

p16 与 ER 在乳腺癌中表达的相关性

闫战涛

(常州市第一人民医院病理科, 江苏 常州 213000)

摘要:目的 探讨 p16 基因表达与雌激素受体(ER)的相关性,分析其在 ER 阴性乳腺癌中的可能应用。方法 选取常州市第一人民医院 2016 年 5 月~2018 年 6 月手术治疗的乳腺癌石蜡标本 181 例为研究对象,使用免疫组织化学(SP 法)分别检测乳腺癌组织中 ER 和 p16 蛋白表达,分析乳腺癌组织中 p16 蛋白表达与 ER 的关系及其与不同亚型乳腺癌临床病理参数的关系。结果 p16 蛋白在 ER 阳性和 ER 阴性乳腺癌组织中阳性率分别为 56.19%(59/105)、35.53%(27/76),差异有统计学意义($P<0.05$);ER 阴性乳腺癌中,p16 蛋白表达与患者的淋巴结转移数、临床分期均相关($P<0.05$),与年龄、肿块大小及组织学分级无关($P>0.05$)。结论 p16 蛋白表达的缺失可能主要出现在 ER 阴性乳腺癌中,上调抑癌基因 p16 的表达有可能作为 ER 阴性乳腺癌一个潜在的治疗靶点,p16 蛋白表达的检测也有可能成为 ER 阴性乳腺癌患者预后评估的一个参考指标。

关键词: p16;ER 阳性;ER 阴性;乳腺癌

中图分类号: R365

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.10.025

文章编号:1006-1959(2019)10-0075-03

Correlation between Expression of p16 and ER in Breast Cancer

YAN Zhan-tao

(Department of Pathology, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213000, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between p16 gene expression and estrogen receptor (ER) and analyze its possible application in ER-negative breast cancer. Methods A total of 181 paraffin-embedded specimens of breast cancer from the First People's Hospital of Changzhou from May 2016 to June 2018 were selected. Immunohistochemistry (SP method) was used to detect ER and p16 proteins in 181 breast cancer tissues. Expression and analysis of the relationship between p16 protein expression and ER in breast cancer tissues and its relationship with clinical pathological parameters of different subtypes of breast cancer. Results The positive rates of p16 protein in ER-positive and ER-negative breast cancer tissues were 56.19% (59/105) and 35.53% (27/76), respectively, the difference was statistically significant ($P<0.05$). ② In ER-negative breast cancer, p16 protein expression was correlated with lymph node metastasis and clinical stage ($P<0.05$), and was not associated with age, mass size and histological grade ($P>0.05$). Conclusion The deletion of p16 protein may be mainly found in ER-negative breast cancer. The up-regulation of p16 expression may be a potential therapeutic target for ER-negative breast cancer. The detection of p16 protein expression may also be a patient with ER-negative breast cancer. A reference indicator for prognostic assessment.

Key words: p16;ER positive;ER negative;Breast cancer

根据雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达状态可将乳腺癌分为 ER 阳性乳腺癌和 ER 阴性乳腺癌^[1]。因乳腺癌具有高度异质性,ER 阳性乳腺癌和 ER 阴性乳腺癌在发病机制、临床病理特征、治疗反应和预后等方面均有很大差异。因此,在越来越追求个体化治疗的今天,进一步研究 ER 阳性乳腺癌和 ER 阴性乳腺癌的分子生物学特征显得十分必要。抑癌基因 p16 位于人染色体 9p21,属于周期依赖性激酶抑制因子 CDK1 家族,其蛋白产物可调节细胞的增值与凋亡和阻止因 DNA 损伤引起的细胞增值^[2]。目前已经证实 p16 蛋白在乳腺癌中呈低表达状态^[3],但其在 ER 阳性乳腺癌和 ER 阴性乳腺癌中表达是否一致尚不清楚。本实验分别检测 181 例乳腺癌组织中 p16 和 ER 表达情况,并结合临床病理资料进一步分析 p16 在乳腺癌中的表达与 ER 的相关性。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集常州市第一人民医院 2016 年 5 月~2018 年 6 月手术治疗的乳腺癌石蜡标本 181 例,经病理检测证实全部为浸润性导管癌。患者全部为女性,年龄 24~88 岁,中位年龄 52 岁;组织学作者简介:闫战涛(1987.4-),男,河南濮阳人,硕士,医师,主要从事乳腺病理诊断工作

