

# P16 和 P15 在恶性黑色素瘤中的表达及其临床意义

陈铨栩 陈湾湾 张 普 罗晓智 赵志光

**摘要** 目的 探讨 P16 和 P15 在恶性黑色素瘤中的表达及其临床意义。方法 采用 SP 法免疫组化检测 66 例恶性黑色素瘤组织中 P16、P15 的表达情况,统计患者的临床资料分析其表达与临床特征的相关性,采用 Kaplan - Meier 曲线对随访数据进行预后分析。结果 恶性黑色素瘤中 P16( $\chi^2 = 33.470, P = 0.000$ )、P15( $\chi^2 = 51.603, P = 0.000$ )的表达率均显著低于皮内痣组织。恶性黑色素瘤中 P16 的阳性表达水平与肿瘤浸润深度( $\chi^2 = 17.888, P = 0.000$ )、淋巴结转移( $\chi^2 = 5.561, P = 0.018$ )和 Ki - 67 增殖指数( $\chi^2 = 7.108, P = 0.008$ )呈负相关;P15 的阳性表达水平与肿瘤浸润深度( $\chi^2 = 9.156, P = 0.000$ )、淋巴结转移( $\chi^2 = 8.817, P = 0.003$ )、远处转移( $\chi^2 = 4.970, P = 0.026$ )和 Ki - 67 增殖指数( $\chi^2 = 15.422, P = 0.000$ )呈负相关。P16、P15 表达阴性的患者,中位总体生存期明显短于表达阳性的患者(14.0 个月 vs 28.6 个月,  $P = 0.025$ ; 14.0 个月 vs 33.4 个月,  $P = 0.003$ )。结论 P16 和 P15 可能在恶性黑色素瘤的发生和发展中起负性作用,可以作为鉴别恶性黑色素瘤和良性黑素细胞病变的指标,也可能对 MM 患者的预后有一定的指导意义。

**关键词** 恶性黑色素瘤 P16 P15 预后分析

中图分类号 R739.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.033

**Expression and Clinical Significance of P16 and P15 in Malignant Melanoma.** Chen Quanxu, Chen Wanwan, Zhang Pu, et al. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

**Abstract Objective** To investigate the expression and significance of P16 and P15 in malignant melanoma. **Methods** SP immunohistochemistry was used to detect the expression of P16 and P15 in 66 malignant melanoma. The clinical data were collected to analyze the relationship between the expression and clinical characteristics. Kaplan - Meier curves were used to conduct survival analysis of follow - up data. **Results** The expression of P16( $\chi^2 = 33.470, P = 0.000$ ) and P15( $\chi^2 = 51.603, P = 0.000$ ) in malignant melanoma were both significantly lower than those of intradermal nevus. There was negative correlation between the expression of P16 and tumor infiltration depth( $\chi^2 = 17.888, P = 0.000$ ), lymph node metastasis( $\chi^2 = 5.561, P = 0.018$ ) and Ki - 67( $\chi^2 = 7.108, P = 0.008$ ), and there was negative correlation between the expression of P15 and tumor infiltration depth( $\chi^2 = 9.156, P = 0.000$ ), lymph node metastasis( $\chi^2 = 8.817, P = 0.003$ ), distant metastasis( $\chi^2 = 4.970, P = 0.026$ ) and Ki - 67( $\chi^2 = 15.422, P = 0.000$ ). The median survival time of patients with negative expression of P16 and P15 was significantly shorter than that of patients with positive expression in malignant melanoma (14.0 months vs 28.6 months,  $P = 0.025$ ; 14.0 months vs 33.4 months,  $P = 0.003$ ). **Conclusion** P16 and P15 may play a negative role in the occurrence and development of malignant melanoma. They can be used as a molecular marker for differential diagnosis of malignant melanoma and benign melanocyte lesions, and may be helpful for the prognosis of patients with malignant melanoma.

