

肝外胆管癌中染色体 9p21 区段抑癌基因簇表达异常的研究

唐启彬¹, 石雪涛², 衣龙海², 孙华文¹, 邹声泉¹

The Study of Relationship between Inactivation of Tumor Suppressor Gene Cluster Located in Chromosome 9p21 and Progression of Extra-hepatic Bile Duct Cancer

TANG Qi-bin¹, SHI Xue-tao², YI Long-hai², SUN Hua-wen¹, ZOU Shen-guan¹

1. Department of General Surgery, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China; 2. Department of Hepatic-Biliary Surgery, Shandong Tumor Hospital

Abstract: Objective To study the abnormal expression of three tumor suppressor p14/ARF, p15/INK4B and p16/INK4A located in chromosome 9p21 in the tissue of extra-hepatic bile duct cancer, and to discuss the possible role of these three genes in the initiation and progression of bile duct cancer. **Methods** The expression of p14, p15 and p16 proteins in the tissues of tumor, tumor side and cholangitis were studied using the method of immunohistochemistry. **Results** The rates of p14/ARF and p16/INK4A gene expression loss in the tumor tissue were higher than that in tumor side tissue and cholangitis tissue, and there was no significant difference between different pathology types. **Conclusion** The abnormal expression of p14/ARF and p16/INK4A gene may play a role in the initiation and progression of extra-hepatic bile duct cancer.

Keywords: Bile duct cancer; Chromosome; Tumor suppressor; Immunohistochemistry

摘要:目的 研究位于 9 号染色体短臂 21 段的抑癌基因簇所包含的 3 个抑癌基因 p14/ARF、p15/INK4B 和 p16/INK4A 在肝外胆管癌组织中的异常表达,探讨这 3 个抑癌基因的表达异常在肝外胆管癌的发生发展过程中的作用。方法 应用免疫组织化学方法研究肝外胆管癌肿瘤组织、癌旁组织以及胆管炎组织的石蜡切片中 p14、p15 和 p16 蛋白的表达。结果 肝外胆管癌组织、癌旁组织以及胆管炎组织中 p14/ARF、p16/INK4A 两个基因表达缺失率两两比较均有显著性差异 ($P < 0.05$),而 p15/INK4B 基因在各组中的表达无显著性差异 ($P > 0.05$)。3 个基因的表达异常与肿瘤的组织学类型无关,在伴有淋巴结转移/局部浸润的病例中缺失率明显增高 ($P < 0.05$)。结论 p14/ARF、p16/INK4A 基因表达异常早期参与了肝外胆管癌发生、发展。

关键词: 肝外胆管癌; 染色体; 抑癌基因; 免疫组织化学

中图分类号: R735.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)09-0523-03

0 引言

大量的研究资料表明 9 号染色体短臂 21 段 (9p21) 的异常在多种肿瘤的发生、发展过程中起着重要的作用。目前已经发现在 9p21 区段有 p14/ARF、p16/INK4A、p15/INK4B 等抑癌基因,它们的位置非常邻近,并且有部分重叠,构成了一个重要的抑癌基因簇。我们本次研究试图通过检测在肝外胆管癌组织中这 3 个基因的异常表达,来初步探讨其在肝外胆管癌发生发展中所起的作用。

1 资料与方法

1.1 资料 取武汉同济医院和山东肿瘤防治研究

院于 1999 年 5 月至 2003 年 1 月期间因肝外胆管癌行手术切除的肝外胆管癌肿瘤组织 43 例,全部病例术后均经常规病理检查诊断为肝外胆管癌。其中男 32 例,女 11 例,平均年龄 52.3 岁;高分化腺癌 27 例,中低分化腺癌 16 例;伴有淋巴结转移的 9 例,不伴淋巴结转移的 34 例;伴有局部浸润的 11 例,不伴局部浸润的 32 例;肝门部胆管癌 11 例,中下段胆管癌 32 例。另外分别取相应的癌旁组织 43 例以及同期经病理检查证实为胆管炎的手术切除标本 14 例。所有标本均用 10% 的甲醛固定,石蜡包埋,切片,片厚 4 μ m。

