

· 论 著 ·

P16、 Δ NP63 在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的表达及相关性研究杨 君¹, 王 彬², 周德平¹, 张轩珍², 李云霞²

(重庆市妇幼保健院:1. 妇产科;2. 病理科 400013)

摘要:目的 探讨 P16、 Δ NP63 蛋白在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的表达、意义及其相关性。方法 采用免疫组化 SP 法检测 42 例宫颈鳞癌, 90 例宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN), 25 例慢性宫颈炎组织石蜡切片中 P16、 Δ NP63 蛋白的表达。结果 (1)从慢性宫颈炎组织、CIN 到宫颈鳞癌, P16、 Δ NP63 的表达均递增, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。 (2) P16 蛋白表达与宫颈癌患者的年龄、临床分期及癌细胞分化程度无关, Δ NP63 蛋白表达与宫颈癌患者年龄、临床分期无关, 与癌细胞分化程度呈负相关, 在分化程度差的肿瘤组织中表达增高($P < 0.05$)。 (3)在 CIN 和宫颈鳞癌中, P16 与 Δ NP63 蛋白表达呈正相关($r_s = 0.6226, P < 0.01$)。结论 P16、 Δ NP63 参与了 CIN、宫颈鳞癌的发生、发展, 其免疫组化检测对宫颈癌的早期诊断有参考价值。

关键词: P16; Δ NP63; 宫颈上皮内瘤变; 宫颈癌

中图分类号: R737.33; R730.43

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)24-3060-03

Expressions of P16 and Δ NP63 in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of cervix uterus and their relationship to clinicopathology

YANG Jun¹, WANG Bin², ZHOU De-ping¹, et al.

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2 Department of Pathology, Chongqing Obstetric and Gynecology Hospital, Chongqing 400013, China)

Abstract: Objective To examine the expression of P16, Δ NP63 in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and to study the clinical significance and their correlativity. **Methods** Expressions of P16 and Δ NP63 were detected by immunohistochemical staining in 42 cases of cervical squamascarcinoma, 90 cases of CIN and 25 cases of chronic cervicitis. **Results** The positive rate of P16 and Δ NP63 in CIN and cervical carcinoma was significantly higher than that in chronic cervicitis respectively ($P < 0.01$). The level of P16 and Δ NP63 expression in CIN and cervical carcinoma increased with the increasing of clinical stage ($P < 0.01$), and positive staining of Δ NP63 in well differentiated carcinoma tissue was higher than that in intermediately or poorly differentiated carcinoma tissue. There was no relationship between the expression of P16, Δ NP63 in cervical carcinoma and the characteristic of clinical or pathology ($P > 0.05$). The expression of P16 was positively correlated to Δ NP63 in CIN and cervical carcinoma ($r_s = 0.6226, P < 0.01$). **Conclusion** The expressions of P16, Δ NP63 contribute to carcinogenesis and development of CIN and cervical carcinoma. P16 and Δ NP63 are of value in early diagnose of CIN and cervical carcinoma.

Key words: P16; Δ NP63; CIN; cervical carcinoma

宫颈癌是严重威胁妇女生命健康的恶性肿瘤, 近年来呈年轻化趋势^[1]。P16 基因又称多肿瘤抑制基因 MTS1、CDKN2 或 INK41, 其编码产生的 P16 蛋白是一种细胞周期蛋白依赖性抑制因子(cyclin dependent inhibitor, CDI), 它通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)对细胞周期起负调控作用。P63 属于 P53 肿瘤抑制基因家族, 转录后产生两种产物: TAP63 和 Δ NP63。 Δ NP63 同源体通过调节细胞分化、凋亡、增殖及移动在癌的进展过程中起致癌作用。研究表明, P16 及 Δ NP63 的表达异常分别与 HPV 感染所致的宫颈癌密切相关^[2-3], 但二者之间的关系研究较少。本文采用免疫组化法检测二者在宫颈癌及癌前病变中的表达, 探讨其相互关系及在宫颈癌的发生、发展、预后判断中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 选择重庆市妇幼保健院病理科 2004 年 1 月至 2008 年 5 月存档的宫颈鳞癌石蜡标本 42 例(其中活检标本 20 例, 手术标本 22 例)。CIN90 例(其中 CIN I 27 例, CIN II 33 例, CIN III 30 例), 作为实验组。同时, 随机选取同期因良性病变行全子宫切除的慢性宫颈炎组织 25 例作对照组。入选病例既往均无放疗、化疗及激素治疗史。实验组 132 例患者, 年龄

