

· 临床研究 ·

## 皮肤鳞状细胞癌中 p16、pRb 蛋白表达的临床病理研究

单 葵, 杨 坤, 李 惠

(重庆医科大学附属第一医院皮肤科 400016)

**摘要:**目的 探讨在皮肤鳞状细胞癌中 p16、pRb 蛋白表达与其临床病理特征的关系。方法 应用免疫组织化学 S-P 法检测 42 例皮肤鳞状细胞癌和 10 例正常皮肤组织中 p16、pRb 蛋白的表达,并结合其临床病理特征进行分析。结果 p16、pRb 蛋白在正常皮肤和皮肤鳞状细胞癌中的阳性表达率分别为 90%、59.5% 和 0、45.2%,两者在皮肤鳞状细胞癌中的表达与正常皮肤比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );高分化鳞癌中 p16 的表达显著高于低分化者( $P < 0.05$ ),pRb 的表达与之相反;皮肤鳞状细胞癌伴淋巴结转移者 p16 蛋白的阳性表达明显下调( $P < 0.05$ ),pRb 蛋白阳性表达明显升高( $P < 0.05$ )。结论 p16、pRb 蛋白的异常表达与皮肤鳞状细胞癌的发生、发展相关,两者的检测可作为判断皮肤鳞状细胞癌的恶性程度及预后的重要指标。

**关键词:** p16; pRb; 皮肤鳞癌; 免疫组织化学

**中图分类号:** R730.261

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2010)10-1246-02

### Clinicopathological study of p16 and pRb expression in cutaneous squamous cell carcinoma

SHAN Kui, YANG Kun, LI Hui

(Department of Dermatology, First Affiliated Hospital, Chongqing

University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between the expression of p16, pRb and clinicopathologic features in cutaneous squamous cell carcinoma (SCC). **Methods** Immunohistochemistry (SP) method was applied to detect the expression of p16 and pRb in 10 cases of normal skin and 42 cases of cutaneous SCC. The clinicopathologic features of SCC were analysed. **Results** Expression of p16 and pRb in 10 cases of normal skin and 42 cases of cutaneous SCC were detected in 90%, 59.5% and 0, 45.2% respectively. Significant difference in measures of p16 or pRb expression was identified between the normal skin and cutaneous SCC ( $P < 0.05$ ). The expression of p16 in highly differentiated SCC was higher than that in poorly differentiated SCC ( $P < 0.05$ ), while the expression of pRb decreased ( $P < 0.05$ ). P16 down expression was associated with lymph node metastasis in SCC, while the expression of pRb increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The abnormal expressions of p16 and pRb may related to the development and advance in cutaneous squamous cell carcinoma. The detection of p16 and pRb could be used to predict the malignant degree and prognosis of cutaneous squamous cell carcinoma.

**Key words:** p16; pRb; squamous cell carcinoma; immunohistochemistry

皮肤鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)的发生是一个多因素参与的、多环节的复杂过程,其最终结果是导致不可调控的细胞增殖而诱发肿瘤。一系列的研究发现, p16/Rb 基因在细胞增殖的细胞周期调控中具有决定性意义<sup>[1]</sup>, pRb/p16 通路失调在 SCC 的发病中呈关键作用<sup>[2]</sup>。本文应用免疫组化 S-P 法检测 42 例 SCC 中 p16/Rb 基因编码的 p16、pRb 蛋白的表达,探讨其表达与 SCC 发生、发展的关系。

### 1 材料与方法

**1.1 标本** 42 例 SCC 均取自本院皮肤科 2000~2007 年手术切除的石蜡包埋组织块,其中男 24 例、女 18 例,年龄 35~86 岁,平均 66.3 岁,病程 2 个月至 16 年,平均 16.5 个月,12 例经病理证实有淋巴结转移。皮损分布:头皮 7 例,面部 12 例,颈部 5 例,手背、胸部及腹部各 4 例,下肢及外生殖器各 3 例。42 例 SCC 按 Broders 分级, I~II 级(高分化)28 例, III~IV (低分化)14 例。所有组织病理切片均重新进行 HE 染色(封 2 图 1),并经两位主任医师确诊。另选择外科手术取下的正常皮肤组织 10 例作为正常对照。

