

文章编号:1005-6947(2008)05-0497-05

· 简要论著 ·

乳腺癌 p16, p53 基因蛋白和 mRNA 的表达及其意义

阮永威, 田兴松, 侯连泽

(山东大学附属省立医院 普通外科, 山东 济南 250021)

摘要:目的 探讨乳腺癌组织 p16 和 p53 基因蛋白及其 mRNA 的表达及其意义。方法 采用免疫组化法和 RT-PCR 技术,检测乳腺癌组织和癌旁组织中 p16 和 p53 基因蛋白及其 mRNA 的表达。分析其表达与乳腺癌临床病理学特征之间的关系。结果 癌旁乳腺组织中 p16 基因蛋白的表达率为 90.0% (27/30), p53 基因蛋白的表达率为 6.67% (2/30); 乳腺癌组织中 p16 基因蛋白表达率为 38.3% (23/60), p53 基因蛋白表达率为 48.3% (29/60)。癌旁乳腺组织的 p16 mRNA 显著高于乳腺癌组织 ($P=0.023$), 而在乳腺癌组织的 p53 mRNA 水平显著高于癌旁乳腺组织 ($P=0.001$)。乳腺癌细胞分化程度越高 p16 蛋白表达率越高, 而 p53 表达蛋白正相反; 有淋巴结和/或器官转移者 p16 蛋白表达率明显低于无淋巴结和/或器官转移者, 而 p53 蛋白的表达率则相反。p16 mRNA 在组织学 I 级的水平显著高于 II, III 级, 而 II, III 级之间差异无显著性; p53 mRNA 在组织学 I 级的水平显著低于 III 级。有淋巴结和/或器官转移的 p16 mRNA 和 p53 mRNA 表达明显低于和高于无淋巴结和/或器官转移者。结论 p16 和 p53 基因的改变与乳腺癌的发生发展关系密切, 可用于评估乳腺癌的预后。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(5): 497-501]

关键词: 乳腺肿瘤; 癌基因; 抑癌基因; p16; p53; mRNA

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** B

乳腺癌约占女性全身恶性肿瘤的 7% ~ 10%。全球每年约 40 万女性死于乳腺癌, 近年来其发病率持续上升。大量研究表明, 癌基因、肿瘤抑制基因/抗癌基因异常改变与乳腺癌的发生、发展关系密切。C-cerbB-2, p16, p53, Ki-67 及 p21 等在乳腺癌组织中均表达异常。笔者应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法 (SP 法)、逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术, 检测 60 例乳腺癌组织和 30 例癌旁乳腺组织中 p16 和 p53 基因蛋白及 mRNA 的表达。分析比较两种组织的表达与乳腺癌临床病理学特征间的关系, 探讨其在乳腺癌发生发展中的作用, 为乳腺癌的预后评估和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本及其一般资料 收集本院乳腺甲状腺外科 2004 年 8 月—2005 年 9 月手术切除的原发性乳腺癌新鲜标本 60 例及其中的乳腺癌旁 (3~5 cm) 乳腺组织 30 例。全部病例经手术前快速冷冻病理检查和手术后常规病理证实为乳腺浸润性导管癌。每例均有完整的临床资料。全部为女性, 年龄 24~53 (平均 39.4) 岁, 中位年龄为 45 岁。病理学分级 I 级 13 例, II 级 31 例, III 级 16 例; 有淋巴结和/或器官转移 35 例, 无淋巴结和/或器官转移 25 例。

1.1.2 要试剂及仪器 p16, p53 免疫组织化学 (免疫组化) 检测所用单克隆抗体及免疫试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司, 其他试剂由本院病理科提供。TaqDNA 聚合酶、MMLV 逆转录酶、Olig (dT) 及 dNTP 为 Promega 公司产品。ED-TA, 溴化乙锭, p16 mRNA 和 p53 mRNA 引物及 Marker 为上海博亚生物公司产品。DEPC 和琼脂

