

宫颈鳞癌组织与宫颈正常组织中 P16 P53 及 Beclin-1 的表达

张欣宁, 吴海燕, 刘永珠

基金项目: 广东清远市科技计划项目(编号:2015B044)

作者单位: 511500 广东, 清远市人民医院妇科

作者简介: 张欣宁(1981-), 女, 大学本科, 硕士学位, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤的诊治。E-mail: lemon-21@21cn.com

[摘要] **目的** 探讨 P16、P53、Beclin-1 三种蛋白在宫颈鳞癌组织及宫颈正常组织中的表达及临床病理意义。**方法** 应用免疫组化 SP 法检测宫颈正常组织组 40 例及宫颈鳞癌组织组 43 例 P16、P53 和 Beclin-1 蛋白表达水平。**结果** 宫颈鳞癌组织中 P16 及 P53 表达阳性率分别为 100.0% 和 86.0%, 高于宫颈正常组织的 5.0% 和 5.0% (P 均 <0.05), 其表达强度与宫颈鳞癌组织呈正相关。而 Beclin-1 在宫颈鳞癌组织中表达阳性率为 55.8%, 正常宫颈组织为 85.0% ($P < 0.01$), 表达强度与宫颈鳞癌组织呈负相关。**结论** P16、P53 蛋白及 Beclin-1 蛋白与宫颈鳞癌的发生发展相关, P16 和 P53 的表达随宫颈上皮恶变的进展而增加, 而 Beclin-1 在宫颈恶性病变中的表达明显下调。

[关键词] 宫颈癌; 宫颈正常组织; P16; P53; Beclin-1; 免疫组化

[中图分类号] R 737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2017)02-0114-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.02.05

Expressions of P16, P53 and Beclin-1 in cervical squamous cell carcinoma and normal cervical tissues

ZHANG Xin-ning, WU Hai-yan, LIU Yong-zhu. Department of Gynaecology, the People's Hospital of Qingyuan City, Guangdong 511500, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of P16, P53 and Beclin-1 in cervical squamous cell carcinoma (CSCC) and normal human cervical tissues and their relationships with clinicopathological parameters.

Methods The expressions of P16, P53 and Beclin-1 protein were detected by immunohistochemical (SP method) in 40 cases of normal human cervical tissues and 43 of CSCC. **Results** The expression rates of P16 and P53 in the CSCC were higher than those in the normal cervical tissues (100.0% vs 5.0% and 86.0% vs 5.0%) ($P < 0.05$), and the expression intensity was positively correlated with the level of cervical squamous cell carcinoma. The expression of Beclin-1 in the CSCC (55.8%) was lower than that in the normal cervical tissues (85.0%) ($P < 0.01$), and the expression intensity was negatively correlated with cervical squamous cell carcinoma. **Conclusion** The expression levels of P16, P53 and Beclin-1 protein are closely related to the development of CSCC. The expressions of P16 and P53 protein are increased with the progression of cervical epithelial malignant, and the expression of Beclin-1 is down-regulated in malignant cervical lesions.

[Key words] Cervical squamous cell carcinoma; Cervical normal tissue; P16; P53; Beclin-1; Immunohistochemistry

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 全球每年约有 20 万妇女死于此病, 其中将近 5.3 万发生在中国^[1]。由于宫颈癌具有发病隐匿的特点, 早期可无明显症状, 且部分病例早期即出现淋巴转移, 导致复发机会增加, 预后较差。因此, 进一步探究宫颈癌的发生机制, 研发特异性的肿瘤标志物, 将有助于提

高治愈率和生存率, 为宫颈癌防治提供新的策略。细胞原癌基因的激活和抑癌基因的失活通常被认为是导致肿瘤发生的两大要素。P16 基因是多肿瘤抑制基因, 突变型 P53 可抑制细胞凋亡, 导致肿瘤形成。Beclin-1 是参与自噬调控的重要基因, 可以抑制肿瘤生长, 在多种恶性肿瘤组织中低水平表达^[2]。本