**1.2 方法** 采用免疫组化 SP 法对 42 例石蜡标本进行免疫组化染色,实验步骤按产品说明书进行。选用的抗体:p16 抗体(Santa cruz 公司产品,购自北京中杉金桥公司), pRb 抗体(Santa cruz 公司产品,购自天津灏洋公司)。免疫组化试剂盒(ZYMED 公司产品,购自北京中杉金桥公司)。用购买试剂所

附 SCC 阳性组织作为阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。另选择外科手术取下的正常皮肤组织 10 例作为正常对照。

**1.3 结果判定标准** p16 蛋白阳性表达呈胞浆/胞核阳性染色(封 2 图 2), pRb 蛋白阳性表达呈胞浆/胞核阳性染色(封 2 图 3)。依据阳性细胞百分比及着色强度综合计分作半定量分析:0 为 0 分, <25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。着色强度:不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕黄色或棕褐色为 3 分。两者相加,0 分为阴性(-), ≤2 分为弱阳性(+), 3~5 分为阳性(++), 6~7 分为强阳性(+++)。若染色强度不一致,随机选取 5 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,取其平均值。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,两样本间差异的比较用  $\chi^2$  检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 2 结果

**2.1 p16、pRb 蛋白在正常皮肤和 SCC 中的表达** p16 蛋白在正常皮肤中的阳性表达率为 90%(9/10),其中弱阳性表达为 7 例,阳性表达为 2 例,无强阳性表达;p16 在 42 例 SCC 中的阳性表达率为 59.5%(25/42),其中弱阳性表达为 14 例,阳性表达为 7 例,强阳性表达为 4 例;p16 蛋白在正常皮肤和 SCC 中的阳性表达率比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。pRb 蛋白在正常皮肤中全部失表达;pRb 蛋白在 42 例 SCC 中的阳性表达率为 45.2%(19/42),其中弱阳性表达为 9 例,阳性表达为 7

例,强阳性表达为 3 例;pRb 蛋白在正常皮肤和 SCC 中的阳性表达率比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。详见表 1。

**2.2 p16、pRb 蛋白在 SCC 中的表达与其临床病理特征的关系** p16 蛋白的阳性表达率由高分化 SCC 的 75% (21/28) 降至低分化 SCC 的 28.6% (4/14), 两者间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。pRb 蛋白的阳性表达率由高分化 SCC 的 32.1% (9/28) 升至低分化 SCC 的 71.4% (10/14), 两者间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。两者的表达与患者的性别、年龄、发病部位、病程等无显著相关( $P > 0.05$ )。伴淋巴结转移的 SCC 中 p16 蛋白的阳性表达率为 41.7% (5/12), 明显低于无转移者 (80%) ( $P < 0.05$ ); 而 pRb 蛋白在伴淋巴结转移的 SCC 中的阳性表达率为 75% (9/12), 明显高于无转移者 33.3% (10/28) ( $P < 0.05$ )。详见表 2。

表 1 p16、pRb 蛋白在正常皮肤和 SCC 中的表达

项目	n	p16		pRb	
		+	%	+	%
正常皮肤	10	9	90	0	0
SCC	42	25	59.5	19	45.2
$\chi^2/P$ 值		4.80/ $P < 0.05$		5.31/ $P < 0.05$	

表 2 p16、pRb 蛋白在不同分化的 SCC 中的表达

项目	n	p16		pRb	
		+	%	+	%
分化程度					
低分化	14	4	28.6	10	71.4
高分化	28	21	75	9	32.1
$\chi^2/P$ 值		6.53/ $P < 0.05$		7.51/ $P < 0.05$	
淋巴结转移					
有转移	12	5	41.7	9	75
无转移	30	24	80	10	33.3
$\chi^2/P$ 值		5.89/ $P < 0.05$		4.44/ $P < 0.05$	

