DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.025

论著

文章编号:1000-5404(2004)12-1098-04

小细胞肺癌 $p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$蛋白表达及其临床意义

李军果[1],叶明福[2],胡义德[1] (第三军医大学新桥医院:[1]肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,[2]病理科,重庆 400037)

提 要:目的 研究$p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$蛋白在小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)中的表达及其临床意义。方法 应用免疫组织化学S-P方法检测24例SCLC癌组织标本中两种蛋白表达。结果 24例标本中,15例$p14^{ARF}$蛋白表达阴性(62.50%),4例$p16^{INK4a}$蛋白表达阴性(16.67%),3例$p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$蛋白表达均阴性(12.50%)。$p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$蛋白阴性率均与患者性别、年龄、临床分期及淋巴结转移无显著性差异($P>0.05$)。结论 SCLC中$p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$蛋白表达阴性是各自独立的事件,可能与SCLC的发生有关,其中$p14^{ARF}$表达阴性占主要地位。

关键词:小细胞肺癌;蛋白表达;$p14^{ARF}$;$p16^{INK4a}$
中图法分类号:R394.3;R734.2 文献标识码:A

Expressions of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4a}$ proteins in small cell lung cancer and the clinical significance

LI Jun-guo[1], YE Ming-fu[2], HU Yi-de[1] ([1]Cancer Research Center, [2]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the expressions of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4a}$ proteins in small cell lung cancer (SCLC) and the clinical significance. **Methods** The expressions of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4a}$ proteins in 24 SCLC samples were detected by immunohistochemistry (SP method). **Results** The negative expression rates of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4a}$ were 62.50% (15/24) and 16.67% (4/24), respectively. Negative expressions of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4a}$ were found in 3 cases (12.50%). The negative expression rates of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4a}$ were not associated with the clinical stages, lymph node metastasis, age, and sex of the patients ($P>0.05$). **Conclusion** The negative expressions of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4a}$ proteins in SCLC, particularly that of $p14^{ARF}$, may be associated with the genesis of SCLC.

Key words: small cell lung cancer; protein expression; $p14^{ARF}$; $p16^{INK4a}$

肺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年升高,已跃居各类恶性肿瘤之首,因此,对肺癌防治的研究必须高度重视。肺癌细胞一个重要的生物学特性是细胞周期调控的失衡[1]。抑癌基因INK4a-ARF同时编码两个蛋白即$p16^{INK4a}$和$p14^{ARF}$,这两个蛋白均为细胞周期调控因子,分别通过cyclin D-CDK4-pRb-E2F和MDM2-p53通路履行调控细胞周期的职责[2]。它们在肺癌中频发失活,但迄今很少有两者同时在SCLC中的表达及意义的研究报道。我们采用免疫组织化学S-P方法对24例SCLC标本中$p14^{ARF}$和$p16^{INK4a}$蛋白表达进行检测,探讨二者各自及联合表达阴性的临床意义,为判断SCLC的预后及选择治疗手段提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集我院1996-2003年间经病理证实的SCLC患者手术切除的肿瘤标本,共24例。常规福尔马林固定、石蜡包埋、2 μm连续切片,HE染色确诊。其中,男性16例,女性8例。最小年龄27岁,最大年龄74岁,平均年龄52岁。有淋巴结转移者5例,无淋巴结转移者19例。局限期17例,广泛期7例。另选20例肺炎症性病变作为对照组。

1.2 试剂

第一抗体兔抗人$p14^{ARF}$多克隆抗体,鼠抗人$p16^{INK4a}$单克隆

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170293);重庆市自然科学基金资助项目(2002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170293) and Chongqing Natural Science Foundation (2002)
作者简介:李军果(1970-),女,河北省邯郸市人,硕士研究生,主治医师,主要从事恶性肿瘤放化疗敏感性调控方面的研究,现在在河北省邯郸市中国人民解放军第285医院工作。电话:(023)68774701
通信作者:胡义德,E-mail:liumingm@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-03-30;修回日期:2004-05-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