分级(WHO 分标准)级: I 级 30 例、II 级 87 例、III 级 64 例;淋巴结转移:62 例淋巴结(腋窝)转移数>3,119 例为 0~3;临床分期(TNM): I、II 合并为 112 例,III 为 69 例。所有标本均经 10%福尔马林固定,常规石蜡包埋。p16 抗体(BS1265, Bioworld 公司); ER 单克隆抗体、SP 试剂盒(ZA-0102、SP9000, 北京中衫金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 ER 和 p16 的检测 使用免疫组织化学染色(SP 法),具体步骤为:将 5 μm 石蜡切片置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中,过夜孵育;二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,去离子水冲洗 5 min,蒸馏水冲洗 2 遍;采用 pH 6.0 的柠檬酸溶液进行抗原修复;加入 100 μl 稀释好的一抗(1:200 稀释),室温下孵育 1 h, PBS 缓冲液冲洗 3 次;去掉 PBS 液后,每张切片再加入 100 μl 稀释好的二抗(1:300 稀释),在室温下孵育 15 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次;二氨基联苯胺显色,在显微镜下检验染色质量,最后用中性树胶封片。阴性对照采用 PBS 缓冲液代替一抗。阳性标准:p16 以细胞核和(或)胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞,阳性细胞数 $\geq 10\%$ 计为阳性^[4],组织内淋巴细胞或正常的乳腺导管上皮为阳性内对照;ER 以细胞核出现棕黄色颗粒为

阳性细胞,阳性细胞数 $\geq 1\%$ 计为阳性^[6]。

1.2.2 p16 蛋白表达与临床病理参数的关系分析 依据乳腺癌组织中 ER 表达情况将 181 例样本分为 ER 阳性组和 ER 阴性组;分别统计两组患者中 p16 表达情况、年龄、肿块大小、淋巴结转移情况、组织学分级和临床分期等临床资料。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件包进行数据处理,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料采用(%)表示,采用 χ^2 检验。乳腺癌组织 p16 与 ER 的表达相关性使用四格表 χ^2 检验,ER 阳性组和 ER 阴性组中 p16 表达与年龄、淋巴结转移数目、组织学分级和临床分期的相关性使用四格表 χ^2 检验,ER 阳性组和 ER 阴性组中 p16 表达与肿块大小的相关性使用列联表(R \times C) χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织 ER 和 p16 蛋白表达检测 乳腺癌组织细胞中 ER 表达定位于胞核,癌旁组织 p16 蛋白表达定位于胞核,乳腺癌组织中 p16 蛋白阳性表达定位于胞浆或胞核。181 例乳腺癌标本中,105 例为 ER 表达阳性,76 例为 ER 表达阴性;ER 阳性标本中 p16 蛋白表达率为 56.19%(59/105),ER 阴性标

本 p16 蛋白表达率为 35.53%(27/76),ER 阴性组 p16 蛋白表达率低于 ER 阳性组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 乳腺癌组织 p16 蛋白表达与 ER 的关系[n(%)]

| ER | n | p16(+) | p16(-) |
|----|-----|-----------|-----------|
| 阳性 | 105 | 59(56.19) | 46(43.81) |
| 阴性 | 76 | 27(35.53) | 49(64.47) |
| 合计 | 181 | 86(47.51) | 95(52.49) |

注: $\chi^2=7.549, P=0.006$

2.2 乳腺癌组织 p16 蛋白表达与临床病理参数的关系 105 例 ER 阳性乳腺癌中:p16 蛋白表达与患者的年龄、肿块大小、组织学分级、淋巴结(腋窝)转移数及临床分期无关,差异无统计学意义(P 均 >0.05);在 ER 阴性乳腺癌中:淋巴结(腋窝)转移数 >3 组织中 p16 蛋白表达率为 17.24%(5/29),淋巴结(腋窝)转移数为 0~3 组织中为 46.81%(22/47),差异有统计学意义($P<0.05$);临床 I + II 期组织中 p16 蛋白表达率为 44.00%(22/50),III 期为 19.23%(5/26),差异有统计学意义($P<0.05$);p16 蛋白表达与患者的年龄、肿块大小、淋巴结转移数及组织学分级无关,差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 2。

