

P63 蛋白质在肺腺癌表达作为不利的因素

Expression of P63 protein in pulmonary adenocarcinomas as factor of poor prognosis

目的：研究细胞分子生物学标记的光谱，并在其中鉴定出可用作肺腺癌临床病程的预后因素的那些分子标记。**材料与方法：**在这项工作中，我们使用了 129 例确诊为肺腺癌患者的档案资料。这项工作中采用了组织学、免疫组织化学、分子遗传学和统计学方法。**结果：**在 29 例（47.5%）肺腺癌在不同比例细胞中观察到了 p63 蛋白的细胞质和/或核心的表达。在 p63 肿瘤细胞中表达的腺癌患者，无病生存（DFS）平均为 25.7 ± 5.1 个月，而在无 p63 表达的患者中，无病生存为 26.1 ± 2.8 个月。该指标不影响患者的总生存期（OS），平均 33.6 ± 2.7 个月。**结论：**研究中发现，p63 阳性肺腺癌患者有轻度降低无复发生存趋势。肺腺癌中 p63 表达的检测可认为是预后不良、肿瘤进展较快的因素之一。这需要进行进一步的研究，并提高研究的统计能力。

关键词：表达； p 63；肺腺癌；肺癌；TP63 基因

Aim. To study the spectrum of cellular molecular-biological markers and identify those of them that can be used as prognostic factors for the clinical course of pulmonary adenocarcinoma. **Material and Methods.** In the given work archive material of 129 patients with confirmed diagnosis of pulmonary adenocarcinoma was used. In the work, histological, immunohistochemical, molecular-genetic and statistical methods were used. **Results.** In 29 cases (47.5%) of pulmonary adenocarcinoma, focal cytoplasmic and/or nuclear expression of p63 protein was observed in different proportions of cells. With expression of p63 in tumor cells, relapse-free survival was on average 25.7 ± 5.1 months, while in patients with no expression of p63 it was 26.1 ± 2.8 months. This parameter did not influence the overall survival of patients which was on average 33.6 ± 2.7 months. **Conclusion.** A weak tendency to reduction of relapse-free survival of patients with p63-positive pulmonary carcinoma of lungs was revealed. Identification of p63 in pulmonary adenocarcinoma may be regarded as a factor of unfavorable prognosis and of risk of faster tumor progression, which requires further study to increase the statistical value of research.

Keywords: expression; p63; pulmonary adenocarcinoma; pulmonary cancer; TP63 gene.

肺癌是肺恶性肿瘤的不均匀的组，可以分为两个主要组：小细胞肺癌（低于 15%）和非小细胞肺癌。非小细胞肺癌的最大类别是腺癌，其占有所有肺癌病例的 30-40%。根据世界卫生组织（2015 年）的分类，腺癌组包括各种结构和分化程度的肿瘤[1]。在大多数情况下，这种亚型发生在女性，非吸烟者的，并且更常见于肺的周围部分[2, 3]。

肺腺癌的形态学诊断通常基于苏木精和曙红染色的组织学制剂。但是，在某些情况下，诊断时会表达某些困难。在这种疑难杂症下，有必要使用一系列针对不同类型的肺组织（抗体）具有特异性的标记物进行免疫组织化学研究，以明确诊断。通常，可以使用 3 标记面板来确认大多数肺腺癌的诊断。该标记面板表征了这种类型肿瘤的免疫表型-细胞角蛋白 7，转化生长因子 TTF-1，合弓纲 A. 在肺鳞状细胞癌的鉴别诊断中，可以使用诸如细胞角蛋白 5/6（通常表达扁平上皮细胞的细胞角蛋白），p63 和 TTF-1 的标记[4-6]。然而，腺癌和肺鳞癌的低分化变体的免疫表型通常以不具有高分化变体特征的标签的表达为特征。因此，在某些低分化肺鳞癌中可以检测到 TTF-1 的表达（占 0.9%的病例），相反，p63 有时会表达腺癌细胞群（根据各种来源，在 1/3 的腺癌病例中）[7-9]。因此，A. Warth et al.（2012 年）表明，在肺腺癌确诊的病例中，有 12.1%检测到了 p63 的表达[10]。重要的是要记住，腺癌中 p63 阳性细胞的数量显著低于鳞状细胞癌的特征（鳞状细胞癌中几乎 100%的细胞核表达该标记）并且通常具有局灶性而不是弥散性分布[10]。

