

Correlation Analysis Between Expression of P21^{WAF1/CIP1}, P16 Proteins and Human Gliomas

P21^{WAF1/CIP1}、P16 蛋白表达与人脑神经胶质瘤的相关分析

JIANG You-hong, SUI Cheng-guang, MENG Fan-dong, MA Ping, WANG Xiao-hua, DAI Xiao-chun
(Institute of Cancer Research of the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

姜又红/隋承光/孟凡东/马萍/
王晓华/戴晓淳
(中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所,
辽宁 沈阳 110001)

【摘要】背景与目的: 探讨 P21^{WAF1/CIP1}、P16 两种抑癌基因与人脑神经胶质瘤恶性程度的关系。材料与方法: 采用 SABC 免疫组织化学方法对 98 例人脑胶质瘤组织及 12 例正常脑组织标本中 P21^{WAF1/CIP1} 和 P16 的表达进行检测, 并进行相关分析。结果: P21^{WAF1/CIP1} 和 P16 阳性表达率在人脑胶质瘤中分别为 58.16% 和 42.86%, 与正常脑组织中的表达情况差异有统计学意义; P21^{WAF1/CIP1} 蛋白和 P16 蛋白阳性表达率均随着胶质瘤的恶性程度的增高而降低; P21^{WAF1/CIP1} 蛋白和 P16 蛋白可协同表达。结论: P21^{WAF1/CIP1} 与 P16 蛋白的阳性表达率及协同表达率可在一定程度上反映胶质瘤细胞的恶性生物学行为, 可以作为一项判断其恶性程度的有效指标。

【关键词】脑胶质瘤; P21^{WAF1/CIP1} 蛋白; P16 蛋白; 免疫组织化学

中图分类号: R730.45

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)05-0311-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & ATM: To investigate the relationship between glioma malignancy grading and P21^{WAF1/CIP1}, P16 gene expressing levels. MATERIAL AND METHODS: The expression levels of P21^{WAF1/CIP1} and P16 proteins were detected in 98 cases of brain glioma using SABC immunohistochemical staining. Eight normal brain tissues were used as control. RESULTS: The positive expression rates of P21^{WAF1/CIP1} and P16 protein in glioma were 58.16% and 42.86% respectively, and a significant difference was observed between gliomas and control. The expression intensity of P21^{WAF1/CIP1} and P16 decreased with the gliomas grade increasing. Coexpression of P21^{WAF1/CIP1} and P16 was found in glioma and normal brain tissues. CONCLUSION: The positive expression rate and coexpression rate of P21^{WAF1/CIP1} and P16 protein may reflex the malignant grade of glioma in some extent, and they can be as a sensitive index for the gliomas grading.

【KEY WORDS】 gliomas; P21^{WAF1/CIP1} protein; P16 protein; immunohistochemistry

P21^{WAF1/CIP1}、P16 作为一个参与细胞周期调控的抑癌基因, 其抑癌作用和在高频率突变, 提示其参与了肿瘤的发生过程。P21^{WAF1/CIP1} 基因及其表达产物对一些肿瘤包括脑肿瘤生长的抑制作用在 EL-Deiry 等^[1]的实验中已经得到证实; Kamb 等^[2]报道了 P16 蛋白表达基因突变在人类恶性肿瘤中普遍存在, 在神经胶质瘤中突变率最高, 约为 80% 左右。目前研究 P21^{WAF1/CIP1}、P16 蛋白表达情况与肿瘤相关性已成为广大学者所关注的热点问题。我们采用免疫组织化学的方

法, 对人脑神经胶质瘤中 P21^{WAF1/CIP1}、P16 基因的表达进行了检测, 探讨这两种抑癌基因在人脑神经胶质瘤中的表达情况及协同表达与人脑神经胶质瘤恶性程度的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑神经胶质瘤组织标本 98 例取自中国医科大学第一临床学院神经外科 1994-01 ~ 2003-10 手术切除的标本, 其中男性 58 例、女性 40 例, 年龄

收稿日期: 2004-05-17; 修订日期: 2004-06-18

作者简介: 姜又红 (1958-), 男, 北京市人, 副教授, 博士, 研究方向: 恶性肿瘤的生物治疗与基因诊断。E-mail: jiangyouhong2000@ahoo.com.cn