23~76 岁, 平均年龄 44.1 岁。实验组与对照组之间患者年龄差异无统计学意义。全部病例均请病理专家复证证实, 宫颈癌组按《肿瘤病理诊断与鉴别诊断学》标准^[4]进行肿瘤细胞分化程度判定: 高分化 15 例, 中分化 22 例, 低分化 5 例; 临床分期采用国际妇产科联盟(FIGO 2000 年)标准: I 期 12 例, II 期 21 例, III 期 7 例, IV 期 2 例。

1.2 主要试剂 兔抗人 P16 多克隆抗体、鼠抗人 Δ NP63 单克隆抗体及阳性对照切片均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法 采用免疫组化 SP 法, 主要染色步骤参照试剂盒说明书进行。以已知阳性切片为阳性对照, 以 PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定标准 P16 阳性染色为细胞核和胞浆出现棕黄色颗粒。 Δ NP63 阳性染色主要位于细胞核, 呈棕黄色或棕褐色颗粒。蛋白表达强度采用显微摄像计算机图像分析系统计算(间质细胞阳性不计入内)。

判定标准: 采用 Gatalica^[5]半定量方法, 将染色强度(intensity, I)分为 4 级: 无染色为 0, 低度染色为 1, 中度染色为 2, 强染色为 3。计算阳性细胞百分率(percentage, P), $0\% = 0$ 分; 小于 $10\% = 1$ 分; $10\% \sim 50\% = 2$ 分; $51\% \sim 80\% = 3$ 分; 大于

80%=4 分。得分=I×P,在 0~12 分,大于或等于 4 分为阳性表达。

1.5 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析,率的比较用 χ^2 检验或四格表确切概率检验,二者相关性用非参数 Spearman 等级相关分析, $P<0.05$ 为显著性检验水准。

2 结 果

2.1 P16、 Δ N P63 蛋白在慢性宫颈炎、CIN 及宫颈癌组织中的表达 慢性宫颈炎组织中 P16 阳性细胞主要分布于基底层和旁基底细胞层,染色均匀,着色较浅,表层细胞无表达。浸润癌中 P16 阳性细胞弥漫或灶状分布,呈粗大颗粒状,着色深。 Δ NP63 蛋白主要表达于胞核,在慢性宫颈炎组织中呈弱阳性表达于基底细胞层和中间细胞层,部分表达于不成熟鳞状上皮化生及增生的储备细胞。随 CIN 级别的增高到宫颈鳞癌, Δ NP63 蛋白表达逐渐增强,其染色范围与病变细胞呈明显相关性。P16 和 Δ NP63 蛋白在慢性宫颈炎、CIN 及宫颈鳞癌组织中的表达情况见表 1,图 1~图 6。

表 1 P16 和 Δ NP63 的表达

分组	n	P16		Δ NP63	
		阳性[n(%)]	P	阳性[n(%)]	P
慢性宫颈炎	25	4(16.00)	$<0.01^a$	7(28.00)	$<0.01^a$
CIN	90	62(68.89)		65(72.22)	
宫颈癌	42	40(95.24)	$<0.01^b$	36(85.71)	$>0.05^b$

^a:3 组间比较;^b:CIN 组与宫颈癌组间比较。

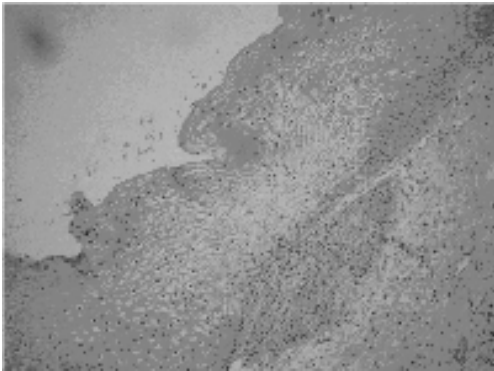


图 1 P16 在慢性宫颈炎组织中阴性表达(SP×100)

