

文章编号:1005-6947(2008)05-0494-03

· 简要论著 ·

# 组织芯片技术应用于检测乳腺癌组织中 p16 和 cyclin D1 的表达

李宏涛<sup>1</sup>, 熊永萍<sup>1</sup>, 徐明亮<sup>1</sup>, 刘勇<sup>2</sup>, 袁晟<sup>2</sup>

(1. 江西省丰城市人民医院 病理科, 江西 丰城 331100; 2. 江西省人民医院 病理科, 江西 南昌 330006)

**摘要:**目的 探讨乳腺癌组织中多肿瘤抑制蛋白(p16)和细胞周期蛋白(cyclin D1)的表达及其意义。方法 采用组织芯片技术制作80例乳腺癌组织芯片,同时用SP免疫组织化学方法检测乳腺癌组织芯片中p16和cyclin D1的表达。结果 80例乳腺癌中p16和cyclin D1的阳性率分别为40.0%和53.8%。乳腺癌中p16低表达与cyclin D1的高表达呈负相关( $r < -0.49$ );p16低表达、cyclin D1高表达与乳腺癌的淋巴结转移密切相关。结论 p16和cyclin D1的表达水平可以作为评估乳腺癌预后的参考指标。应用组织芯片大规模高效检测临床组织样本是可行的,具有快速、方便、经济、准确的特点。

[中国普通外科杂志,2008,17(5):494-496]

**关键词:** 乳腺肿瘤/病理学;组织芯片;抑制基因;细胞周期;免疫组织化学

**中图分类号:** R 737.9

**文献标识码:** B

近年来,在有关乳腺癌的病因、诊断、治疗、预后判断及乳腺癌发生、发展过程中的分子生物学变化的研究出现了许多新进展,细胞增殖调控是其研究的热点之一。细胞增殖调控异常与肿瘤的发生密切相关<sup>[1]</sup>。细胞增殖调控机制的研究包括:研究细胞如何启动和完成有关细胞增殖的生物学事件;研究细胞如何保证这些事件精确地按次序进行。细胞增殖调控是十分复杂而微妙的过程,细胞内外多种因子参与这一过程<sup>[2]</sup>。笔者采用组织芯片技术结合免疫组织化学(免疫组化)技术检测了p16和cyclin D1在乳腺癌组织中的表达,以探讨它们之间的关系及其意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本及其一般资料

80例乳腺癌组织取自丰城市人民医院2000—2004年手术切除标本。患者年龄32~71(平均48.9)岁,术前均未经放疗及化疗。组织

学类型:浸润性导管癌63例,髓样癌12例,浸润性小叶癌5例。淋巴结转移:阳性53例,阴性27例。全部标本经福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋。

### 1.2 组织芯片制作<sup>[3-4]</sup>

1.2.1 组织芯片制作机的主要组成 (1)打孔针:本实验使用直径为2 mm的打孔针,打孔针中心有一根配套的实心针,能将采集到的组织蜡芯推出。(2)距离调节器:系一能准确地控制打孔针按所需距离前后左右移动,可使组织芯整齐地排列在组织芯片蜡块中的小仪器,该调节器为本科室自制。

1.2.2 组织芯片的制作过程 (1)根据需要将组织按不同的种类或顺序设计组织样品的排列方式;(2)根据设计将受体蜡块进行打孔,孔径大小与供体组织钻取孔径大小一致;(3)对供体组织HE切片作形态学观察,并在供体蜡块准确标记所需要的靶点;(4)利用打孔仪钻取靶点组织,并转移至受体蜡块相应的孔位上,即制成所需的阵列蜡块。(5)常规方法作厚4~5 μm切片,裱于玻片上,以备免疫组化实验使用。

1.2.3 组织芯片模块制备 将熔化石蜡制作成4 cm×2 cm×1 cm大小的空白蜡块,设计10×8点组织列阵,用打孔机制成模块。

**基金项目:**江西省卫生厅重大科技计划资助课题(2002-1)。

**收稿日期:**2007-10-22; **修订日期:**2008-04-05。

**作者简介:**李宏涛,男,江西省丰城市人民医院主治医师,主要从事乳腺肿瘤基础临床方面研究。

**通讯作者:**李宏涛 E-mail:lhlihongtao@sina.com

1.2.4 组织芯片的设计和制备 将原蜡块置于 45 °C 温箱中烘 5 ~ 10 min, 然后用打孔针从组织块选定部位逐个取出组织芯, 随即放入预先设计的阵列模块中, 排布成组织芯片。最后, 将制成的组织芯片面朝下放在铜板上, 于 55 °C 放置 30 min, 轻压模块使组织柱在模块中排平。对组织芯片蜡块进行切片, 以备实验使用。

1.3 组织芯片免疫组化标记

采用免疫组化(SP)方法, 单克隆抗 p16 抗体(ZJ11)、单克隆抗 cyclin D1 抗体(DCS/6)和 S-P 试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司, 即用型。滴加抗体前, 切片经高压处理, 修复暴露抗原。以已知阳性切片作阳性对照, 以 PBS 代替一抗作空白对照, DAB 显色。

