人口腔粘膜鳞状细胞癌及白斑 P16 蛋白及 PCNA 表达的研究

姜育红　何国斌　石爱梅　赵红宇

现已知抑癌基因 p16 的编码产物 P16 蛋白可通过抑制细胞周期依赖性蛋白激酶 CDK_4 的活化而使细胞停滞在 G_1 期，从而抑制细胞的增殖[1,2]。增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）是 DNA 聚合酶 σ 的辅助蛋白，对细胞增殖的启动有重要意义[3]。目前 PCNA 常作为反映细胞增殖水平的可靠指标。本文研究口腔粘膜鳞状细胞癌（squamous cell carcinoma，SCC）及白斑（leukoplakia，LK）P16 蛋白及 PCNA 的表达，以了解 P16 蛋白表达对口腔粘膜增殖水平的影响及其与口腔粘膜 SCC 发生、发展过程的关系。

1　材料和方法

所有标本均选自河南医科大学第一附属医院病理科 1990～1997 年存档的蜡块。选取 32 例口腔粘膜白斑，其中单纯增生性白斑 8 例，不典型增生性白斑 24 例；口腔粘膜 SCC 43 例，其中Ⅰ级 13 例，Ⅱ级 19 例，Ⅲ级 11 例。以上标本均经两位病理科医师双盲法阅片并诊断一致。6 例正常口腔粘膜作为实验对照。

P16 蛋白单抗（Santa Cruz 公司）、PCNA 单抗（DAKO 公司）、免疫组化染色用 SP 试剂盒，均购自北京中山生物技术公司。免疫组化染色步骤按 SP 试剂盒说明。每批染色均设阳性对照及阴性对照。

PCNA 染色以细胞核内出现棕黄色颗粒状或弥漫性着色为阳性细胞，细胞浆不着色。P16 蛋白阳性细胞细胞浆和细胞核均可染成深浅不等的棕黄色，出现其一即为阳性细胞。对 PCNA 染色，同时计算 PCNA 阳性指数，即阳性细胞占总计数细胞的百分率。

2　结　　果

2.1　P16 蛋白免疫组化染色结果

正常粘膜组均为 P16 蛋白阳性表达，阳性细胞分布于上皮各层次，胞核和胞浆均为阳性。单纯增生性白斑与正常对照组相似，但染色强度明显增加，角化层以下各层呈现一均匀的棕黄色带状，阴性细胞少见。不典型增生性白斑胞浆表达与单纯增生性白斑相似，但胞核表达出现异质性，表现为有的胞核染色较深，有的胞核着色较浅或为阴性。37.21%（16/43）的口腔粘膜 SCC 表现为 P16 蛋白染色阴性，即胞浆和胞核均为阴性。阴性标本见于 SCCⅡ级及Ⅲ级，但 SCCⅠ级均为阳性表达。口腔 SCC P16 蛋白染色阳性切片异质性更趋明显，可见较多的核阴性细胞散在分布。P16 蛋白染色结果见表 1。

表 1　口腔粘膜鳞癌及白斑 P16 蛋白表达

组别	例数	P16 蛋白阳性	%
正常对照组	6	6	100.00
白斑	32	32	100.00
鳞状细胞癌	43	27	62.79
Ⅰ级	13	13	100.00
Ⅱ级	19	12	63.16*
Ⅲ级	11	2	18.18*

* 两者之间有显著性差异（$P < 0.05$）

2.2　PCNA 染色结果

本实验各组标本均为 PCNA 染色阳性。正常口腔粘膜 PCNA 阳性细胞见于基底层细胞，呈线状排列，数量较少，其它细胞层未见阳性反应。单纯增生性白斑阳性细胞数较正常口腔粘膜增加（$P < 0.05$），阳性细胞也主要分布于基底层，但有 25% 的病例除基底层以外棘细胞层也出现数量不等的阳性细胞。作者称此为基底上层模式。不典型增生性白斑阳性细胞数较单纯增生性白斑明显增加（$P < 0.01$），分布范围较广。不典型增生性白斑多表现为基底上层分布模式。

口腔 SCC 各组 PCNA 阳性细胞分布大致与细胞分化程度有关。高分化 SCC 阳性细胞主要分布于基底样增生活跃的癌巢周边，癌巢中央多为阴性。低分化鳞癌阳性细胞散在分布，遍布于组织全层，数量明显增多。各组 PCNA 染色模式及阳性指数见表 2。

