文章编号:1000-5404(2009)07-0577-04

论著

大鼠肺鳞癌癌变过程中细胞周期调控蛋白的动态表达

刘文斌,刘晋祎,周紫垣,周燕虹,敖 琳,崔志鸿,曹 佳 (第三军医大学军事预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨化合物诱导的大鼠肺鳞癌癌变各阶段细胞周期调控蛋白P16、P27和P53水平动态变化趋势、相互关系及其在癌变过程中的作用。**方法** 3-甲基胆蒽(MCA)及二乙基亚硝胺(DEN)碘油溶液诱发Wistar大鼠肺鳞癌。采用免疫组化S-P法检测P16、P27和P53蛋白在大鼠肺鳞癌癌变各阶段的表达水平,采用Western blot检测鳞癌、癌旁和正常组织中各蛋白表达水平。**结果** 共获取癌变各阶段标本164例,其中正常支气管上皮20例,增生25例,鳞状化生27例,不典型增生37例,原位癌30例,浸润癌25例。P16和P27蛋白表达的阳性率随癌变进展而降低,P53蛋白表达的阳性率随癌变进展而升高。P16与P27蛋白表达呈正相关($P<0.01$),P16和P27蛋白表达与P53蛋白表达呈负相关($P<0.05$)。鳞癌组织中P16与P27蛋白低表达,P53蛋白高表达,与正常组织或癌旁组织有显著性差异($P<0.01$)。**结论** 在癌变过程中细胞周期调控蛋白P16和P27表达下调,P53蛋白表达逐渐增强,可能与大鼠肺鳞癌的发生、发展密切相关。

关键词: 肺肿瘤;癌变;P16;P27;P53
中图法分类号: R394.3; R730.23; R734.2 **文献标识码:** A

Dynamic expression of cell cycle regulation related proteins during carcinogenesis of lung squamous cell carcinoma in rats

LIU Wen-bin, LIU Jin-yi, ZHOU Zi-yuan, ZHOU Yan-hong, AO Lin, CUI Zhi-hong, CAO Jia (Department of Military Hygienic Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate dynamic expressions and correlation of cell cycle regulation related proteins, P16, P27 and P53 during the carcinogenesis of chemical-induced lung squamous cell carcinoma in Wistar rats. Methods Squamous cell carcinoma of lung was induced by left intra-bronchial instillating with 3-methylcholanthrene (MCA) and diethyinitrosamine (DEN) in iodized oil to 80 Wistar rats. Another 10 Wistar rats receiving intrabronchial instillation of iodized oil served as control. In 15, 35, 55, 65 and 75 d after the instillation, 16 rats from experimental group and 2 from the control were sacrificed for HE and SP staining, and Western blotting analysis. SP method was used to examine the expressions of P16, P27 and P53 proteins. Normal tissue, tumor tissue and corresponding adjacent noncancerous tissues were examined by Western blot analysis for the protein expressions of P16, P27 and P53. Results A total of 154 specimens at various pathological phases during carcinogenesis were obtained, including 25 hyperplasia, 27 squamous metaplasia, 37 dysplasia, 30 carcinoma *in situ* and 25 infiltrating carcinoma. The positive rates of P16 and P27 proteins were decreased and the positive rate of P53 protein was increased obviously when the carcinoma developed. The expression of P16 was positively correlated with P27 ($P<0.01$). The expression of P53 was negatively correlated with P16 and P27 ($P<0.05$). The downregulated P16 and P27 expressions, and P53 overexpression were frequently found in lung carcinoma. There was very significant statistical difference between carcinoma and corresponding adjacent noncancerous tissue or normal tissue ($P<0.01$). Conclusion The decreased expressions of P16, P27 and increased expression of P53 in the process of carcinogenesis may be associated with the incidence and development of lung squamous cell carcinoma in rats.

Key words: lung cancer; carcinogenesis; P16; P27; P53

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30571589)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571589)

作者简介: 刘文斌,男,湖南省华容县人,博士研究生,主要从事分子毒理学方面的研究。电话:(023)68772388,E-mail: wenbinliutmmu@sina.com
通信作者: 曹 佳,电话:(023)68752271,E-mail: caojia@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2008-08-12;**修回日期:** 2008-12-20