**Key words** Malignant melanoma; P16; P15; Survival analysis

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是起源于表皮黑素细胞的高度恶性肿瘤,其转移性强、发展迅速、预后差及病死率高<sup>[1]</sup>。近年来世界范围内的黑色素瘤的发生率呈逐年增加的趋势,发病年龄也逐渐年轻化,相应的病死率也随之增加<sup>[2,3]</sup>。MM 发病机制目前尚不明确,大多数 MM 存在 BRAF 基因突变, BRAF 基因突变与 MM 发生、发展和预后密切相关<sup>[4]</sup>。另有研究显示,大部分的痣长到 3 ~ 5mm 会进

入生长停滞,只有一小部分色素痣有重新获得增殖并形成黑色素瘤的能力<sup>[5]</sup>。而原癌基因诱导的停滞与由 CDKN2A 和 CDKN2B 基因编码的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 P16 和 P15 的表达相关。

本研究应用链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶连接法(streptavidin - peroxidase, SP 法)免疫组化检测 66 例 MM 组织中 P16、P15 的表达情况,并进行相关因素分析和预后分析,探讨 P16、P15 在 MM 中的临床意义。

## 材料与方法

1. 标本来源:收集温州医科大学附属第二医院

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院

通讯作者:赵志光,电子邮箱:zhaozhiguang1999@163.com

2013年1月~2018年1月经病理科确诊为恶性黑色素瘤的患者。纳入及排除标准为:(1)患者病理诊断明确,相关MM免疫组化指标支持,排除可疑性病理诊断及混合其他恶性成分的病理诊断。(2)患者肿瘤均行手术根治,术前未行抗肿瘤治疗。(3)患者临床资料完整,预后分析时排除随访时间不足1年失访的患者。共纳入66例MM的组织标本作为实验组,另设60例同一时期诊断为皮内痣的组织标本作为对照组。

2. 研究方法:将所有标本选取病变区域制成组织芯片。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP法)进行免疫组化。大致过程:切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡水化,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶(北京中杉金桥公司)室温孵育1h,柠檬酸修复液微波加热修复10min并冷却至室温,非免疫血清(北京中杉金桥公司)室温封闭3h,鼠抗人P16、P15抗体(英国Abcam公司)按1:200稀释后4℃冰箱孵育过夜,二抗(北京中杉金桥公司)室温孵育1h,辣根酶标记链霉卵白素工作液(北京中杉金桥公司)室温孵育1h,DAB试剂(北京中杉金桥公司)显色,苏木精中核复染,梯度乙醇及二甲苯中脱水,中性树胶封片。统计患者的临床及病理资料,包括性别、肿瘤部位、确诊年龄、肿瘤直径、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移、Ki-67增殖指数和BRAF V600E基因突变情况等。主要通过电话以及住院观察随访,截止时间为2019年6月,生存期以月为单位。

3. 免疫组化结果判定:P16、P15阳性表现为黄色颗粒,主要定位于细胞核,部分细胞质也有少量表达。由两位病理科医生进行双盲阅片,随机观察5个高倍视野(×400)进行结果判定:(1)阳性细胞占总细胞数的比率评分:0~10%为0分,10%(不含)~25%为1分,25%(不含)~50%为2分,>50%为3分。(2)着色深度评分:不着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,褐黄色为3分。依据阳性细胞占总细胞数的比率×着色深度得出总分进行判定:<3分为阴性(-),≥3分为阳性(+)

4. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行统计分析。计数资料采用卡方检验;预后分析采用Kaplan-Meier曲线,生存率比较采用Log-rank检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 结 果

1. P16、P15在恶性黑色素瘤与皮内痣组织中的表达情况:P16在恶性黑色素瘤和皮内痣组织的阳性表达

率分别为30.3%和81.7%;P15在MM和皮内痣组织的阳性表达率分别为22.7%和86.7%。MM中的P16( $\chi^2 = 33.470$ ,  $P = 0.000$ )和P15( $\chi^2 = 51.603$ ,  $P = 0.000$ )阳性表达率均明显低于皮内痣,详见图1、表1。

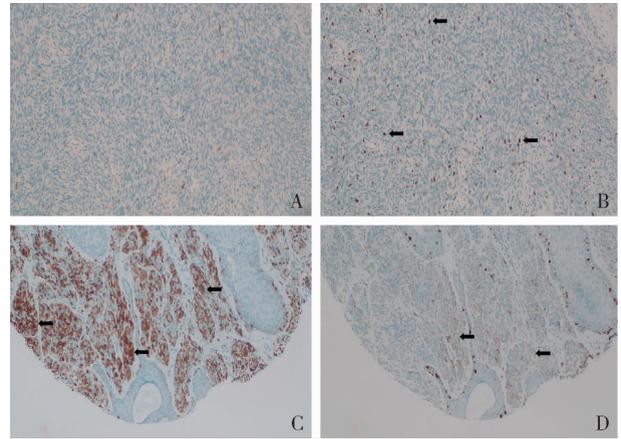


图1 P16、P15在MM与皮内痣组织中的表达(SP法,×200)

