DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.050
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1358 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1358-03

结直肠癌中抑癌基因ING1蛋白的表达及其意义

王自强,余佩武,蔡志民 (第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 了解大肠癌中ING1表达及其意义。方法 采用免疫组织化学方法检测52例大肠癌组织及正常大肠粘膜中ING1及p53蛋白表达。结果 在52例大肠癌组织中ING1蛋白表达较正常粘膜明显减弱(++:9.6%;+:38.5%),其表达减弱与Dukes分期及淋巴结转移情况有关,ING1蛋白表达与p53蛋白表达有关。结论 ING1蛋白表达下调在大肠癌发生、发展过程中起重要作用,表达情况与大肠癌的Dukes分期及转移、预后有一定关系。

关键词:结直肠癌;抑癌基因;ING1;免疫组织化学
中图法分类号:R394.2;R735.35.R735.37 文献标识码:A

Expression and significance of tumor suppressor ING1 in colorectal cancers

WANG Zi-qiang, YU Pei-wu, CAI Zhi-ming (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation between the expression of ING1 and the clinicopathological features in patients with colorectal cancer, and investigate the possible mechanism of ING1 in the oncogenesis of colorectal cancer. **Methods** All samples of normal mucosa and cancer tissues from 52 patients with colorectal cancer were detected for their protein expression levels of ING1 with the SP immunohistochemical staining. **Results** Diminished expression of ING1 protein was found in colotrectal tissue (++:9.6%;+:38.5%). The suppression of P33/ING1 expression was markedly related to the Dukes Stage and metastasis. A parallel relationship was found between the expression of ING1 and p53. **Conclusion** Down-regulation of ING1 may play an important role in the oncogenesis and development of colorectal carcinoma. Its content has a relation to Dukes stage and tumor metastasis, and might serve as a prognostic factor of colorectal carcinoma.

Key words: colorectal neoplasms; tumor suppressor genes; ING1; immunohistiochemistry

抑癌基因可能是抵御肿瘤发生发展的最重要的机制,只要它们具有完整的活性就可能有效地抑制肿瘤的发生,目前被发现的抑癌基因仅十余个,其中p53是研究最透彻同时也可能是最重要的抑癌基因。最近有研究报道p53并不能独立发挥抑癌作用,它需要有一个新发现的抑癌基因——ING1(Inhibitor of growth Ⅰ)的参与[1]。若ING1表达缺失或受到拮抗,p53的抑制生长作用即明显受到抑制,甚至消失。ING1是一个被证实具有抑制细胞生长、促进凋亡、参与细胞衰老调控的抑癌基因[2,3]。目前关于ING1在结直肠癌中表达的研究国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 标本来源

取自1998年10月至1999年10月在我院住院手术切除的大肠癌标本52例,手术中取距肿瘤边缘10 cm的正常粘膜及肿瘤组织。取材后迅速置液氮冻存备检。52例标本均经病理证实为大肠癌,且术前未做任何治疗。其中男性29例,女性23例,平均年龄50.28岁。

作者简介:王自强(1972-),男,四川省自贡市人,硕士,主治医师,主要从事结直肠癌发病基制及生物治疗方面的研究。电话(023)68754000-73074

收稿日期:2002-01-10;修回日期:2002-06-25

1.2 抗体

鼠抗人ING1单抗Cab1-4,加拿大Karl Riabowol教授惠赠。鼠抗人p53单抗Pab1801(Santa Cruz)。

1.3 免疫组化

按S-P试剂盒说明书进行。阳性结果判断:于5个不同高倍镜视野相同范围下计数500个细胞及免疫组化染色阳性细胞数,阳性细胞率小于5%计为阴性(-),5%~50%为阳性(+),大于50%为(++)。