肺癌是全球性的恶性肿瘤[1],其发病机制一直不清。研究肺癌发生的分子机制,尤其是癌变过程的分子机制,对于提高肺癌早期诊断,降低肺癌发病率和死亡率具有重要意义[2]。细胞生命活动以细胞周期为中心,肿瘤发生、发展的研究,都涉及到细胞周期及其调控。细胞周期调控的异常是肿瘤发生的一个重要前提,主要表现在细胞周期分布时相的变化和相关调控因子—细胞周期蛋白(cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)及其抑制剂(CDKIs)表达异常。p16、p27和p53是目前发现的与肿瘤细胞周期调控最密切的3种抑癌基因,但是目前关于它们在肺癌癌变过程中动态表达及其相关关系的报道较少。本研究在我室前期建立的动物模型的基础上,应用免疫组织化学和Western blot检测P16、P27和P53蛋白在癌变过程中的表达,以探讨其与肺癌发生、发展的关系及相互作用机制,为阐明癌变机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

3-甲基胆蒽(MCA)、二乙基亚硝胺(DEN)为美国Sigma公司产品,小鼠抗大鼠p16和p27单抗分别为Santa Cruz和BD Biosciences公司产品,兔抗大鼠p53多抗为博士德公司产品,免疫组化S-P试剂盒购自北京中杉生物技术公司。

1.2 Wistar大鼠肺鳞癌模型的建立

Wistar大鼠90只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),雌雄各半,鼠龄6~8周,体质量180~220 g。实验组80只,对照组10只。大鼠肺鳞癌模型的建立采用"肺叶支气管灌注致癌质碘油"的方法[3,4],实验组每只大鼠左肺下叶一次性灌注0.1 ml致癌物碘油(含三甲基胆蒽10 mg,二乙基亚硝胺0.01 ml),对照组每只大鼠灌注0.1 ml碘油。于灌注后第15、35、55、65、75天随机抽取实验组动物16只和对照组动物2只处死。取大鼠左肺灌注部位病变组织,一分为二,一半固定于4%多聚甲醛,石蜡包埋后进行4 μm连续切片,除作常规HE染色外,其余均采用S-P法免疫组化染色标记;另一半迅速置于液氮中,然后转移至-80 ℃保存,为蛋白提取和Western blot分析备用。

1.3 免疫组织化学染色及结果判定

石蜡组织4 μm厚切片,经脱蜡、脱二甲苯和水化后,置0.01 mol/L,pH 6.0的枸橼酸缓冲液中,加热至95 ℃ 15 min,进行抗原热修复,3% H_2O_2孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶,加免疫性山羊血清孵育20 min,然后滴加稀释的一抗,p16、p27和p53工作浓度分1∶50、1∶200、1∶50,4 ℃过夜,滴加生物素标记的抗IgG抗体和辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液孵育30 min,加新鲜配制的DAB液显色,苏木精复染,然后脱水、透明、中性树脂封片,光镜下观察并摄片。上述抗体稀释和组织切片漂洗均用0.01 mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(PBS),每批染色均设立阴性对照(以PBS液代替一抗)。

p16、p27和p53免疫组织化学评价方法主要有两个方面:表达强度和细胞中表达部位。阳性结果为黄色或棕黄色染色,表达部位是在细胞质和/或细胞核。表达强度参照文献[5]的半定量标准,高倍镜下每张切片选10个视野,每个视野记数100个细胞,按阳性细胞所占比例及分布情况记录如下:阴性(-),单个细胞染色,阳性细胞数<25%;弱阳性(+),散在的或小的细胞团染色,阳性细胞数≥25%,<50%;阳性(++):片状或簇状细胞染色,阳性细胞数≥50%,<75%;强阳性(+++):弥散的细胞染色,阳性细胞数≥75%。

1.4 Western blot检测

蛋白提取:选取经病理学确认的正常、肿瘤及癌旁组织(距癌组织边缘2 cm以上),加入蛋白裂解缓冲液在研磨器中反复研磨,冰浴30 min,4 ℃、14 000 r/min离心,吸取上清液,Lowry法测定蛋白浓度。用裂解液将每个样本的蛋白浓度调整至3 μg/μl。SDS-PAGE:蛋白上样量60 μg,96 ℃ 10 min变性,浓缩胶浓度6%,分离胶浓度p16和p27为12%,p53为15%;转膜:采用半干法,恒压,将蛋白条带转印到NC膜(Milipore)上;封闭:5%脱脂奶粉封闭3 h后,PBS清洗4次,每次10 min;孵一抗:p16、p27和p53工作浓度分1∶100、1∶2 500、1∶400,4 ℃孵育过夜,PBS清洗4次,每次10 min;孵二抗:抗鼠二抗(1∶5 000,荧光标记),室温孵育30 min,PBS清洗4次,每次10 min;信号检测:在Odyssey荧光分析仪上进行信号检测。图像分析:目的条带采用图像分析软件进行光密度积分值分析。以β-actin为内参照,各蛋白与β-actin光密度积分值的比值作为蛋白表达含量。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,各蛋白阳性率差异比较采用χ^2检验,组间均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 大鼠肺癌癌变过程中的病理形态学改变

