DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.015


# 肺癌放疗或化疗后的病理形态及 PCNA p53表达的观察*

谢 青 肖桃元 高广正 张 敏 徐 飞 王亚莉 (第三军医大学附属新桥医院病理科)重庆,630037

提 要 应用抗增殖细胞核抗原和抑癌基因 p53蛋白的单克隆抗体对 37例放疗或化疗后的肺癌进行了检测,并与未经术前治疗的肺癌组织进行对照,部分组织进行了超微结构观察。结果发现:(1)放疗或化疗对肺癌组织细胞浆及胞核有不同程度的破坏。(2)放、化疗后组织(除分化型腺癌外)PCNA指数下降明显($P<0.01$或$P<0.05$)。(3)放疗后肺癌组织 p53表达率减低,但化疗后变化不明显。

关键词 肺肿瘤;增殖细胞核抗原;p53;放疗;化疗
中图法分类号 R734.2

肺癌是我国高发恶性肿瘤之一,转移率及死亡率均较高。近几年虽然术前检查方法较先进,提高了肺癌的检出率,但由于早期临床症状不明显,就诊时许多患者已到中、晚期,失去了手术最佳时期。目前,非手术治疗方式较多,放疗和化疗是经常选择的手术前、后辅助治疗或主要治疗方法。由于组织分类不同及人体的个体差异,对放、化疗的敏感性有很大差异。本研究通过对放、化疗前后组织结构、细胞增殖活性及癌基因表达的变化,探讨非手术治疗效果,为临床治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料与分类

收集 1986~1993年间 154例肺癌资料,患者平均年龄 55.4岁,最大年龄 73岁,最小年龄 31岁。男性 122例,女性 32例,男:女=4:1。肿瘤发生部位以右上肺最多为 46例(30%),左上肺 38例(25%),右下肺 33例(21%),左下肺 22例(14%),右中肺 9例(6%),左舌叶 2例,多叶肺侵犯 4例。154例肺癌中鳞癌 64例,腺癌 48例,小细胞癌 23例,大细胞癌 6例,混合型癌 6例,透明细胞癌 3例,粘液腺癌 2例,粘液表皮样癌 1例,腺样囊性癌 1例。其中 116例 10%福尔马林液固定、石蜡包埋标本,用于免疫组化染色,其余病例因组织较小或蜡块虫蛀未选用。标本按治疗方法分类:① 化疗组 29例;25例为术前 7~15 d一次性大剂量给药,其中 12例为 CAP方案治疗(CTX 1000 mg ADM 30 mg DDP 80~120 mg),另 13例使用下列药品中的 3~4种—— MMC 10 mg VCR 1 mg VP-16 100 mg CaP 300~500 mg CTX 1000 mg DDP 100 mg 化疗组还有 4例为常规 Comvp方案治疗一个疗程,药物剂量 CTX 1000 mg VCR 1~2 mg MTX 10~20 mg VP-16 100 mg② 放疗组 8例:常规术前放疗,照射剂量为 40 GY/20F/4W。③ 对照组:术前未经放、化疗的标本 79例。④ 电镜标本 13例为新鲜标本经 0.25%戊二醛液固定。其中 4例为对照,腺癌及鳞癌各 2例;放疗后标本 5例,腺癌 2例、鳞癌 3例;化疗标本 4例,腺癌、鳞癌各 2例。

### 1.2 试剂

增殖细胞核抗原(Proliferation cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体和抗 p53蛋白单克隆抗体(DO-7)为丹麦 Dako公司产品,生物素化 IgG和 ABC试剂为美国 Vector公司产品。

### 1.3 染色方法

石蜡切片 4μm 3张,HE、PCNA及 p53标记染色。PCNA浓度 1:25,p53浓度 1:50 p53标记前切片经 pH6.0的柠檬酸缓冲液加热预处理。一抗在 4℃冰箱内过夜,室温下复温 30 min,二抗 37℃孵育 30 min,三抗 37℃孵育 45 min,DAB显色,苏木素复染。PBS代替一抗作阴性对照,PCNA阳性对照以正常鳞状上皮基底层细胞核着棕黄色而背景不着色为标准,p53以瘤细胞核着棕黄色而背景不着色为阳性对照。

