

# CDK4 和 p16 在喉鳞状细胞癌中的表达

张俊星<sup>1</sup> 耿曼英<sup>1</sup> 苏磊<sup>1</sup> 张慧<sup>1</sup> 卢星<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨 CDK4、p16 在喉鳞状细胞癌中的表达。方法:采用免疫组织化学 SP 法检测 30 例喉鳞状细胞癌组织和 20 例癌旁组织中 CDK4 和 p16 的表达情况,并分析二者分别与喉鳞状细胞癌临床分期和病理分级的关系。结果:在喉鳞状细胞癌中 CDK4、p16 的表达率分别为 63.3%、46.7%,在癌旁组织中 CDK4、p16 的表达率分别为 25%、90%。CDK4 在喉鳞状细胞癌中的表达高于癌旁组织( $P < 0.05$ ),与病理分级、临床分期均无显著相关性( $P > 0.05$ );p16 在喉鳞状细胞癌中的表达低于癌旁组织( $P < 0.05$ ),与病理分级有相关性( $P < 0.05$ ),与临床分期无显著相关性( $P > 0.05$ );CDK4 与 p16 的表达呈负相关( $r_s = -0.786, P < 0.05$ )。结论:p16 的低表达和 CDK4 的高表达可能在喉鳞状细胞癌的发生发展中起重要作用,且 p16 的低表达可能作为判断肿瘤恶性程度的指标。

**[关键词]** 喉鳞状细胞癌;CDK4;p16

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.02.003

**[中图分类号]** R739.65 **[文献标志码]** A

## Expression of CDK4 and p16 in laryngeal squamous cell carcinoma

ZHANG Junxing GENG Manying SU Lei ZHANG Hui LU Xing

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450014, China)

Corresponding author: GENG Manying, E-mail: manying66@126.com

**Abstract Objective:** To investigate the expression of CDK4 and p16 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) tissues. **Method:** The expressions of CDK4 and p16 in 30 cases of LSCC tissues and 20 cases of edge tissues were detected by immunohistochemical technology SP method, and discuss their correlation with clinical pathology and clinical stage of LSCC. **Result:** The positive rates of CDK4 and p16 were 63.3%, 46.7% in LSCC tissues, and the positive rates were 25%, 90% in edge tissues. The expression of CDK4 in LSCC tissues was significantly higher than that in edge tissues ( $P < 0.05$ ), which was not associated with the clinical pathology and clinical stage ( $P > 0.05$ ); The expression of p16 in LSCC tissues was significantly lower than that in edge tissues ( $P < 0.05$ ), it was associated with the clinical pathology ( $P < 0.05$ ), but not associated with clinical stage ( $P > 0.05$ ); there is a negative correlation between CDK4 and p16 ( $r = -0.786, P < 0.05$ ). **Conclusion:** Low expression of p16 and high expression of CDK4 may play an important role in the development of LSCC and the low expression of p16 in LSCC tissue could be used as important reference markers of malignant degree of tumour.

**Key words** laryngeal squamous cell carcinoma; CDK4; p16

肿瘤的发生、发展是一个多因素参与、多步骤的复杂过程,近年来随着对细胞周期调控因子的研究,人们发现大多数肿瘤细胞中都存在着细胞周期调控的改变,且在肿瘤的发生、发展中起着重要作用,任何一种调控因子发生紊乱将导致细胞异常增殖,从而诱发肿瘤<sup>[1]</sup>。细胞周期的调控是一个极其复杂的过程,其中 p16 和细胞周期蛋白依赖性激酶-4(CDK4)2 种蛋白在调控中起着重要的作用<sup>[2]</sup>,研究发现<sup>[3]</sup>,人类大多数肿瘤细胞中 CDK4 呈高表达状态;而作为 CDK4 的抑制蛋白 p16(多肿瘤抑制基因蛋白,CDKI),其基因已被证实为抑癌基因,在许多肿瘤细胞有缺失,缺失率达 75%。本文对 CDK4 和 p16 两种蛋白在喉鳞状细胞癌(laryngeal

squamous cell carcinoma, LSCC)中的表达进行研究,探讨二者与 LSCC 临床分期和病理分级的关系及二者的相互关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

50 例标本均来自我科 2013-08—2014-03 期间住院手术的 LSCC 原发病例,术前均未接受放疗和化疗。30 例 LSCC 标本常规苏木精-伊红染色,经 2 位病理科医师诊断均为 LSCC,其中男 28 例,女 2 例;年龄 45~68 岁,平均 52 岁;参照国际抗癌联盟(UICC)2002 喉癌 TNM 临床分期:Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 8 例,Ⅲ期 15 例,Ⅳ期 2 例;病理分级:Ⅰ级 12 例,Ⅱ~Ⅲ级 18 例。20 例癌旁组织(术中取正常切缘),经苏木精-伊红染色证实为正常黏膜。

#### 1.2 主要试剂

兔抗人 CDK4、p16 多克隆抗体均为美国

<sup>1</sup> 郑州大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科(郑州,50014)  
通信作者:耿曼英, E-mail: manying66@126.com

