

组织芯片检测 p16 蛋白在不同胃组织中的表达意义

郭玉凤^{1,2}, 张志伟^{1,3}, 贺修胜^{1,3}, 汤国辉⁴, 谢妮⁴, 杨科¹

(1. 南华大学医学院肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南文理学院体育学院, 湖南 常德 415000; 3. 南华大学肿瘤细胞与分子病理学湖南省高校重点实验室, 湖南 衡阳 421001; 4. 南华大学附属南华医院, 湖南 衡阳 421001)

摘要: [目的] 分析胃癌相关差异表达蛋白 p16 在不同胃组织中的表达意义, 为临床早期发现胃癌及评估胃癌患者预后提供有价值的资料。[方法] 采用免疫组织化学染色, 检测胃组织芯片 (包括正常胃黏膜、癌旁、非典型增生、胃癌及淋巴结转移癌组织) 中 p16 蛋白的表达, 分析其在胃癌组织中表达与临床病理特征的关系。[结果] p16 蛋白在正常胃黏膜、癌旁、非典型增生和胃癌组织中的表达率分别为 76.47% (26/34)、79.59% (39/49)、34.62% (9/26) 和 8.64% (7/81); p16 蛋白在胃癌组织中阳性表达率较正常胃黏膜、癌旁组织和非典型增生组织降低 ($P < 0.01$), 而非典型增生组织中阳性表达率较正常胃黏膜和癌旁组织降低 ($P < 0.05$); p16 蛋白表达与胃癌患者年龄、肿块大小和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。[结论] p16 蛋白表达与胃癌的发生发展、患者年龄、肿块大小及淋巴结转移有关。

主题词: 胃肿瘤; p16 蛋白; 临床病理学; 免疫组织化学

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)10-0746-04

Significance of p16 Protein in Different Gastric Tissues Detected by Tissue Array

GUO Yu-fen^{1,2}, ZHANG Zhi-wei^{1,3}, HE Xiu-sheng^{1,3}, et al.

(1. Cancer Research Institute of Medical College, University of Southern China, Hengyang 421001, China; 2. School of Physical Education, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China; 3. University Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology in Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: [Purpose] To analysis the expression of gastric cancer related differential expression protein p16 in various gastric tissues, and to provide valuable data for clinical early detection and prognosis evaluation. [Methods] The expression of p16 protein was analyzed by immunohistochemistry in gastric tissue array including normal gastric mucosa, paracancerous tissue, atypical hyperplasia tissue, gastric cancer tissue and metastatic lymph node. The relationship between expression of p16 and clinicopathologic features in gastric cancer were analyzed. [Results] The expression rate of p16 protein was 76.47% (26/34), 79.59% (39/49), 34.62% (9/26) and 8.64% (7/81) respectively in normal gastric mucosa tissue, paracancerous tissue, atypical hyperplasia tissue and gastric cancer tissue. The positive rate of p16 protein in gastric cancer tissue was lower than that in normal gastric mucosa tissue, paracancerous tissue and atypical hyperplasia tissue ($P < 0.01$). The positive rate in atypical hyperplasia tissue was lower than that in normal gastric mucosa tissue and paracancerous tissue ($P < 0.05$). The expression of p16 protein related to age, size of tumor and lymph node metastasis of gastric cancer ($P < 0.05$). [Conclusion] The expression of p16 protein relates to cancer progress, age, size of tumor and lymph node metastasis of gastric cancer.

Subject words: gastric neoplasms; p16 protein; clinicopathology; immunohistochemistry

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤, 每年新

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金(10K052); 湖南省研究生科研创新项目(CX2010B380); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(CXSY-SJ-09007, CXSY-SJ-10192); 湖南省教育厅科研项目(11C1112); 衡阳市科技局科研项目(2011kj52, 2011kj53)

通讯作者: 张志伟, 副教授, 硕士生导师, 博士; 南华大学肿瘤研究所, 湖南省衡阳市常胜西路 28 号(421001); E-mail: zhangzhiweichina@yahoo.com.cn。

贺修胜, 博士生导师, 博士; 南华大学肿瘤研究所, 湖南省衡阳市常胜西路 28 号(421001); E-mail: hexiusheng@hotmail.com。

