DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.011
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
1246 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)14-1246-04

p63基因在小细胞肺癌及肺腺癌组织中转录表达水平的研究

郭 伟,范士志,蒋耀光,陈建明,李志平,牛会军 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所胸心外科,重庆 400042)

提 要:目的 研究p63基因在人类小细胞肺癌(Small-cell lung carcinoma, SCLC)及肺腺癌组织中转录表达水平及其意义。方法 采用RT-PCR(Reverse transcriptase-PCR)方法对6例小细胞肺癌及15例肺腺癌组织中p63基因两种亚型(TAp63及ΔNp63)转录表达情况进行检测和比较,同时用免疫组化检测p63蛋白在上述组织中的表达情况。结果 5例SCLC肿瘤组织及1例SCLC癌旁组织中ΔNp63呈阳性表达,所有SCLC肿瘤、癌旁及远癌肺组织均无明显TAp63表达;腺癌肿瘤、癌旁及远癌肺组织TAp63与ΔNp63表达均为阴性(RT-PCR)。p63蛋白在SCLC组织中的阳性表达率和表达强度明显大于腺癌组织(免疫组化)($P<0.01$)。结论 p63基因在小细胞肺癌中呈阳性表达,其中主要是ΔNp63表达水平升高,而p63蛋白在SCLC中表达水平明显高于腺癌组织,这可能与其在小细胞肺癌发生、发展中所起的调控作用有关;推测ΔNp63基因在小细胞肺癌组织中转录表达水平升高可能抑制细胞凋亡,促进肿瘤增殖,起到癌基因作用。

关键词:p63;小细胞肺癌;肺腺癌;p53基因家族;基因表达
中图法分类号:R394.3;R730.23;R734.2 文献标识码:A

Expression of p63 gene in small cell lung carcinoma and lung adenocarcinoma

GUO Wei, FAN Shi-zhi, JIANG Yao-guang, CHEN Jian-ming, LI Zhi-ping, NIU Hui-jun (Department of Cardiothoracic Surgery, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the significance of p63 gene expression in small cell lung carcinoma (SCLC) and lung adenocarcinoma. **Methods** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was used to observe p63 gene expression (TAp63 and ΔNp63) in 6 cases of SCLC and 15 cases of lung adenocarcinoma. The p63 protein expression was also observed imunohistochemically. **Results** Over-expressed ΔNp63 was found in 5 cases of SCLC and in tumor-adjacent tissues in 1 case of SCLC. There was no expression of TAp63 in SCLC, tumor-adjacent and tumor-free tissues. RT-PCR showed negative expressions of TAp63 and ΔNp63 in adenocarcinoma, tumor-adjacent and tumor-free tissues. Imunohistochemical staining revealed that the positive-staining rates and intensity of p63 protein in SCLC were significantly higher than those in lung adenocarcinoma ($P<0.01$). **Conclusion** There is positive expression of p63 gene in SCLC, which may be related to the function of p63 in genesis and development of SCLC. The overexpression of ΔNp63 in SCLC can suppress the apoptosis and accelerate the proliferation of tumor, so ΔNp63 may be an oncogene amplified in SCLCs.

Key words: p63; SCLC; lung adenocarcinoma; p53 gene family; gene expression

p63是p53基因家族的又一成员,目前研究证实其与上皮组织发育密切相关[1],并且p63的两种亚型在功能上存在明显差异[2],其中TAp63表达水平升高可以促进细胞凋亡,而ΔNp63的过表达则可抑制细胞凋亡,故而起到癌基因功能。本研究采用RT-PCR(Reverse transcriptase-PCR)及免疫组化方法检测p63基因在人类小细胞肺癌及肺腺癌组织中转录表达的情况,着重探讨其与组织分型及小细胞肺癌发生、发展之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集我院2000至2002年外科手术切除并经病理检查证实之小细胞肺癌病变标本6例,其中男性4例,女性2例,年龄42~67岁(平均50.7岁),除1例为42岁外,其余5例均在50岁以上(83.3%)。男性病例中有3例有长期重度吸烟史(75%),所有病例均经病理证实,其中Ⅱ期3例,Ⅲ期3例。另收集肺腺癌标本15例,每例均取肿瘤、癌旁(距肿瘤边缘2 cm)及远癌肺组织各一份。一半标本10%福尔马林固定,常规脱水留作病理及免疫组化检查;另一半标本取材液氮速冻后保储于-70 ℃下直至提取组织RNA。