14~72岁,平均年龄43岁。根据1993年WHO病理分类标准,98例中I级28例,II级21例,III级31例,IV级18例。另取12例正常脑组织(来源于新鲜尸体解剖脑组织标本)作为正常对照。全部标本均为10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,5 μm厚连续切片。

1.2 试剂 蛋白酶K购自华美生物工程公司。链霉素、卵白素、生物素复合物(Strept avidin-biotin complex, SABC)试剂盒为Zymed公司产品,鼠抗P21^{WAF1/CIP1} mAb和鼠抗人P16蛋白单克隆抗体均为Santa Cruz公司产品,均购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学方法 采用SABC免疫组织化学方法。选乳腺癌阳性标本为阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照。步骤如下:石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,PBS洗5 min;3% H₂O₂室温孵育5~10 min,以清除内源性过氧化物酶的活性;蒸馏水冲洗,PBS浸泡5 min;P16高压锅抗原热修复(修复液为0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液,pH 6.0);5%正常山羊血清(PBS稀释)封闭。P21^{WAF1/CIP1}抗体稀释度为(1:80),P16抗体稀释度为(1:50)。P21^{WAF1/CIP1} 4℃冰箱过夜,37℃复温1 h,0.01 mol/L PBS冲洗,5 min×3次,加1:100羊抗鼠二抗1 h,0.01 mol/L PBS冲洗5 min×3次,A液、B液按1:100混合于PBS中,并立即将混合液加至标本上37℃45~60 min,0.01 mol/L PBS冲洗,5 min×3次;P16室温孵育10 min,倾去血清,滴加鼠抗人P16蛋白抗体(37℃)2 h,0.01 mol/L PBS冲洗,2 min×3次,滴加生物素化山羊抗鼠IgG(37℃)20 min,0.01 mol/L PBS冲洗,2 min×3次,滴加试剂SABC(37℃)20 min,0.01 mol/L PBS冲洗,5 min×4次。DAB显色剂显色,苏木精复染,二甲苯脱水透明,中性树脂封片。结果判断:以细胞核内出现棕褐色颗粒为阳性反应,采用半定量方法观察10个高倍镜视野(×400),运用双盲法根据细胞着色程度和阳性细胞所占的比例分级,P21^{WAF1/CIP1}:阳性细胞占30%者为阳性;P16:阳性细胞占10%以上者为阳性。

1.4 统计分析方法 采用SPSS 10.0统计软件包,进行χ²-检验、χ²_{校正}-检验、Fisher精确概率检验及Kendall相关分析,α=0.05为检验水准。

2 结果

2.1 P21^{WAF1/CIP1}蛋白与P16蛋白阳性表达率及P21^{WAF1/CIP1}蛋白与P16蛋白协同阳性表达率 由表1可见:P21^{WAF1/CIP1}蛋白在人脑胶质瘤及正常脑组织中的阳性表达率分别为58.16%和91.67%,差异有统计学意义(χ²=5.084, P=0.024);P16蛋白在人脑胶质瘤及正常脑组织中的阳性表达率分别为42.86%和83.33%(χ²=7.027, P=0.008,);P21^{WAF1/CIP1}和P16蛋白协同阳性表达率在人脑胶质瘤及正常脑组织中分别为40.82%和83.33%(χ²=7.795, P=0.005,),差异均有统计学意义。

2.2 人脑胶质瘤各病理分级P21^{WAF1/CIP1}蛋白与P16蛋白阳性表达率和正常脑组织及各级间的关系

由表1可见:P21^{WAF1/CIP1}蛋白阳性表达率人脑胶质瘤III级与正常脑组织(χ²_{校正}=5.089, P=0.024,)、IV级与正常脑组织(Fisher精确概率检验, P=0.001);人脑胶质瘤III级、IV级与I级差异均有统计学意义(χ²=5.732, P<0.05;χ²=11.66, P<0.01)。人脑胶质瘤IV级与II级差异亦有统计学意义(χ²_{校正}=5.748, P<0.05)。P21^{WAF1/CIP1}蛋白阳性表达率随着肿瘤的恶性程度的增高而降低(图1)。P16蛋白阳性表达率人脑胶质瘤III级与正常脑组织(χ²_{校正}=10.937, P<0.01)、IV级与正常脑组织(Fisher精确概率检验, P=0.002);人脑胶质瘤III级、IV级与I级差异均有统计学意义(χ²=14.143, P=0.0001;χ²=10.632, P=0.001)。人脑胶质瘤III与II级差异亦有统计学意义(χ²=4.912, P=0.027)。P16蛋白阳性表达率亦随着肿瘤的恶性程度的增高而降低(图1)。