收稿日期: 2012-06-11; **修回日期:** 2012-07-14

发现病例约 40 万, 严重威胁着人们的健康与生命, 是当前危害我国人民身体健康的重大疾病^[1]。大量的研究显示^[2~5], 胃癌中存在众多基因的表达异常, 不同基因的表达与胃癌的组织学类型、肿瘤的分化程度、转移及耐药等密切相关, 对早期诊断与发现、临床治疗、评估和预测胃癌患者预后具有十分有价值的作用。我们课题组前期从正常胃黏膜、非典型增

生胃黏膜、胃癌组织中筛选到一系列胃癌相关的差异表达蛋白质^[6-8],包括 p16、vimentin、CK19、c-JNK2 和 p21 蛋白等,本文选取其中的 p16 蛋白,分析其在正常胃黏膜、癌旁、非典型增生、胃癌及淋巴结转移癌组织中的表达及临床病理学意义。

1 资料与方法

1.1 临床病理资料

胃组织芯片^[9]由湘潭市第一人民医院吴勇军赠送,芯片包括 2003~2009 年湘潭市第一人民医院胃癌手术标本 81 例,其中男性 56 例,女性 25 例,平均年龄 55.35 岁(27~81 岁),常规病理诊断为高分化腺癌 5 例,中分化腺癌 17 例,低分化腺癌 59 例,其中淋巴结转移 55 例,同时取 49 例癌灶 10cm 以上胃黏膜组织作为对照。另外,收集非典型增生胃组织 26 例,正常胃黏膜 34 例。胃组织芯片中依据正常胃黏膜、癌旁、非典型增生、胃癌和淋巴结转移胃癌进行排列,每块组织芯片有 5×10 个点阵,右下方最后一排的最后孔为空白标记,以便确定方位顺序。所有患者术前均未进行放疗或化疗。

1.2 主要试剂

鼠抗人 p16 单克隆抗体及 SP 免疫组化检测试剂盒均购自福建迈新生物有限公司。

1.3 免疫组织化学染色

操作按照超敏 SP 试剂盒所附说明书进行,用 PBS 替代第一抗体作阴性对照,具体步骤如下:将制备好的石蜡切片经二甲苯脱蜡 2 次后水化;PBS 洗片 3×3min;将切片浸入枸橼酸盐缓冲液中抗原修复;加 3%过氧化酶阻断液,37℃ 15min;PBS 洗片 3×3min;滴加非免疫性动物血清,37℃ 10min;滴加鼠抗人 p16 蛋白单克隆抗体,4℃ 过夜;滴加生物素标记的二抗,37℃ 15min;滴加链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶溶液,37℃ 15min;DAB 显色、苏木素复染、返蓝、脱水、透明,封片,显微镜观察、照相。

1.4 免疫组织化学染色结果判定

以黄色、棕色、棕褐色颗粒沉淀为阳性表达。结果判定标准,选取不重复的 5 个视野,按染色强度及阳性细胞所占的百分比综合计分,染色强度:无色计为 1 分,黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞数:≤总数的 10%计为 1 分;11%~50%计为 2 分;大

于 50%计为 3 分。染色强度得分与阳性细胞数得分相乘,1 分计为阴性“-”;2~5 分计为阳性“+”,≥6 分计为强阳性“+++”,阳性细胞数>10%为阳性表达。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计进行数据处理和分析。p16 蛋白的表达采用 χ^2 检验和方差分析,组间的相关性分析采用 Spearman 等级相关进行比较,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p16 蛋白在不同胃组织中的表达情况