1.4 统计学处理

采用SPLM软件进行χ^2检验,分析蛋白间表达关系用秩和检验。

2 结果

ING1在正常结肠粘膜中广泛表达,定位于细胞核,在结肠陷窝分布较少,而在肠腺顶端广泛细胞核着色,见图1。ING1在结肠癌组织中定位于肿瘤细胞核,52例中有5例(9.6%)呈强阳性表达,20例(38.5%)呈阳性表达,27例(51.9%)未表达ING1。ING1与患者性别、年龄、部位、肿瘤分化程度及肿瘤浸润深度无显著性差异($P>0.05$),见表1,而与Dukes分期及淋巴结转移情况有关,见表1。ING1蛋白在Dukes A、B、C、D期中表达阳性率分布为71.4%、68.7%、28.5%、37.5%,ING1在Dukes分期较早的A和B期表达明显高于Dukes C和D期,经统计分析,相差显著($P<0.05$)。无淋巴结转移组ING1表达阳性率为61.5%,而有淋巴结转移组ING1表达阳性率为34.6%,相差显著($P<0.05$)。ING1蛋白表达,Dukes分期较早而无淋巴结转

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

移的病例 ING1 表达较高, ING1 蛋白表达与患者年龄、性别、肿瘤部位、分化程度及肿瘤浸润深度无关系。p53 在结肠癌中表达于肿瘤细胞核, 52 例中有 12 例(23.1%)呈强阳性表达, 12 例(23.1%)呈阳性表达, 总阳性率 46.2%。在本研究中, p53 蛋白表达与所观察的所有临床指标均无显著性差异。在 p53 表达阴性的 28 例病例中有 19 例 ING1 表达缺失, 而 p53 阳性的 24 例病例中仅 8 例 ING1 表达阴性, 在 p53 蛋白表达阴性的病例中 ING1 蛋白表达明显缺失($P<0.05$), 见表 2。

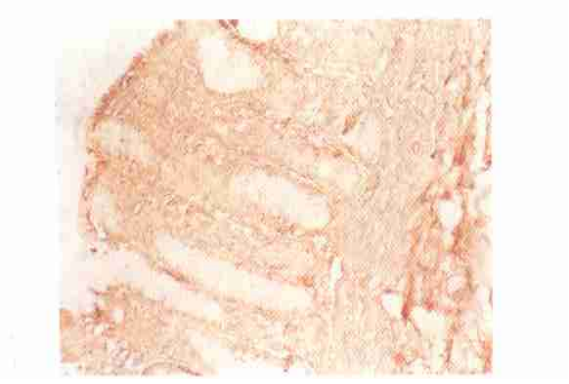


图 1　ING1 蛋白在正常结肠粘膜上皮细胞细胞核中广泛表达 (S-P× 100)

Fig 1　Extensive expression of ING1 protein in the nuclei of epithelial cells in normal colorectal mucosa (S-P× 100)



图 2　ING1 蛋白结肠癌组织中的表达 (S-P× 400)

Fig 2　Expression of ING1 protein in colorectal carcinoma tissue (S-P× 400)

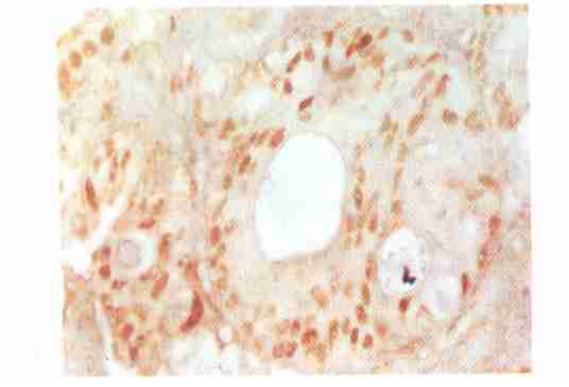


图 3　p53 在结直肠癌组织中的表达 (S-P× 400)

Fig 3　Expression of p53 in colorectal carcinoma tissue (S-P× 400)

表 1　ING1、p53 蛋白表达与结直肠癌临床病理的关系

Tab 1　Relationship of the expressions of ING1 and p53 proteins with clinicopathological features in patients with colorectal cancer

Items	ING1			P	p53			P
	−	+	++		−	+	++	
Gender								
Male	12	15	2	>0.05	14	10	5	>0.05
Female	15	5	3		14	2	7	
Age								
≤45	11	8	2	>0.05	10	7	4	>0.05
>45	16	12	3		18	5	8	
Location of tumor								
Colon	12	11	3	>0.05	13	6	7	>0.05
Rectum	15	9	2		15	6	5	
Differentiation								
Well	6	1	3		7	1	2	
Moderate	14	14	2	>0.05	15	7	8	>0.05
Poor	7	5	0		6	4	2	
Tumor penetration								
Mucosa	4	2	1		5	0	2	
Muscularis	10	8	1	>0.05	9	6	4	>0.05
Serosa and extra	13	10	3		14	6	6	
Dukes stage								
A	2	2	3		4	1	2	
B	5	9	2	<0.05	10	5	1	>0.05
C	15	6	0		13	3	5	
D	5	3	0		1	3	4	
Lymphamatic metastases								
With	17	9**		<0.05	15	5	6	>0.05
Without	10	16**			13	7	6	