研究用免疫组化 SP 法检测宫颈正常组织及宫颈鳞癌组织中 P16、P53 及 Beclin-1 蛋白的表达,探讨其在宫颈癌发生发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 病例资料 选择 2014-01 ~ 2015-01 在清远市人民医院经手术切除或活检的宫颈组织 83 例为研究对象,患者年龄 23 ~ 70 岁,中位年龄 43 岁。其中宫颈鳞状细胞癌组织组 43 例,宫颈正常组织组 40 例。所有病例均未接受过化疗及放疗。

1.2 主要试剂 即用型鼠抗人 P16 单克隆抗体、鼠抗人 P53 单克隆抗体、SP 广谱超敏试剂盒及 DAB 酶底物显色剂等均购自福州迈新生物技术开发有限公司,Beclin-1 兔多抗原液购自 SantaCruz 公司。

1.3 免疫组化法 标本经 4% 中性甲醛固定,石蜡包埋切片,采用免疫组化 SP 法。操作均按 SP 试剂盒说明书进行。用已知阳性片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定 Beclin-1、P16 阳性染色为在细胞膜或浆内出现棕黄色颗粒;P53 阳性染色位于细胞核,呈淡黄色至棕黄色颗粒。免疫组化判定方法,采用半定量评分,用低倍和高倍镜观察全片,在 400 倍镜下任意选择 5 个视野,每个视野数 200 个肿瘤细胞,分别对阳性细胞数所占比例以及染色强度进行评分,评分标准^[3]:1 分为阳性染色细胞数≤10%;2 分为阳性染色细胞数占 10% ~ 50%;3 分为阳性细胞数≥50%。阳性细胞的染色强度评分:0 分为基本不着色;1 分为着色弱;2 分为着色中等;3 分为着色强。两项得分相乘,最后评分,0 分为阴性(-),1 ~ 4 分为弱阳性(+),≥5 分以上为阳性(++)。

1.5 统计学方法 应用 SPSS18.0 统计学软件进行数据分析,计数资料采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P16 蛋白的表达情况比较 P16 阳性表达定位在细胞膜或细胞浆内。P16 在宫颈正常组织及宫颈鳞癌组织中的阳性表达率分别为 5.0%、100.0%,差异具有统计学意义($\chi^2 = 75.35, P = 0.000$),呈上升趋势并呈正相关($r = 0.931, P = 0.000$)。见表 1。

2.2 P53 蛋白的表达情况比较 P53 阳性表达定位在细胞核内。P53 在正常宫颈组织及宫颈鳞癌组织中的表达阳性率分别为 5.0%、86.0%,差异具有统计学意义($\chi^2 = 54.65, P = 0.000$),呈上升趋势,随宫颈病变加重,表达逐渐增强,等级相关分析呈正

相关($r = 0.792, P = 0.000$)。见表 2。

2.3 Beclin-1 蛋白的表达情况比较 Beclin-1 蛋白主要定位于细胞膜或细胞浆。其在宫颈正常组织及宫颈鳞癌组织中表达阳性率分别为 85.0%、55.8%,差异具有统计学意义($\chi^2 = 8.39, P = 0.000$),Beclin-1 在宫颈鳞癌组织表达较宫颈正常组织减弱,呈下降趋势,等级相关分析呈负相关($r = -0.387, P = 0.000$)。见表 3。

表 1 P16 蛋白的表达情况比较(n)

组 别	例数	P16			阳性率(%)
		-	+	++	
宫颈正常组	40	38	2	0	5.0
宫颈鳞癌组	43	0	11	32	100.0

表 2 P53 蛋白的表达情况比较(n)

组 别	例数	P53			阳性率(%)
		-	+	++	
宫颈正常组	40	38	2	0	5.0
宫颈鳞癌组	43	6	26	11	86.0

表 3 Beclin-1 蛋白的表达情况比较(n)