### 1.4 结果判断

0.25%戊二醛固定的组织送电镜室,用 JEM 2000型透射电镜观察。

PCNA阳性细胞计数时为避免主观因素,各型组织切片暂不分组,随机取片选择 4个视野共计数 400个细胞,计算阳性细胞的百分率及各组平均值和范围($\bar{x}\pm s$),各组比较求 $P$值。

p53以切片内阳性细胞超过 5%以上为阳性表达,各组阳性例数比较求 $P$值。

## 2 结果

### 2.1 HE光镜观察

HE染色后观察,放、化疗后组织均有程度不同的坏死和纤维增生,以放疗组最明显,放疗组除 1例高分化鳞癌外其余各例广泛坏死,残留肿瘤细胞呈零星散在分布于纤维组织间,纤维组织内还可见巨核吞噬细胞,胆固醇结晶,钙盐沉积及大量淋巴细胞和组织细胞浸润。部分病例残留肿瘤细胞核固缩、深染,胞浆空化或浓缩红染,但细胞轮廓清楚,胞膜和核膜尚完整(图 1)。

* 全军"八五"攻关项目

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

### 2.2　电镜观察

对照组核大畸形,核仁巨大,鳞癌细胞浆内可见角化物质和张力微丝,细胞间有桥粒连接。腺癌细胞浆内细胞器丰富,有较多的高尔基氏体,部分细胞浆内有板层小体、微腺腔及微绒毛。治疗组细胞浆及胞核均见大的空泡形成,核染色质凝集成块并向核膜边集中。胞浆内细胞器肿胀变性,有较多的溶酶体,核膜和胞膜未见明显破裂。

### 2.3　PCNA阳性细胞指数(见表 1)

对照组阳性细胞多呈强阳性,阳性细胞分布成片(图 2)。治疗组阳性细胞稀疏呈灶性分布,多数呈浅棕色。高分化鳞癌阳性细胞集中在癌巢边沿。化疗组中一次性大剂量给药组 PCNA阳性指数为 35.8± 7.9,与常规给药组 PCNA指数 34.5± 5.2比较,差异不显著。放疗组腺癌和小细胞癌因例数少未进行统计。

### 2.4　p53阳性表达结果(见表 2)

p53阳性物质积聚于肿瘤细胞核内(图 3、4)。化疗组一次性大剂量给药与常规给药组阳性率分别为 32.0%及 28.4%,两者比较差异不显著。



图 1　肺癌治疗后纤维大量增生,残存细胞退变　(HE×420)

**Fig 1　Massive fibrotic proliferation and some remaining degenerative cells after treatment of lung carcinoma**　(HE×420)

图 2　肺腺癌 PCNA阳性表达　(ABC×210)

**Fig 2　Positive expression of PCNA in adenocarcinoma of lung**　(ABC×210)

表 1　肺癌放、化疗前后 PCNA表达变化

**Tab 1　Changes of PCNA expression in carcinoma of lung after treatment**

| Type of carcinoma | Control | | Chemotherapy | | Radiotherapy | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | $\bar{x}\pm s$ | *n* | $\bar{x}\pm s$ | *n* | $\bar{x}\pm s$ |
| Sequemous carcinoma | 40 | 50.1± 11.8 | 14 | 38.9± 9.2△ | 5 | 30.4± 6.9△ |
| Adenocarcinoma | 29 | 40.6± 6.3 | 11 | 35.2± 7.7* | 1 | 33.0± 0 |
| (Poorly differentiated adenocarcinoma) | (11) | 45.6± 7.9 | (3) | 34.0± 5.0△△ | | |
| Small cell carcinoma | 10 | 58.1± 8.3 | 4 | 49.0± 10.0△△ | 2 | 43.0± 2.0 |

△: $P<0.01$, △△: $P<0.05$ *vs* control; *: $P>0.05$ *vs* control

表 2　肺癌 p53阳性表达

**Tab 2　p53 positive expression rate in carcinoma of lung**

| Type of carcinoma | Control | | Chemotherapy | | Radiotherapy | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | p53 (%) | *n* | p53 (%) | *n* | p53 (%) |
| Sequemous carcinoma | 40 | 21 (52.5) | 14 | 6 (42.9) | 5 | 1 (20.0) |
| Adenocarcinoma | 29 | 14 (48.3) | 11 | 3 (27.3) | 1 | 0 |
| Small cell carcinoma | 10 | 6 (60.0) | 4 | 1 (25.0) | 2 | 0 |
| Total | 79 | 41 (51.9) | 29 | 10 (34.5)△ | 8 | 1 (12.5)△△ |

