DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.021
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

文章编号:1000-5404(2001)12-1433-03

论著

肺癌中细胞凋亡水平和 p73 基因的转录表达的研究

何 勇,范士志,陈建明,蒋耀光,李志平 (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 通过观察肺癌癌组织、对应癌旁组织和远癌肺组织中细胞凋亡及 p73 基因转录表达水平的变化,探讨细胞凋亡及 p73 基因转录表达水平与肺癌发生、发展的关系。方法 采用 TUNEL 及 RT-PCR 技术检测 32 例非小细胞肺癌癌组织、癌旁组织和 7 例肺良性病变组织,以及对应正常肺组织细胞凋亡和 p73 mRNA 的表达水平,并结合临床病理学资料进行统计学分析。结果 ①肺癌组织中的凋亡指数明显高于癌旁肺组织和远癌肺组织($P<0.01$),细胞凋亡水平与肺癌组织学类型、分化程度和 P-TNM 分期无明显关系($P>0.05$);②肺癌组织中 p73 mRNA 表达水平和表达率明显高于癌旁肺组织、远癌肺组织和肺良性病变组织($P<0.01$);③组织中凋亡指数的升高和 p73 基因转录表达水平的增加呈显著的正相关($P<0.01$)。结论 肺癌组织中存在细胞凋亡水平的升高和 p73 基因的过度转录表达。

关键词:细胞凋亡;p73 基因;肺癌;基因表达;PCR;TUNEL
中图法分类号:R361.3;R734.2 文献标识码:A

Apoptosis level and p73 gene expression in human non-small cell lung cancer tissues

HE Yong, FAN Shi-zhi, CHEN Jian-ming, JIANG Yao-guang, LI Zhi-ping (Department of Thoracic Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract Objective To explore the relationship of the p73 gene transcript expression and the apoptosis level in cancerous tissues with the incidence and development of human non-small cell lung cancer(NSCLC). Methods The expression of p73 mRNA and the apoptotic index (AI) was detected in 32 human NSCLC tissues, 32 para-cancer tissues, 7 lung benign lesion tissues and matched non-cancer lung tissues with RT-PCR and TUNEL technique. All data were treated with statistical analysis. Results ① The AI was significantly higher in the lung cancer tissues than in the para-cancer tissues and normal lung tissues ($P<0.01$). No correlation was found between apoptosis level and the types, differentiation and P-TNM stages of NSCLC. ② p73 was over-expressed in 28/32 NSCLC tissues. The expression level of the p73 mRNA was significantly higher in the cancer tissues than in the para-cancer tissues and benign lesion tissues ($P<0.01$). ③The expression of p73 gene was positively correlated with the AI of tissue ($P<0.01$). Conclusion There is an over-expression of p73 mRNA and increase of apoptosis level in NSCLC tissues.

Key words: apoptosis; p73; lung cancer; gene expression; PCR; TUNEL

细胞凋亡是一种由凋亡相关基因调控的细胞自身程序化死亡的过程。研究表明,此过程的异常与肿瘤的发生和发展密切相关。通常认为肿瘤的发生、发展不仅是由于细胞增殖速度升高,而且与细胞凋亡过程受抑有关。抑癌基因 p53 能调控靶基因引起细胞周期停滞及细胞凋亡,是在人类肿瘤中发生变异频率最高的基因之一,并且与肺癌尤为相关。p73 是近来发现的 p53 基因家族的新成员,其产物与 p53 蛋白具有非常相似的结构和功能[1]。目前对肺癌组织中细胞凋亡与 p73 基因的转录表达关系的研究,国内外均未见报道。本研究应用 TUNEL 和 RT-PCR 技术对非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)癌组织、癌旁组织、远癌肺组织和良性病变肺组织的细胞凋亡及 p73 mRNA 表达水平进行检测,以探讨不同肺组织中细胞凋亡和 p73 基因的转录表达水平的变化及二者间的关系,分析细胞凋亡与肺癌临床病理特征的关系,p73 基因转录表达水平改变在肺癌发生、发展中的作用和意义。

基金项目:重庆市应用基础基金资助项目(99-5658)
作者简介:何 勇(1972-),男,贵州省遵义市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事 p53 家族基因在肺癌中作用方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)68757234
收稿日期:2001-04-03;修回日期:2001-10-16