作者简介:郭 伟(1974-),男,贵州省贵阳市人,医师,主要从事肺癌的诊断与外科治疗方面的研究。电话:(023)68757241

收稿日期:2002-11-18;修回日期:2003-01-25

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

1.2　组织总 RNA 的提取

采用 Tripure 分离试剂一步法提取：约 500 mg 组织自－70 ℃冰箱中取出后于预冷 Tripure 分离试剂 1 ml 中研磨至浆状，12 000 × *g* 15 min 离心后吸出上清以 0.5 ml 异丙醇沉淀 RNA，再度离心 12 000× *g* 10 min 后以 75％乙醇洗涤、干燥，所得 RNA 沉淀加入 30～50 μl DEPC 处理水溶解，于－70 ℃下保存备用。

1.3　RT-PCR

逆转录（RT）：2 μg RNA 与 1 μg Oligo$(dT)_{15}$ 混合后加入 DEPC 处理水至总体积 10 μl，70 ℃孵育 5 min 后加入 dNTP 各 0.5 mmol/L，Tris-HCl 50 mmol/L（pH 8.3），KCl 40 mmol/L，$MgCl_2$ 7 mmol/L，AMV-RT 30 U，加入 DEPC 处理水至总体积 20 μl。反应混合物 42 ℃孵育 1 h，90 ℃孵育 5 min 后冰上冷却备用。

PCR 扩增反应：引物（由 Takala 公司合成）序列为：TAp63 上游引物 5′-ATGTCCCAGAGCACACAG-3′，下游引物 5′-AGATCATG-GTTGGGGCAC-3′；扩增片段为 629 bp。ΔNp63 上游引物 5′-CA-GACTCAATTTAGTGAG-3′，下游引物 5′-AGCTCATGGTTGGGGCAC-3′；扩增片段为 441 bp。为保证逆转录稳定性，以 β-actin（引物购自 Stargene 公司）为内参照，扩增片段为 661 bp。所有反应均以 4 μl 逆转录 cDNA 为模板，反应体系含 dNTP 各 200 μmol/L，10× PCR buffer 5 μl，$MgCl_2$ 15 mmol/L，*Taq* DNA 聚合酶 1 U，p63 基因或 β-actin 上、下游引物各 1.0 μmol/L，加入 DEPC 处理水至总体积为 50 μl。反应条件为：95 ℃变性 60 s，60 ℃褪火 60 s，72 ℃延伸 90 s，经 35 个循环后取 10 μl PCR 产物经 1％琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色，紫外灯下观察结果、照相。将扫描所得照片于 Epiochemi II 图像分析仪下进行分析，以目的条带与 β-actin 内标带的积分吸光度比值反映 p63 基因的相对表达水平。根据 ΔNp63（或 TAp63）/β-actin 比值大小来判断 ΔNp63 或 TAp63 表达水平高低，ΔNp63（或 TAp63）/β-actin＜0.1 为阴性，＞0.1 时为阳性。

1.4　免疫组化检测 P63 蛋白表达及结果判定

鼠抗人 P63 多克隆抗体（4A-4）及生物素标记兔抗鼠二抗购自 Newmarker 公司，免疫组化 S-P 试剂盒为美国 Zymed 公司产品，按试剂盒说明书进行染色，用 PBS 代替一抗作阴性对照，用已知肺鳞癌阳性切片作阳性对照。

结果判断：免疫组化染色阳性反应为黄-棕黄颗粒，p63 定位于细胞核。两人双盲法观察切片，阳性细胞占全部肿瘤细胞的比例 0（－），＜25％（＋），25％～75％（＋＋），＞75％（＋＋＋）。