SANTA CRUZ 公司产品;SP9000 试剂盒、DAB 试剂盒均为北京中杉生物工程公司产品。p16 抗体和 CDK4 抗体工作液浓度均为为 1 : 100。

1.3 方法

50 例标本均经 4% 甲醛固定,石蜡包埋,作 4 μm 厚连续切片。常规苏木精伊红染色,光镜下细胞形态学观察,以确定病理诊断及分级。应用免疫组织化学 SP 法对组织中 CDK4 和 p16 两种蛋白的表达进行检测,步骤按 SP 试剂盒说明书进行,用购自该公司的已知阳性片作阳性对照,用 PBS 取代一抗作空白阴性对照。

1.4 结果判断

均以细胞内出现棕黄色颗粒作为阳性细胞, p16 抗体在细胞核、细胞质均有着色,单独以细胞核着色的较少;CDK4 抗体在细胞核、细胞质均有着色,弥漫性、灶性分布<sup>[4]</sup>。随机选取 10 个 400 倍视野,每个视野计数 100 个肿瘤细胞。根据染色阳性细胞数,计算阳性细胞所占百分比:<10% 为(-),10%~24% 为(+),25%~49% 为(++), ≥50% 为(+++)。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 19.0 进行分析。组间差异性比较应用 χ<sup>2</sup> 检验或 Fisher 精确概率检验分析,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析判定。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDK4 与 p16 在 LSCC 中的表达及定位

二者均以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性反应。CDK4 抗体在细胞核、细胞质均有着色,弥漫性、灶性分布(图 1)。p16 阳性产物主要位于细胞质,部分可见细胞核染色(图 2)。

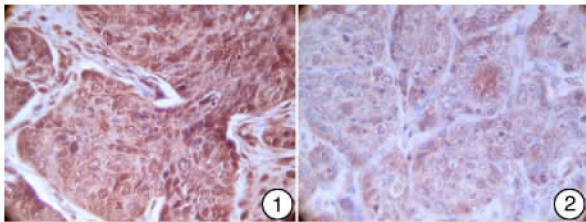


图 1 CDK4 在 LSCC 中的表达 SP 法 ×400;  
图 2 p16 在 LSCC 中的表达 SP 法 ×400。

2.2 LSCC 和癌旁组织黏膜中 CDK4、p16 表达的差异性

CDK4 在 LSCC 中的阳性表达率(19/30, 63.3%)比癌旁组织中的表达率(5/20, 25.0%)明显增高;p16 在 LSCC 中的表达(14/30, 46.7%)低于癌旁组织(18/20, 90.0%)。均差异有统计学意义(P<0.05)。

2.3 LSCC 组织中 CDK4、p16 和临床分期、病理分级的关系

LSCC 中 CDK4 的表达与病理分级无相关性(Fisher 精确检验, P>0.05)和临床分期无相关性(χ<sup>2</sup>=1.256, P>0.05);p16 的表达与病理分级有关(Fisher 精确检验, P<0.05),与临床分期无显著相关性(χ<sup>2</sup>=0.134, P>0.05)。LSCC 组织中 CDK4、p16 和临床分期、病理分级的关系见表 1。

表 1 LSCC 组织中 CDK4、p16 和临床分期、病理分级的关系 例(%)

临床病理特征	例数	CDK4 阳性表达	p16 阳性表达
临床分期			
I	5	3(60.0)	2(40.0)
II	8	5(62.5)	4(50.0)
III	15	9(60.0)	7(46.7)
IV	2	2(100.0)	1(50.0)
病理分级			
I	12	9(75.0)	10(83.3)
II/III	18	10(55.6)	4(22.2)

2.4 LSCC 组织中 CDK4 和 p16 表达的关系

根据 CDK4 和 p16 的阳性细胞所占比率分为阴性、弱阳性、阳性、强阳性,后三者均认为是阳性。对应两者的表达情况得出:二者呈负向表达。LSCC 组织中 CDK4 和 p16 表达的关系见表 2。

表 2 LSCC 组织中 CDK4 和 p16 表达的关系 例

CDK4	p16		Spearman 等级相关分析	
	-	+	r	P
+	4	15	-0.786	<0.05
-	10	1		

3 讨论

在真核细胞复杂的细胞周期调控中, G1/S 是大多数细胞周期的主要调控点,是细胞惟一能从外界接受增殖信号或抑制信号的时期<sup>[5]</sup>。因为细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期最终依赖于 Rb 蛋白的磷酸化<sup>[6]</sup>,而作为细胞周期调控的核心因子 CDK4 在此过程中起着正性调控的作用,所以 CDK4 的表达在细胞周期过程中起着十分重要的作用。何巍等<sup>[7]</sup>研究显示,在口腔鳞状细胞癌组织的发生发展过程中存在着 CDK4 蛋白的高表达,高表达的 CDK4 可以催化其底物视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)的磷酸化,低磷酸化的 Rb 蛋白可与一些转录因子如 E2F 结合,抑制这些转录因子的活性,阻止细胞的增殖;而高磷酸化的 Rb 蛋白则失去这种功能,使 E2F 游离,发挥转录活性,促进细胞周期的进行,细胞由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期,细胞过度增殖,导致癌变,这与王俊阁等<sup>[8]</sup>

