

p14^{ARF} 在宫颈癌中的表达及其与 p53 表达相关性的研究

何培芝, 刘少扬, 江大琼

Expression of p14^{ARF} and p53 Protein in Cervical Carcinomas

HE Pei-zhi, LIU Shao-yang, JIANG Da-qiong

Department of Gynecologic Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract: **Objective** To study the expression of p14^{ARF} protein in cervical carcinoma and its relationship with the expression of p53 gene. **Methods** The expression of p14^{ARF} and p53 protein was detected by immunohistochemistry in 41 cervical carcinoma tissues and 20 normal cervical tissues. **Results** p14^{ARF} was expressed in 35 of 41 (85.4%) cases of cervical carcinomas. In contrast, normal cervical epithelium did not express p14^{ARF}. Overexpression of p14^{ARF} was related to the tumor grade. The expression of p14^{ARF} had no association with p53. **Conclusion** The overexpression of p14^{ARF} has value in diagnostic and prognosis in cervical neoplasm. These proteins maybe use as new markers of cervical neoplasm.

Key words: p14^{ARF}; p53; Cervix neoplasm; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨宫颈癌组织 p14^{ARF} 蛋白的表达及其与 p53 表达的相关性。方法 应用免疫组化方法检测 p14^{ARF}、p53 基因在 41 例宫颈癌及 20 例正常宫颈组织中的表达。结果 p14^{ARF} 在正常宫颈组织中不表达, 41 例宫颈癌中 35 例表达阳性, 占 85.4%。病理分级为 G1、G2 级的宫颈癌的 p14^{ARF} 阳性表达率为 68.4%, G3 级为 100%, 两者比较, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。宫颈癌组织中 p53 蛋白表达阳、阴性者中 p14^{ARF} 蛋白表达阳性率分别为 75.0% (12/16) 和 92.0% (23/25), 两者比较, 无显著性差异, p14^{ARF} 与 p53 表达不相关。结论 p14^{ARF} 在宫颈癌中高表达有一定的诊断和估测预后价值, 可能是宫颈癌新的肿瘤标志物。

关键词: p14^{ARF}; p53; 宫颈肿瘤; 免疫组织化学

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)01-0027-03

0 引言

细胞周期调控是由许多不同基因组成的多条通路来完成的。在人类肿瘤细胞中, 最主要的细胞周期调控通路有两条: Rb 通路 (p16-Rb) 和 p53 通路 (p14^{ARF}-p53)。有关 Rb 通路的研究目前已经较为成熟, 近年来 p53 通路的作用日益受到重视。本研究用免疫组化方法, 检测宫颈癌中 p14^{ARF} 和 p53 蛋白的表达, 旨在探讨 p14^{ARF} 和 p53 在宫颈癌发生发展中的作用, 以及 p14^{ARF} 和 p53 的相互关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

标本选自武汉大学中南医院妇瘤科 2000 年 11 月~2003 年 7 月间手术切除和放疗前宫颈活检、经病理确诊为宫颈癌的石蜡标本 41 例。患者年龄 24~80 岁, 中位年龄 44 岁; 其中鳞癌 33 例, 腺癌 8 例; 病理分级为 G1 级 9 例, G2 级 10 例, G3 级 22

例; 按 FIGO (1985 年) 分期标准, b 期 16 例, a 期 14 例, b 期 8 例, 期 3 例; 有淋巴结转移者 19 例; 浸润浅肌层 21 例, 深肌层 20 例。另取同期因子宫颈癌行子宫全切的光滑宫颈 20 例作对照。

1.2 试剂

鼠抗人 p14^{ARF}、p53 单抗, 广谱型 SP 试剂盒, DAB 显色剂等均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法

组织蜡块 4 μ m 连续切片, 脱蜡至水化后, 切片置缓冲液中, 高温高压抗原修复, 采用免疫组化 SP 染色, 染色步骤严格按试剂盒要求进行。

1.4 结果判定

p14^{ARF} 和 p53 染色阳性信号均为棕黄色, 定位于细胞核。随机计数 5 个高倍视野 ($\times 400$), 不足 5 个高倍视野者, 计数组织中全部细胞数。阳性细胞 $< 10\%$ 定为阴性 (-), 阳性细胞 10% , 定为阳性 (+)。

