

p16 基因在膀胱肿瘤细胞凋亡中的作用

魏少忠¹ 张克亮¹ 陈继红³ 谈 凯¹ 李长青² 程志斌²

摘 要 :目的 探讨 p16 基因与膀胱肿瘤细胞凋亡的关系。方法 应用 SABC 免疫组织化学法检测了 51 例膀胱移行细胞癌 p16 基因的表达 ,同时用流式细胞仪检测其细胞凋亡情况。结果 p16 阳性表达率为 47.1%(24/51) ,平均凋亡肿瘤细胞百分比为 1.5% ,p16 阳性表达的肿瘤组织凋亡细胞百分比>1.5% 的发生率为 62.5% ,p16 阴性表达的肿瘤组织凋亡细胞百分比>1.5% 的发生率为 25.9% ,两者比较有显著性差异($P<0.01$)。结论 p16 基因的表达与膀胱肿瘤细胞凋亡有关 ,p16 基因可能参与膀胱肿瘤细胞凋亡的正向调节作用。

关键词 p16 基因 膀胱肿瘤 流式细胞仪

中图分类号 :R737.14 ; Q786 文献标识码 :A 文章编号 :1000 - 8578(2000)02 - 0097 - 02

近年来 ,有关 p16 基因在人类肿瘤中的表达的研究 ,文献报导较多 ,同时 ,肿瘤组织中的细胞凋亡现象也已受到广泛重视 ,但有关 p16 基因在肿瘤组织细胞凋亡中的调控作用 ,文献报导甚少。我们对 51 例人膀胱移行细胞癌组织用免疫组织化学法检测了 p16 基因的表达 ,同时用流式细胞仪检测其细胞凋亡情况 ,兹报道如下。

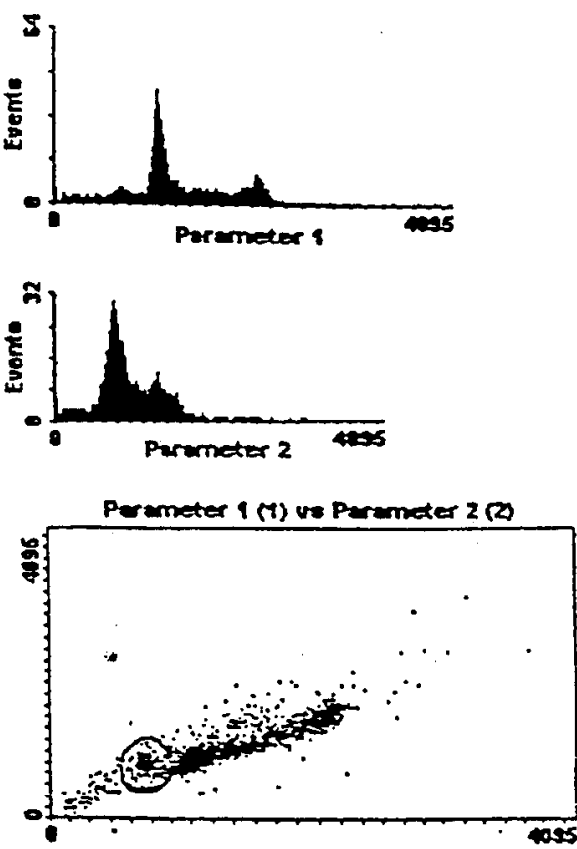
1 材料与方法

1.1 病理标本 来自我院 1989 ~ 1996 年膀胱癌患者手术切除标本 ,经病理证实 ,选择 51 例膀胱移行细胞癌作为研究对象。病理分级按 WHO 方法 ,Ⅰ级 8 例 ,Ⅱ级 17 例 ,Ⅲ级 26 例 ,临床分期按 UICC.TNM 标准 ,分为浅表性肿瘤 T₁₅ ~ T₁ 组共 16 例 ,浸润性肿瘤 T₂ ~ T₄ 组共 35 例。均切取 5 张 5um 厚的蜡片装入试管内 ,为流式细胞仪检测凋亡时备用 ,同时继续切 5um 厚切片 2 张 ,1 张行 HE 染色复查诊断 ,另 1 张行免疫组织化学研究。