**: Cases of + and ++ were combined

表 2　52 例结直肠癌 p53、ING1 表达情况

Tab 2　Correlation between the expressions of p53 and ING1

p53	ING1		Total
	−	+/++	
−	19	9	28
+/++	8	16	24
Total	27	25	$P<0.05$

3　讨论

ING1 是新发现的一个抑癌基因, 定位于 $13q^{33-34}$, 有 3 个外显子, 受不同的启动子控制, 转录出多种不同分子量的蛋白: $p32^{ING1}$、$p47^{ING1}$、$p24^{ING1}$、$p27^{ING1}$[4]。其中 $p47^{ING1}$ 在人类大多数组织中表达很低。关于各亚型的功能目前还不尽清楚。

当用反义 RNA 抑制 ING1 表达时, 可促进乳腺上皮细胞的悬浮生长及增加 NIH 3T3 细胞的集落形成、延长二倍体成纤维细胞的生存。外源性表达 ING1 将导致细胞的 G1 期静息及促进多种细胞发生凋亡。业已证明 ING1 参与了细胞生长的负性调节、细胞衰老控制及凋亡。本实验显示 ING1 表达于结直肠粘膜上皮细胞核, 在肠腺顶部表达明显强于肠腺中下部, 而在肠腺隐窝很少细胞阳性表达 ING1, 正常肠粘膜上皮细胞由隐窝部细胞有丝分裂产生, 逐步向肠腺顶部推移并走向衰老, 说明 ING1 主要表达于衰老的结肠上皮细胞, 说明 ING1 可能参与了正常结肠粘膜的衰老调控。在分期越晚, 伴有转移的大肠癌肿瘤中, ING1 蛋白表达水平越低。提示 ING1 可能通过下调表达, 减弱了对结直肠癌细胞的

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

生长抑制和癌细胞的凋亡发生，从而参与到结直肠癌的发生发展。同时提示检测 ING1 mRNA 表达可能有助于临床对大肠癌远处转移的判断。

在本研究中观察到在 52 例结直肠癌病例中 p53 蛋白阳性率 46.2%。p53 蛋白表达与所观察的所有临床指标均无显著关系，关于 p53 蛋白表达与结直肠癌临床病理指标的关系目前尚不统一，多数文献认为 p53 的表达与结直肠癌的临床病理无显著关系，这种现象很难用突变型 p53 的致瘤性作用解释，一些学者认为可能与 p53 作用的阶段性有关[5]。

研究证实 p53 在结直肠腺瘤向腺癌的恶变中发挥重要作用，同时 p53 的突变和杂合子缺失也参与了溃疡性结肠炎－不典型增生－癌的恶变过程。研究报道在结直肠癌中 p53 突变率为 22% ~ 70%，平均约 50%[5]。研究亦表明在表达野生型 p53 的阳性细胞中，p53 的功能也很少被激活[6]。已有的研究证明 p53 与 ING1 在功能发挥上具有相互制约，需要两个基因的同时存在才能发挥生长抑制及抗凋亡作用。本实验显示，与 p53 蛋白表达阳性组比较，在 p53 蛋白阴性的肿瘤组织中 ING1 蛋白表达亦明显缺失或表达减弱。由于野生型 p53 半衰期短，免疫组化方法不能检测，而突变型 p53 因半衰期延长而能为免疫组化检测，目前普遍认为 p53 阴性的肿瘤细胞多数具有野生型 p53，在这些肿瘤中虽然具有野生型 p53 基因，但可能因为 ING1 的低表达甚至缺失，使得野生型 p53 抑制肿瘤细胞增殖及促进凋亡的作用不能发挥，从而加快了结直肠癌的发生及发展。

参考文献：

[1] Garkavtsev I, Grigorian I A, Ossovskaya V S, *et al*. The candidate tumor suppressor P33ING1 cooperates with P53 in cell growth control[J]. Nature, 1998, 391(6 664): 295－298.