通常，在上曾表皮，食道，子宫，子宫颈，扁桃体，膀胱，支气管，乳腺和前列腺的扁平上皮的超基底细胞和上基底细胞中检测到 TP63 基因表达[11]。该基因在维持这些器官中的多能性（《干》）细胞群中起重要作用。应当指出，很少确认 p63 基因中的点突变，但经常在各种恶性肿瘤中发现。包括在肺肿瘤中，检测到该基因编码的蛋白的基因扩增和过表达[12]。

目的是研究细胞分子生物学标记的光谱，并在其中鉴定出可用作肺腺癌临床病程的预后因素的那些分子标记。

材料与方法

在这项制品中使用了 2014 年 1 月至 2018 年 7 月在国家预算公共卫生机构《莫斯科区域研究临床研究所夫拉季米尔斯基·命名俄罗斯卫生部》的基础上检查和治疗的 129 例确诊为肺腺癌的患者存档材料。将生物材料用于科学目的已获得地方的伦理委员会的批准。

手术和诊断活检在研究所的胸的科进行。诊断是在对苏木精和曙红染色的药物进行组织学检查后做出的，必要时，根据世界卫生组织当前分类推荐的免疫组化研究方法[1]。

免疫组织化学研究按照标准记录进行。将该材料固定在 10%的缓冲液的福尔马林中，将厚度为 4 - 5 μm 的切片涂在涂有粘合剂的玻璃上，然后在 37° C 下干燥过夜，然后在 60° C 下干燥 1 小时。根据对每种特异性抗体推荐的方案，对其他切片进行脱蜡和恢复抗原性。使用 Ven-tana 细菌染色机（意大利）在自动模式下对手术材料进行免疫组织化学反应，在诊断性活检中，使用手动方法在连续切片上进行少量材料的诊断活检。使用了抗体组：广谱细胞角蛋白（克隆 AE1 / AE3），高分子量细胞角蛋白（克隆 β E12），细胞角蛋白 7，细胞角蛋白 5/6，p63，TTF-1，napsin A（Dako，Cell Marque，Ventana）。

为了检测肺癌组织中 EGFR 基因的突变，根据生产商的规程，使用 Rotor-Gene Q 设备（Qiagen，荷兰），使用 Therascreen®EGFR RQ PCR Kit 诊断试剂盒（Qiagen，荷兰）使用实时聚合酶链反应方法。使用 Cobas 脱氧核糖核酸 Sample Preparation Kit 试剂盒从石蜡块中分离脱氧核糖核酸。

使用百分分析分类变量，将连续变量表示为平均值和标准偏差。通过卡普兰-梅伊叶尔（Kaplan-Meier）方法分析无复发生存；生存差异的统计学意义通过对数秩检验。使用一维科克斯（Cox）回归分析风险因素。如果 $p < 0.05$ 则认为差异具有统计学意义。使用 SPSS 软件版本 21.0（IBM Corporation，美国）进行统计分析。

在 129 例肺腺癌患者中（93 例手术和 43 例诊断活检），男性 67 例（52%）和女性 62 例（48%）。40 至 70 岁时 87 位患者（67.4%），70 岁以上 37 位患者（28.7%），40 岁以下 5 位患者（3.9%）。

根据 TNM 分类[13]，1 期腺癌患者占 10.1%（13 人），2 期患者-10.1%（13 人），3 期患者-17.8%（23 人）和 4 期-10.8%（14 人）。在某些患者中，TNM 期不存在。表 1 列出了分析的摘抄汇总信息。

结果和讨论

在 129 例中的 75 例中根据形态学研究诊断为腺癌。在其他场合下，还需要补充的方法-免疫组织化学，该方法包括一组与肿瘤在肺中的位置相对应的有机和细胞特异性标签。在 CK7，TTF-1 和 napsin A 的肿瘤细胞中共表达的理由，以及在不表达 CK5 / 6 和 p63 的情况下，确定了肺腺癌。然而一系列事件，观察到了不是该肺癌亚型特征的标签的表达（表 2）。在 96.4% 的病例中（55 个中的 53 个），在腺癌细胞中观察到了细胞角蛋白 7 的表达，在 94.9%（55 个中的 50 个）中观察到了 TTF-1 表达，在 94.7%（57 中的 54 个）中观察到了餐巾素 A，分别在 34.8%（23 个中的 8 个）-SC 5/6 中，47.5%（32 个中的 29 个）-p63 中（表 2 和图 1）。