1.5 统计学处理

检验方法用 χ^2 检验及四格表确切概率法。

收稿日期: 2004-03-01; 修回日期: 2004-09-06

作者单位: 430071 武汉大学附属中南医院妇瘤科

2 结果

2.1 宫颈癌组织中 p14^{ARF} 的表达

p14^{ARF} 阳性表达为棕黄色粗颗粒状或小点状核染,见图 1,阳性细胞主要见于宫颈癌组织内。41 例宫颈癌中 35 例 p14^{ARF} 表达阳性,占 85.4%,而正常宫颈组织中未见 p14^{ARF} 表达。

2.2 宫颈癌组织中 p14^{ARF} 表达与临床病理

p14^{ARF} 表达与组织类型、FIGO 分期、淋巴结转移及浸润深度无关 ($P > 0.05$),仅和病理分级有关 ($P < 0.05$),且可见到 p14^{ARF} 在高分化宫颈癌中分布于表层,而在低分化中可达基底层,见表 1。

2.3 宫颈癌组织中 p14^{ARF} 表达和 p53 表达的相关性

p53 蛋白阳性产物主要定位于细胞核中,见图 2。41 例宫颈癌组织中 16 例呈阳性表达,占 39.0%。宫颈癌组织中 p14^{ARF} 表达与 p53 蛋白表达不相关 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 宫颈癌临床病理特征及 p53 表达与 p14^{ARF} 表达的相关性

类别	总例数	p14 ^{ARF} 阳性表达	
		例数	%
组织类型			
鳞癌	33	30	90.9
腺癌	8	5	62.5
病理分级			
G1、G2 级	19	13	68.4*
G3 级	22	22	100.0
FIGO 分期			
期	16	13	81.3
、期	25	22	88.0
淋巴结转移			
有转移	19	16	84.2
无转移	22	19	86.4
浸润深度			
浅肌层	21	17	81.0
深肌层	20	18	90.0
p53 蛋白表达			
阳性	16	12	75.0
阴性	25	23	92.0

注: *表示 G1、G2 级组与 G3 级组比较, $P < 0.05$

3 讨论

p14^{ARF} 是近年来发现的又一重要的抑癌基因,定位于 9p21。p14^{ARF} 和 p16 基因的阅读框架含有相同的外显子 E2、E3,但第 1 外显子 E1 不同,p14^{ARF} 为 E1,p16 为 E1。由于 E1 不同,翻译出氨基酸序列完全不同的两种蛋白,这两种蛋白在调控人类肿瘤发生的两条细胞周期调控途径 Rb 途径 (p16-