收稿日期: 2008-02-18; 修订日期: 2008-04-12。

作者简介: 阮永威, 男, 山东大学附属省立医院副主任医师, 主要从事乳腺甲状腺恶性肿瘤的诊断与治疗方面的研究。

通讯作者: 阮永威 E-mail: ruan6302003@sina.com

糖为 Sigma 公司产品。PCR 反应仪为 T Personal Biometra 公司产品。紫外透射反射检测分析仪为上海复生生物工程研究所生产。AlphaImager2200 凝胶电泳扫描仪为 Alpha Innotech 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化 SP 法检测 p16 及 p53 基因表达蛋白 活体标本在 2h 内取材,10% 中性缓冲甲醛溶液固定。玻片应用防脱片剂。石蜡制片,切片厚度 3 ~ 5 μm 。染色前将切片置于含有 0.1% 胰蛋白酶 (trypsin) 溶液的湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 20 min 后进行染色 (SP 法)。每种标本取 3 张用于 HE 染色 (1 张) 和免疫组化染色 (2 张)。严格按照试剂盒说明书要求操作。用已知阳性切片作为阳性对照,磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为一抗进行阴性对照。

1.2.2 RT-PCR 技术检测 p16mRNA 和 p53mRNA 的表达 用 Trizol 方法抽提组织总 RNA:取组织块 50 ~ 100, 将其在液氮中研磨成粉末;移入玻璃匀浆器中加入 1 mL Trizol 抽打匀浆后,移入 1.5 mL 新离心管中,用 5 mL 针头抽打;冰上孵育 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (12 000 g) 5 min。取上清液移入 1.5 mL 新离心管,加 0.2 mL 氯仿,震荡,冰上孵育 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 11 200 r/min (< 12 000 g) 10 min;取上层液移入 1.5 mL 新离心管;加 0.5 mL 异丙醇,震荡,冰上孵育 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 < 11 200 r/min (< 12 000 g) 5 min;弃去上清液,加入 1 mL 75% 乙醇,震荡,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 < 8 800 r/min (< 7 500 g) 5 min;弃去上清液,室温下使之变透明;加入 DEPC 处理水 10 ~ 35 μL 溶解 RNA。RNA 变性电泳观察 18 s,28 s 条带。分光光度计检测 260/280 吸光度值,计算 RNA 浓度,260/280 吸光度值 ≥ 1.8 表明 RNA 样品纯净。

RT 反应体系:RNA 抽提物 5 μL , Radome 引物 2 μL , RNasin 0.5 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 15 min 后立即放入冰溶。RNasin 0.5 μL , 10 mmol/LdNTP 1 μL ,

5 \times RT 缓冲液 4 μL , 25 mmol/LMgCl₂ 4 μL , MMLV 逆转录酶 3 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h, 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 ~ 10 min。

PCR 反应:25 mmol/LMgCl₂ 2 μL , 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , 10 mmol/LdNTP 1 μL , 上下游引物 10 pmol/ μL 2.5 uL \times 2, cDNA 模板 2.5 μL , dd H₂O 34 μL , Taq 酶 0.5 μL , 轻质石蜡油 50 μL , 共 100 μL 。第一步一个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;第二步 30 个循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 取出 5 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像分析系统检测目的基因与 β -actin 的吸光度

PCR 引物:p16:S 为 5'-TTC CTG GAC ACG CTG GTA GT-3', AS 为 5'-TCT GAG CTT TGG AAG CTC TCA G-3'; p53:S 为 5'-TCT GTG ACT TGC ACG TAC TC-3', p53 AS 为 5'-CAC GGA TCT GAA GGG TGA AA-3'; β -actin:S 为 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3', AS 为 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3。

1.3 结果判断

1.3.1 免疫组化 细胞浆或细胞核有明确的黄色或棕黄色颗粒为 p16 蛋白阳性表达。细胞核有明确的黄色或棕黄色颗粒或团块状沉淀为 p53 蛋白阳性表达。无阳性细胞或阳性细胞 < 10% 为 (-), 阳性细胞数 10% ~ 30% (+), 31% ~ 70% (++) , > 70% (+++) (图 1-2)。