表 2 181 例乳腺癌组织中 p16 蛋白表达与临床病理参数的关系(n)

| 项目 | ER 阳性乳腺癌 | | | | ER 阴性乳腺癌 | | | | | |
|-----------|----------|--------|--------|----------|----------|----|--------|--------|----------|-------|
| | n | p16(+) | p16(-) | χ^2 | P | n | p16(+) | p16(-) | χ^2 | P |
| 年龄(岁) | | | | 1.933 | 0.173 | | | | 0.816 | 0.305 |
| <52 | 47 | 28 | 19 | | | 42 | 13 | 29 | | |
| ≥ 52 | 58 | 42 | 16 | | | 34 | 14 | 20 | | |
| 肿块大小(cm) | | | | 2.663 | 0.274 | | | | 3.011 | 0.222 |
| ≤ 2 | 37 | 21 | 16 | | | 36 | 14 | 22 | | |
| 2~5 | 52 | 38 | 14 | | | 31 | 8 | 23 | | |
| >5 | 16 | 11 | 5 | | | 9 | 5 | 4 | | |
| 淋巴结转移数 | | | | 1.709 | 0.184 | | | | 6.845 | 0.009 |
| 0~3 | 72 | 51 | 21 | | | 47 | 22 | 25 | | |
| >3 | 33 | 19 | 14 | | | 29 | 5 | 24 | | |
| 组织学分级 | | | | 1.538 | 0.452 | | | | 2.685 | 0.247 |
| I | 20 | 12 | 8 | | | 10 | 2 | 8 | | |
| II | 48 | 35 | 13 | | | 39 | 17 | 22 | | |
| III | 37 | 23 | 14 | | | 27 | 8 | 19 | | |
| 临床分期 | | | | 2.341 | 0.126 | | | | 4.582 | 0.032 |
| I + II | 62 | 48 | 14 | | | 50 | 22 | 28 | | |
| III | 43 | 23 | 20 | | | 26 | 5 | 21 | | |

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,全世界每年约有 57 万例乳腺癌患者发生肿瘤细胞的远处转移^[7],部分早期乳腺癌患者,也会发生隐匿性转移^[8]。研究根据乳腺癌标志物 ER 将乳腺癌分为 ER 阳性乳腺癌和 ER 阴性乳腺癌。有研究表明,乳

腺癌不同的肿瘤标志物可反映其不同的生物学行为^[9],而且乳腺癌有高度异质性,由于乳腺癌 ER 表达状态的不同,ER 阳性乳腺癌和 ER 阴性乳腺癌在发病机制、临床病理特征、治疗反应和预后等方面均有很大差异。

乳腺癌的发生是一个多因素、多步骤的病理过

程,主要涉及癌基因的激活与抑癌基因的失活。抑癌基因 p16 是细胞周期依赖激酶家族抑制蛋白 (CKIs) 成员之一,可编码一个由 148 个氨基酸组成的蛋白质,在限制点 (R 点) 与 D 型细胞周期蛋白 (cyclinD1) 竞争性结合 CDK4/CDK6,抑制 CDK4/CDK6 的作用,降低 Rb 蛋白磷酸化水平,从而阻止细胞通过限制点 R 点由 G₁ 期进入 S 期。因此,当 p16 蛋白不能正常表达时,会导致细胞无限增殖,进一步引起肿瘤的发生^[10,11]。目前已经证实 p16 蛋白在乳腺癌中呈低表达状态^[3],但其在 ER 阳性乳腺癌和 ER 阴性乳腺癌中表达是否一致尚不清楚。本实验分别检测 181 例乳腺癌组织中 p16 和 ER 表达情况,并结合临床病理资料进一步分析 p16 在乳腺癌中的表达与 ER 的相关性。

国外学者对乳腺癌中 12 种生长抑制基因的甲基化状态和 ER 及孕激素受体的关系进行了分析,结果发现 p16 蛋白表达和 ER 表达无相关性^[12]。Kozomara Z 等^[13]研究表明,p16 蛋白表达和 ER 表达呈正相关。为了进一步探索 p16 蛋白表达与 ER 的关系,本研究用 SP 法分别检测了 181 例乳腺癌组织中 ER 和 p16 蛋白表达情况。结果显示,ER 阳性标本中 p16 蛋白表达率为 56.19% (59/105),ER 阴性标本 p16 蛋白表达率为 35.53% (27/76),ER 阴性组 p16 蛋白表达率低于 ER 阳性组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。根据以上实验结果可以推测,抑癌基因 p16 的表达可能和 ER 有关,p16 蛋白表达的缺失可能主要出现在 ER 阴性乳腺癌中。