1 材料与方法

1.1 研究对象

全部标本取自本科和重庆医科大学附一院胸心外科 1999 年 1 月至 4 月住院患者行手术切除的肺组织,并经病理学检查确诊。肺癌患者 32 例,肺良性疾病患者 7 例。肺癌病例中,男 23 例,女 9 例,年龄 41~72 岁,平均 57.5 岁;其中鳞癌 17 例,腺癌 13 例,腺鳞癌 2 例;病理分期采用 1997 年 UICC 肺癌国际分期标准,Ⅰ期 10 例,Ⅱ期 13 例,ⅢaⅢb 期 9 例。肺良性疾病中炎性假瘤 5 例,结核 2 例,其中男 3 例,女 4 例,年龄 48~62 岁,平均 53.7 岁。

1.2 主要试剂

Tripure 分离试剂、TUNEL 试剂盒购于 Boehringer Mannheim 公司;AMV-Rtase、Oligo(dT)15 引物购于 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶、核糖核酸酶抑制剂(Rnasin)、dNTP 和 PCR Marker 购于 Perkin-Elmer 公司;p73 引物由美国 Mayo 研究所 Wanguo Liu 教授合成后惠赠;β-actin 引物购自英国 Stratagene 公司。

1.3 实验方法

全部标本均在手术时收集。肿瘤均在原发灶取材,癌旁组

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

织取自相应肿块旁 2 cm，远癌肺组织取自距肿块 5 cm 以上之肺组织，在采集癌旁组织和远癌肺组织时特别注意防止被癌组织污染。组织标本一部分常规 10% 福尔马林固定做病理切片；另一部分标本取材后速冻保贮于液氮直至提取组织中的 RNA。冷冻组织按 Tripure 分离试剂盒说明书操作提取组织中的总 RNA，行 RT-PCR 电泳分析 p73 表达情况[2]。病理切片行 TUNEL 法原位细胞凋亡染色并计算出每张切片上的凋亡指数（Apoptotic index，AI）[3]。

1.4 统计学处理

实验数据采用 χ^2 检验、t 检验、F 检验和相关分析，SPSS 统计软件处理。

2 结果

2.1 不同肺组织中的凋亡水平

肺癌组织中 TUNEL AI 值（15.25%）明显高于癌旁肺组织（10.58%）和正常肺组织（9.84%）的 TUNEL AI 值，经 F 检验三组间差异显著（$P<0.01$）。两两比较：肺癌组织与癌旁组织和正常肺组织组间差异显著（$P<0.01$），癌旁组织与正常肺组织组间差异不显著（$P>0.05$），见表 1。细胞凋亡水平与肺癌临床 TNM 分期、组织学类型、细胞分化程度的关系均不显著（$P>0.05$）。肺癌细胞凋亡水平与临床 TNM 分期、组织学类型、细胞分化程度均无明显关系（$P>0.05$），见表 2。

表 1 不同肺组织中细胞凋亡水平的比较

Tab 1 Comparison of AI in the different kinds of pulmonary tissues

Groupe	*n*	AI(%)
Lung cancer tissues	32	15.25±4.2
Lung tissues adjacent to cancer	32	10.58±2.5**
Normal lung tissues	32	9.84±3.9**

**：$P<0.01$ *vs* lung cancer tissues

表 2 人 NSCLC 细胞凋亡水平与临床病理生理特征的关系

Tab 2 Relationship of AI and clinical pathophysiological characteristics of human NSCLC

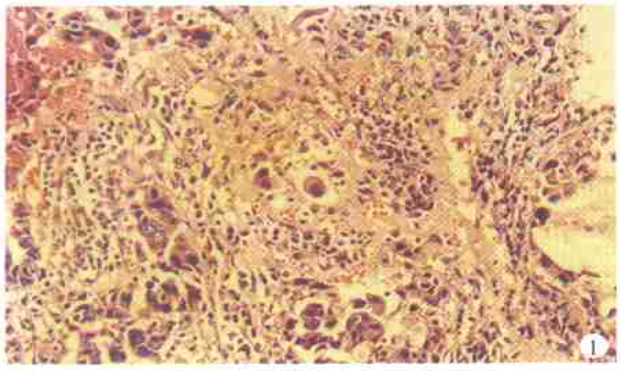
Groupe	*n*	AI(%)	*P*
P-TNM			
Ⅰ	10	15.33±3.7	
Ⅱ	13	14.85±4.1	$P>0.05$
Ⅲ	9	15.07±4.6	
Cell differentiation			
Poor	10	14.35±3.1	
Moderate	14	14.97±3.6	$P>0.05$
Well	8	15.58±2.5	
Histology			
Squamous cell carcinoma	17	15.02±4.5	$P>0.05$
Adenocarcinoma	13	15.16±3.7	

