

P63 蛋白在宣威与非宣威地区非小细胞肺癌中表达的对比研究

刘君¹⁾, 李高峰²⁾, 陈楠²⁾, 彭俊¹⁾, 陈新隆¹⁾, 王平¹⁾, 毛新¹⁾, 宁显谷¹⁾

(1) 云南省第一人民医院, 昆明理工大学附属昆华医院胸心血管外科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤医院胸外科, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 研究宣威与非宣威地区非小细胞肺癌 P63 蛋白的表达, 探讨其与生物学行为的关系. **方法** 免疫组织化学法. **结果** P63 在肺鳞癌组织中高表达; 非小细胞肺癌中, P63 的表达与患者的 TNM 分期、组织分化程度及淋巴结转移情况有关, 与患者性别无关; P63 在非小细胞肺癌中在相同病理类型、分期、组织分化、淋巴结转移情况及同性别的阳性表达率, 宣威组与非宣威组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$). **结论** P63 的表达在宣威并无地区特异性, 并不是宣威肺癌高发的原因.

[关键词] 非小细胞肺癌; P63 蛋白; 免疫组化

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 01 - 0037 - 05

Comparison of P63 Protein Expression in Non-small Cell Lung Cancer between Xuanwei and Other Regions

LIU Jun¹⁾, LI Gao-feng²⁾, CHEN Nan²⁾, PENG Jun¹⁾, CHEN Xin-long¹⁾, WANG Ping¹⁾, MAO Xin¹⁾, NING Xian-gu¹⁾

(1) Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The First People's Hospital of Yunnan Province, The Affiliated KunHua Medical Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Thoracic Surgery, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of the study was to compare the P63 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) between Xuanwei and other regions, and to investigate the relationship of P63 expression and biological behavior. **Methods** Immunohistochemical method was used. **Results** The results indicated that the expression of P63 in lung squamous cell carcinoma was extraordinarily high. P63 was related to the TNM staging system, tissue differentiation degree and lymph node metastasis, but not related to gender. In NSCLC, there was no significant difference of the P63 positive expression rate in the same pathological types, staging, tissue differentiation degree, lymph node metastasis and gender between Xuanwei and other regions. It indicated that the expression of P63 was not the reason why it was high incidence of lung cancer in Xuanwei region.

[Key words] Non-small cell lung cancer; P63 protein; Immunohistochemistry

1997 年, Schmale 等^[1]经探索发现了鼠 KET. 这是一种蛋白, 与 P53 高度同源. 而人的 P63 基因和蛋白在 1998 年被一些研究所发现^[2]. P63 是 P53 家族的一个新成员, 它是一种核转录因子, 能够激活或抑制多种基因的表达^[3], 虽然其与 P53 高

度同源, 但其编码的蛋白质功能却与 P53 明显不同^[4], 因此在肿瘤发生与细胞凋亡的研究中受到了众多研究者的关注^[5]. 在 P53 介导的细胞信号转导途径中, P63 可以通过激活 P53 的靶基因而参与其中. 而且, P63 在肿瘤的形成和转移过程中发挥着

[作者简介] 刘君 (1983 ~), 男, 云南昆明市人, 在读硕士研究生, 住院医师, 主要从事胸心血管外科临床及科研工作.

[通讯作者] 李高峰. E-mail:ligaofenghl@126.com

非常重要的调控作用^[4]。

众多研究证实了这一点。Glickman 的研究表明, P63 的上调可能对食管鳞状细胞癌的形成发挥了重要作用^[6], Hong 的研究则发现: P63 的表达与肝外胆管癌的癌组织分化程度负相关^[7]。日本学者对头颈部鳞状细胞癌和胰腺癌的研究发现: P63 基因复制明显增加, 而突变却极少^[8,9]。P63 蛋白在皮肤鳞癌、膀胱癌及未分化鼻咽癌中高表达^[10,11]。由此判断 P63 的过度表达, 可能与肿瘤的发生和(或) 恶变有关。