由于乳腺癌的异质性以及 ER 阳性和 ER 阴性乳腺癌患者在临床病理、治疗方法及预后的不同,我们又分别分析了 p16 蛋白表达与 ER 阳性和 ER 阴性乳腺癌临床病理参数的关系,结果显示 ER 阳性乳腺癌中:p16 蛋白表达与患者的年龄、肿块大小、组织学分级、淋巴结(腋窝)转移数及临床分期无关 ($P > 0.05$)。但在 ER 阴性乳腺癌中:淋巴结(腋窝)转移数 > 3 组织中 p16 蛋白表达率为 17.24% (5/29),淋巴结(腋窝)转移数为 0~3 组织中为 46.81% (22/47),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),临床 I + II 期组织中 p16 蛋白表达率为 44.00% (22/50),III 期为 19.23% (5/26),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),p16 蛋白表达与患者的年龄、肿块大小、淋巴结转移数及组织学分级无关 ($P > 0.05$)。可见,p16 蛋白表达可能只与 ER 阴性乳腺癌临床病理参数有关。淋巴结转移和临床分期是乳腺癌治疗和预后评估的重要参考,本实验结果显示,ER 阴性组中 p16 蛋白表达率在淋巴结(腋窝)转移数 > 3 和临床 III 期中,分别明显低于淋巴结(腋窝)转移数为 0~3 和临床 I + II 期,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$),因此抑癌基因 p16 有

可能作为 ER 阴性乳腺癌一个潜在的治疗靶点,p16 蛋白表达的检测也有可能成为 ER 阴性乳腺癌患者预后评估的一个参考指标。

综上所述,p16 蛋白表达的缺失可能主要出现在 ER 阴性乳腺癌中,上调抑癌基因 p16 的表达有可能作为 ER 阴性乳腺癌一个潜在的治疗靶点,p16 蛋白表达的检测也有可能成为 ER 阴性乳腺癌患者预后评估的一个参考指标,但尚需在更多样本上的进一步验证。

参考文献:

- [1] Jhaveri K, Esteva FJ. Pertuzumab in the Treatment of HER2+ Breast Cancer [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2014, 12(4): 591-599.
- [2] 刘现义, 李中, 王晓春, 等. 人乳头状瘤病毒感染与乳腺癌的关系及 P16 蛋白表达的相关性 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(9): 2120-2122.
- [3] Wang J, Mao X, Zhang Y, et al. Genome-wide screening of CpG island methylation changes induced by low-dose X-ray radiation in mice [J]. *J Southern Med Univ*, 2014, 34(2): 228-236.
- [4] Wang L, Zhan X, Shen X, et al. P16 promotes the growth and mobility potential of breast cancer both in vitro and in vivo: the key role of the activation of IL-6/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 446(2): 137-148.
- [5] 张一兵, 胡继卫, 卢鹤翔, 等. EZH2, p16 启动子在乳腺癌亚型中的表达及其与临床病理特征的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(21): 42-47.
- [6] Kobierzycki C, Grzegorzolka J, Glatzel-Plucinska N, et al. Expression of p16 and SATB1 in Invasive Ductal Breast Cancer - A Preliminary Study [J]. *In Vivo*, 2018, 32(4): 731-736.
- [7] Cappellani A, Di Vita M, Zanghi A, et al. Prognostic factors in elderly patients with breast cancer [J]. *BMC Surg*, 2013, 9(2): 225-231.
- [8] 张顺礼, 胡继卫, 马杰, 等. 不同亚型乳腺癌组织中 p16 基因甲基化与蛋白表达及临床病理特征的关系 [J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(11): 47-49, 58.
- [9] Choi EJ, Yun JA, Jeon EK, et al. Prognostic significance of RSP01, WNT1, and SDC1 expression in invasive ductal carcinoma of the breast [J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 11(4): 314-321.
- [10] 徐锦屏, 沈卫达, 周英姿, 等. p16、p27 蛋白与乳腺癌临床病理特征的关系及预后价值 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2016, 28(5): 315-317.
- [11] Dalley AJ, Pitty LP, Major AG, et al. Expression of ABCG2 and Bmi-1 in oral potentially malignant lesions and oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Med*, 2017, 3(2): 273-279.
- [12] 杨军, 黄小钟, 郭睿, 等. p16 INK4a 蛋白可作为乳腺癌特异性分子标志 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(6): 751-755.
- [13] Kozomara Z, Supic G, Krivokuca A, et al. Promoter hypermethylation of p16, BRCA1 and RASSF1A genes in triple-negative breast cancer patients from Serbia [J]. *J BUON*, 2018, 23(3): 684-691.

收稿日期: 2019-2-20; 修回日期: 2019-3-7

编辑/成森