组 别	例数	Beclin-1			阳性率(%)
		-	+	++	
宫颈正常组	40	6	12	22	85.0
宫颈鳞癌组	43	19	15	9	55.8

3 讨论

3.1 上世纪 80 年代报告早期宫颈浸润癌的平均发病年龄在 38 ~ 50 岁之间。宫颈癌是仅次于乳腺癌的第二个最常见的女性恶性肿瘤,世界每年新发宫颈癌病例 50 余万,其中我国 13.5 万^[4]。我国部分地区宫颈癌的发生率和病死率有增长趋势,而部分地区还出现了宫颈癌患病的年轻化趋势。80 年代报告早期浸润癌的平均发病年龄在 38 ~ 50 岁之间,中国医学科学院肿瘤医院最近统计,30 例 I a 期的年龄范围 23 ~ 56 岁,中位年龄为 40 岁,提示微灶型浸润癌的年龄提前 10 年左右。因为宫颈的特殊解剖位置,使宫颈癌容易早期发现,理论上宫颈癌是可防可治的,但很多宫颈癌发现时已为晚期,或早期宫颈癌出现脉管浸润、淋巴结转移等情况,导致宫颈癌的复发、转移几率增加,进展期的宫颈癌 5 年生存率仅约 70%,晚期宫颈癌的预后差,5 年生存率仅 50%。如何降低宫颈癌的复发率,寻找有效的监测指标已

成为迫切需要解决的问题。随着对宫颈癌发生发展分子机制研究的逐步深入,人们发现宫颈癌的基因治疗,要想取得突破性进展,需要寻找更多、更有效、更有针对性的目标基因。肿瘤的发生与发展是一个多步骤、多因素的复杂过程。细胞增殖失控、细胞周期失调等改变在肿瘤形成过程中发挥了重要作用。

3.2 P16 基因又称多肿瘤抑制基因或 *cdkn2* 基因,定位于染色体 9p21,它长约 8.5 kb,包括 2 个内含子和 3 个外显子。P16 在 S 期达高峰,与 cyclin D 竞争 CDK4 或 CDK6,从而控制 cyclin D/CDK4 或 cyclin D/CDK6 复合物的形成与活性,抑制其对视网膜母细胞瘤基因编码蛋白的磷酸化作用,而游离的 E2F-1 与未磷酸化的 PRb 结合可阻止 DNA 合成基因的转录,从而使细胞阻滞于 G1 期。这种负反馈调节机制利于确保基因组 DNA 稳定,其功能丧失可能导致肿瘤的发生、发展及恶化。P16 基因的失活在许多恶性肿瘤发生发展中起重要作用,在多种肿瘤组织及其肿瘤细胞系均存在。P16 基因蛋白的变异及其失活会导致该调节途径的失控,从而导致肿瘤细胞过度增殖,致肿瘤发生。在宫颈癌组织中,启动子甲基化是 P16 基因主要的失活形式。随病情进展,失活率增加,P16 蛋白在多种恶性肿瘤组织中呈高表达,在临床上广泛应用于鉴别恶性肿瘤与非恶性肿瘤。本研究结果显示,与其他恶性肿瘤相同,宫颈癌中 P16 基因的表达阳性率远远高于正常宫颈组织中的阳性率,呈明显上升趋势,提示 P16 蛋白表达异常是宫颈癌发生、发展的早期事件。