抗体; 第二抗体超敏链酶卵白素-过氧化酶(S-P)试剂盒(广谱), DAB 显色试剂盒。以上试剂均为即用型, 购自福州迈新生物技术开发公司。

1.3　方法

采用免役组化 S-P 法对 24 例 SCLC 标本及 20 例肺炎症性病变组织进行 $p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$蛋白的检测。主要步骤: 将切片置烤箱 60 ℃脱蜡至水, 1∶10 稀释的抗原修复液(pH 9.0)高温修复切片, 置湿盒 37 ℃恒温孵育 20 min, 暴露抗原决定簇; 3% 过氧化氢甲醇液 37 ℃孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性; 10% 正常山羊血清封闭液 37 ℃孵育 20 min, 减少非特异性背景染色; 滴加第一抗体(兔抗人 $p14^{ARF}$多抗或鼠抗人 $p16^{INK4a}$单抗)置湿盒内 37 ℃孵育 1 h; 滴加生物素标记的二抗置湿盒内 37 ℃孵育 20 min; 滴加 S-P 溶液置湿盒内 37 ℃孵育 30 min; DAB 显色, 镜下控制反应时间, 一般不超过 10 min; 苏木素复染, 脱水透明, 中性树胶封片。

1.4　结果判定

光学显微镜下高倍镜观察 $p14^{ARF}$蛋白阳性部位是细胞核, $p16^{INK4a}$蛋白阳性部位以细胞核为主。根据 $p14^{ARF}$及 $p16^{INK4a}$在 SCLC 瘤细胞中的反应强度, 半定量划分反应等级: 强阳性(+++): 癌组织弥漫黄褐色着色; 阳性(++): 较弥漫或大片状棕黄色着色; 弱阳性(+): 小片状或灶性反应; 阴性(−): 肿瘤组织无着色。

1.5　统计学处理

根据资料性质, 应用 SPSS11.0 软件进行 Fisher 精确检验及配对 χ^2 检验。

2　结果

2.1　SCLC 的基本病理形态

24 例 SCLC 形态结构基本一致, 主要以弥散及片巢状排列的燕麦样小细胞构成, 其胞浆少, 核小, 浓染, 分裂像易见(图 1)。

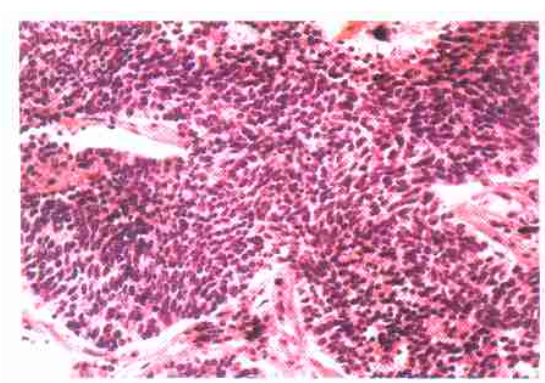


图 1　肺小细胞癌　(HE× 400)

Fig 1　Small cell lung cancer　(HE× 400)

2.2　$p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$在 SCLC 中的表达

24 例 SCLC 组织中, $p14^{ARF}$阳性表达 9 例, 阴性表达 15 例, 表达阴性率为 62.50%, 阳性者以部分癌细胞核散在阳性反应为主(6 例: +; 2 例: ++; 1 例: +++)(图 2); $p16^{INK4a}$阳性表达 20 例, 阴性表达 4 例, 表达阴性率为 16.67%, 大部分病例的癌细胞均显弥漫性胞核及胞浆着色(3 例: +; 6 例: ++; 11 例: +++)(图 3)。两种蛋白表达阴性率差异有非常显著的意义(P=0.001)。肺炎症性病变对照组 20 例肺组织均显阳性或强阳性表达。

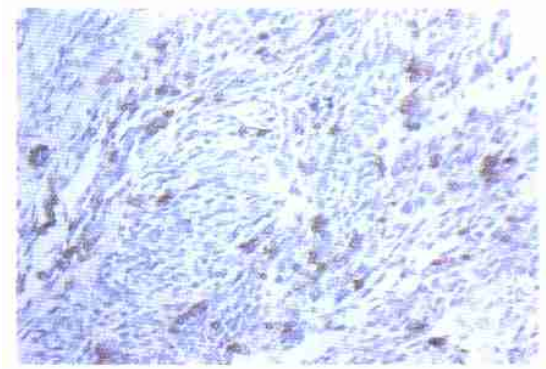


图 2　**$p14^{ARF}$在 SCLC** 中的阳性表达, 核呈棕黄色　(S-P× 400)