### 3 讨 论

p16 基因是由 Kamb 等于 1994 年发现的一个直接控制细胞增殖周期的抑癌基因,是最早发现的 Ink4 家族成员,其编码的蛋白质即 p16 蛋白,在细胞周期 G<sub>1</sub> 限制点通过 p16-CyclinD/CDK4(CDK6)-pRb 调控途径发挥作用<sup>[3]</sup>。目前认为,p16 基因与许多肿瘤的发生、发展关系密切,作为细胞周期 G<sub>1</sub> 至 S 期调控分子开关的 p16 基因失活,是继 p53 基因突变之后,人类恶性肿瘤最为常见的分子事件<sup>[4]</sup>。pRb 蛋白由原始抑癌基因 Rb 编码表达,在细胞周期中以磷酸化和去磷酸化的形式决定着转录因子 E2F 的活性,从而控制着细胞的生长和分化。p16 蛋白是细胞周期依赖性激酶(CDK4/CDK6)的特异性抑制蛋白,它可与 CyclinD 竞争结合 CDK4/CDK6,抑制其酶的活性,阻止 CyclinD 与 CDK4/CDK6 形成的复合物对 pRb 的磷酸化,进而阻止 pRb 释放游离的转录因子 E2F,导致细胞周期停滞于 G<sub>1</sub>/S 交界处,对细胞增殖周期起负调节作用。

目前关于 SCC 中 p16 蛋白和 pRb 蛋白阳性表达率的报道高低不一,Kaabipour 等<sup>[5]</sup>在 24 例 SCC 中发现 p16 蛋白全部阳性表达;刘彦群等<sup>[6]</sup>检测 40 例 SCC,有 15 例 p16 蛋白阳性

表达(37.5%);Ai 等<sup>[7]</sup>采用免疫组化方法检测大样本原发性头颈部 SCC,p16 蛋白阳性表达仅为 26% (26/100);而有关 pRb 蛋白阳性表达率的研究波动在 52.5%~83.3%<sup>[6,8]</sup>。作者在研究中发现,p16 在 42 例 SCC 中的阳性表达率为 59.5% (25/42),pRb 蛋白的阳性表达率为 45.2% (19/42),均与正常皮肤组织差异有统计学意义,推测在 SCC 的发病过程中,p16/Rb 基因编码的 p16 蛋白的表达水平降低,使其对 CDK4/CDK6 的抑制作用减弱,引起 CDK4/CDK6 过度表达,随之促进 pRb 磷酸化,失去对 G<sub>1</sub>/S 关卡的调控,使细胞增殖失控而导致肿瘤发生。

本研究结果与刘彦群等<sup>[6]</sup>、魏志平等<sup>[9]</sup>及吴江<sup>[10]</sup>的研究相似,p16 蛋白的阳性表达率由高分化 SCC 的 75% 降至低分化 SCC 的 28.6%,而 pRb 阳性表达率由中高分化 SCC 的 32.1% 升至低分化 SCC 的 71.4%,不同分化的 SCC 之间 p16、pRb 蛋白的表达差异有统计学意义,且 SCC 伴淋巴结转移者 p16 蛋白表达明显下调、pRb 蛋白表达明显升高。这一结果表明,p16 蛋白和 pRb 蛋白的异常表达与 SCC 的恶性程度密切相关。由于样本量较小,作者在研究中尚未发现 p16、pRb 蛋白的表达与患者的性别、年龄、发病部位、病程具有相关性,但上述结果提示,p16 蛋白的失表达,pRb 蛋白的过度表达可能给予低分化 SCC 恶性生长优势,成为加速肿瘤发生、发展进而转移的重要原因,使其表现出与高分化 SCC 不同的恶性生物学行为。近年来的肿瘤研究<sup>[5,7]</sup>还发现,p16 和 pRb 蛋白的表达呈一种倒置关系,即一种表达伴另一种失表达。本研究也有类似发现,这可能与 p16 和 pRb 之间的负反馈网络有关,提示两者之间只要一个失活,就足以破坏其对 G<sub>1</sub> 期的调控导致细胞增殖失调。作者认为,SCC 的发生和发展是多因素、多步骤作用的结果,其中 p16 蛋白和 pRb 蛋白的表达与 SCC 的临床及病理特征密切相关,两者的检测可作为判断皮肤鳞状细胞癌的恶性程度及预后的重要指标。