A、B. MM组织中P15、P16的表达;C、D. 皮内痣组织中P15、P16的表达。箭头所指为细胞核及细胞质染色。根据免疫组化结果判定:A(-)、B(-)、C(+)、D(-)

表1 P16、P15在MM与皮内痣组织中的表达(n)

项目	P16			P15		
	(+)	(-)	阳性率(%)	(+)	(-)	阳性率(%)
MM	20	46	30.3	15	51	22.7
皮内痣	49	11	81.7	52	8	86.7

2. P16、P15在MM中的表达与临床特征的关系:MM组织中P16的阳性表达水平与肿瘤浸润深度( $\chi^2 = 17.888$ ,  $P = 0.000$ )、淋巴结转移( $\chi^2 = 5.561$ ,  $P = 0.018$ )和Ki-67增殖指数( $\chi^2 = 7.108$ ,  $P = 0.008$ )呈负相关,而与性别、肿瘤部位、确诊年龄、肿瘤直径、远处转移和BRAF V600E基因突变无关( $P$ 均>0.05)。P15的阳性表达水平与肿瘤浸润深度( $\chi^2 = 9.156$ ,  $P = 0.000$ )、淋巴结转移( $\chi^2 = 8.817$ ,  $P = 0.003$ )、远处转移( $\chi^2 = 4.970$ ,  $P = 0.026$ )和Ki-67增殖指数( $\chi^2 = 15.422$ ,  $P = 0.000$ )呈负相关,而与性别、肿瘤部位、确诊年龄、肿瘤直径和BRAF V600E基因突变无关( $P$ 均>0.05),详见表2。

3. MM中P16与P15表达水平的相关性:MM中P16与P15表达水平呈高度正相关( $r = 0.744$ ),详见表3。

表2 P16、P15在MM中的表达与临床特征的关系(n)

项目	P16				P15			
	(+)	(-)	$\chi^2$	P	(+)	(-)	$\chi^2$	P
性别								
男性	13	29	0.023	0.879	11	31	0.789	0.374
女性	7	17			4	20		
肿瘤部位								
头颈部	11	25	1.151	0.562	9	27	0.266	0.876
躯干部	2	9			2	9		
肢端	7	12			4	15		
确诊年龄(岁)								
<40	10	31	2.393	0.302	9	32	0.560	0.756
40~60	8	10			5	13		
>60	2	5			1	6		
肿瘤直径(cm)								
<1	7	13	0.745	0.689	6	14	1.184	0.553
1~3	10	22			7	25		
>3	3	11			2	12		
肿瘤浸润深度(mm)								
<0.75	16	12	17.888	0.000	11	17	9.156	0.000
0.75~1.50	4	19			4	19		
>1.50	0	15			0	15		
淋巴结转移								
无	15	20	5.561	0.018	13	22	8.817	0.003
有	5	26			2	29		
远处转移								
无	15	26	2.023	0.155	13	28	4.970	0.026
有	5	20			2	23		
Ki-67增殖指数								
<10%	11	10	7.108	0.008	11	10	15.422	0.000
≥10%	9	36			4	41		
BRAF V600E 基因突变*								
无	2	8	0.472	0.492	0	10	3.163	0.075
有	16	36			13	39		

\* BRAF 基因检测时有 4 例组织因标本量太少无法检测

表3 MM中P16与P15表达水平的相关性(n)

P15	P16	
	(+)	(-)
(+)	14	1
(-)	6	45

4. P16、P15在MM中的表达与预后的关系:66例MM患者中,有3例患者在后期随访过程中失访,最后共纳入63例患者进行预后分析;其中58例死亡,5例随访截止时仍存活。患者总体中位生存期为22.3个月,95% CI为13.523~31.077,1年、2年和3年生存率分别为82.5%、42.9%和21.9%。P16表达阴性的患者,中位总体生存期明显短于表达阳性的患者(14.0个月 vs 28.6个月),差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.033, P = 0.025$ )。P15表达阴性的患者,中位总体生存期明显短于表达阳性的患者(14.0个月

vs 33.4个月),差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.949, P = 0.003$ ),详见图2。