2.3 正常脑组织和脑胶质瘤各分级中P21^{WAF1/CIP1}蛋白和P16蛋白协同表达情况

由表1可见:

表1 P21^{WAF1/CIP1}、P16蛋白在正常脑组织和脑胶质瘤中的表达情况及与人脑胶质瘤分级的关系

Table 1 Expressing of P21^{WAF1/CIP1}, P16 proteins in normal brain tissue and brain glioma, and its relationship with the grade of human glioma

Grades	n	Positive expression of p21 ^{WAF1/CIP1}		Positive expression of p16		Total	
		n	Rate(×10 ⁻²)	n	Rate(×10 ⁻²)	n	Rate(×10 ⁻²)
Normal brain tissue	12	11	91.67	10	83.33	10	83.33
Brain glioma	98	57	58.16 [*]	42	42.86 ^{**}	40	40.82 ^{**}
Grade I	28	22	78.57	20	71.43	17	60.71
Grade II	21	15	71.43	11	52.38	11	52.38
Grade III	31	15	48.39 ^{a,bb,c}	7	22.58 ^{aa,bb,c}	8	25.81 ^{aa,bb,c}
Grade IV	18	5	27.78 ^{aa,bb}	4	22.22 ^{aa,bb}	4	22.22 ^{aa,bb}

*: Glioma vs normal brain tissue, P<0.05; **: glioma vs normal brain tissue, P<0.01. a: glioma of each grade vs normal brain tissue, P<0.05; aa: glioma of each grade vs normal brain tissue, P<0.01. b: glioma of under grade I vs grade I, P<0.05; bb: glioma of under grade I vs grade I, P<0.01. c: glioma of under grade II vs grade II, P<0.05; cc: glioma of under grade II vs grade II, P<0.01.

P21^{WAF1/CIP1} 蛋白与 P16 蛋白协同阳性表达率人脑胶质瘤 III 级与正常脑组织 ($\chi^2 = 11.764$, $P = 0.001$)、IV 级与正常脑组织 (Fisher 精确概率检验, $P = 0.002$) 差异均有统计学意义。人脑胶质瘤 III、IV 级与 I 级差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.342$, $P = 0.027$; $\chi^2 = 6.543$, $P = 0.011$)。III 级与 II 级差异亦有统计学意义 ($\chi^2 = 3.847$, 别 $P = 0.05$)。P21^{WAF1/CIP1} 蛋白与 P16 蛋白协同表达率随着肿瘤的恶性程度的增高而降低 (图 1)。P21^{WAF1/CIP1} 蛋白与 P16 蛋白阳性表达率呈正相关关系 ($\tau = 0.916$; $P < 0.05$)。

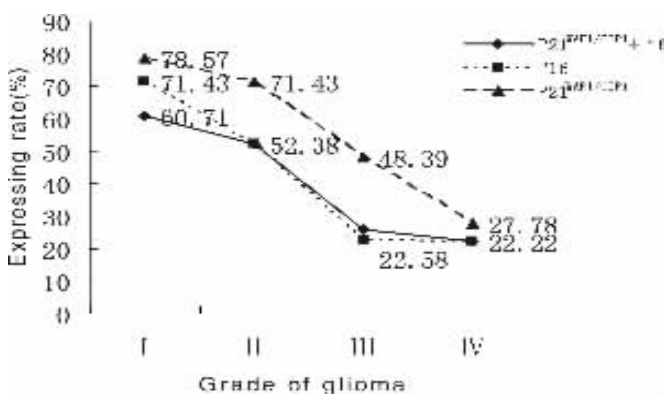


图 1 P21^{WAF1/CIP1}、P16 蛋白表达率及 P21^{WAF1/CIP1} 和 P16 蛋白协同表达率与人脑胶质瘤分级的关系

Figure 1 Relationship of expressing rate of P21^{WAF1/CIP1}, P16 and co-expressing rate of P21^{WAF1/CIP1}, P16 with grade of human brain glioma