免疫组织化学染色结果显示,芯片中不同点阵的组织排列整齐,无脱落,阳性表达信号清楚,背景清洁,p16 蛋白阳性染色主要位于细胞浆和核(图 1)。

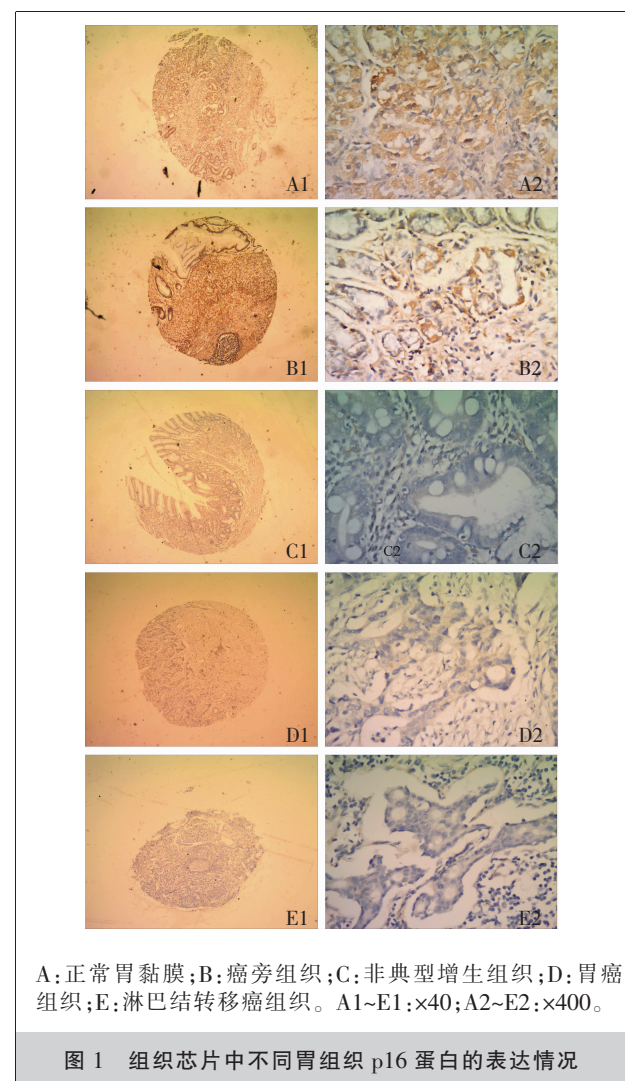


图 1 组织芯片中不同胃组织 p16 蛋白的表达情况

2.2 p16 蛋白在不同胃组织中的表达分析

p16 蛋白在正常胃黏膜、癌旁、非典型增生和胃癌组织中的表达率分别为 76.47% (26/34)、79.59% (39/49)、34.62% (9/26) 和 8.64% (7/81);p16 蛋白在胃癌组织中阳性表达率较正常胃黏膜 ($\chi^2=53.85, P=0.000$)、癌旁组织 ($\chi^2=67.22, P=0.000$) 和非典型增生组织 ($\chi^2=8.5, P=0.000$) 降低,而非典型增生组织中阳性表达率较正常胃黏膜 ($\chi^2=10.62, P=0.023$) 和癌旁组织 ($\chi^2=14.91, P=0.000$) 降低。

2.3 p16 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

p16 蛋白表达与胃癌患者年龄和肿块大小有关,两者小则表达率高 ($P<0.05$);另外,p16 蛋白表达与胃癌的淋巴结转移有关,转移的癌组织中表达率低 ($P<0.01$);而 p16 蛋白表达与性别、胃癌的分型以及 TNM 分期无关 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 p16 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

临床指标	例数	阳性率 (%)	χ^2	P
性别				
男性	56	5.36(3/56)	1.31	0.203
女性	25	16.00(4/25)		
年龄(岁)				
<40	12	33.34(4/12)	7.15	0.013
40~60	52	3.84(2/52)		
>60	17	5.88(1/17)		
肿瘤大小(cm)				
≤3.0	32	12.50(6/32)	4.89	0.034
>3.0	49	6.12(1/49)		
胃癌分型				
高分化腺癌	5	20.00(1/5)	0.04	0.401
中分化腺癌	17	11.76(2/17)		
低分化腺癌	59	6.78(4/59)		
淋巴结转移				
无	26	23.08(6/26)	7.59	0.000
有	55	1.69(1/55)		
TNM 分期				
I、II 期	32	15.63(5/32)	1.97	0.221
III、IV 期	49	40.82(2/49)		