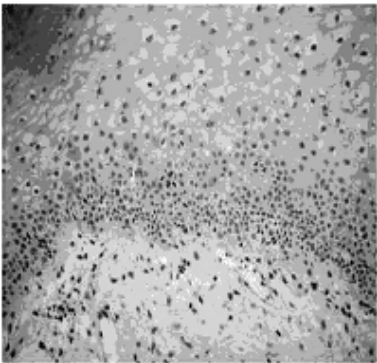


图 2 P16 在 CIN I 中弱阳性表达于细胞核和胞浆(SP×100)

2.2 宫颈鳞癌及 CIN 组织中 P16 和 Δ NP63 蛋白表达与临床及病理特征的关系 P16 和 Δ NP63 蛋白在宫颈鳞癌及 CIN 组织中的表达均与患者年龄无关($P>0.05$),在低度宫颈上皮内病变(CIN I)中的表达低于高度宫颈上皮内病变(CIN II、

CIN III),在宫颈鳞癌中呈强阳性表达,不同临床分期组间表达阳性率无差异。P16 蛋白表达与癌细胞分化程度无关, Δ NP63 蛋白表达与癌细胞分化程度呈负相关,在分化程度差的肿瘤组织中表达增高($P<0.05$)。见表 2。

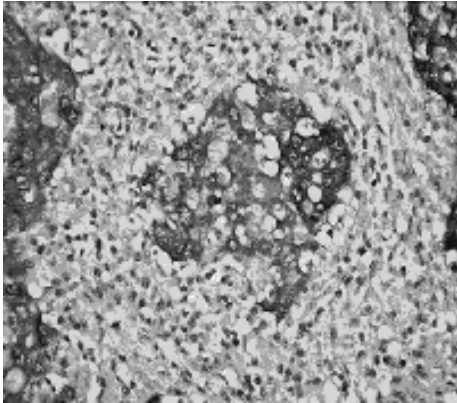


图 3 P16 在宫颈鳞癌组织中阳性表达于细胞核和胞浆(SP×400)

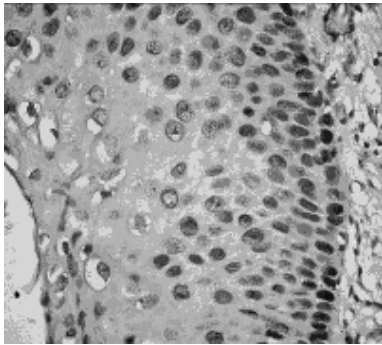


图 4 P63 在 CIN II 中阳性表达于细胞核(SP×400)

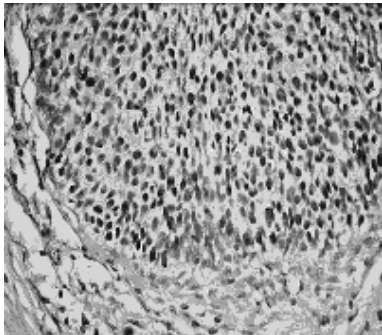


图 5 P63 在 CIN III 中阳性表达于细胞核(SP×200)

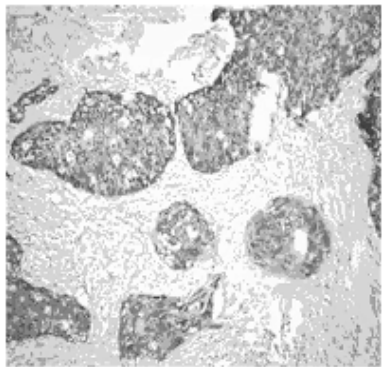


图 6 P63 在宫颈鳞癌组织中阳性表达于细胞核(SP×200)