2.2 不同肺组织中 p73 基因的转录表达

32 例肺癌组织中 28 例 p73 表达阳性，癌旁组织中 5 例表达阳性，远癌肺组织 4 例表达阳性；28 例表达阳性肺癌组织的 p73 表达水平均明显高于对应正常肺组织；5 例表达阳性癌旁组织有 2 例 p73 表达水平明显高于对应正常肺组织；7 例良性病变肺组织及其对应正常肺组织均未见阳性表达。肺癌组织与癌旁组织、良性病变肺组织及对应正常肺组织之间 p73 mRNA 表达率的差异非常显著（$P<0.01$），而癌旁组织、良性病变肺组织及对应正常肺组织之间 p73 mRNA 表达的差异不显著（$P>0.05$）。p73 mRNA 表达水平与肺癌临床 TNM 分期、组织学类型、细胞分化程度的关系均无显著性（$P>0.05$）[2]。

2.3 p73 基因转录表达与细胞凋亡水平的相关性

原位凋亡细胞 TUNEL 阳性染色主要见于肺癌癌细胞见图 1、2，呈单个分布，胞核呈深褐色，胞体皱缩，有的细胞轮廓尚清楚，有的则发生“出泡”现象形成凋亡小体。肺癌组织中 p73 基因的转录表达水平均明显高于癌旁组织和对应正常肺组织，而且肺癌组织中细胞凋亡水平也明显高于癌旁肺组织和正常肺组织，统计学表明，组织中 p73 基因的转录表达水平的增加和细胞凋亡指数的升高呈显著的正相关（$P<0.01$）。



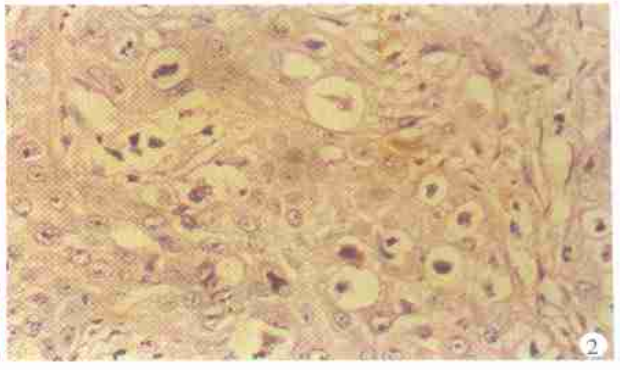


图 1 中分化鳞癌，中央为凋亡小体 （TUNEL× 200）

Fig 1 Apoptotic bodies in moderate-differentiated squamous carcinoma （TUNEL×200）

图 2 中分化鳞癌，凋亡细胞染色呈棕褐色，散在分布 （TUNEL× 200）

Fig 2 Brown apoptotic cells dispersing in moderate-differentiated squamous carcinoma （TUNEL×200）

3 讨论

细胞凋亡是目前肿瘤研究领域的热点之一，现有的研究结果表明，细胞凋亡及相关基因的调控可能与肿瘤的发生发展有关。p73 基因发现于 1997 年，因其产物和 p53 基因产物具有十分相似的结构和功能，故自其发现以来便成为肿瘤分子生物学和遗传学领域的一个研究热点，由于发现时间不长，关于 p73 的正常生

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

理功能以及在肿瘤中的作用等问题都有待进一步研究[1]。

近年来, 有关恶性肿瘤中细胞凋亡水平的改变[3,4], 细胞凋亡与肿瘤临床病理学特点的关系[5,6], 研究者的看法很不一致。既往认为肿瘤形成是细胞无限增殖所致的细胞积聚, 是肿瘤中细胞凋亡受抑的结果, 而近来的研究发现肿瘤中不仅存在细胞的过度增殖, 同时也存在细胞凋亡。本研究应用 TUNEL 法检测了 32 例人 NSCLC 肺癌组织和对应的癌旁组织、远癌肺组织中的细胞凋亡水平, 观察到肺癌组织中 TUNEL AI 值明显高于癌旁肺组织和正常肺组织($P<0.01$), 而癌旁组织与正常肺组织组间无显著差异($P>0.05$)。因此, 可以推测肺癌组织中在细胞增殖明显增加的同时也伴随有凋亡的增加, 但增殖细胞的比例高于凋亡细胞的比例, 使细胞死亡速率下降, 积聚速度加快。本研究未观察到肺癌中细胞凋亡水平与临床病理特征包括临床 TNM 分期、组织学类型、细胞分化程度之间存在明显的相关性($P>0.05$)。说明细胞凋亡是一个独立于临床病理特征之外的病理过程。