3 讨 论

胃癌由于临床起病隐匿,早期症状不典型,容易发生早期浸润与转移,因此许多患者临床就诊时已为晚期^[10]。目前胃癌早期诊断技术缺乏,有效的治疗方法仍以手术为主,以致患者临床疗效和预后仍难不尽人意,许多患者 5 年生存率低,预后非常

差。因此,寻找早期诊断胃癌的分子标志物,对防治及评估患者预后具有十分重要的意义,也是现今防治胃癌研究的热点之一。

从蛋白质组学技术建立至今,其设备的更新与技术的完善日新月异,许多以往无法发现与鉴别的重要蛋白质被不断挖掘,但它们的功能及临床意义仍有待不断地深入研究。蛋白质组学方法获取蛋白信息时步骤多,常存在仪器和人为误差等^[11],影响结果的准确性与真实性,被鉴定的蛋白质的功能和临床应用,尚需后续的研究进行证实与补充。我们课题组前期通过多次从事胃癌相关蛋白质组学研究,筛选了一系列胃癌差异表达蛋白质^[6-8],为揭示胃癌的发生发展机制及寻找胃癌相关的肿瘤标志物提供了实验素材。为了进一步证实被鉴定蛋白质的差异表达及分析它们的临床病理学意义,本研究通过免疫组织化学染色,观察筛选获得的差异表达蛋白质 p16 在不同分化程度、不同病理学类型以及正常胃黏膜至胃癌恶变过程不同组织中的表达,分析其临床意义及临床应用价值。

p16 基因编码的 p16 蛋白是正常细胞周期的调控者,分子量为 15.8 kD,由 148 个氨基酸残基组成^[12]。细胞周期的完成需要周期依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinase,CDK)的参与,而 CDK 需要在细胞周期蛋白的结合下才被激活,同时也可被一系列蛋白质结合而被抑制,这些蛋白质即为周期依赖性蛋白激酶抑制剂(CKIs)^[13]。p16 蛋白就是一种周期蛋白依赖性激酶抑制因子,与周期蛋白(cyclin)竞争性结合周期依赖性蛋白激酶 CDK4 和 CDK6,抑制它们的活性,使其一系列底物(如视网膜母细胞瘤蛋白 Rb)持续去磷酸化,阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期,抑制细胞的增殖^[14]。

当 p16 基因失活不能正常表达时,细胞因不受 G₁ 关卡的限制而迅速增生,导致肿瘤的发生^[15]。p16 基因的缺失、点突变、缺失和启动子的甲基化异常均造成 p16 基因表达缺失,在多种人类肿瘤中广泛存在,而高频率的突变、缺失及甲基化情况与肿瘤的发生发展密切相关,变异 p16 在多种人类癌症中高频率发生^[16]。有研究认为 p16 表达与胃癌预后可能相关^[17]。目前,多种人类肿瘤中均存在 p16 基因的失活,与其他肿瘤有所不同的是,胃癌中 p16 基因表达异常并非基因缺失或突变所致,而是由于其启动子

区 CpG 岛甲基化异常引起^[18]。有研究发现,胃癌癌旁组织中 *p16* 基因甲基化异常与慢性萎缩性胃炎明显相关,与胃癌的发生密切相关^[19]。启动子区 CpG 岛甲基化的异常是 *p16* 基因失活的主要原因,可导致胃癌细胞中 *p16* 蛋白表达缺失,也是胃癌发生过程中的早期事件^[20]。由于 *p16* 对细胞周期的重要调控作用和其在多种肿瘤中均存在表达异常,我们推测 *p16* 在胃癌早期诊断和治疗中可能存在潜在的价值。目前已经发现,联合使用 *p16* 免疫组织化学染色和传统的 HE 染色能够大大提高宫颈癌的检出效率^[21]。我们的结果显示,随着胃黏膜组织恶性度的增加,*p16* 蛋白表达逐渐降低,提示该蛋白与胃癌的发生发展密切相关。*p16* 蛋白表达与患者年龄、肿块大小和淋巴结有关,预示着 *p16* 蛋白可以用于胃癌患者早期检测与预后的观察。