根据研究期间获得的初步数据，腺癌细胞中仅一种标记物 p63 的表达具有预后意义。两组之间的无复发生存差异为 2.48 ± 1.11 个月， $p < 0.026$ 。但是，随着患者选录的增加和对他们的观察时间的增加，这种趋势趋于平均化。尽管如此，我们在 29 例患者中观察到 p63 在不同比例的腺癌细胞中的胞质和/或核表达（47.5%，图 1），并且在这些患者中观察到该病更具侵袭性。在 p63 肿瘤细胞中表达的腺癌患者，无复发生存平均为 25.7 ± 5.1 个月，而在无 p63 表达的患者中，无复发生存为 26.1 ± 2.8 个月。该指标不影响患者的总体生存，平均 33.6 ± 2.7 个月。

总之，应注意以下列的。p63 蛋白由 1998 年发现的 TP63 基因编码，代表 TP53 基因家族。它位于 3q27-29 号染色体上，由 15 个外显子组成。编码该基因的蛋白质在反式激活，

脱氧核糖核酸结合和寡聚化范围中与 p53 蛋白质具有高度同源性，但在其 C 端一段上却有所不同。与仅编码一种蛋白质的 TP53 基因相反，尽管具有多种变形，但 TP63 基因一次编码几种蛋白质产物。可以从两个启动子（TA 和 ΔN ）合成基质 p63 RNA，然后将其置于基因的羧基末端区中的 3 个可变剪接位点（a, b 和 c）。结果，在 TP63 基因的参与下，可以产生 p63 蛋白的 6 个同工型，它们具有的（TA 型）和非具有的（ ΔN 型）反式激活域（图 2）[14, 15]。TAp63 同工型可激活 p53 基因；因此， ΔN 型可终止细胞周期并启动细胞凋亡，而 ΔN p63 同工型则可激活细胞增殖机制并抑制细胞凋亡[16, 17]。TAP63 同工型还可以激活其他包含结构相似元件的基因。比如，这种同工型间接刺激 Jag1 和 Jag2 蛋白基因的转录，它们是 Notch 受体的配体，其活化在选择细胞分化方向中起关键作用。肿瘤细胞中 TA63 同工型的失活和/或丧失会增加其转移和侵袭潜能[15, 17]。

最近的许多研究表明，p63 基因在鳞状细胞分化的方向上促进了干细胞的转化[14]。在实验模型上证明了在胚发生中该基因的表达对于表皮的正常形态发生是必需的，包括牙齿，头发，乳腺，前列腺，汗液和泪腺以及其他器官和系统的形成[15]。在未分化干细胞转化为组织干基底细胞的过程中，形成正常的上皮细胞。在成年生物中，p63 在维持扁平上皮和复层上皮中的干细胞种群中起着重要作用。通常，基础的，纤毛的，杯状的，肺泡细胞也强烈表达 p63。此外，表达 p63 的细胞散布在细支气管末端。在支气管腺粘膜下层的肌上皮细胞中也观察到了 p63 的表达[12, 16, 17]。

我们的研究中发现了 47.5% 的肺腺癌病例中检测到 p63 表达，关于该标志物表达频率的不同作者的数据也不同。根据 P.P. Massion, et al. (2003) 在 18% 的病例中观察到 p63 表达（93 个病例中的 17 个）[18]，根据 G. Pelosi, et al. (2002) 在 16%（95 个案例中有 15 个）[17] 中，根据 F. Bir et al. (2014) 以 25% 的[12]，根据 B.Y. Wang, et al. (2002) - 已经有 60% 的案例[19]。显然，这种差异很可能由评估系统中的不同方法来解释。

我们的研究中发现了 p63 阳性肺腺癌患者有轻度降低无复发生存的趋势。在许多国外研究中也获得了类似的资料。因此，根据 M.L. Iacono et al. (2011)，p63 的 n 端亚型在肿瘤细胞中的表达与低分化鳞肺癌患者的生存显著相关，多变量分析显示其预后不良的风险增加了 8.09 倍 ($p = 0.001$)。作者还注意到，在正常肺组织中识别这种类型的蛋白有助于其恶性转化[20]。在 T. Narahashi et al. 的研究中（2006 年）显示了肺腺癌患者肿瘤细胞质中 p63 的表达与预后不良之间的相关性。在肿瘤中具有这种蛋白的细胞质表达的组与不存在该蛋白的组之间的生存期差异为 2.16 对 4.64 [21]。在 E. Ko et al. 的作品中（2013 年）表明 p63 和 RASSF1A 基因是在 1-2 期手术切除肺癌后且不损害淋巴结的情况下肿瘤生长复发的独立因素[22]。