Fig 2　Positive expression of $p14^{ARF}$ in SCLC　Nuclei were brownish-yellow stained (S-P× 400)

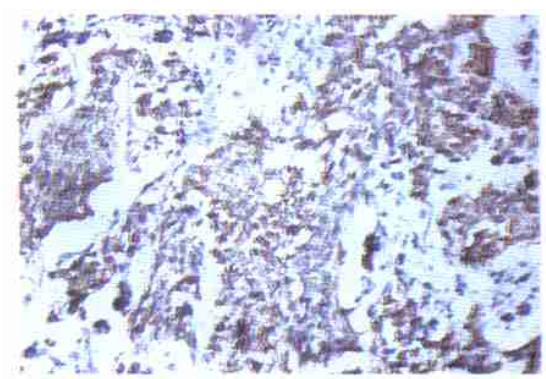


图 3　**$p16^{INK4a}$在 SCLC** 中的阳性表达, 胞核及胞浆呈棕黄色　(S-P× 400)

Fig 3　Positive expression of $p16^{INK4a}$ in SCLC　Nuclei and cytoplasm were brownish-yellow stained (S-P× 400)

2.3　$p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$在 SCLC 中共表达阴性情况

本组资料中 $p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$表达共阴性 3 例, 占 12.50% (3/24); $p14^{ARF}$阳性表达而 $p16^{INK4a}$阴性表达 1 例, 占 4.17% (1/24); $p16^{INK4a}$阳性表达而 $p14^{ARF}$阴性表达 12 例, 占 50.00% (12/24); $p14^{ARF}$或 $p16^{INK4a}$单一阴性加上共阴性表达占 66.7% (16/24)。见表 2。经统计学分析 $p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$表达阴性相互间无显著性差异(P= 0.591)。

2.4　SCLC 中 $p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$表达与临床病理特征的关系

经统计学分析 $p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$表达阴性率与患者性别、年龄、有无淋巴结转移及临床分期均无显著性差异(P> 0.05)。见表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 $p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$表达与SCLC临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship of $p14^{ARF}$ and $p16^{INK4a}$ protein expressions with clinicopathological characteristics of SCLC

Characteristics	n	$p14^{ARF}$		Negative rate (%)	P	$p16^{INK4a}$		Negative rate (%)	P
		−	+~+++			−	+~+++		
Sex					0.675				0.593
Male	16	10	6	62.50		3	13	18.75	
Female	8	5	3	62.50		1	7	12.50	
Age					0.122				0.637
＜50	11	5	6	45.45		2	9	18.18	
≥50	13	10	3	45.45		2	11	15.38	
Lymph node metastasis					0.640				0.365
Without	19	12	7	63.16		4	15	21.05	
With 1-3	5	3	2	60.00		0	5	0	
Clinical stage					0.461				0.538
Localized	17	10	7	58.82		4	13	23.53	
Extensive	7	5	2	71.43		1	6	14.29	

3 讨论

INK4a-ARF 基因位于人第9号染色体短臂2区1带(9p21),此基因位点有2个启动子,产生两个独特的转录产物,它们共享部分外显子,但读框互不相同,因而编码的不同蛋白质通过不同径路对细胞周期起负调控作用[3]。INK4a 由3个外显子(Exon1α、Exon2、Exon3)和2个内含子组成,3个外显子共同编码细胞周期素依赖性激酶4(CDK4)抑制蛋白即$p16^{INK4a}$,其分子量为16×10^3,由156个氨基酸组成。该蛋白与细胞周期素D(cyclin D)竞争性结合CDK4,抑制CDK4的催化活性,从而抑制Rb蛋白磷酸化,减少延伸因子E2F释放,使细胞分裂不能通过$G_1\rightarrow S$限制点而被阻滞于G_1期。ARF是INK4a的可变读框基因,它与INK4a共享Exon2和Exon3,取代Exon1α的是位于其上游约20×10^3处的Exon1β,3个外显子共同编码分子量为14×10^3的蛋白即$p14^{ARF}$,由133个氨基酸组成。该蛋白主要与癌蛋白MDM2结合,加速MDM2降解,恢复和稳定细胞p53水平,增强p53在$G_1\rightarrow S$和$G_2\rightarrow M$的限制点效应,最终使细胞阻滞于G_1和G_2期[4]。