### 参考文献:

- [1] Mckay JA, Douglas JJ, Ross VE, et al. Analysis of key cell cycle check point proteins in colorectal tumors [J]. J Pathol, 2002, 196: 386.
- [2] Murao K, Kubo Y, Ohtani N, et al. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas; frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways [J]. Br J Dermatol, 2006, 155(5): 999.
- [3] Qin Y, Li B, Tan YS, et al. Polymorphism of p16INK4a gene and rare mutation of p15INK4b gene exon2 in primary hepatocarcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2000, 6: 411.
- [4] Mohanna MA, Manogaran PS, Mukhalafi Z, et al. The tumor suppressor P16(INK4a) gene is a regulator of apoptosis induced by ultraviolet light and cisplatin [J]. Oncogene, 2004, 23(1): 201.
- [5] Kaabipour E, Haupt HM, Stern JB, et al. p16 expression in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin; an immunohistochemical study [J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(1): 69.
- [6] 刘彦群, 魏志平, 张昕博. p16 蛋白和 pRb 蛋白在皮肤鳞状细胞癌中的表达和意义 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2005, 21(8): 595. (下转第 1249 页)

膈疝,即行腹腔探查,发现膈肌裂口长约 7 cm,脾脏已大部疝入胸腔,还纳脾脏并修补膈肌结束手术。术后约 10 h,患者出现胸闷、气促及进行性呼吸困难,左下胸壁叩诊呈鼓音,怀疑胸腔脏器疝入胸腔,经上消化道钡剂造影证实诊断即再次入腹探查,见原膈肌裂口修补处闭合严密,而在其内侧 5 cm 探及另一膈肌裂口,胃底和部分胃体由此疝入胸腔。该患者术后恢复顺利,随访至今。本例 24 h 内历经两次手术,其主要的原因为术者对利器伤可能造成膈肌多处损伤并形成多个裂口的认识不足;亦与第 1 次术中探查不全以及术后胃肠减压不力导致腹压升高有关,应引以为戒。

**3.3 血胸多继发于肋骨骨折、肺挫裂伤等胸内脏器损伤,但亦可由 TRD 所致,诊断过程中要对血胸的性质和来源进行仔细甄别。**本组 1 例患者因闭合性胸腹部损伤 2 h 入院,X 线检查提示右侧胸腔密度增高,右肺压缩 80%,纵隔向左侧移位,胸腔穿刺抽出不凝血液,随即安放闭式引流,1 h 内即有 1 500 mL 血液溢出,患者血压下降出现休克,经快速输血、补液,血液动力学仍不稳定,于入院 4 h 后在全麻下经右侧切口入胸探查,发现膈肌破裂长约 15 cm,肝脏部分疝入胸腔,肝右后叶挫裂伤并有活动性出血,还纳肝脏修补膈肌后迅速关胸,再经右肋缘下切口入腹,探查发现腹腔内积血约 2 000 mL,肝十二指肠韧带带血肿胀,右肾破裂,后腹膜巨大血肿,拟行右肾和肝右后叶切除,术中终因休克不可逆转导致循环衰竭死亡。回顾本例诊治经过,有以下几点教训:(1)对血胸的 X 线检查结果未作认真的辨析和全面的思考;(2)未重视 B 超、CT 及诊断性穿刺的临床诊断价值。患者入院后若同时安排 B 超、CT 或腹穿等辅助检查,应可发现肝脏移位、肾脏破损和腹腔积血而早期确定 TRD 等相关诊断,此外,胸腔引流液或腹腔穿刺液若送实验室检查,应能检查出胆汁或尿液,这对于早期诊断、及时手术尤其是切口的选择具有重大的意义。

**3.4 TRD 均可并发膈疝,膈肌一旦破裂则因为呼吸运动的存在而难于自行愈合,膈疝的形成终究不可避免。**早期的膈疝通常缺乏特征性临床表现,而且容易被一些合并伤的伤情掩盖而延误诊治<sup>[7]</sup>。本组 28 例 TRD 并发膈疝 21 例(75%),术前确诊 18 例,占 85.8%,高于文献报道。作者体会,有下列情况应考虑膈疝的存在:(1)伤侧胸部膨隆,胸闷气促,叩诊呈鼓音或浊音,呼吸音减弱、消失或可闻及肠鸣音;(2)闭合伤患者出现舟状腹;(3)一侧胸痛并向同侧肩部放射;(4)胸部 X 线显示膈肌抬高,膈面模糊,膈上发现气泡或密度增高影,邻肺不张,纵隔移位;(5)胸腔内出现消化道造影剂;(6)胸腔穿刺发现或检出胆汁、尿液、食物残渣等。

