文章编号: 1000-5404(1999)12-0916-03

肝细胞癌组织中 P16蛋白表达与丙型肝炎病毒感染的关系

卜 保国,杨建民,汪荣泉,陈文生,罗元辉,房殿春,周子成 (第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038)

【提要】 目的: 研究肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)组织中 P16蛋白表达与丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染的关系。方法: 用免疫组化 ABC法检测 46例 HCC及其癌旁肝组织中 P16蛋白和 HCV抗原的表达。结果: P16蛋白的阴性表达率在 HCC癌组织(58.7%, 27/46)明显高于其癌旁组织(36.8%, 14/38)($P < 0.05$),在 Edmondson Ⅲ Ⅳ级 HCC(78.9%, 15/19)明显高于Ⅰ Ⅱ级 HCC(44.4%, 12/27)($P < 0.05$),在 HCV抗原阳性组(80.0%, 16/20)明显高于 HCV抗原阴性组(42.3%, 11/26)($P < 0.05$)。结论: P16蛋白的表达与 HCC发生发展关系密切, HCV致癌过程可能与细胞周期负性调节因子 P16基因功能受抑有关。

关键词 肝细胞癌; P16蛋白; 丙型肝炎病毒

中图法分类号 R512.63; R735.7 文献标识码 A

以前研究表明, HCV感染与重庆地区 HCC的发生密切相关[1,2],但其致癌机制迄今尚不明确。P16基因是新近发现的 1种抑癌基因,亦属细胞周期负性调节因子,编码 16× 10^3u蛋白,已发现多种原发性肿瘤和肿瘤细胞系有 P16基因缺失与突变[3,4]。为明确 HCV感染能否导致 P16基因表达的异常,我们用免疫组化技术检测 46例 HCC及其癌旁肝组织中 P16蛋白和 HCV抗原的表达,以分析 P16蛋白表达与肝细胞癌发生发展及其与 HCV感染的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

46例手术切除的 HCC标本均系 10%中性福尔马林固定、石蜡包埋的组织块,其中 38例含有癌旁肝组织。鼠抗人 P16单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司,鼠抗 HCV CP10单克隆抗体由本院传染科制备,鼠抗 HCV NS3、NS5单克隆抗体由北京医科大学肝病研究所提供, ABC试剂盒购自 VECTOR公司。

1.2 方法

蜡块组织 5μm厚连续切片,分别作常规 HE染色及 P16蛋白和 HCV CP10、NS3、NS5抗原免疫组化染色。免疫组化染色采用 ABC法,按试剂盒说明步骤操作, DAB显色。以 PBS代替第一抗体作为阴性对照。

1.3 免疫组化结果判定

P16蛋白以胞核染色为准[5],胞核染色或胞核、胞浆均染色者为阳性,胞核、胞浆均不染色或仅胞浆染色为阴性。HCV CP10、NS3、NS5抗原以胞浆染色为阳性[6]。

作者简介: 卜保国,男, 1973.06.06生,山西人,硕士,住院医师,主要从事肝癌基础研究。

收稿日期: 1999-01-30;修回日期: 1999-04-19

1.4 统计学处理

所得数据采用 χ^2检验。

2 结果

2.1 P16蛋白表达与 HCC分级的关系

46例 HCC癌组织中 P16蛋白阳性 19例(41.3%),阴性 27例(58.7%); 38例癌旁肝组织中 P16蛋白阳性 24例(63.2%),阴性 14例(36.8%),癌组织中 P16的阴性表达率明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。P16蛋白的表达与 HCC的 Edmondson分级有关,Ⅰ和Ⅱ级 27例 HCC中 P16蛋白阳性 15例(55.6%),阴性 12例(44.4%); Ⅲ和Ⅳ级 19例中 P16蛋白阳性 4例(21.1%),阴性 15例(78.9%),两组间差异显著($P < 0.05$),见表 1。说明 P16蛋白表达与 HCC分化程度有关, HCC分化愈差, P16蛋白的表达缺失率愈高。

表 1 P16蛋白表达与 HCC分级的关系

Tab 1 Relationship of P16 protein expression with Edmondson grade in hepatocellular carcionma

Edmondson grade	n	P16 protein(+)	P16 protein(-)
Ⅰ	6	4	2
Ⅱ	21	11	10
Ⅲ	11	3	8
Ⅳ	8	1	7
Total	46	19	27

2.2 HCV抗原与 P16蛋白表达的关系

若将 HCV CP10、NS3及 NS5 3种抗原出现其中 1种抗原阳性染色,即认为该例 HCV抗原阳性,则 46例 HCC中 HCV抗原阳性 20例(43.5%)。HCV抗原阳性组 P16蛋白阳性 4例(20.0%), HCV抗原阴性组 P16蛋白阳性 15例(57.7%),

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

HCV抗原阳性组 HCC中 P16蛋白阴性表达率明显高于 HCV抗原阴性组($P < 0.05$),见表 2.