1.3.2 RT-PCR 产物 电泳后应用光密度扫描仪测定电泳带积分光密度 A, 计算 p16mRNA/ β -actin mRNA 和 p53mRNA/ β -actin mRNA 的值, 计算出 p53 mRNA 和 p16 mRNA 相对值, 进行半定量分析。

1.4 统计学处理

数值以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用 SPSS11.0 统计软件包对数据进行方差分析、卡方和 *t* 检验。 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

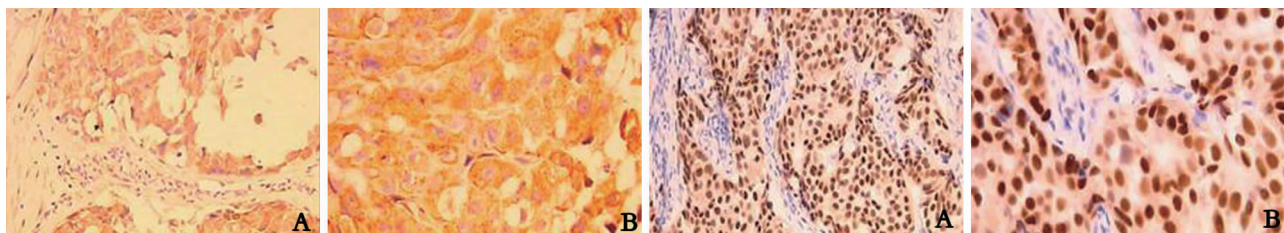


图1 乳腺浸润导管癌免疫组化 p16 蛋白阳性

A: ($\times 200$); B: ($\times 400$)

图2 乳腺浸润导管癌免疫组化 p53 蛋白阳性

A: ($\times 200$); B: ($\times 400$)

2 结果

2.1 p16 和 p53 基因蛋白在乳腺癌及癌旁乳腺组织中的表达

乳腺癌组织中 p16 基因蛋白表达率为 (38.3%) 明显低于癌旁组织表达率 (90.0%) ($P < 0.001$); 而乳腺癌组织中的 p53 蛋白表达率 (48.3%) 明显高于癌旁组织表达率 (6.7%) ($P < 0.01$) (表 1)。

2.2 p16mRNA 及 p53mRNA 在乳腺癌及癌旁乳腺组织中的表达

p16mRNA, p53mRNA 及 β -actin RT-PCR 产物分别为 640 bp, 241 bp 和 318 bp (图 3-4)。乳腺癌组织的 p16mRNA 显著低于癌旁组织 ($P = 0.023$), 而 p53mRNA 在乳腺癌组织的水平显著高于癌旁乳腺组织 ($P = 0.001$) (表 2)。

表 1 p16 和 p53 基因蛋白的表达

组织	n	p16 蛋白阳性				p53 蛋白阳性			
		(+)	(++)	(+++)	%	(+)	(++)	(+++)	%
癌旁乳腺	30	6	8	13	90.0	2	0	0	6.7
乳腺癌	60	3	6	14	38.3	2	4	23	48.3
P 值					0.001				0.01