1.2 主要试剂 p14 和 p15 兔抗人单克隆抗体购自深圳晶美生物技术有限公司,p16 兔抗人单克隆抗体、SP 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色剂均购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 实验方法 切片常规脱蜡至水后,按照 SP 免

收稿日期:2003-07-22; 修回日期:2003-12-04

作者单位:1.430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科;2. 山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

疫组化试剂盒说明书上所给步骤进行操作:用微波进行抗原修复后, H_2O_2 阻断, 正常山羊血清封闭非特异反应, 滴加抗 浓度为 1:100, 4 过夜, 滴加生物素化抗。加入辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液, DAB 显色, 苏木素复染, 镜下观察。阴性对照以正常山羊血清代替抗温育组织切片作为阴性对照; 以 PB 代替抗温育组织切片作为空白对照; 以已知阳性片作为阳性对照。

1.4 免疫组化染色结果判定 为了使染色的判定结果更客观化, 我们参照了国外文献的判定标准^[1]: 染色结果由两个不同的研究者在 400 倍显微镜下进行观察, 取 5 个不同的视野, 计算平均值。

(1) 按照染色阳性的细胞比例进行分类: 阳性细胞比例 <5% 记为“0”; 5% ~ 25% 记为“1”; 25% ~ 50% 记为“2”; 50% ~ 75% 记为“3”; >75% 记为“4”。
(2) 按照细胞染色强度进行分类, 阴性染色记为“0”; 弱阳性染色记为“1+”; 中等强度染色记为“2+”; 强染色记为“3+”。每个标本均按照以上两个指标进行量化, 然后计算 (1) × (2) 的值。如果该标本所得的乘积 <1+, 则判定为表达阴性; 如果乘积 >1+ 则判定为表达阳性。

1.5 统计学处理 计数资料间比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 p14、p15 和 p16 蛋白在肝外胆管癌组织、癌

旁组织和胆管炎组织中的表达 p14、p15 和 p16 蛋白表达及染色情况, 见图 1~4。在 43 例肝外胆管癌组织中 p14、p15 和 p16 蛋白表达缺失率分别为 37.2%、11.6% 和 72.1%, 其中有 5 例 (11.6%) 3 个基因表达全部缺失, 至少有一个基因表达缺失的共有 36 例 (83.7%); 而在相应的癌旁组织中, 分别为 23.2%、9.3% 和 41.9%; 在 14 例胆管炎组织中, 分别为 7.1%、7.1% 和 14.3%, 见表 1。

表 1 p14、p15、p16 蛋白在肝外胆管癌肿瘤组织、癌旁组织和胆管炎组中的表达缺失分析

	肿瘤组织 n=43 (%)	癌旁组织 n=43 (%)	胆管炎组织 n=14 (%)
p14	16 (37.2%)	10 (23.2%)	1 (7.1%)
p15	5 (11.6%)	4 (9.3%)	1 (7.1%)
p16	31 (72.1%)	18 (41.9%)	2 (14.3%)

经 χ^2 检验, p14、p16 蛋白在肿瘤组织、癌旁组织和胆管炎组织中的表达两两比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 p15 蛋白的表达在各组间的表达无显著性差异 ($P > 0.05$); 在肿瘤组织中, p16 的表达缺失率明显高于 p14、p15 ($P > 0.05$)。