△: $P>0.05$, △△: $P<0.05$ *vs* contorl

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



图 3 肺鳞癌 p53阳性表达 (ABC× 420)

**Fig 3 Positive expression of p53 in sequemous carcinoma of lung** (ABC× 420)

图 4 肺腺癌 p53阳性表达 (ABC× 420)

**Fig 4 Positive expression of p53 in adenocarcinoma of lung** (ABC× 420)

## 3 讨论

本组肺癌患者发病高峰在 50~ 60岁之间,以男性多。半数以上的病人肿瘤发生在上叶肺,且以右上肺较多。

目前,治疗肺癌的方式除手术外,放疗及化疗仍是非手术治疗最常使用的方式。HE光镜观察放、化疗后多数病例肿瘤细胞大片死亡,同时可见一些零星分布在纤维组织中的单个或数个成团的残留肿瘤细胞,这些细胞不同于常见的坏死细胞,例如:细胞核及细胞膜完整,电镜也证实膜结构未受破坏;胞浆浓缩红染;胞核深染,电镜下为凝集成块的染色质并有向核膜边靠的现象。这些特征与凋亡细胞的主要形态相似。放、化疗杀伤肿瘤作用主要是通过细胞凋亡过程的研究已有报道[1]。本组材料显示除有凋亡细胞存在外,同时有细胞的大片坏死,(凋亡细胞单个存在,不会成片出现),说明放、化疗对肿瘤的杀伤是多因素的。

细胞增殖活性与肿瘤的预后密切相关[2]。一些研究认为肺癌 PCNA阳性指数与肿瘤分化和患者预后相关。本组 PCNA指数治疗前与文献相似[3~7],鳞癌和小细胞癌化疗后 PCNA指数下降明显,但是腺癌组变化不明显(低分化癌除外),提示化疗对各型肺癌增殖活性有不同程度的抑制。放疗对鳞癌 PCNA指数的影响也表明对其癌细胞增殖活性的降低作用,小细胞癌放疗后 PCNA指数下降幅度大,但由于例数太少,需作进一步探讨。从表 1中还看出,腺癌细胞虽然治疗前 PCNA阳性数低于其它几型,但在放、化疗后变化不明显,这可能是大多数腺癌尽管分化较好仍然有较高复发转移率的原因之一。

近几年研究认为癌基因的表达与肺癌的预后有关,放疗对癌基因表达变化的研究也有报道[7~9]。本文放、化疗后肺癌 p53表达的总体水平提示仅放疗后 p53基因有较明显变化。

此外,化疗组一次性大剂量给药与常规分次分量给药其 PCNA指数及 p53表达率相近似,提示两种方式给药对肺癌的治疗反应无差异。

综上所述,放、化疗对部分肺癌细胞增殖活性有抑制。对抑癌基因的表达有一定影响,同时促使肿瘤细胞的凋亡。因此,放、化疗对肺癌的治疗作用是多因素的,影响肺癌预后的因素也是复杂的,只有采用综合性治疗,尤其是癌基因逆转的治疗可望提高生存率。

## 参考文献


1 Lee FD. Importance of apoptosis in the histopathology of drug ralated lesion in the large intestine. J Clin Pathol, 1993; 46(2): 118

2 Dierendenck V, Wijsman JH, Keijzer R *et al*. Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating-cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparision with Brdurd labelling and Ki-67 staining. Am J Pathol, 1991; 138(5): 1165

3 Landberg G, Tan EM, Roes G. Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen cyclin and Ki-67 antigen: a new view of the cell cycle. Exp Cell Res, 1990; 187(1): 111

4 Bolton WE, Mikulka WR, Healy CG *et al*. Expression of proliferation associated antigens in the cell cycle of sychronized mammalian cell. Cytometry, 1992; 13(2): 117