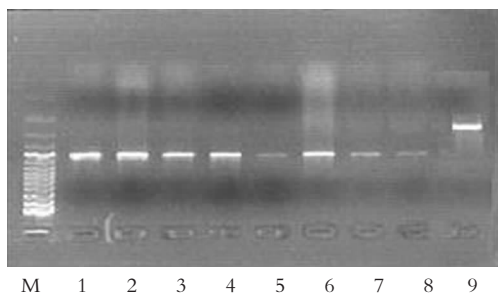


图 3 癌旁乳腺组织及乳腺癌组织 p16mRNA 的表达 M:marker; 1~4:癌旁乳腺组织; 5~8:乳腺癌组织; 9: β -actin

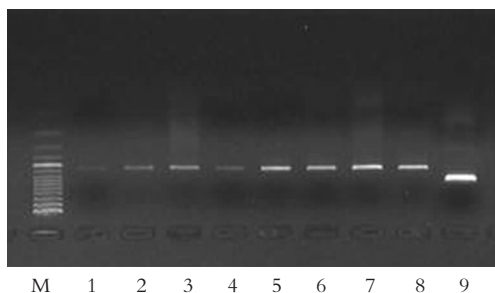


图 4 癌旁乳腺组织及乳腺癌组织 p53mRNA 的表达 M:marker; 1~4:癌旁乳腺组织; 5~8:乳腺癌组织; 9: β -actin

表 2 p16mRNA 和 p53mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

表达产物	癌旁乳腺组织(30 例)	乳腺癌组织(60 例)	P 值
p16mRNA	0.76 \pm 0.12	0.38 \pm 0.23	0.023
p53mRNA	0.45 \pm 0.21	0.86 \pm 0.15	0.001

2.3 p16 和 p53 蛋白及其 mRNA 水平与乳腺癌部分临床病理特征的关系

p16 和 p53 蛋白表达与乳腺癌组织学分级、淋巴结和/或器官转移有关。乳腺癌细胞分化程度越高 p16 蛋白表达率越高, 而 p53 表达蛋白则相反; 有淋巴结和/或器官转移的病例 p16 蛋白的表达率明显低于无淋巴结和/或器官转移者, 而 p53 蛋白的表达率则显著增加 (表 3)。

p16mRNA 在组织学 I 级的水平显著高于 II, III 级, 而 II, III 级之间差异无显著性; p53mRNA 在组织学 I 级的水平显著低于 III 级的水平。有

淋巴结和/或器官转移的 p16mRNA 和 p53mRNA 表达明显低于和高于无淋巴结和/或器官转移者 (表 4)。

表 3 p53 和 p16 蛋白表达与临床特征的关系

临床病理特征	n	p16 蛋白阳性表达		p53 蛋白阳性表达	
		n	(%)	n	(%)
细胞学分级					
I	13	8	(61.5)	3	(21.3)
II	31	12	(38.7)	15	(48.4)
III	16	3	(18.8)	11	(68.8)
χ^2		9.800		5.991	
P		0.008		0.047	
淋巴结和/或器官转移					
有	35	10	(28.6)	23	(65.7)
无	25	17	(68.0)	6	(24.0)
χ^2		9.16		10.16	
P		0.002		0.001	

表4 p16mRNA,p53mRNA 与临床特征的关系

表达产物	乳腺癌组织学分级			淋巴结和/或器官转移	
	I (13 例)	II (31 例)	III (16 例)	有(35 例)	无(25 例)
p16mRNA	0.63 ± 0.18	0.38 ± 0.21 ¹⁾	0.29 ± 0.13 ¹⁾	0.24 ± 0.11 ³⁾	0.55 ± 0.21
p53mRNA	0.38 ± 0.28	0.46 ± 0.19	0.76 ± 0.19 ²⁾	0.69 ± 0.18 ³⁾	0.35 ± 0.14

注:与 I 期比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; 3) 与无转移组比较 $P < 0.01$