表 2 P16 和△N P63 蛋白表达与临床及病理特征的关系

临床病理特征	n	P16		△NP63	
		阳性〔n(%)〕	P	阳性〔n(%)〕	P
年龄(岁)					
≤45	70	51(72.86)	>0.05 ^a	55(78.57)	>0.05 ^a
>45	62	51(82.26)		46(74.19)	
CIN 分级					
CINI	27	13(48.15)	<0.01 ^b	15(55.56)	<0.05 ^b
CINII	33	24(72.73)	>0.05 ^c	23(69.70)	<0.05 ^c
CINIII	30	25(83.33)		27(90.00)	
宫颈癌临床分期					
I期	12	11(91.67)	>0.05 ^d	10(83.33)	>0.05 ^d
II期	21	20(95.24)		18(85.71)	
III期	7	7(100.00)		6(85.71)	
IV期	2	2(100.00)		2(100.00)	
宫颈癌细胞分化程度					
高分化	15	13(86.67)	>0.05 ^e	10(66.67)	<0.05 ^e
中分化	22	22(100.00)		21(95.45)	
低分化	5	5(100.00)		5(100.00)	

^a:不同年龄组间比较;^b:CIN I 组与 CIN II 及 CIN III 组间比较;^c:CIN II 组与 CIN III 组间比较;^d:宫颈癌不同临床分期组间比较;^e:宫颈癌不同分化程度组间比较。

2.3 宫颈鳞癌及 CIN 组织中 P16 和△NP63 蛋白表达二者之间的关联性 经 Spearman 等级相关分析,在宫颈鳞癌及 CIN 组织中,P16 和△NP63 蛋白表达二者之间呈正相关性($r_s = 0.6226, P < 0.01$)。

3 讨 论

人乳头瘤病毒(HPV)已明确为宫颈癌的病因^[6-7]。抑癌基因 P16 基因定位于人染色体 9p21,编码 P16 蛋白,主要通过 与 cyclinD1 竞争性结合 CDK4/CDK6,抑制视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)磷酸化和转录调节因子 E2F 释放,诱导细胞 G₁→S 期 停滞。另一方面,P16 蛋白还可能通过抑制 sp1 与 hTERT 启 动子的结合,诱导染色体端粒缩短,参与肿瘤抑制及启动细胞 衰老过程。研究表明,P16 几乎在 100%高危型 HPV(HR- HPV)阳性的宫颈癌和癌前病变中过表达^[1]。本研究中,宫颈 鳞癌组织中 P16 呈强阳性表达(95.24%),明显高于 CIN 组 (68.89%)及慢性宫颈炎组(16.00%),且随着 CIN 病变程度 升级而表达强度及范围增加,与文献报道相符。推测其主要 分子机制:HR-HPV 致癌基因 E6、E7 蛋白使宿主细胞 P53 和 Rb 基因失活,阻断了 P16 结合 CDK4/CDK6 降低 pRb 磷酸化途 径,同时减少了 pRb-E2F 复合物,使 P16 的负反馈抑制解除, P16 表达升高。P16 表达异常是 HR-HPV 感染并引致宿主细 胞变异的客观表现,在宫颈病变的早期诊断中可能发挥重要 作用。

P53 基因是人类肿瘤中最广泛存在的肿瘤抑制基因,近年 发现其同源基因,包括 P63 和 P73,二者都能激活 P53 相关靶 基因,引起细胞周期停滞及细胞凋亡,但二者生物学功能较 P53 复杂,其不同的转录产物和蛋白异构体在肿瘤的发生发展

中起着抑癌或致癌基因作用。人 P63 基因位于染色体 3q27- 3q29,转录后产生两种产物:TAp63 和△NP63,TAp63 同源体 与 P53 相似,具有抑癌作用,而缺乏转录激活 TA(transcription activation)区域的△NP63 同源体则通过显性抑制的方式阻断 P63 其他异构体、P73 异构体以及 P53 的转录活性,在癌的进 展过程中起致癌作用^[8]。P63 基因 mRNA 在人和鼠组织中主 要表达于表皮、宫颈、泌尿道等具有鳞状上皮分化潜能的基底 细胞和旁基底细胞^[9],其中转录水平最高的是△NP63^[10]。 Martens 等^[3]发现 P63 与 HPV 感染所致的宫颈癌密切相关, 提出 P63 也是 HPV 的靶细胞标记之一。本研究中,从慢性宫 颈炎组织、CIN 到宫颈鳞癌,△NP63 的表达呈递增趋势,尤其 是 CIN 组(72.22%)与慢性宫颈炎组(28.00%)差异有统计学 意义($P < 0.01$),提示△NP63 表达异常可能是宫颈鳞癌早期 病变的信号因子,且△NP63 蛋白表达范围与病变细胞呈明显 相关性,有助于 CIN 病变分级的组织学诊断。