15~35 d后,实验组中有63只大鼠肺组织发生癌变,均为鳞癌。其癌变过程可见支气管黏膜上皮增生、鳞状化生、不典型增生、原位癌、浸润癌等多个阶段,且多为1例病变组织中同时存在多个癌变阶段。早期处死的大鼠,肺组织多为上皮增生、鳞状化生和不典型增生(图1A),晚期多为原位癌和浸润癌(图1B)。对照组大鼠除部分有间质性肺炎表现外,未发现明显的增生性或肿瘤性病变。癌变过程各阶段的计数结果:正常支气管上皮20例(包括对照组和实验组各10例),上皮增生25例,鳞状化生27例,不典型增生37例,原位癌30例,浸润癌25例。

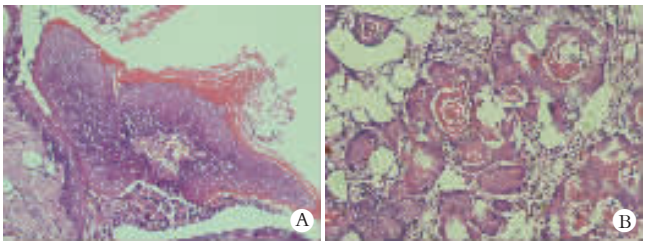
2.2 免疫组化结果

2.2.1 P16蛋白的表达 P16蛋白阳性表达主要定位于细胞核,呈棕黄或棕褐色,细胞质也有少量表达(图2A)。20例正常组织支气管黏膜上皮中18例有表达,阳性率90.00%,随着癌变的进展,阳性率逐渐降低。增生、鳞状化生、不典型增生、原位癌和浸润癌的阳性率分别为84.00%、70.37%、59.46%、53.33%和32.00%。浸润癌与正常、增生、鳞状化生

和不典型增生阶段阳性率有显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$),不典型增生、原位癌与正常组织,以及不典型增生与增生阶段阳性率均有显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$)。

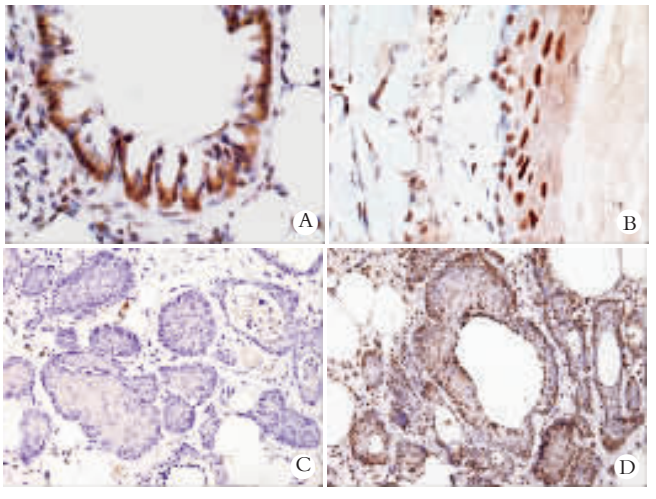
2.2.2　P27 蛋白的表达　　P27 蛋白阳性表达主要定位于细胞核,在高倍视野下呈棕黄色颗粒。从正常到癌变各阶段可见上皮细胞由强阳性到弱阳性表达,浸润癌阶段只在癌巢基底细胞有少许表达(图 2B、C)。正常组织支气管黏膜上皮中 P27 蛋白表达阳性率为 95.00%,与不典型增生(67.57%)、原位癌(60.0%)和浸润癌(40.40%)相比具有显著性差异($P<0.05$)。此外,浸润癌阶段阳性率与增生(88.00%)、鳞状化生(74.08%)和不典型增生相比亦具有显著性差异($P<0.05$)。

2.2.3　P53 蛋白的表达　　P53 阳性表达于细胞核内,正常和增生组织无表达,随着癌变的进展阳性率逐渐升高。癌变支气管上皮或癌巢各层均可见散在或片状分布的阳性细胞(图 2D)。浸润癌(60.00%)与鳞状化生(18.52%)和不典型增生(32.43%)阶段阳性率有显著性差异($P<0.05$),原位癌(43.33%)与鳞状化生阶段阳性率差异有统计学意义($P<0.05$)。