3 讨论

目前尚不明了基因突变和/或失调发生于肿瘤进展的哪个阶段。体内外研究提示,基因变化的相互作用,尤其是叠加作用,是乳腺发生癌变的重要分子生物学基础。

p16 基因突变和缺失广泛存在于各种肿瘤中,其中以胶质细胞瘤最高,达 71%,乳腺癌为 23%^[1]。王本忠等^[2]在乳腺癌组织标本和纯化的乳腺癌细胞的比较研究中发现,27 例乳腺癌石蜡包埋切片中,仅有 2 例出现 p16 基因纯合性缺失;14 例新鲜未纯化乳腺癌标本中,1 例未发现 exon1,1 例 exon3 相应的扩增片段;14 例纯化乳腺癌标本中,有 1 例 exon1~3 均未见扩增片段,2 例未见 exon1~2 扩增片段,2 例未见 exon3 扩增片段;说明纯化乳腺癌细胞可提高 p16 基因突变的检出率。曹新等^[1]研究发现,39 例乳腺癌标本中有 6 例出现 p16 基因扩增阴性,其中单纯 exon1 缺失 2 例,单纯 exon2 缺失 3 例,exon1 和 exon2 同时缺失 1 例;而 10 例乳腺良性疾病组织标本未发现有纯合性缺失。说明乳腺癌组织中可发生 p16 基因缺失,而正常乳腺和良性乳腺病不发生或极少发生 p16 基因缺失。

但也有报道称,乳腺癌组织中未发现或极少出现 p16 基因的纯合性缺失^[3]。分析其原因有:(1)聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)检测新鲜或冷冻组织匀浆标本,标本不可避免地被正常细胞污染,降低基因缺失的检出几率;(2)DNA 过度甲基化,导致基因沉默,PCR-SSCP 很难进行有效的鉴定;(3)p16 基因的密码序列将近 75% 是由 G 或 C 组成,导致检测更加复杂化。

p16 基因在乳腺癌中有多种形式的结构异常。其基因表达障碍主要由于 p16 基因高甲基化,而 p16 基因纯合缺失、突变仅为次要原因。乳腺癌中 p16 基因高甲基化是 p16mRNA 和蛋白

失表达的主要原因^[4]。本研究结果显示 p16mRNA 高表达与细胞分化程度和有无淋巴结和/或转移有关;乳腺癌组织细胞分化程度高、无转移的 p16mRNA 高表达率明显高于细胞分化差、有转移者。提示 p16 基因纯合性缺失、高甲基化与乳腺癌的发生发展、恶性程度、癌细胞的浸润和转移密切相关。

有学者发现,p16 蛋白表达与淋巴结转移与否、临床病理分期有关,而与乳腺癌的预后关系不明显^[5]。郭洪斌等^[6]的结果表明在肿瘤大小、雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)的表达中 p16 蛋白阳性表达差异无显著性,而在 TNM 分期(I~II 期和 III~IV 期)、有无淋巴结转移中表达差异有显著性;随着 TNM 分期的进展、淋巴结发生转移,p16 蛋白表达逐渐下降。陈进武等^[7]报道 p16 基因蛋白表达与病理类型、淋巴结转移有关,而与肿瘤大小、5 年生存率无明显关系。本文结果显示,乳腺癌分化程度高、淋巴结无转移者 p16 蛋白表达率高,反之,则表达率低。

据报道,用免疫组化法检测乳腺癌 p16 基因蛋白的表达率为 24%~60%^[3,7],正常乳腺组织为 100%^[3],癌旁乳腺组织为 92.8%,乳腺纤维瘤为 85%,乳腺上皮增生活跃为 50%^[7]。本研究结果乳腺癌组织中 p16 蛋白表达率为 45.1%。

鉴于 p16 基因的丢失、突变和甲基化与乳腺癌的发生发展关系密切,可将 p16 基因的检测用于肿瘤的辅助诊断;与肿瘤组织学分级相结合,可用于评估乳腺癌患者的预后。由于 p16 基因突变率高,它可成为乳腺癌治疗的极好靶基因。

p53 基因突变、缺失或失活是多种肿瘤发生的原因之一,主要是 p53 基因突变。

p53 抑癌基因突变和蛋白过度表达可见于乳腺癌癌前阶段,是乳腺癌发生的早期事件。Schmitt 等^[8]发现,乳腺导管单纯上皮增生、非典型增生和导管内癌的突变型 p53 蛋白阳性率分别为 4.5%,16.6% 和 26.0%;认为一旦发生

p53 基因突变,细胞便不可能圆满修复损伤的 DNA,不稳定的染色体将导致细胞无限增殖而发生癌变。有学者^[9]推测 p53 基因突变与表达在乳腺癌早期阶段已发生。且随着分级的提高,突变型 p53 蛋白的表达量也增加。与 SPF (S-phase fraction) 相关,突变型 p53 蛋白表达阳性 S 期细胞明显高于表达阴性者,表明突变型 p53 蛋白可以反映乳腺癌的生物学行为。