在 M-Ch. Aubry et al. 的研究中 (2015) 肺腺癌中 p63 的表达与 TP63 基因的扩增相关了; 他们也揭露了位于 3 号染色体 (3q26.1a) 上的 B3GALNT1 基因的复杂改筑 [23]。然而, 这种基因重排的临床意义还不清楚, 这方面还需要进一步的研究。在发育不良和原位肺癌中也观察到了 p63 基因的扩增及其表达。这使作者提出 p63 基因及其在肺上皮细胞中的表达在致癌机制中起着重要作用。

在 25 例患者中发现了 EGFR 基因异常 (31%): 15 例患者 del19ex, 10 例患者 L858R。应当指出的是, 识别出突变的患者主要是女性 (19 例)。

在肺腺癌细胞中 p63 的表达与检测到的 EGFR 基因异常之间没有关系。在研究蛋白阳性组中检测到 p63 基因的违规, 其中有 5 名患者的基因突变 (3 del19ex 和 2L858R) 和无 p63 表达的患者组 (表 3)。

结论

发现轻度的趋势会降低 p63 阳性肺腺癌患者的无病生存期。肺腺癌中 p63 表达的检测可认为是预后不良和肿瘤进程更快发展的风险的因素。这需要进行进一步的研究, 并增加研究的统计能力。

我们认为, 对肺腺癌患者病史的深入分析, 在诊断时对疾病分期分析, 样本量的增加以及对其中不同 p63 同工型表达的研究, 将使我们能够更可靠地判断该因素对疾病进程的预后意义。

表 1. 分析中包括肺腺癌患者的临床和人口统计学特征

指标	患者人数	%
性		
男人	67	52
女人	62	48
年龄		
40 岁以下	5	3.9
40-70 岁	87	67.4
超过 70 岁	37	28.7
肺腺癌的期		
1 期	13	10.1
2 期	13	10.1
3 期	23	17.8
4 期	14	10.8

表 2。免疫组化标签在肺腺癌细胞中的表达

标签	阳性表达	缺乏表达
CK7	53 (96.4%)	2 (3.6%)
TTF-1	50 (90.9%)	5 (9.1%)
Napsin A	54 (94.7%)	3 (5.3%)
CK5/6	8 (34.8)	15 (65.2)
p 63	29 (47.5%)	32 (52.5%)