的研究结论一致。本研究认为 CDK4 在 LSCC 和癌旁组织中的表达存在着明显的差异性,且不随临床分期和病理分级的改变而改变,这与李吉平等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。

作为 CDK4 的抑制蛋白,p16 在 1994 年被 Kamib 等<sup>[10]</sup>首次报导,并指出 p16 基因是一个重要的抑癌基因,在人类多种肿瘤中均发现其表达产物 p16 蛋白的缺失。研究证实<sup>[11]</sup>,p16 抑制细胞周期的过快发展,而 CDK4 则加快其进程。在正常的细胞周期中,p16 功能占主导地位,可专一地与 CDK4 结合,阻止 CDK4 与 CyclinD1 的结合,从而抑制 CDK4 的激酶活性,使 Rb 蛋白处于低磷酸化状态,减少 E2F 的释放,阻止细胞通过 G1/S 检查点,从而减少细胞的过度增殖,减少癌变;临床上关于 p16 的研究众多,研究表明<sup>[3,6-7]</sup>,在多种肿瘤细胞中存在着 p16 基因的突变和缺失,主要表现为 p16 蛋白的低表达,与本研究结果相似,低表达的 p16 对 CDK4 的结合能力减弱,后者活性增强,导致 Rb 高磷酸化,加快细胞通过 G1/S 检查点,使细胞增殖失控,发生癌变。

综上所述,CDK4 和 p16 在 LSCC 中的异常表达及二者的负向表达关系,可能在肿瘤的发生、发展中起着重要作用,综合二者的表达情况可能有助于恶性肿瘤的确诊,且 p16 随着病理分级的提高呈现降低趋势,可能作为肿瘤恶性程度的检测指标。有关联合二者在 LSCC 中的研究在国内尚不是很多,结论尚不能完全统一,本研究中,CDK4 的表达水平不因临床病理分级的改变而改变,与一些关于 CDK4 的研究结果不符,可能与病例类型不同或样本量差异有关,所以对二者的更进一步研究显得非常必要。

#### 参考文献

[1] MCKAY J A, DOUGLAS J J, ROSS V G, et al. Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorec-

tal tumours [J]. *Pathol*, 2002,196: 386-393.

- [2] BORUC J,MYLLE E,DUDA M,et al. Systematic localization of the Arabidopsis core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes[J]. *Plant Physiol*, 2010,152:553-565.
- [3] ZHANG T,NANNEY L B,LUONGO C, et al. Concurrent overexpression of cyc-linD1 and cyclin-dependent kinase 4(Cdk4)in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (Min)mice and human familial adenomatous polyposis Patients[J]. *Cancer Res*,1997, 57:169-175.
- [4] 张红,牛韵韵. 胡曼平食管癌中 p53、p21、p16、cyclinD1、CDK4 免疫组化检测[J]. *免疫学杂志*,2003,19(4):312-314.
- [5] JIANG W, ZHU Z, BHATIA N, et al. Mechanisms of energy restriction: effects of corticosterone on cell growth, cell cycle machinery, and apoptosis[J]. *Cancer Res*,2002,62:5280-5287.
- [6] GIBSON S L,DAI C Y,LEE H W, et al. Inhibition of colon tumor progression and angiogenesis by the INK4a/Arf locus[J]. *Cancer Res*,2003,63: 742-746.
- [7] 何巍,季旭东,李龙江,等. 口腔鳞状细胞癌组织中 Bax 和 CDK4 的表达[J]. *郑州大学学报(医学版)*,2004, 39(3):1017-1019.
- [8] 李俊阁,李晓明,路秀英,等. Stat3 信号转导通路对喉癌细胞 G1-S 期的调控[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2008,22(15):699-702.
- [9] 李吉平,周梁,金晓杰,等. 喉癌中 p16 和 CDK4 表达的研究[J]. *肿瘤*,2000,20(6):445-447.
- [10] KAMB A,GRUIS N A,JANE W F, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. *Science*,1994,12:436-440.
- [11] CHIEN W W, DOMENECH C, CATALLO R, et al. S-phase lengthening induced by p16(INK4a) overexpression in malignant cells with wild-type pRb and p53 [J]. *Cell Cycle*, 2010,9:3286-3296.

(收稿日期:2014-04-08)

## 重要声明

近期,编辑部收到作者反映,有中介机构以本刊编辑部的名义接收稿件并收取费用,为维护广大作者的合法权益,本编辑部郑重声明:本刊编辑部没有委托任何中介机构接收稿件或收取费用,提醒作者谨防受骗。作者投稿可登陆武汉协和医院杂志社官方网站:www.whuhzss.com。

《临床耳鼻咽喉头颈外科杂志》编辑部