1.4 结果判断<sup>[5-6]</sup>

p16 和 cyclin D1 均定位于细胞核, 免疫组化染色阳性均为棕黄色。采用显微摄像计算机图像分析系统计算。判断标准: 阴性(-), 无阳性细胞; 阳性(+), 阳性细胞少于肿瘤细胞的 50%; 强阳性(++), 阳性细胞多于肿瘤细胞的 50%。

1.5 统计学处理

实验数据的统计学处理采用  $\chi^2$  检验和相关系数检验。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中 p16 的表达

80 例乳腺癌组织芯片中, p16 阳性 19 例, 强阳性 13 例, 阳性率为 40.0% (32/80)。不同组织学类型的乳腺癌中 p16 的表达差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。淋巴结转移阳性组 p16 的表达明显低于阴性组 ( $\chi^2 = 21.6, P < 0.005$ ), p16 的低表达与乳腺癌淋巴结转移有明显关系 ( $P < 0.05, r < 0.59$ ) (表 1)。

2.2 乳腺癌组织中 cyclin D1 的表达

80 例乳腺癌组织芯片中, cyclin D1 阳性 23 例, 强阳性 20 例, 阳性率为 53.8% (43/80)。不同组织学类型的乳腺癌中, cyclin D1 的表达组间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。淋巴结转移阳性组 cyclin D1 的表达明显高于阴性组 ( $\chi^2 = 20.0, P < 0.005$ ), cyclin D1 的高表达与乳腺癌淋巴转移有明显关系 ( $P < 0.05, r < 0.61$ ) (表 1)。

2.3 乳腺癌中 p16 与 cyclin D1 表达的相关性

48 例 p16 阴性乳腺癌中 cyclin D1 阳性 35 例,

阳性率 72.9%; 32 例 p16 阳性乳腺癌中 cyclin D1 阳性 8 例, 阳性率 25.0%。两者比较差异有显著性 ( $\chi^2 = 17.60, P < 0.005$ ), 相关系数检验显示两者呈负相关 ( $P < 0.005$ )  $r < -0.49$ ) (表 2)。

表 1 p16 和 cyclin D1 在乳腺癌中的表达

生物学指标	n	p16(例)				cyclin D1(例)			
		(-)	(+)	(++)	%	(-)	(+)	(++)	%
组织学类型									
浸润性导管癌	63	36	16	11	42.9	30	19	14	52.4
髓样癌	12	9	2	1	25.0	5	3	4	58.3
浸润性小叶癌	5	3	1	1	40.0	2	1	2	60.0
淋巴结转移									
阳性	53	42	8	3	20.8	15	21	17	71.7
阴性	27	7	11	9	74.1 <sup>1)</sup>	22	3	2	18.5 <sup>1)</sup>

注 1): 与淋巴结转移阳性组比,  $P < 0.005$

表 2 乳腺癌中 p16 与 cyclin D1 表达的关系

p16	n	cyclin D1(例)			
		(-)	(+)	(++)	%
(-)	48	13	21	14	72.9
(+)	19	14	3	2	26.3
(++)	13	10	2	1	23.0

注:  $r < -0.49, P < 0.005$

3 讨论

细胞周期调控的分子机制涉及 cyclin、细胞周期蛋白依赖激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 以及 CDKs 抑制蛋白三种分子的相互作用, 其核心是 CDKs 的活性表达及调控。细胞增殖的关键是 G<sub>1</sub> 期的启动, 因此对细胞的研究多集中在 G<sub>1</sub>/S 期, 即细胞在静止状态下是如何进入 DNA 合成期的。在 G<sub>1</sub> 期的调控和 G<sub>1</sub>/S 期转换过程中起关键作用的是两种 G<sub>1</sub> 期 cyclin 即 cyclin D1 和 cyclin E。在 G<sub>1</sub> 期中 cyclin D1 和 CDK4 结合, 导致 CDK4 活化; 活化的 CDK4 可使视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 易感基因的蛋白产物磷酸化, 失去抑制转录因子 E2F 的作用; E2F 可启动 DNA 合成, 从而使细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期<sup>[2]</sup>。以上激活过程可通过 CDKs 抑制因子的作用而受到抑制。目前认为 p16 蛋白的作用较为专一, 仅在 G<sub>1</sub> 期竞争 cyclin D1 与 CDK4 结合, 抑制 CDK4 活性, 从而抑制

细胞增殖。

多肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor gene 1, MTS1)又称 p16 基因,是一种肿瘤抑制基因,该基因位于人 9 号染色体的 p21 区域<sup>[7]</sup>。p16 广泛存在于各种肿瘤中,在食管癌、黑色素瘤、胰腺癌及胃癌等组织中都检测到 p16 基因的高频率突变及缺失,其编码 16kD 的蛋白产物,是 CDK4 的抑制因子<sup>[8]</sup>。在早期胃癌中,p16 的表达与组织类型、分化程度、淋巴结转移状况无明显关系,仅与癌细胞的浸润程度有关<sup>[9]</sup>。

cyclin D1 由 295 个氨基酸组成,分子质量为 34 kD,其在细胞中的功能是促进 G<sub>1</sub>/S 期的转变进而促进细胞周期,与细胞增殖有关。目前在人类多种肿瘤中发现其基因扩增、转位、重排和蛋白过表达<sup>[10]</sup>。cyclin D1 的表达与肺癌的组织类型无关,而其高表达对肺癌细胞的淋巴转移起重要作用<sup>[11]</sup>。cyclin D1 的表达与胆管癌的分化程度及有无远处或淋巴结转移有相关,而与其他病理学指标无关<sup>[12]</sup>。cyclin D1 的阳性表达与肝癌的肝内转移和肝癌的分化程度有关,其过度表达与患者术后 < 3 年生存期相关<sup>[13]</sup>。