### 讨 论

恶性黑色素瘤是恶性程度最高的皮肤肿瘤之一,大多数具有很强的侵袭性,较早发生转移,预后极差。虽然我国发生率相对较低,但近年来发生率呈快速增长趋势,已成为严重威胁生命健康的恶性疾病之一<sup>[6]</sup>。

P16基因位于染色体9p21上,是发现的第一个直接参与细胞周期调控的肿瘤抑制基因,与肿瘤的发生、发展过程密切相关<sup>[7]</sup>。其表达产物P16INK4A可与CNK4和CNK6特异性结合,阻碍其与细胞蛋白D1形成复合物,使RB磷酸化受阻,使细胞停留在G<sub>1</sub>期,无法进入S期,抑制肿瘤的增殖<sup>[8,9]</sup>。P15是CKI中INK4家族成员之一,它通过抑制CyclinD-CDK,

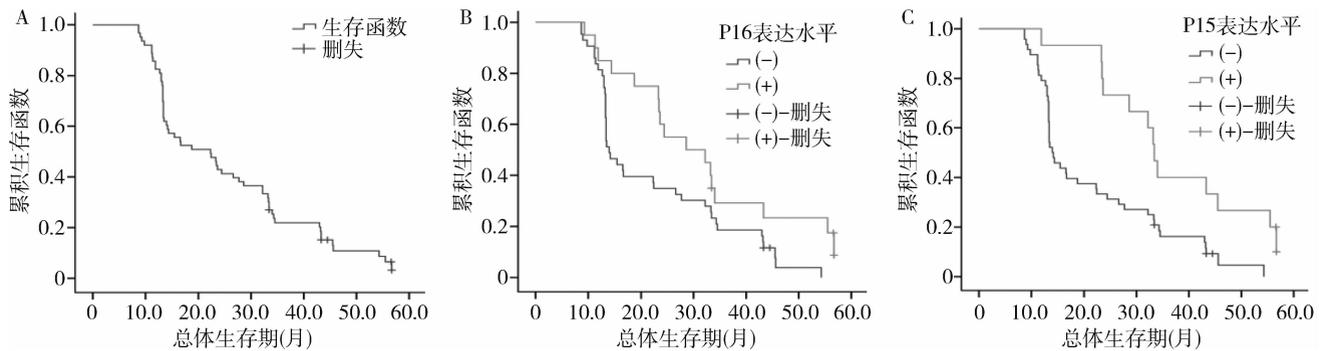


图2 P16、P15在MM中的表达与预后的关系

A. MM患者总体生存期曲线; B. 不同P16表达水平的MM患者总体生存期曲线; C. 不同P15表达水平的MM患者总体生存期曲线

将细胞阻断在G<sub>1</sub>期<sup>[10]</sup>。当P16、P15基因突变或失活时,P16、P15表达下调,细胞周期无法调控,以致细胞无限生长从而发生肿瘤。临床上,大多数痣长到3~5mm通常会退出增生期进入生长停滞状态。虽然大多数痣仍处于生长停滞状态(甚至在高龄时段消退),但有一小部分痣存在重新获得增殖并形成黑色素瘤的能力<sup>[11]</sup>。癌基因诱导的停滞是由细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂CDKN2A编码的P16和CDKN2B编码的P15高表达促进的<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,P16和P15在MM中表达均下调,可能对鉴别MM和良性黑色素细胞病变具有诊断价值。虽然MM中P16和P15的表达呈高度正相关,但相比较而言,P15的表达下调更显著,可能成为诊断MM更可靠的生物学标志物之一,这也与Ma等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。