1.5　统计学方法

数据分析采用 SPSS 软件包处理，采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　RT-PCR

5 例 SCLC 肿瘤组织及 1 例 SCLC 癌旁组织中 ΔNp63 呈阳性表达，见图 1，目的条带与 β-actin 内标带的积分吸光度比值间无明显差异（$P>0.05$）；1 例 SCLC 肿瘤组织及其余癌旁、远癌组织无明显 ΔNp63 表达，所有 SCLC 肿瘤、癌旁及远癌肺组织均无明显 TAp63 表达。腺癌肿瘤、癌旁及远癌肺组织 p63 基因（ΔNp63 及 TAp63）表达均为阴性，见表 1。图 2 表明 ΔNp63 在 SCLC 及肺腺癌肿瘤组织中转录水平有显著差异，并且在 SCLC 肿瘤及癌旁组织间也有显著差异（$P<0.01$）。

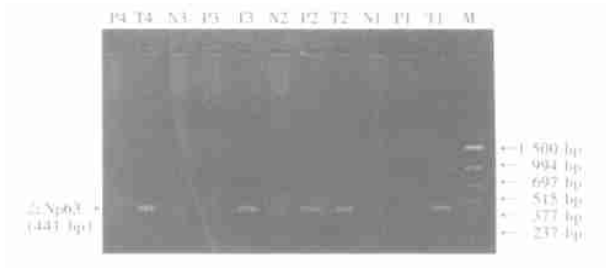


图 1　p63 基因在 SCLC 肿瘤、癌旁及远癌组织中的表达情况（RT-PCR）

Fig 1　Expression of p63 RNA in SCLC, tumor-adjacent and tumor-free tissues (RT-PCR)

表 1　p63 基因在 SCLC 及肺腺癌中的表达情况（RT-PCR）

Tab 1　p63 gene expression in SCLC, adenocarcinoma and tumor-adjacent tissues (RT-PCR)

	n	TAp63		ΔNp63	
		Positive	Negative（%）	Positive（%）	Negative（%）
SCLC（T）	6	0	6（100）	5（83.3）	1（16.6）
Adenocarcinoma（T）	15	0	15（100）	1（6.7）	14（93.3）*
SCLC（P）	6	0	6（100）	1（16.6）	5（83.3）
Adenocarcinoma（TA）	15	0	15（100）	0	15（100）

