

- crease invasion rate of tumor cells; a population study. *Breast Cancer Res Treat*,2008,110(1):39-49
  - 3 Chia J, Kusuma N, Anderson R, *et al.* Evidence for a role of tumor - derived laminin - 511 in the metastatic progression of breast cancer. *Am J Pathol*,2007,170(6):2135-2148
  - 4 Singletary SE, Allred C, Ashley P, *et al.* Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002,20:3628-3636
  - 5 Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor - beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol*,2002,118(2):211-215
  - 6 Baselga J, Rothenberg ML, Tabernero J, *et al.* TGF - beta signalling - related markers in cancer patients with bone metastasis. *Biomarkers*, 2008,13(2):217-236
  - 7 Biswas S, Guix M, Rinehart C, *et al.* Inhibition of TGF - beta with neutralizing antibodies prevents radiation - induced acceleration of metastatic cancer progression[J]. *J Clin Invest*, 2007,117(5):1305-1313
  - 8 Dong M, How T, Kirkbride K C, *et al.* The type III TGF - beta receptor suppresses breast cancer progression[J]. *J Clin Invest*, 2007,117(1):206-217
  - 9 Sheen - Chen SM, Chen HS, Sheen CW, *et al.* Serum Levels of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in Patients With Breast Cancer. *Arch Surg*, 2001,136(8):937-940
  - 10 Holler E. Laminin isoform expression in breast tumors. *Breast Cancer Res*,2005,7(4):166-167
  - 11 Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, *et al.* Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *J Cell Biol*,1983,97(6):1882-1890
  - 12 余莲,余丽珍,李玉闽. 中枢神经系统白血病患者治疗前后脑脊液中层黏蛋白、透明质酸水平变化的初步观察. *中华血液学杂志*, 2005,26(9):575
- (收稿:2010-01-18)  
(修回:2010-04-07)

# 胃癌细胞 P53、P16 蛋白表达与化疗药物敏感性的关系

耿 明 王 琳 刘晓红 曹永成 景洪标

**摘 要** **目的** 探讨胃癌对化疗药物的耐药性及其与 P53 和 P16 蛋白表达的关系。**方法** 收集 75 例新鲜胃癌标本,制备单细胞悬液,分别加入 HCPT、CDDP、ADM、5-FU 和 MMC 培养 48h,用 MTT 比色法检测胃癌细胞对化疗药物的敏感性;免疫组化技术检测 P53 和 P16 蛋白在胃癌组织中的表达。**结果** 胃癌细胞对不同化疗药物敏感性不同:5-FU ( $43.4 \pm 9.2$ )、CDDP ( $41.9 \pm 8.7$ ) 和 HCPT ( $40.6 \pm 8.3$ ) 对胃癌细胞的抑制率与 ADM ( $31.6 \pm 7.8$ ) 和 MMC ( $28.7 \pm 7.3$ ) 比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。胃癌组织中 P53 和 P16 蛋白的阳性率分别为 81.33% (61/75) 和 38.67% (32/75)。P53 阳性者显示对 5-FU、ADM、HCPT 有明显的体外耐药性 ( $P < 0.05$ ),P16 在 5-FU 和 CDDP 耐药组阳性率低于敏感组 ( $P < 0.05$ )。**结论** P53 和 P16 蛋白参与了胃癌对化疗药物原发性耐药的产生。MTT 药敏检测有助于筛选有效化疗药物。

**关键词** 胃肿瘤 化疗药物 敏感性 MTT 比色

**Relationship between Expression of P53, P16 and Chemosensitivity in Gastric Carcinoma.** Geng Ming, Wang Lin, Liu Xiaohong, Cao Yongcheng, Jing Hongbiao. Department of Pathology, General Hospital of Jinan Military Unit, Shandong 250031, China

**Abstract Objective** To investigate the relationship between expression of P53, P16 and sensitivity to chemotherapeutic drugs in gastric carcinoma. **Methods** 75 samples of gastric cancer obtained from operating room were prepared to single-cell suspension and separately exposed to HCPT, CDDP, 5-Fu, ADM, MMC for 48 hours. The sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs was evaluated with MTT assay. Expression of P53 and P16 was detected by immunohistochemistry. **Results** The sensitivity of gastric carcinoma cells to chemotherapeutic drugs was different. Inhibitory rate of tumor cells exposed to 5-FU ( $43.4 \pm 9.2$ ), CDDP ( $41.9 \pm 8.7$ ) and HCPT ( $40.6 \pm 8.3$ ) were significantly higher than those of cells exposed to ADM ( $31.6 \pm 7.8$ ) and MMC ( $28.7 \pm 7.3$ ) ( $P < 0.05$ ). Positive rate of P53 and P16 in gastric cancer was 81.33% and 38.67% respectively. P53 positive cells showed resistance to 5-FU, ADM and HCPT. P16 expression was significantly lower in the resistance to 5-FU and CDDP than that in the the sensitivity. **Conclusion** P53 and P16 may contribute to primary drug-resistance of gastric cancer. MTT chemosensitivity test could constitute the prediction on ap-

