

非小细胞肺癌中 CDK4 I /P16 的表达及 与淋巴转移关系的研究

附院肿瘤科(046000) 陈晓峰 苏晋梅

华西医科大学附属第一医院 周清华 张尚福 杨桦 成娘

R 734.202

摘要 为研究 CDK4 I /P16 与非小细胞肺癌的发生及发展的关系,应用免疫组化 LSAB 法研究了 83 例肺癌手术标本中 CDK4 I 蛋白的表达。结果显示,CDK4 I 蛋白表达总的平均阳性率为 65.93%。P16 蛋白表达与肺癌的临床分期,组织学分类、肺癌原发部位、患者的年龄及有淋巴结转移的原发灶与无淋巴结转移的原发灶之间比较无显著差异($P>0.05$),中一高分化的肺癌(77.95%)与低分化的肺癌(53.05%)之间有显著差异($P<0.01$);肺癌的原发灶(64.16%)与相应转移灶(淋巴灶)(53.66%)之间有显著差异($P<0.01$)。肿瘤大小 T1+T2(68.90%)与 T3+T4(60.83%)之间差异显著($P<0.05$)。本研究结果表明 CDK4 I 蛋白检测可以作为人非小细胞肺癌的抑制基因,并可能是肺癌术后预后的重要指标之一。

关键词 肺癌;CDK4 I /P16 基因表达;淋巴结转移

P16 基因又称 CDK4 I (Cyclin - dependent kinase 4 inhibitor, Serrano 等^[1]1993 年在与细胞周期依赖激酶(CDK)相结合蛋白的研究中,用酵母双杂合蛋白作用筛选法系统研究与 CDK4 作用的蛋白,在 SV40T 抗原转化细胞中发现并分离了特异性的周期蛋白依赖性激酶 4 抑制蛋白(CDK4 I) - P16 蛋白,并克隆了 cDNA, P16 基因定位于 9P21, 编码分子量 15.845KD 蛋白。研究 P16 的蛋白表达与肺癌的关系对阐明肺癌的发生发展及寻找新的肿瘤标志物有重要理论意义。本研究用免疫法分析了 83 例肺癌手术标本中 P16 蛋白表达及与淋巴结转移的关系报道如下:

1 材料与方

1.1 材料取自华西医大附一院胸外科 1993 年 1 月 - 11 月间。手术切除的非小细胞肺癌标本 83 例,所有患者术前均未进行化疗和放疗。标本用 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,制成 5um 厚切片。经 HE 染色组织学观察明确诊断。其中鳞癌 45 例,腺癌 27 例,腺鳞癌 11 例。最大年龄 77 岁,最小年龄 25 岁。病理学分级和 P-TNM 分期按 1988 年国际抗癌联盟标准, I 期

22 例, II 期 8 例, IIIa 39 例, IIIb 6 例, IV 8 例。

1.2 免疫组织化学染色:采用链亲合素 - 生物标记法(Labelled streptavidin - biotin method LSAB)。免疫组化试剂盒购于美国 Vector 公司, P16 多克隆抗体为美国 Santa Cruz Biotechnology Inc 产品,病理切片先经微波炉处理,然后按 LSAB 法进行染色,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做阳性的对照。

1.3 结果判定:根据细胞或细胞核和细胞浆同时显示棕黄色颗粒为阳性,每张切片在 400 倍显微镜下顺序找 5~10 个视野,每个视野数 100~200 个细胞,共计 1000 个细胞来决定出每张切片上肺癌细胞 P16 蛋白阳性表达的百分数。

1.4 统计:用角度转换处理以上每个百分数,用美国 Stata 软件行 t 检验、F 检验和秩和检验。

2 结果

2.1 P16 蛋白表达与原发癌及转移灶的关系有淋巴转移的肺癌原发灶阳性表达率为 64.

16%,而转移灶(淋巴结)的阳性表达率为 53.66%,两者之间比较有显著差异($P < 0.01$),见表 1。

2.2 P16 蛋白表达与肺癌细胞分化程度关系中一高分化的肺癌阳性为 77.95%,而低分化肺癌阳性率为 53.05%,两者之间比较差异显著($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 P16 蛋白表达与原发肿瘤大小(T)的关系 肺癌患者中,T1+T2 阳性率为 68.90%,而 T3+T4 阳性率为 60.83%,两者之间比较有显著差异($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 P16 蛋白表达与临床分期、组织学类型、肿瘤原发部位、淋巴结转移状态、患者的年龄之间均无明显关系($P > 0.05$),见表 1。

3 讨论

CDK4 I /P16 基因是一种抑癌基因,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 P16 基因突变或缺失时 P16 蛋白则不能正常表达,不能结合 CDK4,从而不