T：Tumor tissue，TA：Tumor-adjacent tissue；　*：$P<0.01$ *vs* SCLC

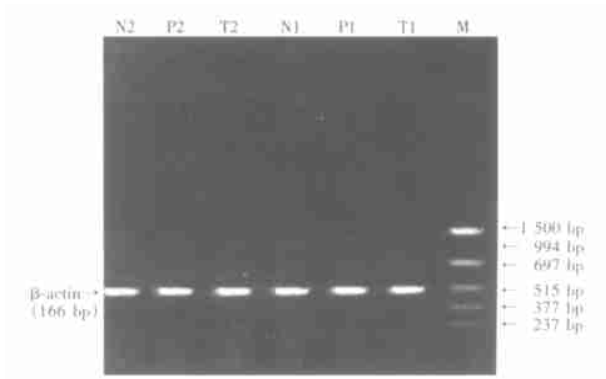


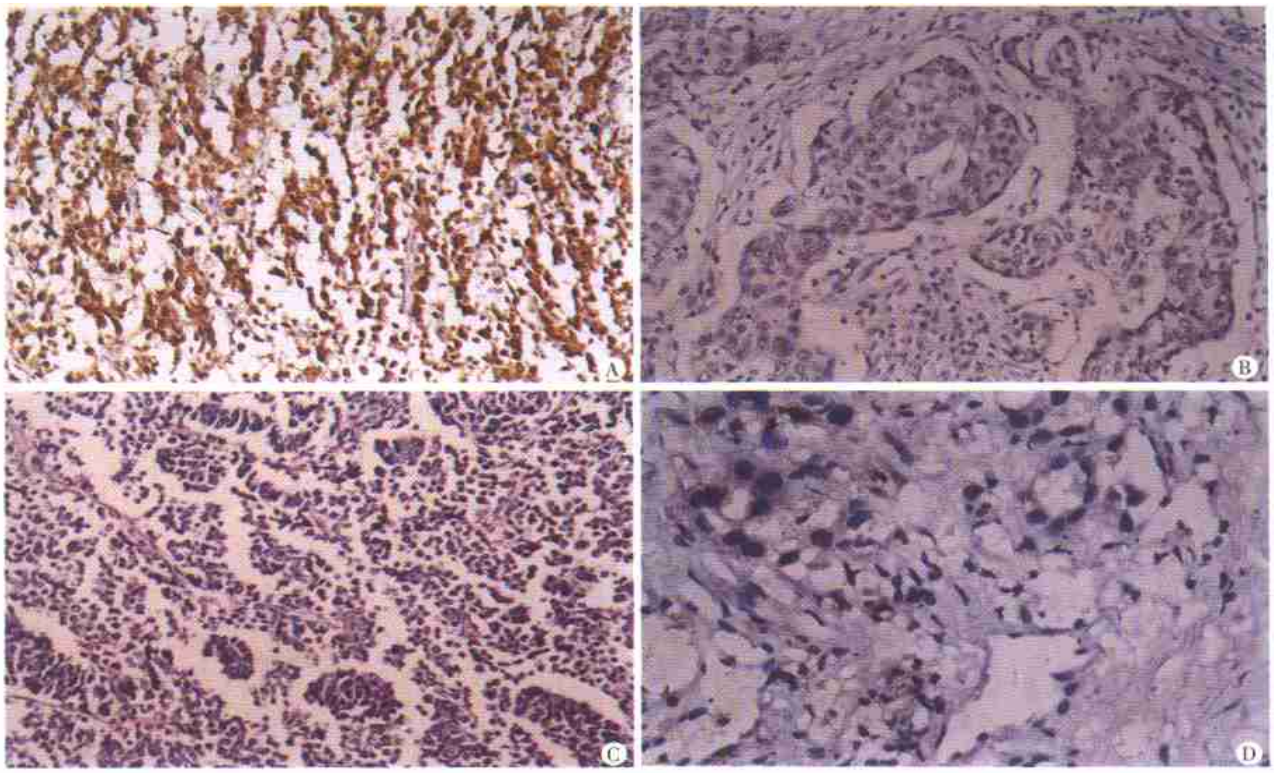
图 2　β-actin 在 SCLC 肿瘤、癌旁及远癌组织中的表达情况（RT-PCR）

Fig 2　Expression of β-actin in SCLC, tumor-adjacent and tumor-free tissues (RT-PCR)

2.2　免疫组化

6 例 SCLC 肿瘤组织中有 5 例 P63 蛋白呈强阳性表达（＋＋以上），见图 3A，1 例 SCLC 肿瘤组织 P63 蛋白表达呈阴性，见图 3C，癌旁及远癌肺组织内 P63 表达均为阴性；15 例腺癌癌组织中有 1 例 P63 蛋白呈阳性表达（＋），见图 3B，其余腺癌癌旁及远癌组织均无 P63 蛋白表达，见图 3D。P63 蛋白呈黄-棕黄颗粒，定位于细胞核。P63 蛋白表达水平与肿瘤组织分型关系密切，在 SCLC 组织中 P63 蛋白表达率和表达强度明显大于腺癌组织（$P<0.01$），而与性别、年龄及临床分期无明显关系，表明 P63 蛋白在 SCLC 肿瘤组织中高表达，而在肺腺癌及癌旁、远癌组织中无明显表达，见表 2。

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



A: SCLC tissue (S-P× 200) positive; B: Mid-classifying adenocarcinoma tissue (S-P× 200) positive; C: SCLC tissue (S-P× 200) negative; D: Low classifying adenocarcinoma tissue (S-P× 400) negative