本研究观察到肺癌组织中 p73mRNA 表达水平较良性病变肺组织和远癌肺组织有明显升高, 提示肺癌中确实存在 p73 的过度转录表达, p73 基因可能参与调控肺癌的发生。现有的研究在多种瘤细胞株中证实 p73 具有和 p53 一样的调控细胞周期进程、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤生长的功能, 而且 wt-p73 比 wt-p53 更能诱导 p21 的表达, p73 过表达时比 p53 有更肯定的促凋亡活性[7,8]。但生理状态下 p73 基因转录表达与细胞凋亡的关系并不明了[9]。目前在已检测的细胞株和人类肿瘤如肺癌、前列腺癌、大肠癌和膀胱癌等肿瘤中均未发现 p73 基因的突变[10], 可以认为肿瘤中 p73 均以 wt-p73 形式存在。本研究表明肺癌组织中凋亡指数及 p73 mRNA 表达水平明显高于癌旁肺组织和正常肺组织, 因此, 肺癌组织中 p73 基因的转录表达水平的增加和细胞凋亡水平的升高有显著的相关性。本研究以组织学分型、分化程度及临床 TNM 分期为基础, 比较了人非小细胞肺癌组织各组内指标间 p73 基因的阳性表达率, 发现差异均无显著性意义, 提示 p73 的表达是独立于临床病理学特征之外的分子参数。

研究者认为: p73 或许在肿瘤发生机制中并不像 p53 一样是一个抑癌基因[10]。但在某些肿瘤组织中 p73 比正常组织中表达更高说明 p73 的过量表达很可能参与了这些肿瘤的发生、发展过程。Jack 认为: 即使 p73 并非抑癌基因, 但找到一个方法开启 p53 缺失的肿瘤细胞中 p73 的功能, 将使癌症治疗成为可能[11]。有关 p73 是不是一种抑癌基因、在肿瘤中为什么很少突变、它的活化调节机制以及与 p53 的关系都有待进一步研究。

参考文献:

[1] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, *et al*. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers[J]. Cell, 1997, 90(4): 809－819.

[2] 何　勇、李志平、范士志, 等. p73 基因在人非小细胞肺癌组织中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(5): 536－538.

[3] Cai L, Wang G J, Xu Z L, *et al*. Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma (HCC) from northern China[J]. Anticancer Res, 1998, 18(6B): 4 667－4 672.

[4] Ishida M, Gomyo Y, Tatebe S, *et al*. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling[J]. Virchows Arch, 1996, 428(4－5): 229－235.

[5] 孙保存, 赵秀兰, 惠　京, 等. 大肠癌及其癌前病变中细胞凋亡与细胞增殖间关系的原位观察[J]. 中华医学杂志, 1996, 76(11): 848－851.

[6] Aihara M, Scardino P T, Truong L D, *et al*. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason Grade 3 adenocarcinoma of the prostate[J]. Cancer, 1995, 75(2): 522－529.

[7] Kovalev S, Marchenko N, Swendeman S, *et al*. Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines[J]. Cell Growth Differ, 1998, 9(11): 897－903.

[8] Herath N I, Kew M C, Whitehall V L, *et al*. p73 is up-regulated in a subset of hepatocellular carcinomas[J]. Hepatology, 2000, 31(3): 601－605.

[9] Jost C A, Marin M C, Kaelin W G, *et al*. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis[J]. Nature, 1997, 389(11): 191－194.

[10] Han S, Semba S, Abe T, *et al*. Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers[J]. Eur J Surg Oncol, 1999, 25(2): 194－198.

[11] Dickman S. First p53 relative may be a new tumor suppressor[J]. Science, 1997, 277(5 332): 1 605－1 606.

(编辑　潘式文)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》, 本刊实行 3 位分节法, 废除撇分节法(如 2,431 改为 2 431)。但年份、页数、部队著号、仪表型号、标准号不用 3 位分节法。中文出现的数字, 凡属计数数值, 一律用阿拉伯数字表示。

(本刊编辑部)

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