表 2　HCV抗原与 HCC癌组织中 P16表达的关系

Tab 2　Relationship of hepatitis C virus antigen expression with P16 protein in hepatocellular carcinoma

Group	n	P16 protein(+)		P16 protein(−)	
		n	%	n	%
HCV antigen(+)	20	4	20.0	16	80.0
HCV antigen(−)	26	15	57.7	11	42.3

3　讨论

P16基因位于人染色体 9p21,全长 8.5 kb,编码 16×10^3u的蛋白。P16蛋白能够抑制细胞周期依赖性激酶 4(CDK4)介导的 Rb基因蛋白产物——Rb蛋白磷酸化,而磷酸化的 Rb蛋白能抑制细胞 G_1期向 S期演进,从而抑制细胞分裂增殖[3,4]。当 P16蛋白缺失时,细胞增殖失控,可致肿瘤形成。有报道[7]发现,P16蛋白在肝癌细胞系中的表达缺失率为 50.0% (3/6),在原发性肝癌中的表达缺失率为 34.4% (11/32)。Piao等[8]发现 HCC组织中 P16基因纯合缺失率为 61% (25/41)。本文用免疫组化研究发现,HCC组织中 P16蛋白的阴性表达率高达 58.7%,癌旁组织中 P16的阴性表达率也达 36.8%,并发现 P16蛋白的表达与 HCC分化程度有关,分化程度愈低,P16蛋白的阴性表达率愈高,提示 P16蛋白的表达缺失可能与 HCC的发生发展及预后有关。

HCV感染与 HCC的发生密切相关[1,2,9],但其致癌机制尚不清楚。HCV由于为 RNA病毒,一般认为不会通过整合作用直接改变宿主的基因结构,因而 HCV对细胞生长调控因子的影响是其目前致癌机制研究的重点之一。最近文献[10]报道,HCV核心区蛋白能抑制 P21基因促进子的转录,从而干扰正常的细胞周期调控,促进细胞的异常增殖。本研究发现,HCV抗原阳性组 HCC的 P16蛋白阴性表达率明显高于 HCV抗原阴性组,提示 HCV的致癌过程可能与细胞周期负性调节因子 P16基因功能受抑制有关。

参考文献

[1] Yang J M, Liu W W, Jin H Y. Relationship of hepatitis C virus infection with primary hepatic carcinoma: An investigation of serum HCV RNA in different population groups[J]. J Med Coll PLA, 1993, 8(2): 109–113.

[2] 杨建民,刘为纹,晋华源.肝细胞癌中 HCV复制中间体的研究[J].中华消化内科杂志,1994,14(4):210–212.

[3] Kamb A, Cruis N A, Weaver-Feldhaus J, *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 264(5157): 436–440.

[4] Nobori T, Miura K, Wu D J, *et al*. Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in mutiple human cancers[J]. Nature, 1994, 368(6473): 753–756.

[5] Geradts J, Kratzke R A, Niehans G A, *et al*. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/mutiple tumor suppresor 1 (CDK2/MTS1) puduct $P16^{INK4/CDKN2}$ in archival human solid tumors: Correlation with retinoblastoma protein expression[J]. Cancer Res, 1995, 55(24): 6006–6011.

[6] 汪荣泉,周子成,杨建民,等.肝癌及癌旁组织中丙型肝炎病毒 NS5抗原的免疫组织化学研究[J].中华医学杂志,1996,76(8):623–624.

[7] Hui A M, Sakamoto M, Kanai Y, *et al*. Inactivation of $P16^{INK4}$ in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1996, 24(3): 575–579.

[8] Piao Z, Park C, Lee J S, *et al*. Homozygous deletions of the CDKN2 gene and heterozygosity of 9P in primary hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Letter, 1998, 122(1–2): 201–207.

[9] Resnick R H, Koff R. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma: Prevalence and significance[J]. Arch Int Med, 1993, 153(14): 1672–1677.

[10] Ray R B, Steele R, Meyer K, *et al*. Hepatitis C virus core protein represses $P21^{WAF1/Gip1/Sdi1}$ promoter activity[J]. Gene, 1998, 208(2): 331–336.

(编辑　刘　鹏)

Relationship of P16 protein expression with hepatitis C virus infection in hepatocellular carcinoma

BU Bao-guo, YANG Jian-ming, WANG Rong-quan, CHEN Wen-sheng, LUO Yuan-hui, FANG Dian-chun, ZHOU Zhi-chen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract　**Objective**: To study the relationship betwee P16 protein expression and hepatitis C virus (HCV) infection in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods**: P16 protein expression and HCV antigens were examined in the tissue samples of 46 cases of HCC and 38 samples of peri-carcinoma tissues with