近些年来我国的肺癌发病率逐年增加, 全国肿瘤登记中心发布的《2012 中国肿瘤登记年报》显示: 肺癌居全国恶性肿瘤发病率第一位, 死亡率第一位。而云南是癌症高发区之一, 云南省的肺癌发病率是全国发病率的两倍。云南宣威地区有地区特异性, 其女性肺癌死亡率居全国第一位^[12]。

应用免疫组织化学法, 研究宣威与非宣威地区非小细胞肺癌 P63 蛋白的表达, 探讨其与生物学行为的关系, 并将宣威组与非宣威组 P63 的表达情况进行比较。以探究 P63 的表达在宣威地区有无特异性, 探究宣威肺癌高发与 P63 的表达是否有关。

1 资料与方法

1.1 临床资料

实验组: 收集 2012 年 10 月至 2013 年 6 月云南省第一人民医院(昆明理工大学附属昆华医院)胸外科手术切除的 30 例宣威地区非小细胞肺癌患者的癌组织和正常肺组织(正常组织规定为: 距癌组织边缘大于 5 cm)。在 30 例患者中, 男性 16 例, 女性 14 例, 年龄 38 ~ 70 岁, 平均 55.6 岁; 鳞癌 13 例, 腺癌 17 例; I 期 9 例, II 期 15 例, III 期 6 例; 高分化 9 例, 中分化 14 例, 低分化 7 例; 淋巴结转移阳性的患者 16 例, 淋巴结转移阴性的患者 14 例。

对照组: 同期 30 例非宣威地区非小细胞肺癌患者的癌组织和正常肺组织(正常组织规定为: 距癌组织边缘大于 5 cm)。在 30 例患者中, 男性 14 例, 女性 16 例, 年龄 36 ~ 72 岁, 平均 56.2 岁; 鳞癌 14 例, 腺癌 16 例; I 期 10 例, II 期 16 例, III 期 4 例; 高分化 10 例, 中分化 12 例, 低分化 8 例; 淋巴结转移阳性的患者 13 例, 淋巴结转移阴性的患者 17 例。

每例均有详细的病历资料及手术记录, 术前检查所有病人均无远处转移, 全部肺癌病例术前均未

接受放疗或化疗。2 组患者资料差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

所有标本常规取材, 福尔马林固定, 石蜡包埋, 3 μm 厚连续切片; 即用型 P63 蛋白鼠抗人单克隆抗体, 免疫组化法。细胞浆、细胞核出现棕色颗粒为阳性细胞, 随机选择 4 个高倍视野, 计数 100 个细胞; 其中 P63 染色呈深棕色、大颗粒的阳性细胞 $> 50\%$ 者为 (+++), 浅棕色、小颗粒的阳性细胞 $10\% \sim 50\%$ 为 (++) , 阳性细胞 $< 10\%$ 为 (+)。

1.3 统计学处理

数据处理采用 SPSS 软件进行 χ^2 检验或确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P63 在癌和正常组织中的表达情况

P63 蛋白在非小细胞肺癌中的阳性表达率为 81.67% (49/60) 与正常肺组织 5.00% (3/60) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 P63 在宣威、非宣威肺组织中的表达

P63 在鳞癌组织中的表达阳性率为 81.48%, 在腺癌组织中的表达阳性率为 51.51%, 在正常组织表达阳性率为 5.00%, 故 P63 在鳞癌组织中的表达, 明显高于腺癌组织 ($P < 0.05$) 及正常组织 ($P < 0.05$) 中的表达; 宣威地区, P63 在鳞癌组织中的阳性表达率高于腺癌组织, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 非宣威地区, P63 在鳞癌组织中的阳性表达率同样高于腺癌组织, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而非宣威鳞癌组织中的阳性表达率高于宣威鳞癌组织, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 宣威腺癌组织与非宣威腺癌组织中的阳性表达率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

P63 在鳞癌中的表达明显高于腺癌或许与 P63 受表皮生长因子的下游通路——磷酸肌醇激酶 3 调节有关^[13], 见表 2。

2.3 P63 表达与临床分期的关系

P63 蛋白在癌组织中阳性表达率随 TNM 分期增加呈上升趋势, 在分期晚的患者中阳性表达率较高, 这与宋宇^[14]的研究结果一致。

I 期与 II 期患者比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), II 期与 III 期患者比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), I 期与 III 期患者比较, III 期患者 P63 表达阳性率明显高于 I 期患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。P63 蛋白表达在 I、II、III 期

患者中宣威组与非宣威组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3.