MM的分期与肿瘤的直径、浸润深度、淋巴结转移和远处转移相关。P16、P15的表达水平与肿瘤的直径并无明显相关性,可能的原因是本研究应用的组织芯片只包括部分肿瘤组织,对于较大的肿瘤有一定局限性。随着病变浸润深度的增加和淋巴结转移,P16、P15的表达逐渐下降,表明两者可能与MM的侵袭与淋巴结转移能力相关,可能的机制是P16、P15基因突变或失活时,细胞周期失去抑制,导致细胞无限生长以致肿瘤侵袭性和转移性增强。Su等<sup>[14]</sup>研究也显示,在结膜恶性黑色素瘤中P16的表达水平与肿瘤的侵袭能力呈负相关。同时,P15的表达与MM发生远处转移呈负相关,表明在预测MM发生远处转移方面,P15更有优势。另外,表面有无破损也是肿瘤分期的指标之一,然而大部分患者数据缺失,因此并无纳入本研究。Ki-67是一种细胞增殖相关的核抗原,可以反映肿瘤的增殖、浸润、转移和预后等。本研究以10%为临界点,得出P16、P15的表达与Ki-67增殖指数呈负相关;P16、P15表达缺失,肿瘤细胞

增殖更活跃,可能通过多种机制增强肿瘤的侵袭能力。BRAF基因突变是MM最常见的突变方式,主要是BRAF V600E突变,平均突变率为60%~80%,与MM发生、发展和预后密切相关。Mackiewicz - Wysocka等<sup>[7]</sup>研究显示,色素痣P16的表达水平在BRAF突变型中更高,恶性黑色素瘤P16的表达水平在BRAF突变型中更低。而本研究显示,P16的表达水平与BRAF基因无明显相关性,可能的原因是痣细胞增殖被BRAFFV600E瞬时激活,BRAFFV600E也诱导P16表达来停止黑色素细胞增殖<sup>[15]</sup>。

国内外关于P16、P15与预后的关系,争议很大。本研究显示,P16与P15的表达水平均与MM的总体生存期呈正相关。P16与P15的表达水平下调,肿瘤细胞增殖更活跃,侵袭能力与转移能力更强,因而患者的预后不佳。吴晓雯等<sup>[16]</sup>研究也显示,P16 INK4A基因突变会阻碍与CNK4和CNK6特异性结合,从而肿瘤增殖更活跃,生存期更短。但是,Chen等<sup>[17]</sup>研究显示,P16高表达预示黏膜黑色素瘤有较差的生存期;Sanki等<sup>[18]</sup>研究显示,P16的表达与皮肤黑色素瘤的生存期无关。这种争议,可能与纳入的患者的分期以及治疗不同有关,有待于增加样本量进一步研究。

本研究收集了笔者医院近5年的MM患者66例,样本量仍偏少;随访过程中,有3例(4.5%)患者失访;随访截止时,有5例(7.9%)患者仍存活,这对研究结果产生一定的误差。因此,笔者还会进一步纳入相关患者,延长随访时间,以得到更为可靠的结果<sup>[19]</sup>。