表 3。 p63 表达和不表达的患者中 EGFR 突变的鉴定

	p63 阳性表达	缺乏 p63 表达
EGFR 基因中存在突变	5	4
EGFR 基因无突变	10	12

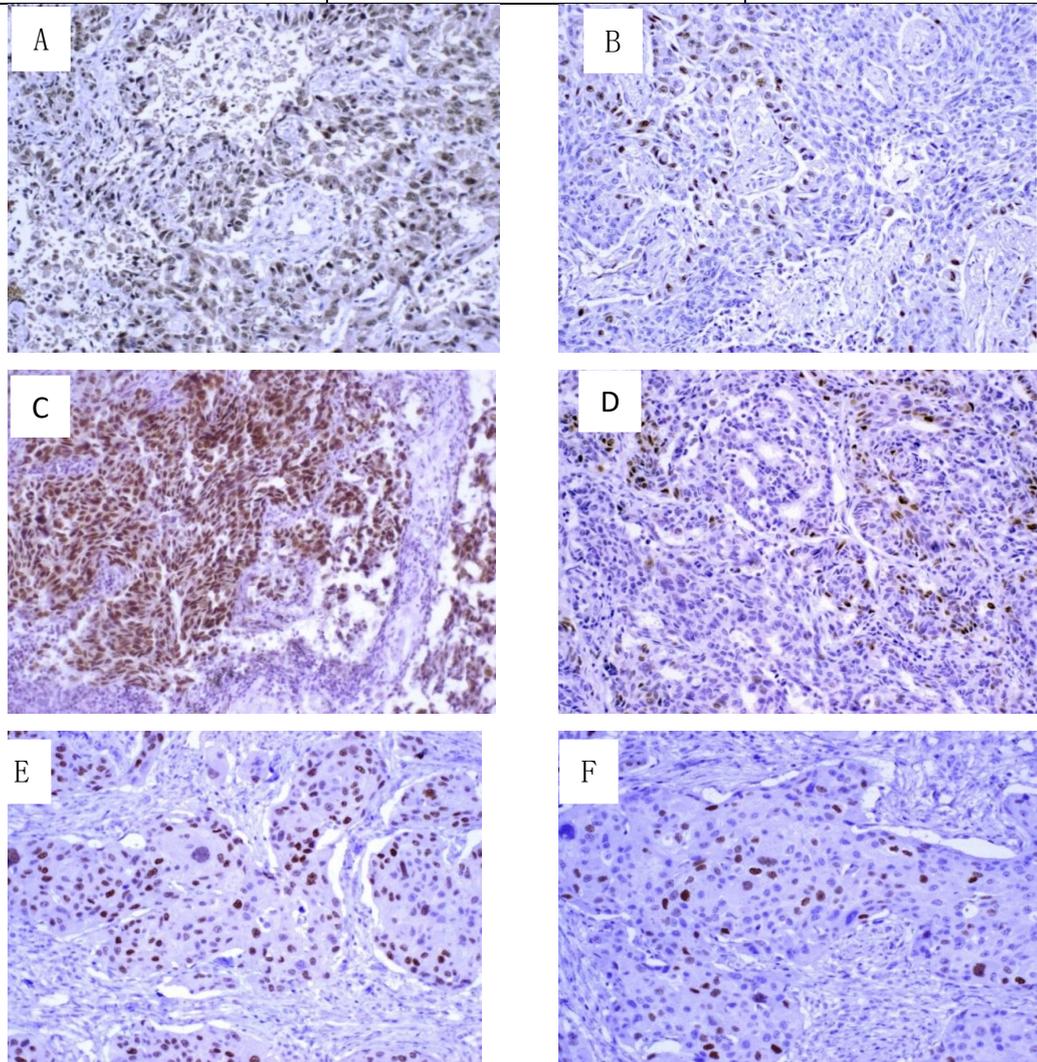


图 1 TTF-1 和 p63 在肺腺癌细胞中的共表达（与针对 TTF-1 和 p63 的抗体的免疫组织化学反应，x125-A, B, C, D 的增加，x250 - E, F 的增加）：TTF-1 在大多数细胞（A, C, E）中的表达，p63 表达不均匀且局灶性中表达（B, D, F）

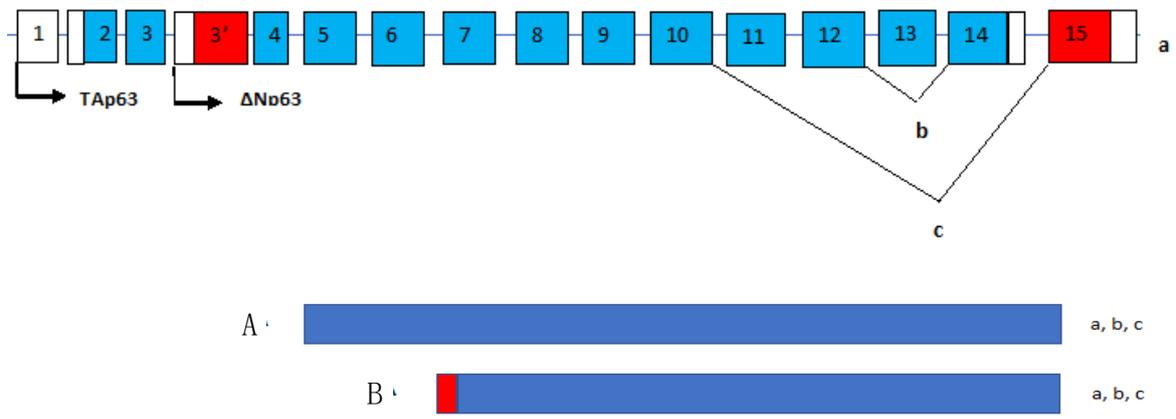


图 2TP63 基因及其蛋白质的略图：

A. TP63 基因的外显子和相应结构域图； B. p63 蛋白的同工型[14. 11]