宫颈癌的预后与临床分期密切相关。本研究中,宫颈鳞癌 组织中 P16 蛋白表达与患者临床特征无明显相关性,△NP63 蛋白表达仅与癌细胞分化程度呈负相关,提示 P16、△NP63 蛋 白的表达对宫颈癌的预后判断意义不大。

本研究中,在宫颈鳞癌及 CIN 组织中 P16 和△NP63 蛋白 表达二者之间显示正相关性($P < 0.01$),推测△NP63 通过阻 断 P53 介导的反式激活,抑制野生型 P53 基因的抑癌功能导 致的细胞周期调控异常与 HR-HPV E6、E7 蛋白使宿主细胞 P53 和 Rb 基因失活,P16 蛋白过表达导致细胞变异具有协同 作用,其具体分子机制尚待进一步研究。

综上所述,P16、△NP63 蛋白的表达异常可能是宫颈鳞癌 发生的早期分子事件,二者具有协同性,并在宫颈鳞癌及癌前 病变的发生发展中发挥重要作用,其免疫组化检测对宫颈癌的 早期诊断具有参考价值,P16、△NP63 有望成为宫颈癌早期诊 断的敏感指标。

参考文献:

[1] Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, et al. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976—2000[J]. Cancer,2004,100(5):1035.
[2] Eleuterio J Jr, Giraldo PC, Goncalves AK, et al. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions:the role of p16INK4a and highrisk human papillomavirus[J]. Acta Obstet Gynecol Scand,2007,86(1):94.
[3] Martens JE, Arends J, Vander Linden PJ, et al. Cytokeratin 17 and P63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell [J]. Anticancer Res 2004,24(2B):771.
[4] 廖松林. 肿瘤病理诊断与鉴别诊断学[M]. 福州:福建科学技术出版社,2006:526.
[5] Gatalica Z, Lele SM, Rampy BA, et al. The expression of Fhit protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma [J]. Cancer,2000,88(6):1378.
[6] Graflund M, Sorbe B, Sigurdardóttir S, et al. Relation between HPV-DNA and expression of p53, bcl-2, p21WAF-1, MIB-1, HER-2/neu and DNA ploidy (下转第 3066 页)

例小于胎龄儿,新生儿体重 900~2 980g,低体重儿 8 例。存活儿未再发生宫内死亡,出生后其中 1 例新生儿重度窒息,1 例新生儿出生后 7d 因呼吸窘迫综合征死亡。

3 讨 论

3.1 多胎妊娠之一宫内死亡的发生率 妊娠晚期发生死胎与活胎并存在我院占住院分娩多胎的 3.30%,国内外报道甚少,而对双胎之一宫内死亡的发生率,波兰报道为 0.5%~6.8%^[1],国内张颖报道为 4.98%,苏琦枫^[2]报道为 3.65%。