INK4a-ARF 是哺乳动物细胞中为数不多的重叠编码基因位点,$p16^{INK4a}$和$p14^{ARF}$蛋白在功能上的相似与协调性,决定了该基因位点的重要生物学意义[5]。近年来已证实INK4a-ARF基因在神经胶质瘤、黑色素瘤、鼻咽癌、乳腺癌、头颈部肿瘤、白血病、食道癌、胃癌、胰腺癌等恶性肿瘤中表达频发阴性,其功能失活的机制主要包括该基因的阴性、突变和甲基化。与此同时,学者们对发病率和死亡率极高的肺癌也进行了与INK4a-ARF基因异常的相关性研究,并取得了明显进展。许多学者的研究结果显示,肺癌INK4a基因失活主要发生在NSCLC中,其阴性率约为50%甚至更多,在SCLC中INK4a基因失活的频率很低甚至不发生[6]。而ARF基因在SCLC中阴性率为65%,在NSCLC中阴性率为25%[7]。INK4a-ARF基因位点纯合阴性很少发生在NE肺癌(起源于肺部的神经内分泌癌)中[8]。INK4a-ARF基因阴性除与肺癌发病密切相关外,还与肺癌发展及预后有着密切关系[9]。但也有研究显示,INK4a-ARF基因改变与临床和预后的关系无统计学意义[10]。本研究重点探讨了$p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$在SCLC中的共表达情况,发现:①本组SCLC标本中$p14^{ARF}$或$p16^{INK4a}$单一阴性加上均阴性表达比例为66.7%(16/24),说明SCLC中$p16^{INK4a}$、$p14^{ARF}$蛋白表达阴性率较高,其中$p14^{ARF}$表达阴性率明显高于$p16^{INK4a}$,提示INK4a-ARF基因表达改变具有一定的组织特异性,而$p14^{ARF}$蛋白表达阴性可能与SCLC的发生有关;②24例SCLC标本中只有3例$p16^{INK4a}$、$p14^{ARF}$蛋白表达均阴性,推测SCLC INK4a-ARF基因位点DNA一级结构阴性发生率很低,不超过12.5%(3/24),因为$p16^{INK4a}$、$p14^{ARF}$蛋白表达均阴性可能还存在启动子区甲基化或点突变等原因;③$p16^{INK4a}$、$p14^{ARF}$表达阴性相互间无显著性差异($P>0.05$),提示它们表达阴性是各自独相立的事件,这可以从两个基因具有各自的启动子得到解释;④$p14^{ARF}$、$p16^{INK4a}$蛋白阴性率与患者性别、年龄、临床分期及淋巴结转移均无明显差异($P>0.05$)。此结果可能与病例数少有关,需要进一步扩大样本量的研究。

参考文献:

[1] Xue Q, Sano T, Kashiwabara K, *et al*. Aberrant expression of pRb, p16, $p14^{ARF}$, MDM2, p21 and p53 in stage I adenocarcinomas of the lung[J]. Pathol Int, 2002, 52(2): 103—109.

[2] Gibson S L, Dai C Y, Lee H W, *et al*. Inhibition of colon tumor progression and angiogenesis by the Ink4a/Arf locus[J]. Cancer Res, 2003, 63(4): 742—746.

[3] Kuo M L, Duncavage E J, Mathew R, *et al*. Arf induces p53-dependent and -independent antiproliferative genes[J]. Cancer Res, 2003, 63(5): 1046—1053.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[4] 胡义德, 高 楠, 曹世龙. 肺癌 INK4a/ARF 基因缺失与突变研究进展[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2000, 20(2): 102－104.
[5] Silva J, Silva J M, Dominguez G, *et al*. Concomitant expression of $p16^{INK4a}$ and $p14^{ARF}$ in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms[J]. J Pathol, 2003, 199(3): 289－297.
[6] Kim D H, Nelson H H, Wiencke J K, *et al*. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3419－3424.
[7] Sato M, Horio Y, Sekido Y, *et al*. The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines[J]. Oncogene, 2002, 21(31): 4822－4829.
[8] Chaussade L, Eymin B, Brambilla E, *et al*. Expression of p15 and p15.5 products in neuroendocrine lung tumours: relationship with p15(INK4b) methylation status[J]. Oncogene, 2001, 20(45): 6587－6596.
[9] Gessner C, Liebers U, Kuhn H, *et al*. BAX and $p16^{INK4A}$ are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of non-small cell lung cancer[J]. Eur Respir J, 2002, 19(1): 134－140.
[10] 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.