A: 支气管上皮不典型增生; B: 浸润癌

图 1　实验组大鼠肺组织病理学观察　(HE×100)



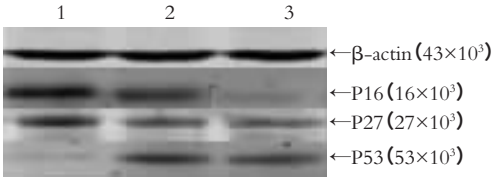
A: 正常支气管黏膜的 P16 蛋白阳性表达; B: 癌变组织中 P27 蛋白阳性表达; C: 浸润癌中 P27 蛋白阴性表达; D: 浸润癌中 P53 蛋白的阳性表达

图 2　P16、P27、P53 蛋白在不同组织中表达的免疫组化观察　(S-P×200)

2.2.4　P16、P27、P53 蛋白表达的相关性　　P16 阳性表达的 98 例肺癌中,84 例 P27 阳性表达,仅 14 例 P27 阴性表达;而 P53 仅在 20 例中阳性表达,78 例阴性表达;P27 阳性表达的 107 例肺癌中,有 26 例 P53 呈阳性表达,余 81 例 P53 呈阴性表达。P16 与 P27 表达呈显著正相关($\chi^2=44.999$, $P=0.000$),P16、P27 与 P53 表达呈负相关($\chi^2=6.046$, $P=0.014$; $\chi^2=4.106$, $P=0.043$)。

2.3　Western blot 结果

从正常支气管黏膜到癌旁组织和癌组织,P16 和 P27 蛋白表达皆逐渐降低,而 P53 蛋白表达皆逐渐增强(图 3,表 1)。各蛋白表达在不同组别间都有明显差异($P<0.01$)。



1:正常组织;2:癌旁组织;3:癌组织

图 3　Western blot 检测正常、肿瘤及癌旁组织中 P16、P27 和 P53 蛋白表达

表 1　P16、P27 和 P53 蛋白在正常、癌旁和癌组织中的表达

组别	n	P16	P27	P53
正常组织	10	1.05±0.17	0.94±0.09	0.12±0.04
癌旁组织	10	0.58±0.16[a]	0.64±0.07[a]	0.48±0.11[a]
癌组织	10	0.21±0.07[ab]	0.38±0.18[ab]	0.85±0.13[ab]

a: $P<0.01$, 与正常组织比较; b: $P<0.01$, 与癌旁组织比较

3　讨论

细胞周期调控通过正向作用的 CDK 与负向作用的 CDKI 相互作用实现。P16 与 P27 是具有代表性的 CDKIs。P16 可与 cyclinD 竞争结合 CDK4,直接抑制其活化,使细胞周期阻滞于 G_1 期。本研究结果显示支气管黏膜上皮癌变过程中,P16 蛋白阳性率呈明显的下降趋势。正常组织 P16 蛋白表达明显高于癌旁组织和癌组织。提示在化合物导致的大鼠支气管上皮癌变过程中可能存在由纯合性缺失、杂和性缺失、5'CpG 岛甲基化或点突变等导致的 p16 基因失活[6]。说明 p16 基因表达的异常是支气管黏膜上皮癌变过程中的早期事件,上皮细胞在由正常发展成癌的过程中,p16 基因的改变在逐步积累,最终才表现为形态学及生物学特性的改变。目前已发现多种化合物导致的肺肿瘤与 P16 蛋白的异常表达有关,并且多项研究表明启动子区域的甲基化紊乱是其蛋白表达丢失的主要机制[7]。此外,在 MNNG 诱导的大鼠胃癌中也发现了高频率的 p16 基因甲基化和蛋白表达丢失[8]。而本研究中 P16 蛋白表达的丢失是否由甲基化导致还有待进一步研究。