3 讨论

细胞周期调节失控是癌变的一个重要原因,细胞周期的正常演进依赖于细胞周期蛋白和抑制蛋白的共同调节而完成,因此,开展与细胞周期调控有关的抑癌基因的研究是揭示其致癌机制的重要途径。P21^{WAF1/CIP1} 蛋白作为周期依赖性激酶抑制因子,调节细胞周期的进程,参与细胞生长、增殖、分化、衰老等多种活动。低浓度 P21^{WAF1/CIP1} 作为 CDK 的聚集因子,促进 G₁ 期向 S 期转化,但高水平表达的 P21^{WAF1/CIP1} 蛋白于 cyclin 竞争性地与 CDK 结合而抑制该激酶活性,使细胞发生 G₁ 期停滞,抑制 G₁/S 进程。P21^{WAF1/CIP1} 过量表达可以阻止细胞的生长,有利于 DNA 修复或细胞凋亡的进行。研究发现,P21^{WAF1/CIP1} 表达蛋白水平在多种肿瘤中明显下调^[3],并且与预后有关^[4]。P16 蛋白能直接抑制细胞增殖周期,与许多肿瘤的形成和发展关系密切。我们的研究结果表明:① P21^{WAF1/CIP1} 蛋白与 P16 蛋白在人脑胶质瘤中的表达率均低于正常脑组织中的表达率且差异均有统计学意义。即人脑胶质瘤中的 P21^{WAF1/CIP1} 蛋白呈低表达,当 P21^{WAF1/CIP1} 发生突变,其表达减弱或消失时,很可能使正常细胞增殖分化转变为增殖分化不良,或者是抑制增生的作用减弱或消失,从而细胞发生恶性变^[5]。亦

可推测恶性胶质瘤的发生与 P16 基因缺失引起的 P16 蛋白表达降低有密切关系^[6],P16 基因的缺失可能是胶质瘤恶性变的一个重要机制^[7]。② P21^{WAF1/CIP1} 蛋白阳性表达率随着肿瘤的恶性程度的增高而降低,即恶性程度越高,P21^{WAF1/CIP1} 阳性表达率越低,据此 P21^{WAF1/CIP1} 的阳性表达率亦可在一定程度上反映胶质瘤细胞的恶性生物学行为,可考虑作为一项判断其恶性程度的有效指标。P16 蛋白的阳性表达率亦随着肿瘤的恶性程度的增高而降低,即组织学分化程度越低,恶性程度越高,P16 阳性表达率越低,P16 蛋白的阳性表达率也可在一定程度上反映胶质瘤细胞的恶性生物学行为^[8]。③ 人脑胶质瘤中的 P21^{WAF1/CIP1} 蛋白和 P16 蛋白可协同表达,kendall 相关系数反映其两项指标之间呈明显正相关趋势,其协同表达率随着肿瘤的恶性程度的增高而降低。说明 P21^{WAF1/CIP1} 基因和 P16 基因在体内调节机制的作用下可共同阻断细胞周期的进行,协调 DNA 复制和修复以及细胞周期之间的关系,并成为周期事件与周期进展的协调者,一旦它们的功能丧失必将导致细胞周期协调性的缺陷,以致不能适应不良外界环境的变化,引起细胞增殖及分化的紊乱,导致细胞恶变。

参考文献:

- [1] EL-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential Mediator of P53 tumor suppression[J]. Cell, 1993, 75: 817-825.
- [2] Kamb A, Gruis NA, Weaver J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 265(5157): 436-438.
- [3] 张维,荆梦杰,李淑军. 抑癌基因 P21^{CIP1/WAF1} 在食管癌中的表达及其预后意义 [J]. 临床消化病杂志, 1999, 11: 147-148.
- [4] Lkeguchi M, Saito H, Katano K, et al. Expression of P53 and P21, are independent prognostic factors in patients with serosal invasion by gastric carcinoma digestive diseases[J]. Science, 1998, 280: 1035-1038.
- [5] 王占祥,章翔,易声禹,等. 脑胶质瘤组织 P21^{WAF1/CIP1} 基因表达与 P53 基因的关系 [J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(9): 1102-1104.
- [6] 金永健,金玉兰,李龙山. P16 mRNA 及其蛋白、EGFR 在脑胶质瘤中的表达 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2000, 16(1): 38-40.
- [7] 焦保华,耿少梅,张庚申. 脑胶质瘤组织中 P16/MTS1 基因缺失研究[J]. 河北医药, 2000, 22(8): 565-566.
- [8] 李卫国,李新钢,孔建新,等. P16 蛋白在人脑胶质瘤中的表达 [J]. 山东医药, 2001, 41(4): 15-16.