3.3 P53 基因是一种抑癌基因,分为野生型和突变型两种。野生型 P53 蛋白(wtP53)属抑癌基因,能维持基因稳定,抑制癌变。wtP53 是凋亡抑制基因,能诱导细胞自噬,延迟凋亡的发生;它由于缺乏诱导自噬的能力,引起 HCT-116 细胞快速地进入凋亡状态,但其半衰期极短,用免疫组化方法难以捕捉。突变型 P53 基因的功能恰恰相反,不仅不能抑制肿瘤的发生,反而促进细胞恶性转化,抑制细胞凋亡,获得致癌活性。突变型 P53 蛋白与野生型 P53 蛋白结合并使后者失去抑癌作用。突变型 P53 半衰期明显延长,具有很强的代谢稳定性,在细胞中沉积,可以用免疫组化方法检测^[5]。故我们检测出的 P53 基因均为突变型,属癌基因。它的表达异常与结构改变可能是肿瘤发生发展的重要环节^[6]。在本研究中,显示出宫颈鳞癌组织的 P53 蛋白表达水平远远高于正常宫颈组织。随着宫颈鳞状细胞癌病变的进展,P53 的表达强度也逐渐加强且呈正相关($r =$

0.792, $P < 0.01$);在癌组织分级、临床分期中,P53 蛋白的表达并无差异,提示 P53 蛋白的过表达发生于宫颈癌进展早期,是宫颈癌发生的较早期因素,故检测异常 P53 蛋白的表达有望作为早期诊断宫颈癌的一项有用指标。

3.4 自噬参与肿瘤的发生发展,起促进和抑制双重作用。自噬既可以诱导细胞主动性地死亡,也可以作为一种防御机制来抗御环境变化对细胞所造成的损伤。抑制自噬可促进癌前期细胞的生长,自噬发挥抑癌作用。继凋亡之后,对自噬的研究成为肿瘤治疗的新的切入点。Beclin-1 是新近克隆的哺乳动物的自噬调控基因,是候选的肿瘤抑制基因。目前人们认为,在调控组织稳态、发育和疾病方面,自噬与凋亡能起关键作用。由于自噬基因 Beclin-1 具有 BH3 结合结构域,可与 Bcl-XL 结合,促进细胞凋亡,推测 Beclin-1 在哺乳动物中抑制肿瘤形成可能与此功能有关。Beclin-1 基因的缺失性突变导致自发性肿瘤发生率提高^[7,8]。本研究显示,Beclin-1 在宫颈鳞癌组织中以阴性和弱阳性表达为主,各占 43.2% 和 34.6%,阳性表达率显著低于正常宫颈组,提示宫颈鳞癌中存在 Beclin-1 表达的缺失(阴性表达)和下调(弱阳性表达)。结合本研究的结果,我们可以推测在宫颈鳞癌的发展过程中,或许在宫颈鳞癌前期病变中已存在 Beclin-1 表达下调,推测其在宫颈鳞癌的发生中起着一定的作用。

3.5 细胞自噬在多种生理病理活动中都起着重要作用,自噬相关蛋白 Beclin-1 的下调能导致自噬、凋亡的缺陷、细胞恶性度增加从而促进肿瘤的发生和进展。在细胞自噬中,抑癌基因的产物通常会导致细胞自噬水平的提高,而癌基因的产物则通常抑制细胞自噬过程。从这个实验可以看出,Beclin-1 在正常宫颈组织中高表达,在宫颈恶性病变中的表达下调。而 P16、P53 的表达则相反,恰恰与此理论相吻合。共同检测 P16、P53 及 Beclin-1 三种蛋白有利于对宫颈癌的恶性程度及侵袭力作进一步评估。目前已有相关的报道^[9],将 P53 的基因治疗联合宫颈癌的放射治疗,使巨块型宫颈癌的放射治疗疗效得到改善。研究自噬与凋亡等相关肿瘤表达因子在宫颈癌发生、发展中的关系,有利于进一步论证将凋亡诱导及自噬性细胞死亡引入肿瘤基因治疗的可行性。

参考文献

- 1 朱凤琴,凤林,胡向阳. P16、P53 在宫颈上皮内瘤变和浸润性鳞癌中的表达及意义[J]. 安徽医科大学学报,2009,44(2):201 -

204.

2 王赞宏,彭芝兰,段振玲,等. 自噬基因 Beclin 1 在宫颈鳞癌中的蛋白表达及其临床意义[J]. 四川大学学报(医学版),2006,37(6):860-863.

