

# p19<sup>ARF</sup> 和 p16<sup>INK4a</sup> 在人骨肉瘤中表达的比较研究

邓超, 邵增务

The Differences on the Expression of p19<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4a</sup> in Human Osteosarcoma

DENG Chao<sup>1</sup>, SHAO Zeng-wu<sup>2</sup>

Department of Orthopaedics Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430079, China

**Abstract :Objective** To elucidate the differences in tumor genesis, progression on the expression of p19<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4a</sup> in human osteosarcoma. **Methods** Paraffin embedded surgical specimens from 37 cases of human osteosarcoma are used to detect p19<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4a</sup> proteins by monoclonal indirect immunofluorescence method. **Results** p16<sup>INK4a</sup> protein was detected in 21 of 37(56.8%) cases in human osteosarcoma, p19<sup>ARF</sup> protein was detected in 15 of 37(40.5%) cases in human osteosarcoma. No significant correlate expression of p19<sup>ARF</sup> proteins and p16<sup>INK4a</sup> protein was found. No obvious correlations were found between the expression of p16 and p19 and the tumor staging, grading, major vascular involvement and lung metastasis in human osteosarcoma. **Conclusion** p16 and p19 downregulation seem to be an important event in tumor genesis and progression in human osteosarcoma. There was no relationship between these two inhibitory genes.

**Key words :**Human osteosarcoma; p16<sup>INK4a</sup>; p19<sup>ARF</sup>; Cyclin-dependent kinase inhibitors(CKIs)

**摘要:**目的 比较 p16<sup>INK4a</sup> 和 p19<sup>ARF</sup> 两种抑癌基因在可切除的人骨肉瘤组织中的表达形式,探讨其在人骨肉瘤的发生、发展中的意义。方法 人骨肉瘤切除石蜡标本 37 例,用单克隆抗体间接免疫荧光法同时测定肿瘤组织的 p16、p19 蛋白的表达。结果 p16<sup>INK4a</sup> 表达率 56.8% (21/37), p19<sup>ARF</sup> 表达率 40.5% (15/37); p16 与 p19 表达无相关性;p16 和 p19 与骨肉瘤的外科分期、病理分级、血管浸润和肺部转移均无显著相关。结论 p16、p19 的下调都可能是骨肉瘤发生发展的重要原因之一,未发现这两种抑癌基因之间的表达有显著关系。

**关键词:**人骨肉瘤; p16<sup>INK4a</sup>; p19<sup>ARF</sup>; 周期蛋白依赖激酶抑制剂

中图分类号:R738.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)12-0887-03

## 0 引言

p16<sup>INK4a</sup> (以下简称 p16) 基因改变在人类恶性肿瘤中普遍存在<sup>[1,2]</sup>,包括人骨肉瘤<sup>[3]</sup>。p16 基因所在的 IN K4a 位点还编码一种 p19<sup>ARF</sup> (以下简称 p19) 基因,它是 p53 的上游基因,也是一种重要的抑癌基因<sup>[4]</sup>。迄今尚未见有关 p19 在人骨肉瘤组织中表达情况的报道。本文通过检测人类可切除性骨肉瘤组织中 p16 和 p19 蛋白的表达形式,探讨这两种抑癌基因在骨肉瘤中的意义。

## 1 资料与方法

1.1 对象与标本 骨肉瘤标本 37 例,同济医院 2001 年 1 月~2004 年 6 月手术切除并石蜡包埋标本 37 例,男性 21 例,女性 16 例,年龄 12~57 岁。

标本经甲醛固定,常规石蜡包埋,切片厚度 5 μm。所有病例术前均未接受过放化疗。

1.2 实验方法与主要试剂 应用间接免疫荧光法检测组织中 p19 和 p16 的表达:5 μm 连续切片,脱脂至水;每个标本切两张,分别加入 25 μl 的 p19 和 p16 的一抗,完全覆盖住玻片上的组织,室温孵育 60 min;用洗涤液洗 3 次,各 5 min。加入标记 FITC 标记的抗体(二抗)25 μl,室温孵育 20 min。用固定液封片。观察前空气干燥 30 min。

所用两种一抗分别为鼠抗人 p19 单克隆抗体(武汉晶美公司),工作浓度 1:100;鼠抗人 p16 单克隆抗体(武汉晶美公司),工作浓度 1:100;二抗为 FITC 标记酶羊抗鼠 IgG(武汉晶美公司),工作浓度 1:100。

1.3 结果判定 荧光显微镜下观察染色切片,胞浆或胞膜出现绿色颗粒为阳性细胞。每张切片随机观察 5 个高倍视野按阳性细胞所占比例分为“-”:细胞未染色;“+”:阳性细胞 < 50%;“++”:阳性细胞 > 50%。