笔者先前的研究表明,在不同组织学类型和淋巴结转移的大肠癌中,p16 和 cyclin D1 的表达无显著差异,p16 的表达与癌细胞的浸润程度呈负相关,cyclin D1 的表达与癌细胞的浸润程度呈正相关<sup>[14]</sup>。有研究表明 p16 和 cyclin D1 与乳腺癌的发生,发展密切相关<sup>[15]</sup>。本实验显示不同组织学类型的乳腺癌中 p16 和 cyclin D1 的表达差异无显著性。提示 p16 和 cyclin D1 的表达与乳腺癌的组织学类型无关。乳腺癌淋巴结转移阳性组 p16 的表达显著低于阴性组,乳腺癌淋巴结转移阳性组 cyclin D1 的表达高于阴性组。乳腺癌中 p16 与 cyclin D1 的表达呈负相关,提示细胞周期调控因子 p16 的低表达和 cyclin D1 的高表达对乳腺癌淋巴结转移起重要作用。故认为 p16 和 cyclin D1 的表达水平可以作为评估乳腺癌预后后的参考指标。

组织芯片(组织微阵列)一般是指将数十至上千个小组织整齐地排放在一张载玻片上而制成的组织切片<sup>[4]</sup>,其的特点是:体积小,信息含量大,一次性实验即可获大量结果。组织芯片蜡块可做 100~200 张连续切片。这样用同一套组织芯片即可迅速对上百种生物分子标记(如抗原、DNA 和 RNA)进行分析、检测<sup>[2]</sup>。笔者等制作了

80 例乳腺癌的组织芯片,每张组织芯片上 80 个样品,排列整齐,外形为圆形或类圆形,较少有皱折和掉片现象。仅用几张芯片即完成了全部实验,极大地节约了研究经费和降低了劳动量,在最短的时间内获得了大肠癌中 p16 和 cyclin D1 表达的全部数据。因此认为,应用组织芯片大规模高效检测临床组织样本是可行的,具有快速、方便、经济、准确的特点。

#### 参考文献:

- [1] Sheer CJ. Mammalian G<sub>1</sub> cyclins [J]. Cell, 1993, 73(6): 1059-1065.
- [2] 刘勇. 肿瘤细胞增殖调控的研究进展 [J]. 实用癌症杂志, 1997, 12(2): 155-157.
- [3] 刘勇. 生物芯片技术及其在肿瘤研究中的应用 [J]. 江西医学检验, 2002, 20(6): 376-378.
- [4] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. Nat Med, 1998, 4(7): 844-847.
- [5] 刘勇, 路名芝, 文进. 细胞周期调控基因 p21 WAF1/CIP1 在膀胱移行细胞癌中的表达 [J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(6): 443-444.
- [6] 刘勇, 路名芝. 细胞周期调控因子 p27、cyclin E 和 Ki-67 在早期胃癌中的表达 [J]. 中华普通外科杂志, 2002, 17(6): 366.
- [7] Kamb A, Gruis NA, Weaver FJ, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. Science, 1994, 264(5157): 436-440.
- [8] 刘勇, 路名芝, 李启明. 肺癌中 MTS1/p16 和 p53 基因产物表达与细胞增殖的关系 [J]. 临床与实验病理学杂志, 1998, 14(2): 134-136.
- [9] 刘勇, 李启明, 王夷黎, 等. p16, p53 蛋白和增殖细胞抗原在早期胃癌中的表达 [J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(6): 573.
- [10] Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, et al. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas [J]. Cancer, 1996, 78(3): 390-395.
- [11] 杨海玉, 刘勇, 路名芝. 肺癌中抑癌基因 p21 和癌基因 cyclin D1 的表达 [J]. 中华结核与呼吸杂志, 2000, 23(11): 703(附插页).
- [12] 徐晓军, 罗仑昆, 何振平, 等. 细胞周期相关基因 cyclin D1 在胆管癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(2): 138-139.
- [13] 董俊峰, 吴小鹏. 原发性肝细胞癌 Survivin, cyclin D1 的表达及其临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2007, 10(2): 156-159.
- [14] 李宏涛, 袁晟, 李艳琴, 等. 采用组织芯片技术检测大肠癌组织中 p16 和 cyclin D1 的表达 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2004, 9(5): 456-458.
- [15] 田兴松, 周文红. 乳腺癌细胞中 p16, p53, CDK4/cyclin D1 的表达和预后的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(4): 260-264.