基金项目:济南军区“十一五”计划课题(J115Z004)

作者单位:250031 济南军区总医院病理科

通讯作者:耿明,电子信箱:gm2227@sina.com

plying chemo - drugs and identify drug - resisting cases.

**Key words** Gastric neoplasms; Chemotherapeutic - drugs; Sensitivity; MTT colorimetric assay

化疗在胃癌治疗中占有重要的地位。由于多种耐药基因的存在和表达,多数胃癌的化疗效果仍不理想。因此对胃癌化疗敏感性和耐药性的研究越来越受到重视<sup>[1-3]</sup>。我们取手术切除的新鲜胃癌标本,进行体外培养,用 MTT 比色法检测胃癌细胞对羟基喜树碱(HCPT)、阿霉素(ADM)、顺铂(CDDP)、5-氟尿嘧啶(5-FU)和丝裂霉素(MMC)5种化疗药物的敏感性,并用免疫组化法检测 P53 和 P16 蛋白在胃癌组织中的表达,分析其与胃癌化疗药物敏感性的关系,进一步阐明胃癌原发性耐药发生的相关因素。

### 材料与方法

1. 标本收集和制备:收集济南军区总医院 2006 年 4 月~2007 年 2 月手术切除的 81 例胃癌新鲜标本。男性 47 例,女性 37 例,年龄 29~78 岁,中位年龄 56 岁。所有标本术前均未行放、化疗。肿瘤离体后,从无坏死部位取材,用酸性离子水冲洗,置于 Hanks 液无菌小瓶中, PBS 冲洗 3 次,剪成糊状,200 目铜网过滤,1000r/min 离心 5min,移去上清,Hanks 液漂洗 2 次,10%胎牛血清 RPMI-1640 培养液重悬,以 0.4%台盼蓝染液计数,调整单细胞悬液至活细胞浓度  $3 \times 10^5/\text{ml}$ 。

2. MTT 药物敏感试验:本组细胞培养成功 75 例,成功率 93.75% (75/81)。取单细胞悬液滴入 96 孔培养板,每孔 180 $\mu\text{l}$ 。药敏检测方法按照参考文献报道方法<sup>[4]</sup>。判断标准:将 MTT 检测结果中抑制率 < 30% 者判为耐药,  $\geq 30\%$  者判为敏感,30%~50% 为中度敏感, > 50% 为高度敏感。

3. 免疫组化染色:免疫组化染色用 SP 法。一抗鼠抗人 P53 和 P16 单克隆抗体均购自中杉生物公司,按试剂盒说明书操作,用生理盐水代替一抗做阴性对照。结果判断标准:P53 和 P16 蛋白阳性表达为在细胞核内出现棕色颗粒。高倍镜下取 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,阳性细胞数  $\geq 25\%$  为 (+)。

4. 统计学处理:用 SPSS 11.5 统计包进行处理,单因素方差分析 (ANOVA) 进行多个样本均数间的显著性检验,用 spearman 等级相关进行两变量间的相关性分析。  $P < 0.05$  视觉差异具有统计学意义。

### 结 果

1. 化疗药物作用后胃癌细胞形态改变和 MTT 药敏检测结果:81 例胃癌标本,培养成功 75 例,成功率 93.75% (75/81)。经不同化疗药物作用后,倒置显微镜下观察见肿瘤细胞数量减少,活力下降,严重者失去贴壁能力,胞质内空泡增加,细胞碎片形成,形态完整性受破坏。MTT 检测显示,5 种药物的平均抑制率依次为:5-FU ( $43.4\% \pm 9.2\%$ )、CDDP ( $41.9\% \pm$

$8.7\%$ )、HCPT ( $40.6\% \pm 8.3\%$ )、ADM ( $31.6\% \pm 7.8\%$ )、MMC ( $28.7\% \pm 7.3\%$ )。经统计学分析,5-FU、CDDP 及 HCPT 间的平均抑制率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),但与 ADM、MMC 比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,表 1)。