CyclinD1 与 CDK4 复合物-pRb) 和 p53 途径 (p14^{ARF}-MDM2-p53-p21) 中起重要作用。p16 是 CDK 抑制剂,通过 CDK 而抑制 Rb 蛋白的磷酸化,使细胞周期停滞于 G1 期。p14^{ARF} 则可直接结合 MDM2,使 MDM2 与 p53 在核内分离,解除 MDM2 介导的 p53 的抑制,使 p53 水平升高,然后启动凋亡或细胞周期阻滞。研究发现,p14^{ARF} 基因缺失及启动子甲基化与多种肿瘤的发生发展有密切关系。在脑转移瘤^[1]、少突胶质细胞肿瘤^[2] 中常发生 p14^{ARF} 甲基化现象,在膀胱癌^[3]、口腔鳞癌^[4] 中常出现 p14^{ARF} 基因缺失。p14^{ARF} 也可发生突变,但主要发生在外显子 E2 的 5 端,人类肿瘤中 p14^{ARF} 特异的 E1 突变现象尚未见报道。当 p14^{ARF} 发生缺失、甲基化及突变时,其 mRNA 及蛋白水平会相应的下降。与上述观点不同的是,我们的研究结果发现 p14^{ARF} 高表达于几乎所有宫颈癌中,且 p14^{ARF} 的表达随病理分级增高而增强,这与 Sano 等^[5] 在宫颈癌中的研究结果相一致。究其原因,可能与宫颈癌中高危型 HPV E6、E7 癌蛋白有关。我们知道,高危型 HPV E6、E7 癌蛋白可结合 p53、Rb 蛋白,从而使失活。宫颈癌中 p14^{ARF} 高表达可能是 p53 途径中 p53 蛋白功能失活导致的负反馈表达的结果。另一种可能就是,由于 E7 癌蛋白可结合 pRb 蛋白,使 E2F1 从 E2F1/p Rb 复合物中释放出来,而 E2F1 可诱导 p14^{ARF} 表达,从而使得 p14^{ARF} 在宫颈癌中高表达。另外,我们在正常宫颈组织中未检测出 p14^{ARF} 免疫活性,这并不表示 p14^{ARF} 表达缺失,也不表示该基因失活,可能是在正常细胞中 p14^{ARF} 水平较低而用免疫组化方法检测不到。研究发现大多数正常细胞中,p14^{ARF}、p16 在 mRNA 和蛋白水平表达均较低,因此,只有当 p14^{ARF} 表达上调时,比如在 HPV 感染的宫颈癌细胞中,才可用免疫组化方法检测其蛋白表达。另外,p14^{ARF} 在高分化宫颈癌中分布于表层,而在低分化中可达基底层,及 p14^{ARF} 在低分化组明显高于高分化组 ($P < 0.05$),这可能与 HPV 的 E6、E7 蛋白在高低分化的宫颈癌中表达方式不同有关。因此,我们推测 p14^{ARF} 在基底层中阳性表达的那个点至关重要,他将提示我们病变会进展。

p53 基因是目前研究最活跃的基因之一,有野生型和突变型两种亚型。野生型具有维持基因组稳定、抑制癌变、调节细胞分化和衰老的功能;而突变型 p53 蛋白则失去抑癌功能,可引起细胞恶性增殖,导致细胞的转化和肿瘤的发生。野生型 p53 蛋白半衰期很短,用免疫组化方法不易检出,而突变型 p53 蛋白半衰期延长,易在恶性细胞中堆积。因此,应用

免疫组化检测出的 p53 蛋白均为突变型 p53 蛋白。Stott 等^[6]研究发现野生型 p53 可负调节 p14^{ARF} 表达,当 p53 突变失活时,p14^{ARF} 可高表达。已有研究报道在结肠癌^[7]、乳腺癌^[8]中 p14^{ARF} 和 p53 表达相关,但我们的研究结果提示 p14^{ARF} 和 p53 表达不相关,他们之间不是线性关系,而是错综复杂的网络关系。这与 Xue 等^[9]在肺鳞癌中的研究结果相一致。

p14^{ARF} 阳性可提示该瘤细胞有 HPV 感染,它随病理分级增高而表达增强的现象,使得我们能用免疫组化的方法对宫颈癌进行诊断,同时对估测其预后也有很大的价值,p14^{ARF} 可能会成为宫颈癌中继 p16 之后的新的肿瘤标志物。

(本文图见封 2)

参考文献:

- [1] Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, et al. Promoter methylation status of multiple genes in brain metastases of solid tumors[J]. *Int J Mol Med*, 2004, 13(1):93-98.
- [2] Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B, et al. Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes[J]. *J Neuro-pathol Exp Neurol*, 2001, 60(12):1170-1180.

- [3] Chang LL, Yeh WT, Yang SY, et al. Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer[J]. *J Urol*, 2003, 170(2 Pt 1):595-600.
- [4] Tachibana M, Shinagawa Y, Kawamata H, et al. RT-PCR amplification of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral cancer sections: analysis of p53 pathway[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(3C):2891-2896.
- [5] Sano T, Masuda N, Oyama T, et al. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia[J]. *Pathol Int*, 2002, 52(5-6):375-383.
- [6] Stott FJ, Bates S, James MC, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2[J]. *EMBO J*, 1998, 17(17):5001-5014.
- [7] Burri N, Shaw P, Bouzourene H, et al. Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer[J]. *Lab Invest*, 2001, 81(2):217-229.
- [8] Dominguez G, Silva J, Silva JM, et al. Different expression of p14ARF defines two groups of breast carcinomas in terms of TP73 expression and TP53 mutational status[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001, 31(2):99-106.
- [9] Xue Q, Sano T, Kashiwabara K, et al. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in squamous cell carcinomas of lung[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(3):285-292.

