

# p14ARF 基因在大肠癌中的表达及意义

刘 辉, 罗丽明, 倪国文, 李 华, 郭建国, 周中银

刘辉, 罗丽明, 倪国文, 李华, 郭建国, 武汉市普仁医院消化内科  
湖北省武汉市 430081  
周中银, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
通讯作者: 刘辉, 430081, 湖北省武汉市青山区红卫路本溪街1号, 武汉市  
普仁医院消化内科. whzzy@tom.com  
电话: 027-68868236  
收稿日期: 2005-03-18 接受日期: 2005-04-13

## 摘要

**目的:** 探讨 p14ARF 基因在大肠癌中的表达及其生物学意义。

**方法:** 应用免疫组织化学(S-P)法和 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术原位观察 60 例大肠癌患者的癌组织、癌旁组织和正常组织中 p14ARF 基因蛋白的表达和细胞凋亡。

**结果:** 癌组织 p14ARF 基因的阳性表达相对含量(PU)( $9.57 \pm 1.03$ )明显低于癌旁( $28.17 \pm 5.26$ ,  $t = 2.51$ ,  $P = 0.02 < 0.05$ )和正常组织( $43.76 \pm 7.14$ ,  $t = 3.61$ ,  $P = 0.006 < 0.01$ );癌旁凋亡指数(AI)( $8.51 \pm 2.63\%$ )高于癌组织凋亡指数(AI)( $5.65 \pm 1.76\%$ ,  $t = 2.18$ ,  $P = 0.04 < 0.05$ );p14ARF 基因蛋白的阳性表达按患者的性别、年龄、肿瘤大小分组比较各组间无明显区别;按癌组织的分化程度、淋巴结转移和 Dukes 分期比较, 低分化组、有淋巴结转移组和 Dukes C+D 期组的 p14ARF 基因蛋白表达分别低于高分化组( $7.93 \pm 1.89$  vs  $12.76 \pm 2.28$ ,  $t = 2.36$ ,  $P = 0.03 < 0.05$ )、无淋巴结转移组( $7.21 \pm 1.95$  vs  $13.12 \pm 2.33$ ,  $t = 2.34$ ,  $P = 0.03 < 0.05$ )和 Dukes A+B 期组( $7.87 \pm 1.18$  vs  $12.03 \pm 2.15$ ,  $t = 2.36$ ,  $P = 0.03 < 0.05$ )。

**结论:** p14ARF 基因在大肠癌组织中表达下调, 从而抑制大肠癌的细胞凋亡, 这可能是大肠癌发生、发展的机制之一; p14ARF 基因的表达下调与大肠癌的恶性生物学行为有关。

刘辉, 罗丽明, 倪国文, 李华, 郭建国, 周中银. p14ARF 基因在大肠癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1597-1599  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1597.asp>

## 0 引言

INK4a/ARF 基因位于人第9号染色体短臂2区1带(9p21), p14ARF 是 INK4a 的可变读框基因, 由三个外显子 E1 $\beta$ 、E2、E3 和两个内含子组成, 三个外显子共同编码分子质量为 14 kd 的蛋白(即 p14ARF), 其由 133 个氨基酸组成, 能诱导细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 或 G<sub>2</sub> 期, 是第一个直接调控细胞周期并抑制细胞分裂的新型抑癌基因<sup>[1-2]</sup>. p14ARF 是一种重要的凋亡调控基因, 其独特的结构和生物学功能在肿瘤分子生物学研究中日益受到重视. 大肠癌是常见的严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均较高, 尤其是近年, 由于人们的饮食结构和生活方式的改