收稿日期:2005-10-26;修回日期:2005-11-09

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科

作者简介:邓超(1980-),男,硕士,主要从事脊柱、骨肿瘤的研究

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件分析,  $P < 0.05$  为有显著差异。

## 2 结果

2.1 p16 和 p19 在骨肉瘤中的表达 骨肉瘤中的 p16 表达率 56.8% (21/37); 骨肉瘤中的 p19 表达率 40.5% (15/37)。在骨肉瘤中, p16 和 p19 的表达无明显相关性, 同时表达 p16 和 p19 的有 5 例, 见表 1。

表 1 骨肉瘤分型与 p16 和 p19 表达的关系

分型	例数	p16			p19		
		- - -	+	++	- - -	+	++
骨母细胞型	16	5	8	3	9	5	2
软骨母细胞型	12	5	5	2	8	3	1
纤维母细胞型	9	6	3	0	5	3	1
合计	37	16	16	5	22	11	4

从表达形式看, p16 在骨肉瘤中有胞浆型 12 例和胞膜型 9 例。p19 在骨肉瘤中的表达有胞膜型 8 例, 胞浆型 3 例和核型 4 例。

2.2 p16 和 p19 的表达阳性者, 年龄集中于 10~20 岁; 男性阳性比例高于女性尤以 p16 较明显。

2.3 p16 和 p19 的表达与骨肉瘤病理学指标的关系, 见表 2。

表 2 骨肉瘤病理学指标与 p16 和 p19 阳性率

肿瘤分期	例数	p16		P	p19		P
		阳性数	百分率 (%)		阳性数	百分率 (%)	
<b>肿瘤大小(cm)</b>							
4	20	11	55		8	40	
< 4	12	6	50		5	41.7	
<b>外科分期</b>							
B	19	9	47.3		5	26.3	
< B	13	8	61.5		8	61.5	
<b>肿瘤分化程度</b>							
高分化	9	6	66.7		5	55.6	
中分化	15	8	53.3		7	46.7	
低分化	8	3	37.5	< 0.05 *	1	12.5	< 0.05 *
<b>血管侵润</b>							
有	19	10	52.6		8	42.1	
无	13	7	53.8		5	38.5	
<b>肺部转移</b>							
阳性	5	2	40		3	60	
阴性	27	15	55.6	> 0.05	10	37	> 0.05

注: 37 例病史资料完整, 32 例有肿瘤大小及分化的病理资料; \* 高分化 vs 中、低分化

## 3 讨论

骨肉瘤是运动系统常见的恶性肿瘤, 可发生于

各种年龄, 其中 75% 发生于青少年, 病情凶险, 预后较差, 多数病例在原发灶较小的早期即发生广泛的肺转移, 越来越多的研究结果表明, 骨肉瘤的恶性表型及预后与癌基因的过量表达和抑癌基因缺失密切相关<sup>[5]</sup>。

p16 基因编码的 p16 蛋白为细胞周期的一种负性调节因子, 其缺失为肿瘤的侵润和转移提供了选择性的生长优势。p16 蛋白可与细胞周期素 D 竞争结合细胞周期依赖性激酶 (CD K4), 使 CD K4 失活, 从而阻止 Rb 的磷酸化, 去磷酸化的 Rb 以活性形式结合 E2F 及 ATF2 等转录因子, 阻止细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期<sup>[6]</sup>。p19 是近年被注意到的一种潜在重要的抑癌基因, 它与 p16 虽然位于同一个基因位点, 有一个外显子相同, 但阅读框架不同, 因而抑癌机制不同, p16 通过 pRb 起作用, 而 p19 则通过上游基因 p53 起作用。有人发现人类 p19<sup>ARF</sup> 通过结合 MDM2 并加速其衰解, 从而加强 p53 蛋白的稳定性, 引起 p53 在体内的积聚<sup>[7,8]</sup>。敲除 p19 而保留 p16 表达的细胞, 迅速产生各种肿瘤, 提示在某些肿瘤 p19 才是真正的肿瘤抑制蛋白。缺乏 p19 的小鼠早年就会发生肿瘤<sup>[9]</sup>。已发现在人 T 细胞白血病、非小细胞和口腔磷癌有 p19 的下调, 而在骨肉瘤尚无报道。

本实验用免疫荧光间接法同时检测在同一骨肉瘤组织中 p16 和 p19 这两种既相互联系, 又完全不同的抑癌基因的表达。我们发现在骨肉瘤中, 两者表达率都比较高 (56.8% 和 40.5%), 但两者间无明显相关性, 同时表达 p16 和 p19 的只有 5 例。

我们的研究发现, p16 和 p19 的表达率与骨肉瘤的病理分期负相关, 提示 p16 及 p19 的异常可能与骨肉瘤的进展有关 (见表 2)。两者虽然在有肺转移的病理切片中的表达率比较高, 但由于例数不多, 统计学上无显著意义。