表 1 75 例胃癌培养细胞 MTT 药敏检测结果

|      | 敏感性[ $n(\%)$ ] |           |           | 平均抑制率<br>( $\%, \bar{x} \pm s$ ) |
|------|----------------|-----------|-----------|----------------------------------|
|      | 高              | 中         | 低         |                                  |
| HCPT | 7(9.33)        | 25(33.33) | 43(57.33) | $40.6 \pm 8.3^*$                 |
| CDDP | 7(9.33)        | 26(34.67) | 42(56.00) | $41.9 \pm 8.7^*$                 |
| 5-FU | 9(12.00)       | 29(38.67) | 37(49.33) | $43.4 \pm 9.2^*$                 |
| ADM  | 4(5.33)        | 27(36.00) | 44(58.67) | $31.6 \pm 7.8$                   |
| MMC  | 3(4.00)        | 25(33.33) | 47(62.67) | $28.7 \pm 7.3$                   |

\* 与 ADM、MMC 比较,  $P < 0.05$

2. P53 和 P16 蛋白在胃癌中的表达及与胃癌耐药性的关系:在 75 例胃癌组织中,P53 和 P16 蛋白阳性率分别为 81.33% (61/75) 和 38.67% (32/75)。其中在 5-FU、ADM 和 HCPT 耐药组中,P53 蛋白阳性率分别为 91.89% (34/37) 和 90.90% (40/44) 和 90.70% (39/43),显著高于 3 种药物敏感组 71.05% (27/38),67.74% (21/31) 和 68.75% (22/32) P53 蛋白的表达,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),P53 与 5-FU、ADM 和 HCPT 的体外耐药性明显相关(表 2)。P16 蛋白在 5-FU 和 CDDP 耐药组中的阳性率为 21.62% (8/37) 和 23.80% (10/42),显著低于敏感组 63.16% (24/38)、66.67% (22/33),差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,表 3)。P16 与 5-FU 和 CDDP 体外耐药性相关。

表 2 P53 蛋白表达与 MTT 检测结果的关系

| 药物   | $n$ | P53 表达    |           | $\chi^2$ | $P$   |
|------|-----|-----------|-----------|----------|-------|
|      |     | 阳性( $n$ ) | 阴性( $n$ ) |          |       |
| HCPT | 耐药  | 43        | 39        | 6.271    | 0.013 |
|      | 敏感  | 32        | 22        |          |       |
| CDDP | 耐药  | 42        | 35        | 0.827    | 0.646 |
|      | 敏感  | 33        | 26        |          |       |
| 5-FU | 耐药  | 37        | 34        | 7.629    | 0.025 |
|      | 敏感  | 38        | 27        |          |       |
| ADM  | 耐药  | 44        | 40        | 4.350    | 0.009 |
|      | 敏感  | 31        | 21        |          |       |
| MMC  | 耐药  | 47        | 39        | 0.985    | 0.841 |
|      | 敏感  | 28        | 22        |          |       |

表 3 P16 蛋白表达与 MTT 检测结果的关系

| 药物   | <i>n</i> | P16 表达         |                | $\chi^2$ | <i>P</i> |
|------|----------|----------------|----------------|----------|----------|
|      |          | 阳性( <i>n</i> ) | 阴性( <i>n</i> ) |          |          |
| HCPT | 耐药       | 43             | 17             | 0.814    | 0.732    |
|      | 敏感       | 32             | 15             |          |          |
| CDDP | 耐药       | 42             | 10             | 9.320    | 0.016    |
|      | 敏感       | 33             | 22             |          |          |
| 5-FU | 耐药       | 37             | 8              | 8.128    | 0.025    |
|      | 敏感       | 38             | 24             |          |          |
| ADM  | 耐药       | 44             | 17             | 0.850    | 0.479    |
|      | 敏感       | 31             | 15             |          |          |
| MMC  | 耐药       | 47             | 19             | 0.783    | 0.636    |
|      | 敏感       | 28             | 13             |          |          |

讨 论

用 MTT 比色法,检测了 5 种化疗药物对胃癌原代培养细胞的抑制率,结果显示,不同化疗药物对胃癌细胞抑制率不同;胃癌对化疗药物的耐药性存在个体差异,即使组织学类型、分化程度相同的病例,对同一种药物的敏感性不尽相同,且 HCPT、5-FU、ADM 及 CDDP 对胃癌细胞的抑制与胃癌组织病理学类型有关。推测化疗药物主要作用处于增生期的细胞,肿瘤分化程度越低,细胞群体中处于增生阶段(S 期 + G<sub>2</sub> 期)的细胞比例越多,因此低分化的胃癌细胞对化疗药物的敏感性高于高分化的胃癌细胞。