3 Schindl M,Birner P,Bachtiry B,et al. The impact of expression of the metastasis suppressor protein KAI1 on prognosis in invasive squamous cell cervical cancer[J]. Anticancer Res,2000,20(6B):4551-4555.

4 Hanahan D,Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell,2011,144(5):646-674.

5 何培芝,刘少扬,江大琼. p14 在宫颈癌中的表达及其与 p53 表达相关性的研究[J]. 肿瘤防治研究,2005,32(1):27-29.

6 Queiroz C,Silva TC,Alvos VA,et al. P16(INK4a) expression as a potential,prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions[J]. Pathol Res Pract,2006,202(2):77-83.

7 丁振斌,周 俭,樊 嘉,等. 自噬基因 Beclin 1 抑制肿瘤作用的研究进展[J]. 中国临床医学,2008,15(4):515-517.

8 Xu Y,Kim SO,Li Y,et al. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death[J]. J Biol Chem,2006,281(28):19179-19187.

9 徐祯祯,权循凤,蒋 俊,等. 调强放疗联合 P53 基因治疗中晚期宫颈癌的临床疗效[J]. 安徽医学,2015,36(1):19-22.

[收稿日期 2016-06-20][本文编辑 韦 颖]

课题研究 · 论著

脑损伤指数在重型颅脑损伤昏迷患者
预后评估中的价值

张艺滨, 王建群, 陈良鑫, 王超英

基金项目: 福建泉州市科技计划项目(编号:2015Z51)

作者单位: 362500 福建,泉州市德化县医院神经外科

作者简介: 张艺滨(1985-),男,大学本科,医学学士,主治医师,研究方向:颅脑损伤的诊治。E-mail:zyb2008qz@163.com

[摘要] **目的** 研究脑损伤指数(craniocerebral injury index,CCII,即 GCS 评分/CT 计分比值)对重型颅脑损伤(severe craniocerebral injury,SCCI)昏迷患者的应用及其对预后评估的价值。**方法** 回顾性分析 90 例 SCCI 昏迷患者的临床资料,获取 GCS 评分及对患者头颅 CT 图像进行 Rotterdam CT 计分,并分析 CCII 与患者的病情严重程度及预后的关系。**结果** 预后良好组患者的 CCII 较预后不良组高,GCS 评分 6~8 分组较 3~5 分组的 CCII 明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。患者的 CCII 与患者 GOS 预后评分呈正相关($r_p=0.932,P=0.000$)。GOS 预后评分各组患者之间的 CCII 从好到差的不同预后呈逐渐递减的趋势,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** CCII 有助于评估患者病情、预后及指导临床诊治,具有良好的临床应用价值。

[关键词] 重型颅脑损伤; 昏迷; GCS 评分; CT 计分; 预后

[中图分类号] R 743.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2017)02-0117-04
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.02.06

The research of the craniocerebral injury index on the assessment of prognosis in comatose patients with severe craniocerebral injury ZHANG Yi-bin, WANG Jian-qun, CHEN Liang-xin, et al. Department of Neurosurgery, Dehua County Hospital of Quanzhou City, Fujian 362500, China

[Abstract] **Objective** To study the application of craniocerebral injury index(the ratio of GCS/CT score, CCII) in the patients with severe craniocerebral injury(SCCI), and the effect of CCII on the assessment of prognosis. **Methods** The clinical data of the patients with SCCI were retrospectively analyzed. The GCS scores and Rotterdam CT scores of CT images, the relationship between the CCII scores and the prognosis, and the relationship between CCII and the severity of the illness were analyzed. **Results** The CCII scores of the good prognosis group were significantly higher than the those of the poor prognosis group, and the CCII scores of the group with GCS in the range of 6~8 were significantly higher than those of the group with GCS in the range of 3~5($P<0.05$). The CCII scores were