2.4 P63 表达与组织分化程度的关系

P63 蛋白在癌组织中阳性表达率与组织分化程度呈负相关, 在分化低的患者中表达率较高. 低分化癌组织中 P63 蛋白的阳性表达率高于中分化癌组织, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 中分化癌组织中 P63 蛋白的阳性表达率显著高于高分化癌组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 低分化癌组织中 P63 蛋白的阳性表达率显著高于高分化癌组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高、中、低分化癌组织宣威组与非宣威组相比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4.

2.5 P63 表达与淋巴结转移的关系

P63 在淋巴结转移组的阳性表达率高于无淋巴

结转移组, P63 在淋巴结转移组的阳性表达率为 89.66%, 在无淋巴结转移组的阳性表达率为 41.94% 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). P63 在淋巴结转移组阳性表达率, 宣威组与非宣威组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$). P63 在无淋巴结转移组阳性表达率, 宣威组与非宣威组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$). 陈洪雷^[9]等的研究同样发现 P63 蛋白表达与淋巴结转移有关, 见表 5.

2.6 P63 表达与性别的关系

P63 蛋白的表达与性别无关 ($P > 0.05$). P63 蛋白的表达宣威男性与非宣威男性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$). P63 蛋白的表达宣威女性与非宣威女性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$). 这与宋宇^[14]的研究结果一致, 见表 6.

表 1 P63 在非小细胞肺癌和正常肺组织中的表达 (n)

Tab. 1 Expression of P63 in NSCLC tissues and normal lung tissues (n)

组织类型	n	P63 蛋白		
		+	-	阳性率 (%)
非小细胞肺癌	60	49	11	81.67*
正常肺组织	60	3	57	5.00

与正常肺组织比较, * $P < 0.05$.

表 2 P63 在宣威、非宣威肺组织中的表达 (n)

Tab. 2 Expression of P63 in lung tissues of patients in Xuanwei and other regions (n)

分 类	n	P63 蛋白		
		+	-	阳性率 (%)
宣威鳞癌	13	10	3	76.92
宣威腺癌	17	9	8	52.94
宣威正常组织	30	2	28	6.66
非宣威鳞癌	14	12	2	85.71
非宣威腺癌	16	8	8	50.00
非宣威正常组织	30	1	29	3.33

表 3 P63 表达与临床分期的关系 (n)

Tab. 3 The correlation between P63 expression and clinical stages (n)

临床分期	n	P63 蛋白		
		+	-	阳性率 (%)
宣威 I 期	9	4	5	44.44
宣威 II 期	15	10	5	66.67
宣威 III 期	6	5	1	83.33*
非宣威 I 期	10	4	6	40.00
非宣威 II 期	16	12	4	75.00
非宣威 III 期	4	4	0	100.00*

与同组 I 期患者比较, * $P < 0.05$.

表 4 P63 表达与组织分化程度的关系 (n)

Tab. 4 The correlation between P63 expression and the tissue differentiation degree (n)

组织分化程度	n	P63 蛋白		
		+	-	阳性率 (%)
宣威高分化	9	3	6	33.33
宣威中分化	14	10	4	71.43*
宣威低分化	7	6	1	85.71*
非宣威高分化	10	4	6	40.00*
非宣威中分化	12	9	3	75.00*
非宣威低分化	8	7	1	87.50*

与同组高分化比较, * $P < 0.05$.

表 5 P63 表达与淋巴结转移的关系 (n)

Tab. 5 The correlation between P63 expression and lymph node metastasis (n)

淋巴结情况	n	P63 蛋白		
		+	-	阳性率 (%)
宣威有淋巴结转移	16	14	2	87.50
宣威无淋巴结转移	14	5	9	35.71*
非宣威有淋巴结转移	13	12	1	92.31
非宣威无淋巴结转移	17	8	9	47.06*

与同组有淋巴结转移比较, * $P < 0.05$.