化疗药物对肿瘤细胞的作用之一就是诱导凋亡的发生。但多数患者对化疗药物并不敏感,这种对多种分子结构不同、作用机制各异的抗肿瘤药物产生的交叉耐药性成为多药耐药性,其本质是肿瘤细胞对抗化疗药物诱导的细胞凋亡。许多癌基因和抑癌基因不仅参与了恶性肿瘤形成,亦参与了肿瘤细胞的耐药,在肿瘤的多药耐药中也起着至关重要的作用<sup>[5]</sup>。p53 基因为肿瘤抑制基因,当该基因发生突变时,对细胞凋亡的调控作用受阻,导致肿瘤细胞对化疗药物产生耐受性。用免疫组化方法检测到的 P53 蛋白是突变型 p53 基因产生。本研究结果显示,突变型 P53 蛋白在胃癌对 5-FU、AMD 和 HCPT 耐药组中呈高

表达,提示其参与了其耐药性的发生。有研究显示肿瘤组织中 P53 和 P-gp 常同时表达<sup>[6]</sup>。因此我们推测,突变型 p53 可通过抑制细胞凋亡能和促进 MDR 基因的激活至少两种途径介入了胃癌耐药的发生。

p16 基因参与细胞生长增生的负调节,p16 基因的失活可导致 P16 蛋白的表达异常。p16 还直接对抗凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达,有研究表明 Bcl-2 与肿瘤的耐药性有关,可能是一种新的耐药基因<sup>[7]</sup>。因此在胃癌 P16 表达的下调降低了胃癌对化疗药物的敏感性。本研究结果进一步证实,P16 蛋白与 5-FU 和 CDDP 的耐药性关系更密切,可能与药物作用机制等因素有关,提示对 P16 阳性的胃癌患者应避免使用上述两类抗癌药物。

参考文献

- 1 耿明,尹迎春,曹永成,等. 化疗药物对原代胃癌细胞的体外杀伤效应及其与端粒酶逆转录酶 mRNA 表达的关系. 中华肿瘤杂志, 2007,29(11):838-841
- 2 Zhang D, Fan N. Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges. Expert Rev Anticancer Ther, 2007,7(10):1369-1378
- 3 杨皎娃,牛建花,曾季平,等. 胃癌多药耐药细胞株 BGC823/5-FU 的建立及其耐药机制的研究. 中国病理生理杂志, 2008,24(11):2167-2170
- 4 耿明,尹迎春,曹永成,等. 化疗药物对原代胃癌细胞的体外杀伤效应及其与 Bcl-2 表达的关系. 中华胃肠外科杂志, 2008,11(3):276-279
- 5 Carneiro F, Oliveira C, Ijeite M, et al. Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. Semin Diagn Pathol, 2008,25(4):274-287
- 6 Angelo C, Giuseppina B, Cristina E, et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. Cell, 2009, 138(18):1083-1095
- 7 Xiao Yonglei, Miao Zhong, Lan Fangfeng, et al. Bcl-XL small interfering RNA enhanced sensitivity of Hepg2 hepatocellular carcinoma cells to 5-Fluorouracil and hydroxycamptothecin. Acta Biochim Biophys Sin, 2006, 38: 704-710

(收稿:2010-01-26)

(修回:2010-04-05)

《医学研究杂志》诚聘审稿专家启事

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》),是由卫生部主管,中国医学科学院主办的国家级医学学术类杂志。中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊。为进一步提升杂志质量,充分发挥《医学研究杂志》在我国医学领域中的前沿与导向作用,经本刊研究决定,邀请相关领域专家担任本刊审稿人。真诚地希望各位专家在百忙之中抽出时间登陆《医学研究杂志》网站:www.yxyjzz.cn,并通过主页左侧工具栏“专家审稿”版块进行注册。从 2010 年开始,本杂志将开展网上审稿。届时,我们会将相关领域的稿件让您审阅,并定期付给您审稿费。审稿相关信息提示会通过您在采编系统中留下的电子信箱发送给您。您可以按照邮件提示,登录采编平台对稿件进行处理、审阅。再次对您的支持表示感谢!如有疑问,请拨打咨询电话:010-52328679(单政)。

《医学研究杂志》编辑部