图 3 P63蛋白在人类小细胞肺癌(SCLC)及肺腺癌中的表达情况

Fig 3 Expression of P63 protein in SCLC and adenocarcinoma tissues

表 2 P63 蛋白在 SCLC 及肺腺癌肿瘤组织中的表达情况(免疫组化)

Tab 2 P63 protein expression in SCLC and adenocarcinoma tissues (immunohistochemical staining)

	n	P63 protein expression(%)	
		−	+ ~ +++
SCLC(T)	6	1(16.6)	5(83.3)
Adenocarcinoma (T)	15	14(93.3) *	1(6.7)

T: Tumor tissue; *: $P<0.01$ *vs* SCLC

3 讨论

小细胞肺癌(SCLC)是各种组织类型肺癌中恶性程度最高的一种,许多病人由于肿瘤在病变早期的广泛转移而失去外科手术机会。尽管其对放射线及化疗较敏感,绝大多数病人在确诊后的 2 年内即因原发和转移病灶死亡,SCLC 患者的 2 年生存率不到 5%[3]。目前研究已证实肺癌形成过程是一种多因素共同作用的结果,其中多种基因表达水平、功能和彼此间的相互影响起着关键作用。目前已发现在肺癌组织中主要的基因变异包括:p53、Rb 基因的突变与失活;K-ras 基因的突变及降解[4]。其中 p53 在 SCLC 中出现突变失活的几率为 70%,而且 p53 的突变在一些肺癌癌前病变中也可发现,这表明在肺癌形成的早期起关键作用的是肿瘤抑制因子如 p53 的失活。作为 p53 基因家族的一员,p63 在肿瘤的发生、发展中也起着一定的作用,近年来通过对 p63 基因的深入研究已证实人类 p63 基因定位于染色体 3q27~29 区,包含 15 个外显子,由于启动子的变化及可变性拼接,p63 基因至少编码 6 种蛋白质形式[5]。mRNA从5′启动子开始时编码含有转录活化区的 p63 蛋白形式(TAp63),当转录从 3′启动子开始时则编码缺乏转录活化区的 p63 蛋白形式(ΔNp63)。由于可变性拼接,在合成 TAp63 及 ΔNp63 时形成了 3 种不同的 C-末端,即 α,β,γ。p63 的两种亚型在功能上存在明显差异,其中 TAp63 表达水平升高可以促进细胞凋亡,而 ΔNp63 的过表达则可抑制细胞凋亡,故而起到癌基因功能。

我们的研究结果表明在 SCLC 组织中 ΔNp63 转录表达水平明显升高,而 TAp63 在 SCLC 组织中则无明显表达。而 p63 基因的两种亚型在肺腺癌及其癌旁、远癌组织中均无明显表达。在 6 例 SCLC 中有 5 例肿瘤组织及 1 例癌旁组织 ΔNp63 呈阳性表达;1 例肿瘤组织及其余癌旁、远癌组织中无明显 ΔNp63 表达。所有标本组织中均无 TAp63 表达,并且 ΔNp63 的表达水

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

平与肿瘤临床分期间无明显相关。这表明:①在 SCLC 中表达水平升高的 p63 基因亚型为 ΔNp63;②ΔNp63 表达水平与肿瘤临床分期无明显关系。Hibi 等[6] 观察到 ΔNp63 在肺鳞状上皮癌中表达水平异常升高,而且 ΔNp63 呈阳性表达的细胞株与空白对照组在肿瘤细胞集落形成率及裸鼠接种后肿瘤直径上存在显著差异,由此得出 ΔNp63 在肺鳞状上皮癌中起癌基因作用。本研究观察到的结果与此类似,表明 ΔNp63 在 SCLC 中同样起着癌基因功能。提示 ΔNp63 在 SCLC 肿瘤形成、进展及转移过程中发挥一定的调控作用,主要表现在肿瘤组织中 ΔNp63 表达水平升高,而促进细胞凋亡的 TAp63 表达水平相对于正常肺组织无明显改变,因此可以推测 p63 基因在 SCLC 中所起的作用主要是促进肿瘤细胞快速增殖、扩散。