综上所述, 我们的研究证实 p16 及 p19 的下调和骨肉瘤的发生发展有密切联系, 并且这两种抑癌基因之间的表达无显著相关。目前认为肿瘤的发生机制是多基因多步骤的, 1995 年 cyclin D1-CD K4-p16-PRB Path way 理论<sup>[10]</sup> 的提出揭开了多因素研究的序幕, 今后骨肿瘤病因学研究也将沿此方向深入下去。本实验还证实 p16<sup>INK4a</sup> 和 p19<sup>ARF</sup> 在骨肉瘤中表达途径不同, 为进一步研究使用多基因联合治疗骨肉瘤提供了实验基础。

## 参考文献:

- [1] Wong SC, Chan JK, Lee KC, et al. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in inva-

- sive ductal carcinoma of the breast [J]. J Pathol , 2001 , 194 (1) :35-42.
- [2] Esteller M , Gonzalez S , Risques RA , et al. K- ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer[J]. J Clin Oncol , 2001 ,19 (2) :299-304.
- [3] 杨俊涛,孙运才.骨肉瘤中 p16 抑癌基因的表达及意义[J].中华骨科杂志,1998,5:288.
- [4] Molofsky AV ,He S,Bydon M , et al. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways[J]. Genes Dev , 2005 ,19 (12) :1432-1437.
- [5] Weinborg RA. Oncogene,antioncogene and the molecular basis of multistep carcinogenesis[J]. Cancer Res ,1989 ,49 (6) :3713-3719.
- [6] Liggett WH Jr , Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer[J]. J Clin Oncol , 1998 ,16(3) :1197-1206.
- [7] Martoriati A ,Doumont G ,Alcalay M , et al. Dapk1 , encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint , is a transcription target of p53[J]. Oncogene , 2005 , 24 (8) :1461-1466.
- [8] Pomerantz J ,Schreiber-Agus N ,Liegeois NJ , et al. The Ink4a tumor suppressor gene product , p19<sup>ARF</sup> , interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53[J]. Cell , 1998 , 92 (6) :713-723.
- [9] Sarkar A ,Vergilis I ,Sharpless NE , et al. Impaired processing of DNA photoproducts and ultraviolet hypermutability with loss of p16IN K4a or p19ARF[J]. J Natl Cancer Inst , 2004 , 96 (23) :1790-1793.
- [10] Lukas J ,A ugaard L ,Struass M. Oncogenic aberrations of p16/ IN K4/ CDKN 2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control[J]. J Cancer Res , 1995 , 55 : 4818- 4823.

[编辑:张 麟]

## · 简讯 ·

## 欢迎订阅 2007 年《中国组织工程研究与临床康复》(原《中国临床康复》杂志)

本刊 2007 年更名,但仍是美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)、俄罗斯《文摘杂志》、波兰《哥白尼索引》(IC)、中国科技论文统计源期刊、中国中文(临床医学类)核心期刊、《中国高影响力医学期刊论文计量报告》(第 1 版)收录期刊、中国科技核心期刊、中国科技期刊精品数据库等收录期刊。更名是为了更快的实现国际化的目标。

本刊 2005 年所发表的文章,被美国《化学文摘》单篇收录率 > 50 %。因此,作者在本刊发稿可有较大机会实现单篇文章被国际数据库收录的愿望,不仅体现了该篇稿件的学术价值,同时在作者晋升、评聘、课题评奖中会起到重要的作用。

2007 年本刊对发稿重点提出新的要求:为进一步提高学术质量, 在生物材料研究方面重点突出:组织工程支架材料、组织工程材料学特征及人工器官和医学植介入体的材料学与人体生物相容性等问题。在组织构建研究方面重点突出:各组织器官构建、组织工程生物活性因子、组织工程分子生物学、组织工程实验技术方法等。在种子细胞研究方面重点突出:干细胞生物学特征、干细胞移植、干细胞因子、干细胞实验技术方法、干细胞临床应用相关基础实验。在器官移植研究方面重点突出:大器官移植、组织移植、细胞移植,并关注异种异体移植及医学植介入体植入、人工器官植入的研究进展。在康复工程研究方面重点突出:康复工程理论、康复工程临床应用、生物医学工程学、生物医学电子学、生物医学光子学、生物医学成像及图像处理、计算机及脑的生物信息处理及组织器官生物力学及三维有限元分析。在临床康复研究方面重点突出:康复预防、康复技术、心理康复、运动医学、康复评估、康复理论。

欢迎上述研究的英文稿件和应用中医药方法研究的相关稿件投稿。

本刊出版周期:一般稿件修回后 6 个月出版,“绿色特快通道”承诺修回稿件 3 个月内出版。

通联方式:

咨询电邮: CRTER\_szb200 @163 . com

电 话:024-23389106 024-23384352

传 真:024-23381085

投稿电邮:kf23385083 @sina . com kf22838105 @sina . com

国内订阅邮发代号:8-584; 本社订阅:辽宁省沈阳 1200 邮政信箱 邮编:110004;12 元/册。更多信息详见 www.zglckf . com