5 Ogawa JI, Tsurumi T, Yamada S *et al*. Blood vessel inva-


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

sion and expression of Sialyl Lewis and proliferating cell nuclear antigen in stage Ⅰ non-small cell lung cancer. Cancer, 1994; 73(4): 1177
6 Ishida T, Kaneko S, Akazawa K *et al*. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. Cancer Res, 1993; 53(20): 5000
7 Korkolopoulou P, Oates J, Crocker J *et al*. p53 expression in oat and non-oat small cell lung carcinomas: correlation with proliferating cell nuclear antigen. J Clin Pathol, 1993; 46(12): 1093
8 Alapetite C, Moustachi E, Cosset JM *et al*. Oncogenes and radiosensitivity: in vitro studies protential impact in radiotherapy. Bull Cancer Radiother, 1992; 79(3): 242
9 Porter PL, Gown AM, Kramp SG *et al*. Widespread p53 overexpression in human malignant tumor. Am J Pathol, 1992; 140(1): 145

(收稿: 1995-12-10;修回: 1996-07-03)
(编辑 冯崇英)

# Observation on histological changes and expression of proliferative cell nuclear antigen and oncogene p53 in patients with lung carcinoma after radiotherapy or chemotherapy

Xie Qing, Xiao Taoyuan, Gao Guangzheng, Zhang Min, Xu Fei, Wang Yali (Department of Clinical Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

**Abstract** Alterations of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) and cancer-inhibitory gene p53 were determined in 37 patients with lung carcinoma after radiotherapy or chemotherapy with ABC immunohistochemical staining. Some lung tissues were observed with electron microscopy. The patients before therapy were observed likewise to serve as the control. It was found that: (1) The cytoplasm and nuclei of the cancerous tissue were destroyed to various degrees by radiotherapy or chemotherapy; (2) PCNA was significantly decreased after treatment ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); (3) The expression rate of p53 in cancerous tissue was decreased after radiotherapy and slightly changed after chemotherapy.

**Key words** lung carcinoma; proliferative cell nuclear antigen; p53; radiotherapy; chemotherapy

# IGF-Ⅱ受体(IGF-Ⅱ R)反义基因对肝癌细胞癌基因转录及生物学行为的影响

# Effect on oncogenes transcription and biological behavior of human hepatoma cells by IGF-Ⅱ receptor antisense gene transfection

陈文生 刘为纹 周筱梅* 顾建人* (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆, 630038

IGF-Ⅱ和 IGF-Ⅱ R过量表达是肝癌细胞自分泌和/或邻分泌系统的分子基础,自分泌生长刺激机理是肝癌细胞恶性增殖的重要原因。应用反义技术的原理,构建 IGF-Ⅱ R反义基因真核表达系统,经磷酸钙-DNA共沉淀的方法,导入 SMMC-7721人肝癌细胞株,有效地抑制了7721细胞内源性 IGF-Ⅱ R的表达,阻断 IGF-Ⅱ→ IGF-Ⅱ R的自泌、邻泌作用途径。结果发现 c-myc基因 mRNA转录发生一定程度下调,而 IGF-Ⅰ R基因 mRNA转录明显上调。p53 TTR N-ras基因转录无明显变化。IGF-Ⅱ R反义基因抑制细胞转染克隆的形成,但转染细胞生长速度无明显变化。同时,这些细胞进入 S期比例及细胞凋亡发生率均明显增多,细胞不能在软琼脂培养基中生长,在裸鼠体内的致瘤能力降低。而 IGF-Ⅱ R正义基因及 pCMVneo空载体转染细胞对照组无上述改变。本研究说明: c-myc转录下调可能促进肝癌细胞的分化,而 IGF-Ⅰ R转录上调可能为代偿机理或为 IGF-Ⅱ R反义基因对其的激活作用所致。IGF-Ⅱ R反义基因可能抑制肝癌细胞的生长,但当 IGF-Ⅰ R表达增加时可产生对抗作用,从而使这些细胞生长不表现明显的抑制,同时可能促进细胞由 $G_1$→ S期。IGF-Ⅱ R反义基因还可诱导肝癌细胞发生凋亡,一定程度地逆转其恶性表型。我们的研究结果表明,采用反义技术干预肝癌细胞生长因子受体基因表达可能给肝癌基因治疗提供新的途径,有进一步探索的价值。

关键词 IGF-Ⅱ R;反义基因;肝癌
中图法分类号 R735.7
(收稿: 1996-07-18;修回: 1996-07-24)
(编辑 王 红、沈锡庚)

* 上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室 上海, 200032

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