2.2 p14、p15 和 p16 蛋白表达异常与肝外胆管癌的病理及临床特点的关系 p14、p15 和 p16 蛋白的表达异常与病人的年龄、性别、肿瘤的病理学类型和肿瘤的发生部位无关, 而 p14 和 p16 蛋白的表达缺失率在伴有淋巴结转移或局部浸润的病例中明显增高 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 p14、p15 和 p16 蛋白在不同的肝外胆管癌组织中的表达分析 n(%)

		p14	P	p15	P	p16	P
性别	男 (n=32)	12 (37.5%)	>0.05	3 (9.4%)	>0.05	22 (68.8%)	>0.05
	女 (n=11)	4 (36.4%)		2 (18.1%)		9 (81.8%)	
年龄	<50 岁 (n=16)	6 (37.5%)	>0.05	2 (12.5%)	>0.05	13 (81.3%)	>0.05
	>50 岁 (n=27)	10 (37.0%)		3 (11.1%)		18 (66.7%)	
发病部位	肝门部 (n=11)	5 (45.5%)	>0.05	1 (9.1%)	>0.05	9 (81.8%)	>0.05
	中下段 (n=32)	11 (34.4%)		4 (12.5%)		22 (68.8%)	
病理类型	高分化腺癌 (n=27)	10 (37.0%)	>0.05	3 (11.1%)	>0.05	18 (66.7%)	>0.05
	中低分化腺癌 (n=16)	6 (37.5%)		2 (12.5%)		13 (81.3%)	
淋巴结转移	(+) (n=9)	5 (55.6%)	<0.05	1 (11.1%)	>0.05	9 (99.9%)	<0.05
	(-) (n=34)	11 (32.4%)		4 (11.8%)		22 (64.7%)	
局部浸润	(+) (n=11)	6 (54.5%)	<0.05	1 (9.1%)	>0.05	10 (91.0%)	<0.05
	(-) (n=32)	10 (31.3%)		4 (12.5%)		21 (65.6%)	

3 讨论

染色体 9p21 区段包含有控制细胞正常生长的三个重要的抑癌基因^[2,3] p14/ARF、p15/INK4B 和 p16/INK4A, 它们的位置非常邻近, 并且有部分重叠, 构成了一个重要的抑癌基因簇。目前在多种肿瘤中^[4-6] 如胃癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、鼻咽癌、肝外胆管癌等都发现了该基因簇的改变, 其方式有如下

几种: 染色体上等位基因的纯合性缺失、杂合性缺失、基因突变以及所含基因启动子区域 CPG 岛的甲基化。该区段的改变可以导致位于其中的基因发生改变, 不能编码蛋白或编码出错误的蛋白, 引起细胞生长的失控。目前国外也有关于肝内外胆管癌组织中染色体 9p21 区段抑癌基因簇的异常改变的报道^[7-9]。

在本次研究中,p14 和 p16 蛋白的表达缺失率在肝外胆管癌组织、相应的癌旁组织和胆管炎组织之间两两比较均有显著性差异,而 p15 的表达在 3 种组织之间的差异无显著性,这表明 p14 和 p16 的表达异常可能参与了肝外胆管癌的发生或发展。我们还发现 p16 蛋白的表达缺失率无论是在肿瘤组织中,还是在癌旁组织中均高于 p14,这提示 p16 蛋白的表达异常在肝外胆管癌的发生、发展过程中可能扮演了一个更重要的角色。在本次研究中,p14 和 p16 蛋白的表达缺失率在肝外胆管癌的肿瘤组织中最高,而在相应的癌旁组织中的表达缺失率却比胆管炎组织高,这提示两者的表达异常可能是肝外胆管癌发生机制中的早期事件,然而二者的表达缺失率在伴有淋巴结或局部浸润的病例中却又明显高于不伴淋巴结转移或局部浸润的病例,这似乎又提示二者的表达异常在肝外胆管癌的发展过程中也扮演了一定的角色。

另外,目前国内绝大部分文章,在有关免疫组织化学染色结果判定上标准不统一,单纯的采用计数染色阳性细胞数或划分染色强度的方法可能会导致结果判断的误差增大。我们参考国外文献^[1],将两个指标综合考虑,取其乘积进行判断,可以更大程度上减少误差。

