与周围型肺癌之间比较 CDK4I 表达水平均无显著差异($P>0.05$)。在肺癌原发灶阳性率为 60.41%, 明显高于转移灶(淋巴结)的阳性率 41.88% ($P<0.05$)。无淋巴结转移的肺癌阳性率 65.45%, 明显高于有淋巴结转移的肺癌组织阳性率 53.33% ($P<0.05$)。中一高分化的肺癌组织阳性率 64.72%, 明显高于低分化的肺癌组织的阳性率 51.40% ($P<0.05$)。并且随着 TNM 分期越晚, 肺癌组织的阳性表达率越低 ($P<0.05$)。提示 CDK4I 基因表达的阳性率越高, 其肺癌组织的转移趋势越低, 其恶性程度越低, 也证实 CDK4I 确实为一种抑癌基因而起作用。

我们的研究结果也显示: 肺癌组织中 CDK4I 的表达高与低直接关系到患者的预后, 高表达组 5 年生存率为 54.18%, 而低表达组 5 年生存率为 19.43%, 两者比较有显著差异 ($P<0.05$)。用 COX 比例风险模型进行多因素分析, 以确定包括 CDK4I 的表达、TNM 分期、淋巴结转移状态、原发肿瘤大小(T)、患者年龄、肺癌细胞分化程度、吸烟与否、患者性别、肿瘤部位、手术方式(是否根治)10 个临床病理指标, 以确定某个因素是否可做为独立的判断预后的根据, 结果表明 CDK4I 与手术方式(是否根治)是独立的与预后相关的因素。

本研究提示 CDK4I 基因可能参与调控肺癌细胞的分化、癌细胞的浸润及癌细胞的转移过程, CDK4I

基因产物表达水平降低与肺癌的发生、发展和转移密切相关。这可能与部分 CDK4I 基因突变使其产物的蛋白构象发生改变, 生物半衰期延长, 以及 CDK4I 基因表达与 Rb 失活之间的交互性, 使得部分 CDK4I 蛋白表达过量有关^[5,6]。另一方面肺癌的预后可能与多种基因调控有关。总之, 肺癌中 CDK4I 基因产物表达异常的确切机理以及两者之间的关系有待于更深入研究。

参 考 文 献

- [1] Serrano M, Hannon CJ, Beach DA. New regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4I[J]. Nature, 1993, 366(6454): 704-707.
- [2] Nobori T, Mlurak, Wu DJ, et al. Deletion of the cyclin dependent kinase 4 inhibitor in multiple human cancer[J]. Nature, 1994, 368(6473): 753-756.
- [3] Arap W, Niskawa, R, Furnari FB, et al. Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth[J]. Cancer Res, 1995, 55(6): 1351-1354.
- [4] Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16 INK4[J]. Cancer Res, 1994, 54(22): 5816-5820.
- [5] Reed JA, Loganzo J RF, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin dependent kinase inhibitor suppressor genes in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression[J]. Cancer Res, 1998, 55(13): 2713-2718.
- [6] 谭卫林, 王元如, 董俊瑞等. 不同病理类型结直肠癌中 MTS1 基因的表达[J]. 中华实验外科杂志, 1998, 15(6): 499-500.

原发性输卵管癌误诊为卵巢癌两例报道

杨丽型 (解放军第二零一医院特诊科, 辽宁省辽阳市 111000)

[中图分类号] R7373.32 [文献标识码] B [文章编号] 1005-8664(2002)02-0027-01

例 1: 48 岁, 阴道排粉红色水样物 3 月, 妇检: 宫颈光滑, 附件右侧增厚, 左侧可触及一直径 6cm 质硬包块, 固定, 无压痛。超声: 子宫内膜厚 0.6cm, 肌层回声均匀, 左附件区见 6.0×3.3cm 以实性为主的囊实混合性肿块, 右附件区见 2.3×2.2cm 强回声为主肿块。彩色多普勒显示: 左附件区肿块血流信号丰富, 可采集到动脉血流频谱, RI 0.8。子宫直肠窝探及约 4.7cm 液性暗区。超声诊断: 1、双附件区占位性病变, 考虑卵巢恶性肿瘤。2、腹水。术中所见: 子宫正常大小, 左卵巢增大 7×6×6cm, 不规则, 下 1/2 与盆壁肠管粘连, 其下端深入直肠子宫韧带侧窝, 固定不动, 左输卵管与卵巢及周围组织粘连。右卵巢 4×3×3cm, 与右盆壁粘连, 右输卵管正常, 深黄色腹水约 600ml。手术诊断: 卵巢癌 II 期。病理诊断: 左输卵管低分化腺癌, 肿瘤约 7×7×7cm, 并见右侧附件转移性结节, 大小约 3×3×2cm。

例 2: 57 岁, 因腹胀, 纳差 3 月入院, 超声诊断: 1、盆腔多发囊实混合性结节, 考虑卵巢恶性肿瘤。2、腹腔内肠管及大网膜低回声结节, 肿瘤转移所致, 网膜饼形成。3、腹腔内大量游离液体。腹腔探查: 放出淡红色腹水约 6000ml, 子宫萎缩, 右输卵

管增粗, 表面肿瘤点状种植, 右侧卵巢增大约 5×3×4cm, 表面种植菜花样肿瘤, 与子宫后壁粘连。左侧卵巢质硬, 与输卵管粘连, 亦见多个肿瘤小结节, 与阔韧带粘连。肝表面、膈表面均有粟粒样结节, 胃之浆膜表面、两侧升结肠布满结节, 大网膜饼状 10×7×5cm, 与腹壁粘连, 病理诊断: 右输卵管低分化实性癌, 伴双侧卵巢转移, 网膜及盆腹腔广泛转移。

讨论: 原发性输卵管癌临床十分少见, 其术前确诊率很低, 常被误诊为卵巢癌。术前误诊原因: 1、原发性输卵管癌十分少见, 常被忽视。2、输卵管位于盆腔内不易被发现。3、肿瘤发展早期症状不明显, 缺乏可靠的临床诊断方法, 常与其它妇科肿瘤相混淆。因此要提高对本病的认识, 凡有下列情况, 应考虑输卵管癌的可能: 1、有输卵管临床三联症即阴道排液、腹痛、腹块; 2、有持续的不规则子宫出血, 尽管细胞学涂片阴性或子宫内膜检查阴性; 3、绝经前后发现附件包块, 并借助下列辅助检查, 诊断性刮宫、宫腔细胞学检查、超声、CT、腹腔镜、宫腔镜及血清 CA125 测定。到目前为止, CA125 是输卵管癌仅有的较有意义的肿瘤标志物, CA125 可作为诊断和随诊原发性输卵管癌的标志。但输卵管癌并卵巢转移时, 术中有时也难以作出明确诊断, 需病理学诊断确诊。原发性输卵管癌病理诊断要点: 肿瘤来源于输卵管内膜, 出现输卵管黏膜上皮的组织形式, 可见到正常上皮至癌变上皮的过渡形态, 子宫内膜及卵巢若出现癌灶, 组织学检查应符合转移癌。

收稿日期: 2001-03-21

作者简介: 杨丽型(1972-), 女, 瓦房店人, 医师, 从事特诊专业。