[2] IGor Garkavtsev, Karl Riabowol. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the P33ING1 candidate tumor suppressor[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(4): 2 014－2 019.

[3] Helbing C C, Veillette C, Riabowol K, *et al*. A novel candidate tumor suppressor: ING1, is involved in the regulation of apoptosis[J]. Cancer Res, 1997, 57(7): 1 255－1 258.

[4] Cheung KJ Jr, Li G. The tumor suppressor ING1: structure and function [J]. Exp Cell Res, 2001, 268(1): 1－6.

[5] 钱木华. 人大肠肿瘤组织 P53 基因突变表达及临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(5): 332－334.

[6] Lohrum M A, Vousden K H. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules[J]. Trends Cell Biol, 2000, 10(5): 197－202.

（编辑 王 红）

（上接 1357 页）

表 1 NG、CT、UU PCR 反应结果

	例数	阳性数	阳性率（%）	循环阈值（Ct）		
				最大值	最小值	平均值
NG	269	25	9.29	36.97	21.00	27.80
CT	419	30	7.16	37.00	21.77	29.90
UU	434	38	7.16	39.80	25.50	34.50

结果分析：Ct 值等于 0 或≥40 的样本为阴性。0＜Ct 值≤38 的为阳性。38＜Ct 值＜40 的样本重做。重做结果不等于 40 或 0 者为阳性，等于 40 或 0 为阴性（本次统计中出现 1 例结果 Ct 值大于 38，重做结果为阳性）。

3 讨论

快速，准确的诊断是正确指导临床、提高诊治水平的重要因素。传统的检测方法（细菌涂片，细菌培养，免疫学技术）普遍存在检出率低，周期长（48 h），特异性差的缺点。80 年代出现的 PCR 技术虽解决了检出率低，周期长的问题，但由于错误扩增和产物污染导致假阳性率高，不能正确指导临床实践。随着 PCR 技术的日臻成熟，已出现的荧光基因探针杂交定量 PCR 方法在常规 PCR 基础上，把目的基因扩增，特异分子杂交和荧光化学融为一体，利用基因扩增的灵敏性，分子杂交的特异性和光化学反应的精确性[3,4]，实时在线探测 PCR 过程中荧光信号强弱的变化，根据 PCR 反应的酶动力学特点，获得 DNA 模板的准确定量结果。由于该实验过程从扩增到检测均是在单管封闭条件下进行，并通过微机控制，实现了对扩增产物进行实时动态检测和结果的自动分析。与竞争性 PCR，PCR-EIIA 等定量 PCR 相比，荧光定量 PCR 不仅进一步提高了特异性，无需 PCR 后处理和冗长的电泳，紫外或染色检测，还具有定量范围宽，定量准确等优点，使假阳性率降低到最低限度，并且从根本上解决了 PCR 扩增产物污染的难题[2,5]。本研究应用荧光定量 PCR 方法对 1 122 例门诊送检标本进行检测，检出阳性感染患者 93 例，阳性率 8.29%。与最近欧美国家提供的社区筛检（NG/CT 8.7%）大体接近。据国内学者报告，通过 PCR 与传统方法比较，发现淋病治疗前镜检 85%阳性，培养 90%阳性，PCR 则为 100%阳性；而治疗后镜检 5%阳性，培养 10%阳性，PCR 为 35%阳性。由于荧光定量 PCR 具有上述特点，因此它不仅成为常规 PCR 的更新换代技术，还能正确指导临床做出诊断，为临床考评疗效提供依据。

关键词：荧光定量 PCR；淋球菌；沙眼衣原体；解脲支原体
中图法分类号：R446.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] 程 钢，何蕴韶，周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(3): 135－138

[2] 赖宏芳，付晓野，董玉琳，邓志军. 荧光探针定量 PCR 检测 HBV-DNA[J]. 上海医学检验杂志, 2000, 15(1): 18－19.

[3] Heid C A, Stevens J, Livak K J, *et al*. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 986－994.

[4] Gibson, Heid C A, Williams P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 995－1 001.

[5] 邹先进，罗 凯，蔡 兰. 实时荧光定量聚合酶链反应检测沙眼衣原体等病原体感染[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(2): 86.

（编辑 薛国文）

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