变, 其发病率正在逐年增加<sup>[3-4]</sup>. 细胞凋亡受到抑制是大肠肿瘤形成的重要原因之一<sup>[5]</sup>, 而 p14ARF 在大肠癌中的表达及意义尚不完全清楚. 我们通过检测 p14ARF 蛋白在大肠癌中的表达, 观察其与细胞凋亡的关系, 探讨 p14ARF 基因的表达在大肠癌发生、发展和预后中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 所有标本为武汉普仁医院和湖北省肿瘤医院 2000-2004 年手术切除大肠癌石蜡标本, 共 60 例, 其中男性 32 例, 女性 28 例, 年龄 37-75 岁, 平均  $58 \pm 7.8$  岁. 所有病例术前均未行放疗和化疗, 并由两位病理医生确诊. 每例取癌组织, 距癌 5 cm(癌旁)组织, 距癌 10 cm(正常)组织各一块, 中性甲醛(40 g/L)固定, 常规脱水, 石蜡包埋和制备 4  $\mu$ m 厚连续切片(切片事先用多聚赖氨酸处理), 切片分别进行 HE 染色作组织病理学、免疫组织化学研究和 TUNEL 染色。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色** 切片脱蜡至水, 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 胰酶消化, 采用 S-P 染色法, 切片置于抗原修复液(0.01 mol/L 柠檬酸盐)中微波抗原修复 12 min, 100 mL/L 羊血清封闭, 加入鼠抗人 p14ARF 单克隆抗体(抗体购自美国 Neomarkers 公司), 4℃ 过夜; 免疫组化染色均按 S-P 试剂盒推荐方法进行。

**1.2.2 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术(TUNEL)法染色** 按原位凋亡检测试剂盒说明书的步骤检测凋亡细胞(试剂盒购自德国 Roche 公司)。

**1.2.3 结果判断** (1)免疫组织化学定量: 采用 HIPAS-2000 型计算机图像分析系统(同济千屏影像工程公司产品), 摄取放大 400 倍的图像, 输入图像分析系统. 对图像进行灰度变换, 使染色阳性面积与背景分开, 进行自动检测. 以测量窗口为固定面积, 对阳性染色及背景的灰度级和面积进行测试, 参照申氏方法<sup>[6]</sup>计算阳性单位(positive unit, PU), PU 代表阳性染色的相对含量. 每张切片选 5 个视野, 求 PU 均值. (2)细胞凋亡判断及评价标准: 以细胞核呈棕黄色染色者为凋亡细胞. 在 400 倍高倍视野下, 每例标本随机选取 5 个癌区, 计算凋亡细胞在全部癌细胞中所占的比例, 即凋亡指数(apoptosis index, AI)。

**统计学处理** 应用 SPSS10.0 软件统计包对数据进行处理, 计量资料以 mean  $\pm$  SD 表示, 采用  $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 大肠癌、癌旁和正常组织 p14ARF 基因蛋白表达和凋**

亡指数 p14ARF蛋白的阳性表达主要为胞质和胞膜着色,部分胞核着色,为浅黄和棕黄色,染色均匀.阳性细胞多呈局灶样分布,少数呈散在分布.取阳性细胞局灶样分布处作图像分析测PU值. p14ARF在大肠癌旁和大肠癌中的表达(PU值)均明显低于正常结肠组织,二者之间差异均有显著性( $P<0.05$ ),在癌旁和癌组织中的表达差异亦有显著性( $P<0.05$ ),癌组织中的表达(PU值)低于癌旁组织.免疫组织化学定量分析见表1.凋亡阳性细胞在组织中为单个散在或簇状分布,核物质呈现棕黄色.大肠正常黏膜凋亡细胞数量很少,多位于表层上皮中.癌组织和癌旁组织呈散在分布.癌旁和癌组织凋亡指数(AI)分别为  $8.51 \pm 2.63\%$  和  $5.65 \pm 1.76\%$ ,二者比较差异有显著性( $P<0.05$ ).

表1 大肠癌、癌旁、正常组织中p14ARF蛋白表达、AI的比较(mean  $\pm$  SD)

项目	癌组织	癌旁组织	正常组织
p14ARF(PU)	$9.57 \pm 1.03^a$	$28.17 \pm 5.26$	$43.76 \pm 7.14$
AI(%)	$5.65 \pm 1.76^a$	$8.51 \pm 2.63$	$1.75 \pm 0.49$

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 癌旁组织和正常组织.

2.2 p14ARF蛋白表达与大肠癌临床病理参数的关系(表2) p14ARF蛋白的阳性表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小、无相关性( $P>0.05$ ),与癌组织的分化程度、淋巴结转移和Dukes分期相关( $P<0.05$ ),低分化组、有淋巴结转移和Dukes C/D期的p14ARF蛋白表达低于相对应组别( $P<0.05$ ).