综上所述,P16、P15可能在恶性黑色素瘤的发生和发展中起负性作用,可以作为鉴别MM和良性黑色素细胞病变的指标,也可能对MM患者的预后具有一定的指导意义。

参考文献

- 1 Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells[J]. *Neoplasma*, 2016, 63(4): 510 - 517
- 2 Naidoo C, Kruger CA, Abrahamse H. Simultaneous photodiagnosis and photodynamic treatment of metastatic melanoma[J]. *Molecules*, 2019, 24(17):3153
- 3 Bomar L, Senithilnathan A, Ahn C. Systemic therapies for advanced? melanoma[J]. *Dermatol Clin*, 2019, 37(4):409 - 423
- 4 Dumaz N, Jouenne F, Delyon J, et al. Atypical BRAF and NRAS mutations in mucosal melanoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1133
- 5 Mcneal AS, Liu K, Nakhate V, et al. CDKN2B loss promotes progression from benign melanocytic nevus to Melanoma[J]. *Cancer Discovery*, 2015, 5(10):1072
- 6 陈柳含, 张洋洋, 李先安. 肢端恶性黑色素瘤临床特征及预后因素分析[J]. *中国癌症*, 2019, 29(5):362 - 371
- 7 Mackiewicz - Wysocka M, Czerwińska P, Filas V, et al. Oncogenic BRAF mutations and p16 expression in melanocytic nevi and melanoma in the Polish population Postepy Dermatol Alergol[J]. *Advances in Dermatology & Allergology*, 2017, 34(5): 490 - 498
- 8 Tyagi E, Liu B, Li C, et al. Loss of p16INK4A stimulates aberrant mitochondrial biogenesis through a CDK4/Rb - independent pathway Oncotarget[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 55848 - 55862
- 9 Garola R, Singh V. Utility of p16 - Ki - 67 - HMB45 score in sorting benign from malignant Spitz tumors[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(10):152550
- 10 Laura A, Taylor, Conor O'Day, et al. P15 expression differentiates nevus from melanoma[J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(12): 3094 - 3099
- 11 Koh SS, Roehmholdt BF, Cassarino DS. Immunohistochemistry of p16 in nevi of pregnancy and nevoid melanomas[J]. *J Cutaneous Pathol*, 2018, 45(12):891 - 896
- 12 Mcneal AS, Liu K, Nakhate V, et al. CDKN2B loss promotes progression from benign melanocytic nevus to melanoma[J]. *Cancer Discovery*, 2015, 5(10):1072
- 13 Ma SA, O'Day CP, Dentchev T, et al. Expression of p15 in a spectrum of spitzoid melanocytic neoplasms[J]. *J Cutan Pathol*, 2019, 46(5):310 - 316
- 14 Su FF, Chen JL. Expression and clinical significance of p16 and Ki - 67 in malignant melanoma of the conjunctiva[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2019, 33(3):821 - 825
- 15 Tschandl P, Berghoff AS, Preusser M, et al. Impact of oncogenic BRAF mutations and p16 expression on the growth rate of early melanomas and nevi in vivo[J]. *Br J Dermatol*, 2015, 174(2):364 - 370
- 16 吴晓雯, 闫君雅, 代杰, 等. 中国 134 例黑色素瘤患者 P16INK4a、CDK4 和 CCND1 基因突变及其临床意义[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(2):153 - 157
- 17 Chen HB, Li YY, Long Y, et al. Increased p16 and p53 protein expression predicts poor prognosis in mucosal melanoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 53226 - 53233
- 18 Sanki A, Li W, Colman M, et al. Reduced expression of p16 and p27 is correlated with tumour progression in cutaneous melanoma[J]. *Pathology*, 2007, 39(6): 551 - 557
- 19 黄鲁众, 张晓晔, 崔国元, 等. 43 例局限期小细胞肺癌术后预后分析[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(5):94 - 98

(收稿日期:2019 - 10 - 24)

(修回日期:2019 - 11 - 10)

## 核受体 Nur77 对卵巢癌细胞增殖转移的影响及机制研究

姜 平 杨喜科 王秋宇

**摘要** 目的 研究核受体 Nur77 对卵巢癌细胞增殖转移能力的影响及其作用机制。方法 以人高转移性卵巢癌细胞株 HO - 8910PM 为疾病模型,利用慢病毒载体转染构建 HO - 8910PM(Nur77 - / - )细胞株,下调 Nur77 的表达。利用 Nur77 激动剂壳囊孢酮 B(Csn - B)处理细胞做比较研究。按不同的实验细胞和处理方式设 4 个组别进行研究,对照组为转染空载体的 HO - 8910PM 细胞,研究组为 HO - 8910PM(Nur77 - / - )细胞,Csn - B 组为 HO - 8910PM 细胞加入 Csn - B 处理 24h,Csn - B(Nur77 - / - )组为 HO - 8910PM(Nur77 - / - )细胞加入 Csn - B 处理 24h,流式细胞法检测各组细胞数量在不同细胞周期的分布比例,Western blot 法检测磷酸化 Nur77(p - Nur77)、磷酸化蛋白激酶 B(p - Akt)、周期蛋白 - D1(Cyclin D1)、上皮性钙黏附蛋白(E - cadherin)、神经性钙黏附蛋白(N - cadherin)、波形蛋白(Vimentin)的含量,ELISA 法检测 3 种基质金属蛋白酶(MMP - 2、MMP - 7、MMP - 9)细胞培养液中的浓度,Transwell 检测细胞的转移、侵袭能力。**结果** 随着 p - Nur77 的含量增加;研究组 < Csn - B(Nur77 - / - )组 < 对照组 < Csn - B 组,处于 S 期, G<sub>2</sub> 和 M 期细胞数量的比例逐渐增大(P < 0.05), p - Akt 的含量逐渐上升, Cyclin D1 的表达量随之

作者单位:473000 河南省南阳市中心医院妇科

通讯作者:王秋宇,副主任医师,电子信箱:autumnsky2000@foxmail.com