1.2 主要仪器与试剂 实验所用流式细胞仪为德国 Partec 公司生产 ,检测细胞凋亡的双荧光染料(DNA、蛋白质染色)由该公司赠送 ,兔抗人 p16 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司 ,SABC 免疫组织化学染色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

1.3 流式细胞检测 试管中的石蜡包埋切片脱蜡后制成单细胞悬液 ,加入对 DNA、蛋白质染色的双荧光染料 ,然后在鞘液的约束下 ,让已被染色的单细胞悬液从流动室射出 ,当光束照到细胞颗粒上时 ,则会产生两种不同的荧光信号 ,分别代表着细胞内的 DNA 和蛋白质 ,这些信息被记录下来并通过计算机处理 ,从而获得细胞的双参数分析结果 ,可以明显区分凋亡

细胞(附图 1) ,并可计算它在整个细胞中所占的百分比。



附图 1 bladder cancer auto-apoptosis(1.71%)

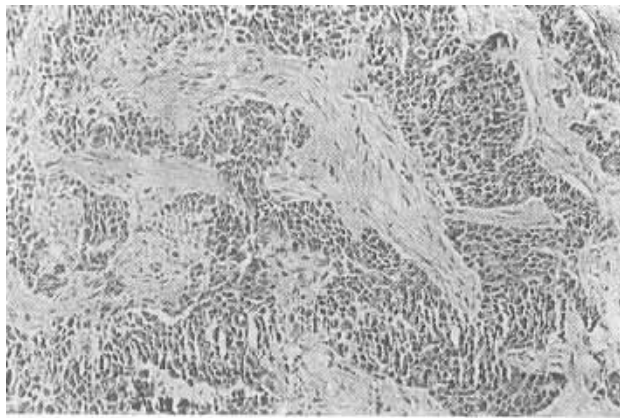
1.4 免疫组织化学染色(SABC 法) 石蜡切片经二甲苯脱蜡 ,系列酒精浸后充分水洗 ,3% H₂O₂/PBS 5 分钟灭活内源性酶 ,1:50 正常血清封闭非特异性背景 20 分钟。依次加入一抗(兔抗人 p16 多克隆抗体 1:100 4℃过夜) ,二抗(生物素化羊抗兔 IgG1:100 20 分钟) ,SABC 30 分钟 ,上述各步间均以 PBS 缓冲液振荡洗三次 ,5 分钟/次 ,DAB 显色 ,苏木素复染 ,常规脱水 ,透明、封片。实验中以乳腺癌阳性切片为阳性对照 ,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

收稿日期 :1999 - 05 - 13 ,修回日期 :1999 - 06 - 01
作者单位 :1. 430079 武汉 ,湖北省肿瘤医院腹泌外科 ,
2. 放疗科 3. 湖北医科大学附属一医院

1.5 统计学方法采用 χ^2 检验

2 结果

51 例膀胱移行细胞癌 p16 阳性表达的有 24 例,阳性率为 47.1%(24/51)。阳性显示为棕黄色,大部分见于细胞浆中(附图 2),极少数位于胞核。



附图 2 p16 在膀胱移行细胞癌中的阳性表达

平均凋亡细胞百分比为 1.5%,p16 阳性表达的肿瘤组织凋亡细胞百分比 >1.5% 的有 15 例,占 62.5%(15/24),p16 阴性表达的肿瘤组织凋亡细胞百分比 >1.5% 的仅有 7 例,占 25.9%(7/27),两者比较有显著性差异($P<0.01$)。