表 1 CDK4 I /P16 蛋白表达与非小细胞肺癌临床及病理参数关系

项 目	例 数	P16 蛋白表达		P 值	项 目	例 数	P16 蛋白表达		P 值
		均数(X)(%)	标准差(%)				均数(X)(%)	标准差(%)	
年龄					组织学类型				
<50 岁	20	67.20	3.03	$P > 0.05$	肺癌	27	68.18	3.12	$P > 0.05$
50-60 岁	32	67.36	1.02		鳞癌	45	63.48	2.13	
>60 岁	31	61.66	2.03		腺癌	11	61.01	1012	
临床分期					淋巴结转移				
I + I	28	67.07	3.64	$P > 0.05$	No	40	67.67	3.02	$P > 0.05$
II + IV	55	65.16	4.41		N1-3	43	64.16	2.73	
原发肿瘤大小					肿瘤位置				
T1+T2	37	68.90	3.33	$P < 0.05$	中央型	52	66.81	4.26	$P > 0.05$
T3+T4	46	60.83	3.76		周围型	31	61.90	4.19	
细胞分化程度					原发癌与转移灶				
中-高分化	54	77.95	2.01	$P < 0.01$	原发癌	43	64.16	2.73	$P < 0.01$
低分化	29	53.03	3.48		转移灶	43	53.66	6.29	

能阻止细胞分裂;同时增加 CyclinD 与 CDK4 结合,促进细胞分裂,导致细胞增生失去控制,用 P16 转染有 P16 缺失的肿瘤细胞株,则使肿瘤细胞的生长受到抑制^[2]。Tam 等^[3]在人双倍体成纤维细胞中已证实在细胞的 S 期始,当 Rb (retinoblastoma Protein) 的活性降低时,P16 水平将升高,但是具体控制支配 P16 表达的机理还不清楚。Reed 等^[4]应用免疫组化方法发生分化程度高的恶性黑色素瘤之 P16 蛋白表达率高,已发生转移的恶性黑色素瘤之 P16 蛋白表达低。shimizu 等^[5]应用 PCR-SSCP 分析人肺癌标本 2/15 有 P16 基因突变。Kelley 等^[6]应用 PCR 分析人肺癌细胞株发生非小细

胞肺癌 P16 基因纯合性缺失率 23.%,小细胞肺癌 P16 基因纯合缺失率为 1%。

我们应用免疫组化研究 83 例非小细胞肺癌,P16 蛋白表达水平与肺癌的临床分期、组织学类型、肺癌原发部位、患者的年龄及淋巴结转移状态之间比较,均无显著差异($P > 0.05$);中-高分化的肺癌(77.95%)与低分化的肺癌(53.05%)之间比较,有显著差异($P < 0.01$);肺癌的原发灶(64.16%)与转移灶(淋巴结)(53.66%)之间比较,有显著差异($P < 0.01$);原发肿瘤大小 T1+T2(68.90%)与 T3+T4(60.83%)之间比较,有显著差异($P < 0.05$);本研究结果与 Reed 等^[4]的研究结果相似,也与

Kamb 等^[7]人所期待的 P16 的抑癌功能相吻合,从表 1 可见,P16 蛋白随着肿瘤浸润深度的发展,细胞分化程度的降低,阳性表达率逐渐下降。我们认为,CDK4 I /P16 基因在人非小细胞肺癌中可以作为肿瘤抑制基因,并且可以作为肺癌基因治疗的候选基因。

参考文献

1. serrano M, Hannon GJ, Beach DA. New regulatory motif in cell - cycle control causing appcific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993, 366(6454): 704-707
2. Arap W, Niskawa R, Furnari FB, et al. Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res*, 1995, 55(6): 1351-1354
3. Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin - dependent kinase 4 inhibitor P16 INK4. *Cancer Res*, 1994, 54(22): 5816-5820.

4. Reed JA, Loganzo J rF, shea CR, et al. Loss of expression of the P16/cyclin - dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gens in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progressaion. *Cancer Res*, 1995, 55(13): 2713-2718
5. Shimizu T, Sekiya T. loss of heterozygosity at 9p21 loci and mutations of the MTS1 and MTS2 genes in human lung cancers. *Int J Cancer*, 1995, 63(5): 616-621
6. Kelley MJ, Nakagawa K, Steinberg SM, et al. Differential inactivation of CDKN2 and Rb Protein in non - small - cell and small - cell lung cancer cell lines. *JNCI*, 1995, 87(11): 756-761
7. Kamb A, Gruis NA, Weaver - Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *science*, 1994, 264(5158): 432-440

✱ 进修生

(收稿日期: 1997-11-04)

CDK4I/P16 expression and it's correlation with metastatic cancer of lymph node in human non - small cell cancer.

Chen Xiaofeng, Su jingmei, Zhou Qinghua, et al.

Department of Microbiology changzhi Medical College(046000)

abstract Using Labelled streptavidin - biotin (LSAB) method, we examined the expression of cyclin - dependent kinases 4 inhibitor/P16(CDK4 I') in 83 cases of human non - small cell lung cancer, the average rate of P16 protein positive expression was 65. 93%; The positive expression werw higher in moderate - well differentiation of tumor cell (77. 95%) than in poorly differentiation (53. 0. %) ($P < 0. 01$), higher incidnce of P16 positive expression were found in primary lesions (64. 16%) than in metastatic lesions (the metastatic cancer of lymph node) (53. 66%). There were also sognificant differences between T1 + T2 (68. 90%) in tumor size and T3 + T4 (60. 83%) in. There were not significant differentiation between the clinical stage, between the pathological types of the carcinoma, and between primary sites, between metastatic status of lymph node and between patients, ages ($P > 0. 05$). The results suggest that CDK4 I /P16 gene may be the suppressor gene in human non - small cell lung cancer and a Key index judging prognosis of postoperative patients of lung cancer.

Key words Lung cancer; CDK4I/P16; Genetic expression; Lymphatic metastasis