P27 蛋白主要作用于 G_1 期激酶复合物,其抑制活性主要有 2 个途径:一是通过与 CDK 亚单位的结合,使 CDK 处于非活性状态;二是直接结合 cyclin-CDK 复合物上抑制其激酶活性,阻止细胞周期从 G_1 期向 S 期的转化[9]。目前关于 p27 在肿瘤中的研究多集中于乳腺癌、肠癌,而在肺癌中的研究比较少。本研究采用免疫组化和 Western blot 检测癌变各阶段 p27 表达情况,结果表明正常组织阳性率为 95.00%。在癌变过程中 p27 表达有显著性降低。p27 水平的下降可能通过 2 种机制促进肿瘤的发生、发展。一方面促进 G_1 期的进展、增加细胞的增殖速度,这种现象已经在乳腺癌中得到证实[10];另一方面可能使肿瘤细胞对抗增殖信号失去敏感性即不发生细胞凋亡,从而间接促进了肿瘤的发生、发展。同时本研究还显示,P27 与 P16 蛋白表达呈显著正相关,提示可能存在某种协同作用共同调控细胞周期。

p53 基因及其蛋白产物可通过参与细胞周期的负调节而调控细胞的增殖和分化。p53 基因分野生型和突变型 2 种。野生型 p53 是抑癌基因,通过对细胞生长的调控和促进程序性细胞死亡的发生而起抑癌作用,其蛋白产物半衰期短,含量低,因此本研究中采用免疫组化方法检测到的 P53 蛋白均为突变型。突变型 p53 是致癌基因,其促进细胞转化,具有致癌效应[11]。本研究结果表明 P53 蛋白在正常和增生上皮未发现表达,在支气管上皮鳞状化生阶段开始有表达,而后随着癌变进展表达不断升高,说明 P53 蛋白表达是支气管上皮癌变的早期事件并且与肺癌的发生、发展密切相关,提示其可作为判断肿瘤发生的重要标志物。Blanco等[12]在研究二氧化硅诱导的大鼠肺腺癌时发现,随着癌变的进展,P53 蛋白表达逐渐升高,在不典型增生阶段达到最高值,而后开始下降。进一步研究表明 P53 蛋白表达阳性的肿瘤中突变发生率很低,与人肺癌中 p53 突变率较高的结论相矛盾,可能是因为大鼠基因组中 p53 基因比较保守。因此,进一步研究 p53 基因结构的改变,将有助于阐明其在支气管上皮癌变机制中的作用和意义。

本研究观察到在 MCA 及 DEN 诱发的大鼠肺鳞癌癌变过程中,细胞周期调控蛋白参与了其中某些阶段。p16 和 p27 与肺癌启动及进展有关并且有协同作用,与 p53 可能存在负反馈作用。从上述基因产物功能的角度看,联合检测上述蛋白的表达并对其基因进行进一步分析,对了解肺癌的启动、发生、发展和癌细胞恶性表型的维持,阐明探讨细胞周期的级联调控机制与肺癌癌变的关系具有重要的意义。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58 (2): 71 - 96.

[2] Paleari L, Granone P, Grozio A, *et al*. Commentary: early diagnosis of lung cancer: where do we stand? [J]. Oncologist, 2007, 12(12): 1433 - 1436.

[3] Tian H S, Liu M Q, Gao W Q, *et al*. Induction of Lung carcinoma by intralobar bronchial instillation of iodized oil in rats[J]. Chin Med J (Engl), 1984, 97 (1): 36 - 40.

[4] 刘文斌, 刘晋祎, 曹 佳. 大鼠肺鳞癌模型两种麻醉方法的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18 (1): 54 - 57.

[5] Wang Y C, Lin R K, Tan Y H, *et al*. Wild-type p53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2005, 23 (1): 154 - 164.

[6] Gazzeri S, Gouyer V, Vour'ch C, *et al*. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers[J]. Oncogene, 1998, 16 (4): 497 - 504.

[7] Kondo K, Takahashi Y, Hirose Y, *et al*. The reduced expression and aberrant methylation of p16 (INK4a) in chromate workers with lung cancer[J]. Lung Cancer, 2006, 53(3): 295 - 302.

[8] Bai H, Gu L, Zhou J, *et al*. p16 hypermethylation during gastric carcinogenesis of Wistar rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [J]. Mutat Res, 2003, 535(1): 73 - 78.

[9] Besson A, Hwang H C, Cicero S, *et al*. Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype[J]. Genes Dev, 2007, 21(14): 1731 - 1746.

[10] Viglietto G, Motti M L, Bruni P, *et al*. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer[J]. Nat Med, 2002, 8 (10): 1136 - 1144.

[11] Tam A S, Foley J F, Devereux T R, *et al*. High frequency and heterogeneous distribution of p53 mutations in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors [J]. Cancer Res, 1999, 59 (15): 3634 - 3640.

[12] Blanco D, Vicent S, Fraga M F, *et al*. Molecular analysis of a multistep lung cancer model induced by chronic inflammation reveals epigenetic regulation of p16 and activation of the DNA damage response pathway[J]. Neoplasia, 2007, 9 (10): 840 - 852.

(编辑 王 红)