3 讨论

现已公认,抑癌基因通过维持细胞周期调控系统和信号传递系统的正常运作实现抑癌作用。位于人类第 9 号染色体短臂上的 p16 抑癌基因编码产生细胞周期素依赖激酶 4(CDK4)的抑制蛋白,即 p16 蛋白,它通过与细胞周期素 D(CyclinD)竞争结合 CDK4 而抑制 CDK4 的正向调节作用,使细胞终止于 G₁ 期^[1]。近来有报道显示,p16 基因与 p53 基因和/或 Rb 基因一起在细胞分化周期水平上参与细胞凋亡的发生^[2]。Hartwell 等在研究中发现,p16 蛋白与 WAF-1 和 p53 基因一起参与了细胞增殖调节,使细胞终止于 G₁ 期关卡,进而诱导细胞凋亡^[3~5]。本实验通过对 p16 蛋白阳性表达及阴性表达组内凋亡肿

瘤细胞百分比的比较发现,p16 阳性表达的肿瘤组织中凋亡细胞百分比在 1.5% 以上者占 62.5%,而 p16 阴性表达组内凋亡细胞百分比在 1.5% 以上者仅占 25.9%,二者比较 p16 阳性组内凋亡细胞比例明显高于 p16 阴性组($P<0.01$)。提示 p16 基因与膀胱肿瘤细胞凋亡过程有关,可能通过对 CDK4 的抑制促进凋亡发生,进而可以推测 p16 阳性者预后好于 p16 阴性者。

细胞凋亡是生物组织中的单个细胞受其内在基因编程的调节,通过主动的生化过程而自杀死亡的现象。细胞凋亡障碍不仅参与恶性肿瘤的发生,而且影响其生物学行为^[6]。致癌因素通过抑制细胞凋亡导致肿瘤发生,而肿瘤细胞中的凋亡现象可以认为是机体对抗肿瘤的主动努力,几乎在所有未经治疗的恶性肿瘤均可发现凋亡现象。我们的研究显示,51 例膀胱移行细胞癌组织中都存在细胞凋亡现象,只是凋亡细胞所占的比例有所不同。

然而,迄今为止,真正的凋亡基因实际上仍未发现,从细胞凋亡的形态学及生化学改变的复杂性这一点上考虑,推测凋亡可能由若干个基因(群)共同完成。我们的实验仅研究了 p16 基因与膀胱肿瘤细胞凋亡的关系,其它可能与膀胱肿瘤凋亡相关的调控基因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Kamb A, Crais, Fedhaus JW, et al. A cell cycle regulator potentially invovded in genesis of manny tumor types[J]. science, 1994, 15 264(5151): 436~440.
- [2] Tam sw, shay jw, pagano M, Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16 INK4[J]. cancer Res, 1994, 15 5816~5820.
- [3] Hartweel LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266 :1821.
- [4] Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53[J]. Biochen Biophysica Acta, 1993, 1155 :181.
- [5] Lowe sw, Scgmitt EW, Smith SW, et al. p53 is required for raliation-induced apoptosis in mouse thymocytes[J]. Nature, 1993, 362(6423): 847~849.
- [6] Williams GT. Programmed cell death :apoptosis and oncogenesis[J]. Cell, 1991, 65 :1097.

Effect of p16 Gene on the Apoptosis of Bladder Carcinoma Cells

WEI Shao-zhong, ZHANG Ke-liang, LI Chang-qin et al

Department of abdominal and Urologic surgery Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China

Abstract Objective In order to investigate the effect of p16 gene on bladder carcinoma apoptosis. **Methods** 51 cases bladder carcinomas were studied by immunohistochemical (IHC) technique, while flow cytometry were used for apoptosis test. **Result** The positive rate of p16 was 47.1%(24/51). The average percentage of apoptosis cells were 1.5%, the percentage of apoptosis cells in p16 positive tumor tissue was 62.5% (more than 1.5%), the percentage of apoptosis cells in p16 negative tumor tissue were 25.9% (more than 1.5%), there were significant difference between positive and negative groups. **Conclusion** The expression of p16 was related with bladder tumor cell apoptosis, p16 gene may take part in positive-regulation of bladder tumour cell apoptosis.

Key words p16 gene; Bladder tumor; Flow cytometry