表 6 P63 表达与性别的关系 (n)

Tab. 6 The correlation between P63 expression and gender (n)

性 别	n	P63 蛋白		
		+	-	阳性率 (%)
宣威男性	16	10	6	62.50
宣威女性	14	9	5	64.29
非宣威男性	14	9	5	64.29
非宣威女性	16	11	5	68.75

3 讨论

目前的研究提示, P63 与肿瘤的发生、发展具有显著的相关性^[16]. P63 是一种能激活或抑制多种基因表达的核转录因子^[3]. 它可以表达出两类亚型蛋白, 一类是 TAp63 亚型; 另一类是 Δ Np63 亚型^[17]. 这两类亚型蛋白以四聚体的形式组成 P63 蛋白^[18], 但组成方式尚不清楚, 其结构与功能的关系也不明晰, 需进一步的研究.

P63 作为 P53 家族的新成员, 它与 P53 具有高度同源性, 可以通过激活 P53 的靶基因, 参与 P53 介导的细胞信号转导途径^[4], 从而抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡. 那么 P63 是不是和 P53 一样, 是一种抑癌基因呢? 曾经是有争论的^[19]. 后来的研究发现, P63 生物学功能的表现, 是与它所表达的两

种亚型蛋白的结构和功能密切相关的, 如 P63 表达 TAp63 亚型, 因其能激活或抑制 P53 的靶基因, 从而发挥肿瘤抑制因子的功能^[17]; 如 P63 表达 Δ Np63 亚型, 因其缺乏 TA 区而不能诱导转录, 而不能发挥肿瘤抑制因子的功能, 但其却有 DNA 结合域, 可竞争 DNA 结合位点, 从而发挥负性调节的功能, 因此具有潜在癌基因的功能^[17,20].

宣威地区肺癌发病率显著高于非宣威地区, 本实验通过比较 P63 蛋白在宣威地区与非宣威地区非小细胞肺癌中的表达, 探究 P63 的表达在宣威地区有无特异性, 以探究宣威肺癌高发的原因.

本研究得出 P63 蛋白在非小细胞肺癌中的阳性表达率为 81.67% (49/60) 与正常肺组织 (3/60) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 P63 在非小细胞肺癌中作为癌基因而不是抑癌基因

起作用,与Choi等^[21]研究结果类似. P63的阳性表达率明显高于正常组织,充分说明了P63与非小细胞肺癌的发生、发展具有密切的相关性.

实验结果发现,鳞状细胞癌与腺癌相比较,P63在鳞状细胞癌中高表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),这提示P63与鳞状细胞癌发生关系密切.陈洪雷^[15]等应用免疫组化法研究发现P63蛋白在人非小细胞肺癌中的阳性表达率为80.0%,P63蛋白表达与肺癌的组织学类型和淋巴结转移有关,在肺鳞癌中阳性表达率显著高于腺癌,与本实验结果一致. Di Como等^[22]发现P63主要表达于基底细胞和鳞癌、转化细胞癌,而不是在腺癌包括乳腺和前列腺等,本文研究结果与之一致.

同时在TNM分期中,TNM分期越晚,P63表达越强.P63的表达与组织分化程度负相关,说明P63的高表达常提示非小细胞肺癌恶性程度高.P63与淋巴结转移情况正相关,则说明P63高表达常提示易于淋巴转移.所以P63的高表达提示预后差,其可用于判断非小细胞肺癌的恶性程度以及预后^[14].

实验结果发现,P63在非小细胞肺癌中在相同病理类型、分期、分化程度、淋巴结转移情况及性别的阳性表达率,宣威组与非宣威组比较,差异无统计学意义,表明虽然P63在非小细胞肺癌中作为癌基因而不是抑癌基因起作用,但是P63的表达在宣威并无地区特异性,说明P63的表达并不是宣威肺癌高发的原因.