在前面我们曾经提到,抑癌基因的表达缺失可以由基因缺失、突变和启动子的甲基化等多种原因引起。在这次研究中我们利用免疫组织化学的方法,仅仅证实该抑癌基因簇中的 p14 和 p16 在肝外胆管癌组织以及癌旁组织中表达异常,但是在肝外胆管癌中基因的表达缺失是何种原因所致,我们尚未加以探讨,这还需要以后进一步研究。

(本文图见封 2)

参考文献:

- [1] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (22): 5071-5074.
- [2] Sasaki S, Kitagawa Y, Sekido Y, et al. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (24): 3792-3798.
- [3] Calero Moreno TM, Gustafsson G, Garwicz S, et al. Deletion of the Ink4 locus (the p16^{INK4a}, p14^{ARF} and p15^{INK4b} genes) predicts relapse in children with ALL treated according to the Nordic protocols NOPHO-86 and NOPHO-92 [J]. *Leukemia*, 2002, 16 (10): 2037-2045.
- [4] Kaye FJ, RBand cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (45): 6908-6914.
- [5] Peng CY, Chen TC, Hung SP, et al. Genetic alterations of INK4 α /ARF locus and p53 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22 (2B): 1265-1271.
- [6] Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, et al. Prognostic significance of p16^{INK4a} alterations and p21 loss of heterozygosity in locally advanced gastric adenocarcinoma [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 192 (3): 286-293.
- [7] Yoshida S, Todoroki T, Ichikawa Y, et al. Mutations of p16^{INK4}/CDKN2 and p15^{INK4B}/MTS2 genes in biliary tract cancers [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (13): 2756-2760.
- [8] Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Genetic and epigenetic alterations of the INK4a-ARF pathway in cholangiocarcinoma [J]. *J Pathol*, 2002, 197 (5): 624-631.
- [9] Caca K, Feisthammel J, Klee K, et al. Inactivation of the INK4a/ARF locus and p53 in pancreatic extrahepatic bile duct cancers and bile tract cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97 (4): 481-488.

[编辑校对:刘红武]

肝外胆管癌中染色体 9p21 区段抑癌基因簇表达异常的研究

(正文见 523 页)