[编辑:刘红武;校对:杨卉]

(上接第 23 页)

用于 c-erbB-2 过表达的转移性乳腺癌的治疗,并取得了较好的治疗效果。有待进一步研究:以 HER-2/ neu 为靶点的治疗是否同样可以用于 c-erbB-2 阳性表达的伴 NE 分化非小细胞肺癌的临床监测和治疗。

(本文图见封 2)

参考文献:

- [1] Schleusener J T, Tazelaar HD, Jung S, et al. Neuroendocrine differentiation is an independent prognostic factor in chemotherapy treated nonsmall cell lung carcinoma[J]. *Cancer*, 1996, 77(7):1284-1291.
- [2] 余少平,熊永炎,田素芳,等.非小细胞肺癌神经内分泌分化的检测及意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2002, 29(6):457-459.
- [3] Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer[J]. *Biochim Bio-*

phys Acta, 1998, 1378(1):F21-F59.

- [4] World Health Organization. The World Organization histological typing of lung tumors second edition[J]. *Am J Clin Pathol*, 1982, 77(2):123-136.
- [5] Lyoda A, Hiroshima K, Toyozaki T, et al. Clinical Characterization of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma and Large Cell Carcinoma with Neuroendocrine[J]. *Cancer*, 2001, 91(11):1992-2000.
- [6] Berchuck A, Kamel R, Whitaker R, et al. Overexpression of HER-2/ neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian[J]. *Cancer Res*, 1990, 50(13):4087-4091.
- [7] Hartmann LC, Ingle JN, Wold LE, et al. Prognostic value of c-erbB-2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer[J]. *Cancer*, 1994, 74(11):2956-2963.
- [8] Baselga J. Clinical trials of Herceptin (R) (trastuzumab) [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(suppl 1):18-24.

[编辑:安凤;校对:周永红]

p14^{ARF} 在宫颈癌中的表达及其与 p53 表达相关性的研究

(正文见 27 页)

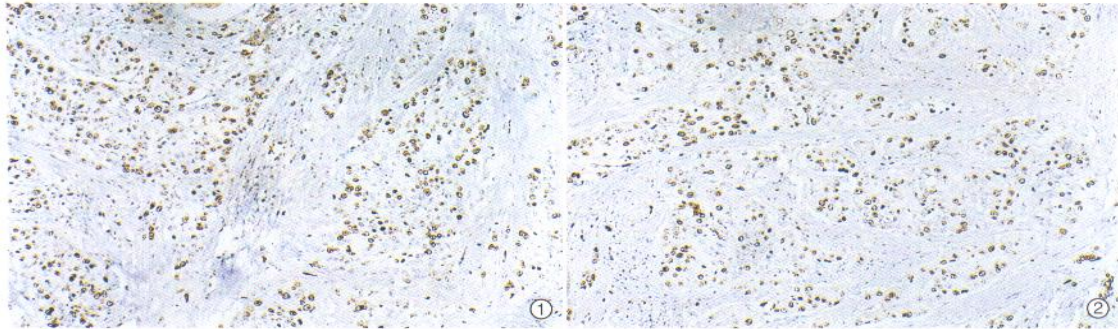


图 1 p14^{ARF} 在宫颈癌中的表达

图 2 p53 在宫颈癌中的表达

非小细胞肺癌中伴神经内分泌分化及 c-erbB-2 表达的意义

(正文见 22 页)