p63 能够调节血管内皮生长因子(VEGF)表达[7],其中 TAp63γ 抑制 VEGF 表达而 ΔNp63α 起促进其表达的作用,这一途径是通过调节缺氧诱导因子(HIF)1α 稳定性实现的。由于 VEGF 表达水平以及与之相关的微血管密度(MVD)可作为评价 SCLC 病人预后及转归的一个重要因素[8],这表明在 SCLC 中由于 ΔNp63 过表达而引起的 VEGF 表达水平升高,也是促进小细胞肺癌肿瘤组织快速增殖并广泛转移的重要原因之一。展望今后,如能在小细胞肺癌肿瘤细胞中促进 TAp63 表达,发挥其肿瘤抑制因子作用的同时,抑制 ΔNp63 的过度表达从而封闭其癌基因活性,很可能会是 SCLC 基因治疗的一种新的策略和方法。

参考文献:

[1] 柯 勇,范士志,蒋耀光. p53 基因家族研究进展[J]. 第三军医大学学报,2000,22(12):1215-1217.
[2] Dohn M, Zhang S, Chen X, *et al*. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes[J]. Oncogene, 2001,20(25):3193-3205.
[3] Smyth J F, Fowlie S M, Gregor A, *et al*. The impact of chemotherapy on small cell carcinoma of the bronchus[J]. Q J Med, 1986,61(234):969-976.
[4] Sekido Y, Fong K M, Minna J D. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1378(1):F21-F59.
[5] Yang A, Kaghad M, Wang Y, *et al*. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes mutiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities[J]. Mol Cell, 1998,2(3):305-316.
[6] Hibi K, Trink B, Patturajan M, *et al*. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97(10):5462-5467.
[7] Senoo M, Matsumura Y, Habus S, *et al*. Tap63gamma(p51A) and dNp63aipha(p73L), two major isoforms of the p63 gene, exert opposite effects on the vascular endothelial growth factor(VEGF) gene expression[J]. Oncogene, 2002,21(16):2455-2465.
[8] Fontanini G, Faviana P, Lucchi M, *et al*. A high vascular count and overexpression of vascular endothelial growth factor are associated with unfavourable prognosis in operated small cell lung carcinoma[J]. Br J Cancer, 2002,86(4):558-563.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2003)14-1249-01

个案与短篇

腹膜恶性间皮瘤 6 例临床分析

Clinical analysis of 6 patients with peritoneal malignant mesothelioma

肖 航[1],刘海峰[2] (第三军医大学附属西南医院:[1] 老年病科;[2] 全军消化专科中心,重庆 400038)

我院于 1994 年 11 月至 2002 年 6 月共收治腹膜恶性间皮瘤 6 例,现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般情况

本组 6 例,男 3 例,女 3 例。年龄 26~71 岁。病史 20 d 至 11 月不等,均无确切石棉接触史。

1.2 临床表现

主诉单纯腹胀、腹痛 2 例。腹胀、腹痛合并低热、盗汗 2 例。腹胀、腹痛合并腹部包块 2 例。

1.3 辅助检查

6 例患者腹部 B 超均证实有腹水;其中 2 例经查体及腹部 CT 证实腹部有包块,1 例胸片发现多发性结节。6 例腹水检查均为渗出液,为黄色混浊液体。腹水检查均未发现瘤细胞。

1.4 诊断情况

4 例经腹腔镜下腹膜活检,病理证实为腹膜恶性间皮瘤;1 例经 B 超引导下穿刺腹部包块活检病理证实为腹膜恶性间皮瘤;1 例因肠梗阻经剖腹探查,术后病理证实为腹膜恶性间皮瘤。

1.5 治疗与预后

2 例以腹水为主要表现的患者,经高聚金葡素腹腔内注射后(2 500 U/次,2~3 次/周),腹水无明显消退,1 个月后,患者均放弃治疗。余 4 例均未作进一步治疗。

作者简介:肖 航(1976-),男,黑龙江省齐市人,医师,主要从事老年医学方面的研究。电话:(023)68754000-73069

收稿日期:2002-08-23;修回日期:2002-09-15

(下转 1253 页)

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