表2 大肠癌 p14ARF 蛋白表达与病理参数的关系(mean  $\pm$  SD)

临床病理参数	组别	n	p14ARF PU
性别	男	32	$9.95 \pm 1.87$
	女	28	$8.96 \pm 1.06$
年龄	<55	20	$8.92 \pm 1.16$
	$\geq 55$	40	$10.36 \pm 1.37$
肿瘤长径(cm)	<3	26	$9.15 \pm 1.29$
	$\geq 3$	34	$9.78 \pm 1.16$
组织学类型	高中分化管理腺癌	35	$12.76 \pm 2.28^a$
	低分化管理腺癌	25	$7.93 \pm 1.89$
淋巴结转移	无	33	$13.12 \pm 2.33^c$
	有	27	$7.21 \pm 1.95$
Dukes 分期	A + B	27	$12.03 \pm 2.15^c$
	C + D	33	$7.87 \pm 1.18$

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 低分化管理腺癌组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs 淋巴结转移组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs C + D组.

### 3 讨论

大肠癌的发生发展是一个多基因参与,多步骤的复杂过程.分子生物学研究表明,肿瘤是一种癌基因的激活和抑

癌基因失活的基因病<sup>[7]</sup>.在人类肿瘤细胞中,p53-mdm2-p14ARF这条分子通路的作用日益受到重视<sup>[8]</sup>.p53通路在调控人类肿瘤发生的过程中有两种情况:细胞凋亡和细胞周期阻滞于G<sub>1</sub>期和(或)G<sub>2</sub>期<sup>[9-10]</sup>.p53和mdm2基因研究较多,其在肿瘤组织中的表达和意义比较明确.INK4a/ARF基因是1993年Serrano *et al*<sup>[11]</sup>采用酵母双杂交筛选法研究与CDK4结合的蛋白时发现的第一个直接调控细胞周期并抑制细胞分裂的新型抑癌基因,是除p53基因之外人类肿瘤中最常见失活的抑癌基因座.他定位于人第9号染色体短臂2区1带(9p21),可编码两种抑癌基因:P16INK4a和p14ARF.有关p14ARF基因的研究,目前报道不多.

我们运用免疫组化的方法显示p14ARF在大肠正常黏膜中表达较强,在癌旁组织中有部分表达,较正常黏膜组织阳性细胞少,染色较弱,在癌组织中阳性细胞相对较少,即p14ARF蛋白在大肠癌旁组织和大肠癌中分别存在着不同程度的缺失,在大肠癌组织中较癌旁组织中缺失较多.提示p14ARF的缺失与大肠癌的发生、发展有明确的关系.这与在脑恶性肿瘤、肺癌和乳腺癌等中的研究报道是一致的<sup>[11-13]</sup>.

在评估p14ARF蛋白表达和大肠癌各临床病理学参数的关系时,本实验提示p14ARF蛋白表达与肿瘤患者的性别、年龄、肿瘤大小等无显著关系,但与组织分化程度、淋巴结转移和Dukes分期存在着高度的相关性,分化程度低、有淋巴结转移和Dukes分期为C/D期的p14ARF蛋白表达明显低于对应组( $P<0.05$ ),这提示p14ARF蛋白表达与大肠癌的恶性生物学行为有关,上述结果提示p14ARF虽然参与了大肠癌的发生,但他的缺失对大肠癌的发展和浸润的作用更大,这与国外报道的结果是一致的<sup>[14]</sup>.p14ARF蛋白在大肠癌组织中表达的减少,影响了P53通路信号的传导,使其对大肠癌细胞的生长抑制作用减弱,在一定程度上促进了大肠癌的发生、发展.这也说明p14ARF表达的降低对于大肠癌的诊断和预后的判断具有一定的价值.

ARF位点的失活,常常导致ARF肿瘤抑制功能的丧失,诱发肿瘤的形成<sup>[15]</sup>.因此ARF与肿瘤的形成相关,他参与细胞的增殖,生长,凋亡.Radfar *et al*<sup>[16]</sup>研究表明ARF缺失以及P53缺失的鼠前B细胞中不表现凋亡特征.本实验结果显示,正常大肠黏膜的凋亡细胞位于表面上皮内,癌组织和癌旁组织则散在分布,癌旁组织细胞凋亡指数高于癌组织,提示p14ARF蛋白表达下调可能与大肠癌细胞的凋亡抑制有关,这可能是其参与大肠癌发生的机制之一.