3.2 多胎妊娠晚期发生死胎与活胎并存期待疗法的可行性 本组有 1 例,发现宫内死胎时间最长为 98d,活胎均存活分娩,新生儿未见异常。多胎双卵双胎妊娠晚期发生死胎与活胎并存,是否会给存活儿带来危险主要取决于胎盘上是否有吻合血管,可能是因为双卵双胎间较少血管吻合支有关;母亲无 1 例出现弥散性血管内凝血(DIC),原因可能为一胎儿死亡后胎盘血管闭塞胎盘表面大量纤维素沉积,阻止了凝血酶向母体及存活胎儿的释放^[3]。因此可在密切监测母体情况下,促进生存胎儿的生长和成熟。如母体出现 DIC 时,必须终止妊娠;而 3P 试验和 D-二聚体含量则是对母体凝血功能监测较为敏感的指标^[4]。如母体情况稳定,可在生存儿宫外能生存时择期使其娩出,为防止宫缩时更多的死胎分解物进入母体,应适当采取剖宫产娩出活胎。本文活胎分娩后仅 1 例 7d 后死亡,其余均存活,母体均无 DIC。双胎之一宫内死亡多发生于单卵双胎,与双胎输血综合征(TTTS)有关,双胎输血综合征在单绒毛膜双羊膜腔胎盘中约为 5%~15%,是影响单绒毛膜双胎围产期结局的主要原因^[5]。但胎死后继续妊娠对孕母无影响,而存活胎儿神经系统受损多见。本文 1 例因 IVF 术移植 2 枚胚胎后发育为 3 个胎儿,妊娠 17 周发现 1 胎无心胎儿,妊娠 26 周 1 胎宫内死亡,另一胎妊娠 32 周剖宫产存活。无心胎儿,是多胎妊娠的一种少见的畸形,又称双胎反向动脉灌注(TRAP),发生率约占单卵双胎的 1%,TRAP 基本的变化是在胚胎发生时期在双胎的脐动脉出现动脉吻合。具有血流动力学优势的胚胎成为泵血胎,通过脐动脉吻合向另一胎儿供血,低氧含量的血流通过脐动脉进入髂动脉再进入腹主动脉进入无心胎,使双胎中的无心畸形借正常胎儿心脏的动力,通过交通支获得循环血液而生存。无心畸形因无心脏,它利用另一个正常胎儿的心脏

的血供不断长大,因此是受血儿,常伴有水肿及羊水过多,而正常胎儿为供血儿,个体发育小,贫血,羊水过少。本文中 1 例无心胎儿体重 100g,仅有躯干及左侧肢体。过去都主张及时终止妊娠以防止组织凝血活酶释放导致 DIC;子宫内胎儿栓塞综合征,以及双胎输血综合征等危及胎儿及母体,但此时如孕周尚不足 34 周,存活胎儿未成熟,过早终止妊娠则早产儿死亡率极高。本文 1 例 28 周早产儿因药物保胎失败阴道分娩,在出生后 7d 因新生儿呼吸窘迫综合征死亡。宫内死胎时间与母体预后的关系有待进一步研究,并且要将脐带与胎盘因素考虑在内。国内报道发现死胎的胎盘里沉积着大量的纤维蛋白,它可以直接降低母体的纤维蛋白原,继而增加纤维蛋白的降解产物,或可以阻断从胎儿和胎盘来的促凝血酶原激酶进入母体循环,预防了弥漫性血管内凝血,两个机制是在形成广泛的纤维化的基础上运行的^[6],因此,如多胎之一或二宫内死亡,B 超排除活胎发育异常监测并积极治疗妊娠合并症,采取期待疗法至 34 周分娩是可行的。

参考文献:

- [1] Dziechciowski KI. Elective cesarean section in cases of threatened twin pregnancy[J]. Ginekol Pol, 2000, 7(3): 146.
- [2] 苏琦枫. 双胎之一胎死宫内原因监测与处理[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2002, 18(2): 75.
- [3] 曹泽毅 主编. 中华妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 416.
- [4] 王志坚, 李宏, 柳美莲. 双胎妊娠中晚期胎儿宫内死亡 13 例临床分析[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(11): 1483.
- [5] Lim YK, Tan TY, Zuarde R, et al. Outcomes of twin-twin transfusion syndrome managed by a specialised twin clinic [J]. Singapore Med J, 2005, 46(8): 401.
- [6] 朗景和 主译. 威廉姆斯产科学[M]. 20 版. 西安: 世界图书城出版公司, 2001: 22.

(收稿日期: 2009-06-05)

(上接第 3062 页)

- in early cervical carcinoma: correlation with clinical outcome [J]. Oncol Rep, 2004, 12(1): 169.
- [7] Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus [J]. J Formos Med Assoc, 2008, 107(3): 198.
 - [8] Wu G, Nomoto S, Hoque M, et al. TAp63a and ΔNp63a regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development [J]. Cancer Res,

2003, 63: 2351.

- [9] Westfall MD, Pietenpol JA. P63: molecular complexity in development and cancer [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(6): 857.
- [10] Noszczyk BH, Majewski ST. P63 expression during normal cutaneous wound healing in humans [J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 108(5): 1242.

(收稿日期: 2009-06-05)