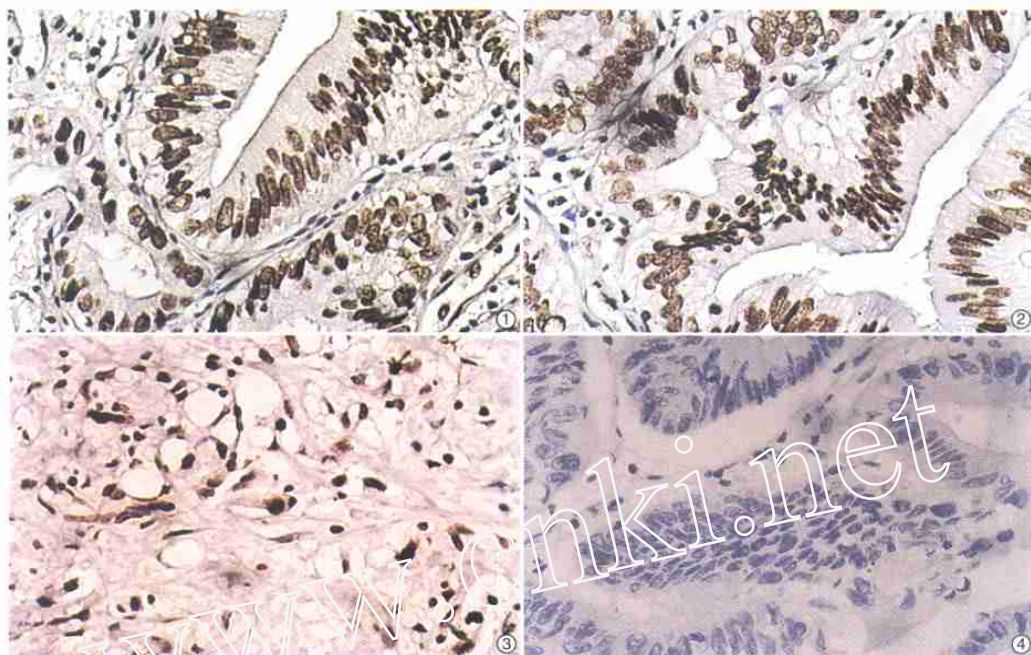


图1 在胆管炎组织中, p14 表达强阳性, 染色位于细胞核 × 400
图2 在胆管炎组织中, p16 表达强阳性, 染色位于细胞核 × 400
图3 在癌旁组织中, p15 表达呈阳性, 染色也位于细胞核 × 400
图4 在肿瘤组织中, p16 表达阴性, 细胞核无染色 × 400

散发性结直肠癌中 FHIT 蛋白与 Msh2、bcl-2、bax 蛋白表达的关系

(正文见 548 页)

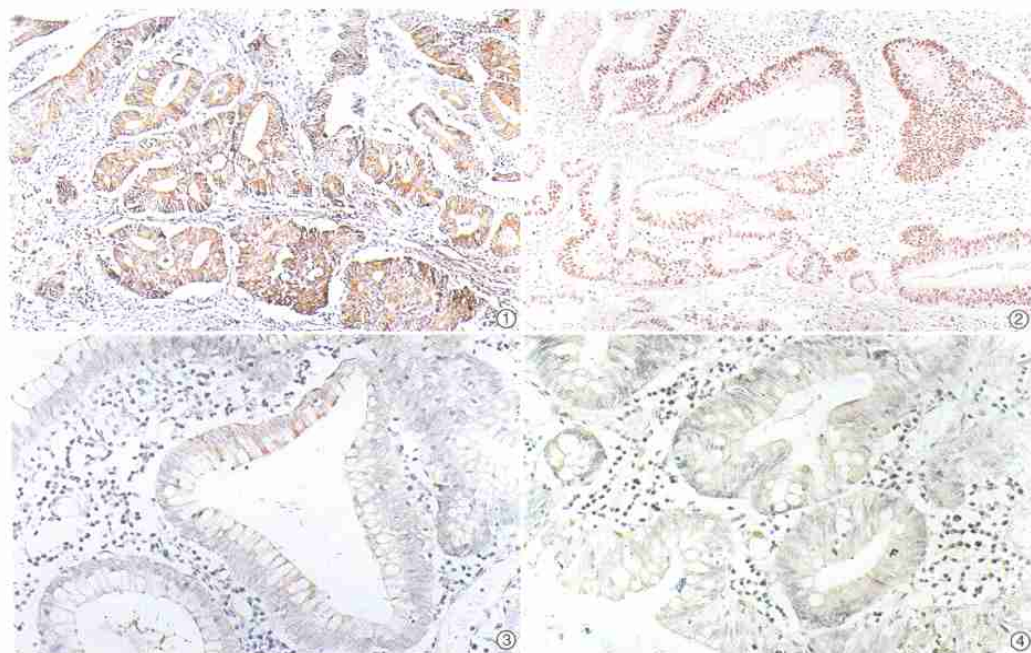


图1 散发性结直肠癌组织 FHIT 蛋白阳性表达, 阳性部位为细胞的胞浆被染成黄褐色 (S-P × 100)
图2 散发性结直肠癌组织 Msh2 蛋白阳性表达, 阳性部位为细胞核被染成棕黄褐色 (S-P × 100)
图3 散发性结直肠癌组织 bcl-2 蛋白阳性表达, 阳性部位为细胞浆和核膜被染成棕黄色 (S-P × 200)
图4 散发性结直肠癌组织 bax 蛋白阳性表达, 阳性部位为细胞浆和核膜被染成棕黄色 (S-P × 200)