TRD 并发膈疝一经诊断即应手术治疗<sup>[8]</sup>。术中一律采用气管插管静脉麻醉,避免因牵张反射诱使或加重心肺功能障碍;回纳疝入脏器时应轻柔缓慢,切忌粗暴拉扯,如果胃腔过度充盈应减压后回纳;疝入脏器如合并破裂、出血、梗阻、绞窄或坏死等,应视具体情况进行妥善的处理;手术前后均应常规置

放闭式引流和胃肠减压,以降低胸、腹腔压力,有利于肺的复张,防止胃肠反流;术后应加强器官功能保护,维持血液动力学稳定,纠正电解质与酸碱平衡失调,使用强力抗生素预防或控制感染,加强基础护理尤其是呼吸道和消化道管理,给予足够的营养支持以纠正贫血、低蛋白血症,尽量减少各种并发症的发生。

**3.5 关于 TRD 手术径路的选择,学界持有不同的见解<sup>[9-11]</sup>。**作者认为:(1)手术径路的选择应视伤情而定,以能够便利、快捷地处理致命伤为首要前提;(2)若无致命伤,宜首选腹部切口,该切口创伤较小,可取平卧位,对呼吸循环的影响和干扰不大,同时,既可有效处理腹内脏器的损伤,又可全面探查双侧膈肌的情况,其优点不可替代;(3)经腹术中若遇某些特殊情况如肝脏膈面损伤、疝入脏器难以回纳等,宜另做剖胸切口加以处理,而不主张采用胸腹联合切口,因为该切口创伤较大,除降低胸廓的稳定性之外,在切开膈肌时,还可能损伤膈肌的运动神经和供血血管,不利于膈肌修补术后的愈合以及生理功能的恢复;(4)对于陈旧性膈疝,则应采用经胸切口,既有较好的术野,又便于分离粘连。

#### 参考文献:

- [1] 张晓明,殷桂林,张殿堂,等. 48 例创伤性膈肌破裂的诊治体会[J]. 创伤外科杂志,2003,5(5):328.
- [2] 黄孝迈. 现代外科学[M]. 北京:人民军医出版社,1997:346.
- [3] 张德全,刘勇军,袁世全,等. 严重胸部损伤的救治特点[J]. 重庆医学,2005,34(12):1861.
- [4] 陈文庆. 现代胸腹结合部外科学[M]. 北京:人民军医出版社,1996:327.
- [5] 刘晓林,陈瑜,曾江潮,等. 脾损伤非手术治疗病例遴选原则和诊断方式选择[J]. 医学信息杂志,2009,22(7):1232.
- [6] 崔岩恒. 创伤性膈疝的诊断与治疗[J]. 中华胸心外科杂志,1993,9(1):63.
- [7] 徐文怀,陈如清. 危重急症的诊断与治疗[M]. 北京:中国科技出版社,1997:429.
- [8] 吴孟超,吴在德. 黄家驷外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:2118.
- [9] 葛明建,李良彬,温剑虎,等. 26 例创伤性膈肌破裂的临床诊治[J]. 创伤外科杂志,2001,3(3):177.
- [10] 郑镇木. 创伤性膈疝的诊断和治疗[J]. 中国实用外科杂志,1999,19(7):406.
- [11] 曾会昌,杨康,杨军民,等. 胸部穿透伤(附 320 例报告)[J]. 重庆医学,2002,31(5):364.

(收稿日期:2009-08-25)

(上接第 1247 页)

- [7] Ai L, Stephenson KK, Ling W, et al. The p16(CDKN2a/INK4a) tumor suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases[J]. Mod Pathol,2003,16(9):944.
- [8] 武钦学,吴志华,唐慰萍. P16, p15 及 Rb 蛋白在皮肤鳞状细胞癌中的表达[J]. 岭南皮肤病科杂志,2004,11(2):

102.

- [9] 魏志平,张昕博,刘彦群. 皮肤鳞状细胞癌中 p16 蛋白、细胞周期蛋白 D1 的表达及其意义[J]. 临床皮肤科杂志,2005,34(5):291.
- [10] 吴江. 某些表皮肿瘤中 CDK4、p16 表达及其与临床病理特征的关系[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2005,21(5):351.

(收稿日期:2009-09-10 修回日期:2009-10-30)