### 4 参考文献

- 1 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707
- 2 Larsen CJ. pRB, p53, p16INK4a, senescence and malignant transformation. *Bull Cancer* 2004;91:399-402
- 3 陈世耀, 吴同法, 刘厚钰, 王吉耀, 张善身, 张希德. 10 a 内镜检查分析. 世界华人消化杂志 1999;7:15-17

- 4 Wang Z, Wang F, Wang WQ, Gao Q, Wei WL, Yang Y, Wang GY. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. *World J Gastroenterol* 2004;10:550-554
- 5 宋今丹, 高丰, 蒋英丽, 赵欣, 陈誉华, 王芸庆. 细胞凋亡与大肠肿瘤. *世界华人消化杂志* 2002;10:429-431
- 6 申洪. 免疫组织化学染色定量方法的研究(III). *中国组织化学与细胞化学杂志* 1995;4:89-92
- 7 Qiao D, Gaitonde SV, Qi W, Martinez JD. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 2001;22:957-964
- 8 Calabro V, Mansueto G, Santoro R, Gentilella A, Pollice A, Ghioni P, Guerrini L, La Mantia G. Inhibition of p63 transcriptional activity by p14ARF: functional and physical link between human ARF tumor suppressor and a member of the p53 family. *Mol Cell Biol* 2004;24:8529-8540
- 9 Ito T, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Komeda T, Nakao K. Alteration of the p14 (ARF) gene and p53 status in human hepatocellular carcinomas. *J Gastroenterol* 2004;39:355-361
- 10 Xiao EH, Li JQ, Huang JF. Effects of P53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2004;10:190-194
- 11 Martinez JC, Palomino JC, Cabello A, Sepulveda JM, de la Camara AG, Ricoy JR. HDM2 overexpression and focal loss of p14/ARF expression may deregulate the P53 tumour suppressor pathway in meningeal haemangiopericytomas. *Histopathology* 2005;46:184-194
- 12 Wang YC, Lin RK, Tan YH, Chen JT, Chen CY, Wang YC. Wild-type P53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:154-164
- 13 Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/P16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530
- 14 Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of P16 (INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000;60:129-133
- 15 Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2004;111:224-228
- 16 Radfar A, Unnikrishnan I, Lee HW, DePinho RA, Rosenberg N. p19 (Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13194-13199

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 胆囊收缩素受体在胰腺癌细胞中的表达及胆囊收缩素对胰腺癌细胞周期的影响

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 曹亮, 魏群

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 魏群, 南通大学附属医院消化内科  
江苏省南通市 226001  
曹亮, 南通市第一人民医院 江苏省南通市 226001  
通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化内科.  
zhouquoxiong@pub.nt.jsinfo.net  
电话: 0513-5777166 传真: 0513-5519820  
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

### 摘要

**目的:** 观察胆囊收缩素受体(CCKR)在人胰腺癌细胞株 SW1990 中的表达及胆囊收缩素(CCK)-8 肽对胰腺癌细胞周期的影响。

**方法:** 应用 RT-PCR 方法检测人胰腺癌细胞株 SW1990 中胆囊收缩素受体(CCKR)mRNA 的表达, 细胞化学法检测 SW1990 细胞中胆囊收缩素受体(CCKR)蛋白水平的表达, 流式细胞仪检测不同浓度的 CCK-8 肽对 SW199 细胞周期的影响。

**结果:** 在人胰腺癌细胞株 SW1990 中不表达 CCK-A 亚型受

体, 但表达 CCK-B 亚型受体; CCKR 在癌细胞株 SW1990 中的表达主要位于细胞膜上, 细胞浆内也可见。在  $10^{-8}$  g/L -  $10^{-5}$  g/L 浓度范围内, CCK-8 肽促进 SW1990 细胞的增殖, 呈剂量依赖性, 细胞周期分析发现 S 期细胞增加,  $G_2/M$  期细胞减少。

**结论:** CCKB 受体在人胰腺癌细胞株 SW1990 中表达, CCK-8 肽能促进 SW1990 细胞的增殖, 抑制细胞的凋亡, CCK 通过 CCKR 在胰腺癌细胞的增殖中发挥重要作用。

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 曹亮, 魏群. 胆囊收缩素受体在胰腺癌细胞中的表达及胆囊收缩素对胰腺癌细胞周期的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1599-1602  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1599.asp>

### 0 引言

胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)是人体正常胰腺