2.3　P16 蛋白表达与 PCNA 阳性指数的关系

P16 蛋白表达阴性的标本，相应的 PCNA 阳性指数明显高于 P16 蛋白表达阳性者（$P < 0.001$）。但当比较范围限

作者单位：450052　河南医科大学口腔医学系（姜育红，何国斌），河南医科大学第一附属医院口腔科（石爱梅，赵红宇）

制在 SCC Ⅱ级和Ⅲ级时，二者之间的差别则无统计学意义。

表 2 口腔粘膜鳞癌及白斑 PCNA 表达

组别	例数	基底上层模式（%）	PCNA 阳性指数 $\bar{x}\pm s$（%）
正常对照组	6	0（0.00）	8.02±1.23[b]
白斑	32	22（68.75）	22.49±11.73[b]
单纯增生	8	2（25.00）[a]	11.71±2.23[c]
不典型增生	24	20（83.33）[a]	26.07±11.42[c]
鳞状细胞癌	43		40.54±15.97[b]
Ⅰ	13		25.63±6.54[d]
Ⅱ	19		35.85±10.47[d]
Ⅲ	11		55.51±14.22[d]

a: 两者之间 $P<0.01$; b: 两两之间 $P<0.01$; c: $P<0.01$; d: 两者之间 $P<0.01$;

3 讨 论

本实验 37.21% 的口腔 SCC 标本未检测到 P16 蛋白，这可能是由于 p16 基因的缺失[4,5]，也可能是由于 p16 基因甲基化抑制其转录[6]。这一现象只出现在细胞分化程度较差的口腔 SCC Ⅱ级和Ⅲ级，提示 P16 蛋白缺失可能是口腔 SCC 从低度恶性向高度恶性转化的重要变化。Nishikawa 等[7] 对人星形细胞瘤的研究也有相似的结果。

本研究结果表明从正常口腔粘膜到不典型增生性白斑，均见有 P16 蛋白表达，且上皮染色较均匀，提示 p16 基因及其产物的缺失与口腔癌前损害的发生关系不大，这与 Zhong 等[8] 的研究结果一致。

本实验正常口腔粘膜 PCNA 染色皆为阳性，说明正常口腔粘膜具有一定的分裂增殖能力。口腔粘膜从癌前损害到口腔 SCC，随着恶性程度的增加，PCNA 阳性指数有增加趋势，反映该过程细胞增殖活性的不断增加。由于各病变组 PCNA 阳性指数重叠较小，作者认为，利用 PCNA 阳性指数作为口腔 SCC 进展的量化指标以及作为口腔 SCC 的辅助诊断值得进一步研究。

本实验口腔 SCC Ⅲ级病例 PCNA 阳性指数明显高于其它各组，除由于 SCC Ⅲ级具有较高的细胞增殖活性外，也可能与该组病例 P16 蛋白表达阴性率较高有关。

（本文承蒙刘学杰教授指导，特此致谢）

4 参考文献

1 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science, 1994, 264 (4): 436～440

2 Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature, 1994, 368 (4): 753～756

3 Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, et al. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature, 1984, 309 (5): 374～376

4 Yeudall WA, Crawford RY, Ensly JF, et al. MTS1/CDK4 is altered in cell lines derived from primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. Carcinogenesis, 1994, 15 (12): 2683～2686

5 Spruck CH Ⅲ, Gonzalez-Zulueta M, Shibata A, et al. P16 gene in uncultured tumours. Nature, 1994, 370 (7): 183～184

6 陶江川，吴秉铨，方伟岗，等. 头颈部癌组织 $CDKN_2$ 基因突变及甲基化状态的研究. 中华病理学杂志, 1997, 26 (6): 152～154

7 Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, et al. Loss of $p16^{ink4}$ expression is frequent in high grade gliomas. Cancer Res, 1995, 55 (9): 1941～1945

8 Zhong SY, Klein-Szanto AJ, Sauter EB, et al. Higher frequency of alterations in the P16/$CDKN_2$ gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumour of the head and neck. Cancer Res, 1994, 54 (10): 5050～5053

(1998-10-23 收稿)

冠桥修复前激光龈外科处理

任煜光 李若兰

牙龈的炎症性肥大、增生、临床牙冠过短、基牙龈下龋坏等都会影响修复治疗，需进行龈切除及龈成形术，以便获得良好的修复效果。作者应用脉冲 Nd: YAG 激光进行冠桥修复前的牙龈外科处理，取得良好的临床效果。它具有操作轻便准确、出血少、可立即取印模、术后反应轻微等优点，现介绍如下。

本课题为广东省自然科学基金资助项目（编号 940845）

作者单位：510515 第一军医大学南方医院