突变型 p53 与乳腺癌的预后有关,乳腺癌组织中表达率越高,其预后越差^[10]。有研究表明,p53 在 I, II 级浸润性导管癌中的表达有显著性差异^[11]。笔者也发现 p53 表达者的新辅助化疗效果较阴性表达者差^[12]。因此,p53 基因可作为判断乳腺癌患者预后的有效指标,作为肿瘤标志物也具有较高的应用价值。笔者发现 p53 蛋白阳性表达率为 48.3% (29/60),p53 mRNA 及蛋白阳性表达与组织学分级和转移有显著相关。但是,有学者^[13]认为 p53 蛋白与手术后腋窝淋巴结转移密切相关,与病理类型和组织学分级无关。也有人^[14]认为 p53 蛋白阳性表达与病理分级和淋巴结转移无显著关系。

综合国内外文献,同时结合本研究结果,认为 p53 蛋白高表达的乳腺癌具有较强的侵袭力和转移力,与淋巴结转移密切相关,能提示预后不良,可作为乳腺癌评估预后的一个重要指标。

参考文献:

- [1] 曹新,魏钦俊,姜玉章. 乳腺癌组织中 p16 基因变异及 CpG 岛甲基化状态的研究 [J]. 肿瘤, 2005, 25 (4): 366 - 369.
- [2] 王本忠,朱新生. 乳腺癌细胞 p16 基因的研究 [J]. 中华外科杂志, 2000, 38 (1): 17 - 18.
- [3] Quesnel B, Fenaux P, Philippe N, *et al.* Analysis of p16

- gene detection and point mutation in breast carcinomas [J]. *Oncogene*, 1995, 10 (2): 351 - 355.
- [4] Herman JG, Abouezzi Z, Borgen PI, *et al.* Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation all common human cancers [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (18): 4525 - 4530.
- [5] 高学硕, 万文徽, 赵爱莲, 等. p16 蛋白在乳腺癌中表达状况及生物学意义 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2000, 15 (2): 93 - 94.
- [6] 郭洪斌, 张培, 王斌, 等. p16 蛋白、C-erbB-2 在乳腺癌中表达的意义 [J]. 中国老年学杂志, 2005, 25 (6): 718 - 719.
- [7] 陈建武, 王佩飞. 乳腺癌相关基因蛋白的表达及意义 [J]. 现代实用医学, 2003, 15 (11): 680 - 683.
- [8] Schmitt FC, Leal C, Lopes C. p53 protein expression and nuclear DNA content in breast intraductal proliferations [J]. *J Pathol*, 1995, 176 (3): 233 - 241.
- [9] Vant Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer [J]. *Nature*, 2002, 415 (6871): 530 - 535.
- [10] 于志勇, 于金明, 吴泰璜, 等. 乳腺癌分子生物学特性检测的临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27 (7): 420 - 422.
- [11] 田兴松, 周文红. 乳腺癌细胞中 p16, p53, CDK4/cyclinD1 的表达和预后的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14 (4): 260 - 264.
- [12] 阮永威, 金星, 马宏岩. 乳腺癌 p53, ki-67 和 bcl-2 的表达与新辅助化疗的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15 (4): 247 - 249.
- [13] 孙慧, 张立华, 阎庆娜, 等. p53、nm23、PCNA 在临床 I 期乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2002, 29 (2): 82 - 86.
- [14] Reed W, Hannisdal E. The prognostic value of p53 and C-erbB-2 immuno-staining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factor in 613 patients with a follow-up of 14 - 30 years [J]. *Cancer*, 2000, 88 (4): 804 - 813.