总之,本研究证实了课题组前期筛选的胃癌相关蛋白质 *p16* 的差异表达,检测了它们在不同胃组织类型、不同分化程度胃癌及淋巴结转移癌中的表达情况及与临床病理的联系,为进一步临床应用提供了非常有价值的实验依据。由于样本量有限,临床的推广仍需大样本检测评估。

参考文献:

- [1] Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(4):713-739.
- [2] Nguyen LT, Uchida T, Murakami K, et al. *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 12):1445-1453.
- [3] Fuccio L, Zagari RM, Eusebi LH, et al. Meta-analysis: can *Helicobacter pylori* eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? [J]. *Ann Intern Med*, 2009, 151(2):121-128.
- [4] Paoletti X, Oba K, Burzykowski T, et al. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis [J]. *JAMA*, 2010, 303(17):1729-1737.
- [5] Islami F, Sheikhattari P, Ren JS, et al. Gastric atrophy and risk of oesophageal cancer and gastric cardia adenocarcinoma—a systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(4):754-760.
- [6] 李艳兰, 贺修胜, 陈彦, 等. 胃腺癌组织蛋白质双向电泳图谱分析[J]. 南华大学学报(医学版), 2004, 32(3):278-282.
- [7] 陈彦, 贺修胜, 容映晖, 等. 胃癌组织及癌旁组织蛋白质双向电泳图谱的差异分析[J]. 中国医师杂志, 2004, 6(4):442-444.
- [8] 陈苏琼. LCM 结合定量蛋白质组学技术筛选胃癌组织差异表达蛋白质[D]. 衡阳: 南华大学, 2011.
- [9] 张志伟, 汤国辉, 赵强, 等. AKT-p27Kip1-Cyclin E 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(21): 2233-2240.
- [10] Dhalla F, da Silva SP, Lucas M, et al. Review of gastric cancer risk factors in patients with common variable immunodeficiency disorders, resulting in a proposal for a surveillance programme [J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 165(1):1-7.
- [11] Ransohoff DF. Proteomics research to discover markers: what can we learn from Netflix? [J]. *Clin Chem*, 2010, 56(2):172-176.
- [12] Choi JW, Lee JH, Kim YS. Frequent upregulation of cyclin D1 and *p16* expression with low Ki-67 scores in multinucleated giant cells [J]. *Pathobiology*, 2011, 78(4):233-237.
- [13] Wang XY, Wang YG, Wang YF. Ginsenoside Rb1, Rg1 and three extracts of traditional Chinese medicine attenuate ultraviolet B-induced G1 growth arrest in HaCaT cells and dermal fibroblasts involve down-regulating the expression of *p16*, *p21* and *p53* [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2011, 27(4):203-212.
- [14] El-Bahrawy M. Expression of *p16* in post-radiotherapy cervical biopsies [J]. *Histopathology*, 2011, 58 (7):1174-1176.
- [15] Al Dhaybi R, Agoumi M, Gagné I, et al. *P16* expression: a marker of differentiation between childhood malignant melanomas and Spitz nevi [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2011, 65(2):357-363.
- [16] Lundberg M, Leivo I, Saarilahti K, et al. Increased incidence of oropharyngeal cancer and *p16* expression [J]. *Acta Otolaryngol*, 2011, 131(9):1008-1011.
- [17] Hu SL, Kong XY, Cheng ZD, et al. Promoter methylation of *p16*, *Runx3*, *DAPK* and *CHFR* genes is frequent in gastric carcinoma [J]. *Tumori*, 2010, 96(5):726-733.
- [18] Bashir SA, Pandith AA, Yousuf A, et al. Lack of *p16* gene mutations in gastric cancers in Kashmir [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(2):339-342.
- [19] Tian H, Zhang N, Suo WH, et al. Gastrin suppresses the interdependent expression of *p16* and anion exchanger 1 favoring growth inhibition of gastric cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(6):1462-1474.
- [20] Ma J, He X, Wang W, et al. E2F promoter-regulated oncolytic adenovirus with *p16* gene induces cell apoptosis and exerts antitumor effect on gastric cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(7):1425-1431.
- [21] Huang LW, Pan HS, Lin YH, et al. *P16* methylation is an early event in cervical carcinogenesis [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(3):452-456.