P63在非小细胞肺癌中呈高表达,提示P63与非小细胞肺癌的发生、发展有密切的相关性.P63的表达可能与非小细胞肺癌的生长、浸润、转移有关,而与性别无关.P63在鳞癌中的表达显著高于腺癌,有助于鉴别诊断鳞癌与腺癌.非小细胞肺癌中P63在相同病理类型、分期、分化程度、淋巴结转移情况及性别的阳性表达率,宣威组与非宣威组比较,差异无统计学意义,表明P63的表达在宣威并无地区特异性,并不是宣威肺癌高发的原因.

[参考文献]

[1] SCHMALE H, BAMBERGER C. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53 [J]. *Oncogene*, 1997, 15(11): 1 363 - 1 367.

[2] FISHMAN S J, MULLIKEN J B. Hemangiomas and vascular malformations of infancy and childhood [J]. *Pediatr Clin North Am*, 1993, 40(6): 1 177 - 1 200.

[3] YANG A, KAGHAD M, WANG Y, et al. p63, a p53 homo-

logat 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities [J]. *Mol Cell*, 1998, 2(3): 305 - 316.

[4] 张超,代红艳,卿晋,等. P63基因的研究进展[J]. *皮肤病与性病*, 2012, 34(3): 142 - 144.

[5] KAELIN W G J R. The p53 gene family [J]. *Oncogene*, 1999, 18(53): 7 701 - 7 705.

[6] GLICKMAN J N, YANG A, SHAHSAFAEI A, et al. Expression of p53 related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders [J]. *Hum Pathol*, 2001, 32 (11): 1 157 - 1 165.

[7] SERBER Z, LAI HC, YANG A, et al. A C-terminal inhibitory domain controls the activity of P63 by an intramolecular mechanism [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(24): 8 601 - 8 611.

[8] 侯毅鞠,李艳,郭素红,等. p63基因的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2005, 26(4): 229 - 231.

[9] ITO Y, TAKEDA T, WAKASA K, et al. Expression of p73 and p63 proteins in pancreatic adenocarcinoma: p73 over-expression is inversely correlated with biological aggressiveness [J]. *Int J Mol Med*, 2001, 8 (1): 67 - 71.

[10] SERBER Z, LAI HC, YANG A, et al. A C-terminal inhibitory domain controls the activity of P63 by an intramolecular mechanism [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(24): 8 601 - 8 611.

[11] SUN T T, EICHNER R, SCHERMER A, et al. *The Cancer Cell* [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1984: 142 - 146.

[12] 吕任齐,赵体德. 云南省9县市肺癌死亡率趋势分析 [J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(12): 700 - 701.

[13] MORGUNKOVA A. The p53 gene family: control of cell proliferation and developmental programs [J]. *Biochemistry*, 2005, 70(9): 321 - 323.

[14] 宋宇. Survivin, p53, p63, p73, p21在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[D]. 苏州:苏州大学, 2007.

[15] 陈洪雷,陈福春,王敏,等. 人非小细胞肺癌组织p63和p73的表达及意义[J]. *肿瘤防治杂志*, 2003, 10(10): 1 015 - 1 018.

[16] VAN BOKHOVEN H, BRUNNER H G. Splitting P63 [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(1): 1 - 13.

[17] MANGIULLI M, VALLETTI A, CARATOZZOLO M F, et al. Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the p63 gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(18): 6 092 - 6 104.

[18] BELYI V A, LEVINE A J. One billion years of p53/p63/p73 evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106 (42): 17 609 - 17 610.

[19] SALLONE C, CAGGESE C, LANARE C, et al. Molecular clock and gene function [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57(1): 277 - 285.

[20] WEBER A, LANGHANKI L, SCHUTZ A, et al. Expression profiles of p53, p63 and p73 in benign salivary gland tumors [J]. *Virchows Arch*, 2002, 441(5): 428 - 436.

[21] CHOI H R, BATSAKIS J G, ZHAN F, et al. Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis [J]. *Hum Pathol*, 2002, 33(2): 158 - 164.

[22] DI COMO C J, URIST M J, BABAYAN I, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(2): 494 - 501.