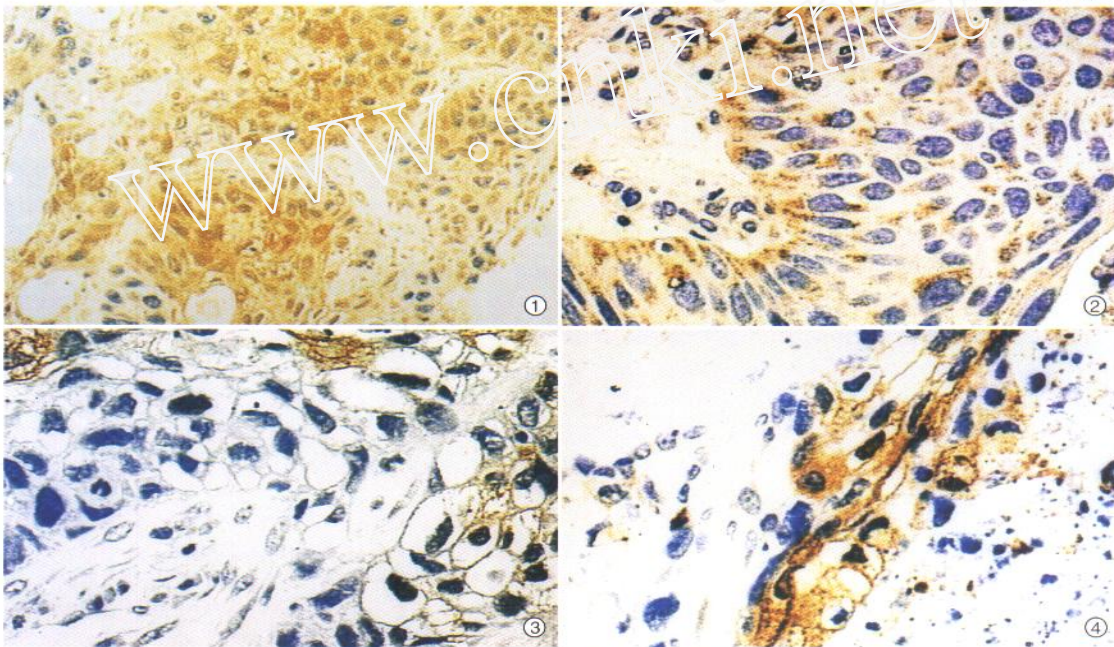


图 1 NSE 阳性($\times 200$)

图 2 CgA 阳性($\times 400$)

图 3 Syn 阳性($\times 400$)

图 4 c-erbB-2 阳性($\times 400$)

乳腺癌细胞促血管生成能力及 MMP-9 表达与其 淋巴道转移的关系

(正文见 15 页)

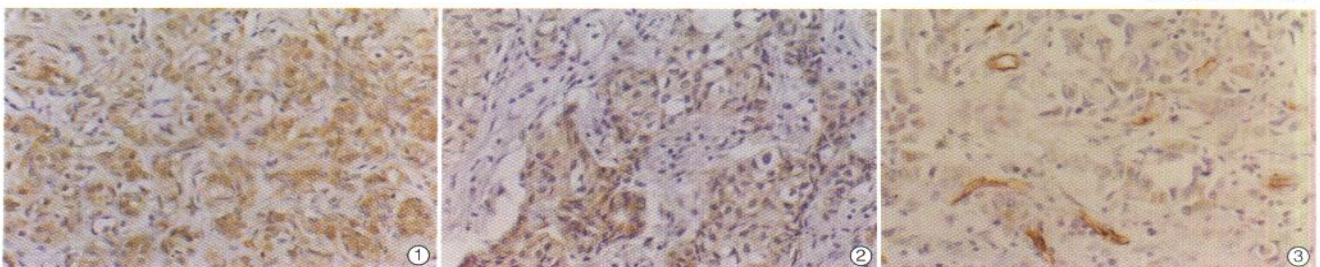


图 1 乳腺浸润性导管癌中癌细胞 VEGF 表达(SP, $\times 200$)

图 2 乳腺浸润性导管癌中癌细胞 MMP-9 表达(SP, $\times 200$)

图 3 乳腺浸润性导管癌中血管内皮细胞 CD34 表达(SP, $\times 200$)