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

immunohistochemical and avidin-biotin complex methods. **Results:** The rate of negative P16 protein expression was significantly higher in the carcinomatous tissue (58.7%, 27/46) than in the pericarcinomatous tissues (36.8%, 14/38) and in Edmondson grade Ⅲ and Ⅳ HCC (78.9%, 15/19) than in Edmondson grade Ⅰ and Ⅱ HCC (44.4%, 12/27) ($P < 0.05$). The rate of negative P16 protein expression was significantly higher in HCV antigen positive group (80%, 16/20) than in HCV antigen negative group (42.3%, 11/26) ($P < 0.05$). **Conclusion:** P16 protein expression seems to be related closely to the pathogenesis and development of HCC and HCV antigen may be involved in its pathogenesis through the inhibition on the function of P16 gene, which exerts a negative regulation of cell proliferation of HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; P16 protein expression; hepatitis C virus

文章编号: 1000-5404(1999)12-0918-01

异丙酚-普鲁卡因-芬太尼静脉复合麻醉的临床研究

Clinical observation of propofol-procaine-fentanyl total intravenous anesthesia

陶 军,刘桥义,杨天德,吴悦维,方国新 (第三军医大学附属新桥医院麻醉科,重庆 400037)

为探寻理想的全凭静脉麻醉(Total intravenous anesthesia, TIVA)方法,本文采用异丙酚与普鲁卡因、芬太尼配伍施行静脉复合麻醉,经临床试用,取得满意效果。

1 资料与方法

选择 ASAⅠ-Ⅱ级、非心脏手术病人 8例(男 5例、女 3例),年龄 25~52岁,体重 45~69 kg 全麻诱导为静注异丙酚 2~2.5 mg/kg(90 s注完)、芬太尼 4μg/kg 琥珀胆碱 2 mg/kg,气管内插管,控制呼吸。以 2%普鲁卡因复合液 100 ml(含异丙酚 200 mg 芬太尼 0.2 mg)静脉滴入维持麻醉,滴速初始为 1.5 ml/kg·h^{-1},30 min后视麻醉深度调节滴速为 0.5~1.5 ml/kg·h^{-1}。术毕前 20 min停用复合液。当病人苏醒,自主呼吸恢复正常后拔除气管导管。

麻醉期间连续监测心率、收缩压、舒张压、平均动脉压和血氧饱和度。于麻醉开始后 2、30、60、120、180 min,由给药对侧静脉分别采取血样 3 ml,分离血浆后,采用高效液相色谱法(HPLC)检测血浆异丙酚浓度。

为观察异丙酚和芬太尼在复合液中的稳定性,取上述复合液 10 ml,放置于室温下,分别于 10、30、60、120 min取样用 HPLC法检测异丙酚和芬太尼含量。

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验进行统计学处理,$P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

异丙酚-普鲁卡因-芬太尼复合液在室温(20℃)下放置 2 h,异丙酚和芬太尼浓度无明显变化($P>0.05$),见表 1。

表 1 复合液中异丙酚、芬太尼的含量($\bar{x}\pm s$)

	10 min	30 min	60 min	120 min
异丙酚(g/L)	2.01±0.03	1.98±0.04	2.03±0.06	2.02±0.08
芬太尼(mg/L)	2.02±0.03	2.02±0.02	1.99±0.01	2.02±0.02

全麻诱导后,收缩压降低 7.86%,舒张压降低 6.78%,心率减慢 14.18%。气管插管后恢复至麻醉前水平。维持期收缩压、舒张压、平均动脉压和心率平稳。

血浆中异丙酚浓度的变化随麻醉时间延长逐渐降低。

平均麻醉时间为(4.39±0.77)h,异丙酚维持用量为(2.54±0.47)mg/kg·h^{-1},普鲁卡因为(24.89±4.37)mg/kg·h^{-1},芬太尼(2.62±0.29)μg/kg·h^{-1}。清醒时间平均为 9.8 min,所有病例均未使用钠洛酮,自主呼吸 15~20次/min,潮气量 410 ml以上,血氧饱和度>98%。术后 24 h随访,均无术中知晓,术后无恶心呕吐。

3 讨论

普鲁卡因静脉复合麻醉是我国常用的麻醉方法,但至今尚无理想的药物配伍方案。异丙酚起效快,作用时间短,强效镇静安眠,恢复快速安全,不良反应少,但镇痛效能弱。而芬太尼镇痛效果好,对心血管系统抑制作用轻,但镇静效能弱,易出现术中知晓现象,术后呼吸抑制和恶心呕吐发生率较高。两者均不能单独作为 TIVA的理想药物。异丙酚与芬太尼伍用,则能取长补短,具有良好的麻醉效能。从临床试用结果来看,普鲁卡因-异丙酚-芬太尼静脉复合麻醉诱导迅速平稳,麻醉深度易于调节,血流动力学稳定,恢复快速完全,无术中知晓和术后恶心呕吐。

(下转 922页)

作者简介: 陶 军,男,1961.09.27生,湖北省武汉市人,在读博士生,讲师,主要从事心肺疾病手术的麻醉及心肺损伤防治方面的研究,发表论文 5篇。电话: (023)68755282

收稿日期: 1999-08-28;修回日期: 1999-10-15

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