（编辑 陈聪连）

文章编号: 1000-5404(2004)12-1101-02

个案与短篇

急性重症胰腺炎并发 ARDS 早期临床观察及护理

Early observations and nursing care for patients with severe acute pancreatitis complicated with ARDS

黄和平, 肖 静 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆科, 重庆 400042）

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)严重并发症之一, 病死率高。1997 年 2 月至 2002 年 12 月我科收治符合SAP 临床诊断标准的病人 86 例, 并发 ARDS 19 例。治愈 11 例, 死亡 8 例。抢救成功的病例大多数是在 ARDS 早期。因此, 在护理中做好护理评估, 加强对并发症早期症状的观察并采取有效措施, 有利于阻止病变向 ARDS 与多器管衰竭(multiple organ failure, MOF)发展, 降低病死率。总结相关护理体会, 报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

86 例SAP 并发ARDS 19 例。男性 11 例, 女性 8 例。年龄 47～86 岁, 平均 62 岁。8 例合并胆囊结石, 8 例有高脂饮食史, 3 例无明显诱因。发生 ARDS 的时间为病后 48 h 至 10 d, 其中 3 例发生在手术治疗后, 14 例在发病后 2～3 d, 2 例发生在 7～10 d。

1.2 临床表现

本组病例均有剧烈腹痛、呕吐和不同程度腹膜炎表现, 6 例有黄疸, 9 例有休克表现, 9 例有血性腹水。出现 ARDS 后表现呼吸急促, 呈进行性呼吸困难, 呼吸频率 30～38 次/min, 胸部 X 线摄片发现肺部模糊或斑片状阴影 11 例, 少量胸水 3 例。确诊时 PaO_2 38～63 mmHg (4.9～8.2 kPa), 平均 54 mmHg (7.1 kPa)。O_2sat 78%～86%。

作者简介: 黄和平(1956－), 女, 安徽省泾县人, 副主任护师, 主要从事腹部外科护理方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: (023)68757247

收稿日期: 2003-06-11; 修回日期: 2004-03-12

2 观察与护理

2.1 观察炎症反应的程度

SAP 不仅表现为胰腺局部炎症, 而且表现为全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。SAP 病人应安置在监护房间, 常规使用床边监护仪, 监测血压、心率、呼吸、体温、氧饱和度。定期监测血尿淀粉酶、血糖、血常规, 评估 SIRS 程度。SIRS 严重程度与肺损伤和 ARDS 的发病密切相关, 是临床动态观察的重要指标[1]。本组病人均符合修订后 SIRS 标准[2] 2 项以上。即: 体温＞38 ℃或＜36 ℃; 心率＞100 次/min; 呼吸频率＞22 次/min; 或 $PaCo_2$＜4.3 kPa; WBC 计数＞12.0×10^9/L 或＜4.0×10^9/L 或未成熟中性粒细胞＞0.10。在病情观察中把符合SIRS 标准 2 项以上的SAP 患者看成是高危病人, 警惕ARDS 发生。

2.2 评估肺部情况, 观察 ARDS 先兆

ARDS 是 SAP 引起的过度全身炎症反应综合征在肺部的表现[3]。在做好SAP 常规护理基础上加强肺部情况评估, 1～2 h 听诊肺部呼吸音变化, 观察有无胸闷、呼吸急促、有无进行性呼吸困难及 ARDS 先兆[4], 即: 呼吸＞35 次/min、吸氧流量 6 L/min 时 PaO_2＜10.7 kPa, 并排除左心功能不全引起者。了解胸部 X 线摄片情况及动脉血气结果。本组 11 例胸部 X 线摄片发现肺部模糊或斑片状阴影。PaO_2 38～63 mmHg (4.9～8.2 kPa), 平均 54 mmHg (7.1 kPa)。O_2sat 78%～86%。

2.3 纠正低氧血

SAP 往往早期出现低氧血症, 大约 20%经处理未能纠正者可发展成ARDS。有效给氧是纠正低氧血症的主要措施。根据

（下转 1104 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net