

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)24-2263-04

中心体相关激酶 Aurora-A 和 mt-P53 在大肠癌中的表达及意义

苏晓路, 张 煦, 田卫华 (兰州大学基础医学院病理学研究所, 甘肃 兰州 730000)

Expressions of centrosome-associated kinase Aurora-A and mt-P53 in colorectal cancer and their significance

SU Xiao-Lu, ZHANG Xu, TIAN Wei-Hua

Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

【Abstract】AIM: To investigate the expression levels of centrosome-associated kinase Aurora-A and mutant type P53 (mt-P53) in colorectal cancer and to explore their mutual relationship and their roles in tumorigenesis and tumor progression. **METHODS:** Pathological specimens from colorectal cancer, pericancerous tissues and normal colorectal tissues were examined for the expression levels of Aurora-A and mt-P53 proteins by tissue microarray technique and immunohistochemistry (SP method), and the clinicopathological parameters were analyzed. **RESULTS:** The positive rates of Aurora-A expression in normal colorectal tissues, pericancerous tissues and colorectal cancer were 0%, 36% and 69% respectively and the positive rates of mt-P53 expression in normal colorectal tissues, pericancerous tissues and colorectal cancer were 0%, 21% and 57% respectively. Compared with normal colorectal tissues and pericancerous tissues, the expression levels of Aurora-A and mt-P53 were significantly higher in tumor tissues ($P < 0.05$). Aurora-A overexpression was related to the depth of invasion and mt-P53 overexpression was related to the depth of invasion, lymph node metastasis and Dukes' classification ($P < 0.05$). There was a strong positive correlation between the expressions of Aurora-A and mt-P53 ($r = 0.776, P < 0.01$). **CONCLUSION:** Overexpression of Aurora-A and mutation of P53 play a critical role in tumorigenesis and tumor progression of colorectal cancer. So co-detection of Aurora-A and mt-P53 may be useful for early diagnosis and prognosis prediction of colorectal cancer.

【Keywords】 Aurora-A; genes, P53; genomic instability; tissue microarray; colorectal neoplasms

【摘要】目的: 研究中心体相关激酶 Aurora-A 和突变型 P53 (mt-P53) 在大肠癌中的表达规律, 探讨其相互关系及在肿瘤发生发展中的作用. 方法: 应用组织芯片和免疫组化技术 (SP 法) 检测 Aurora-A 和 mt-P53 在 51 例大肠癌组织、癌旁组织和正常大肠组织中的表达, 并结合临床病理学参数进行综合分析. 结果: 在正常大肠组织、癌旁组织和正常大肠组织中 Aurora-A 的阳性表达率分别为 0、36% 和 69%, mt-P53 的阳性表达率分别为 0、21% 和 57%. 与正常大肠组织和癌旁组织相比, 大肠癌组织中 Aurora-A 和 mt-P53 的表达明显升高 ($P < 0.05$), 两者的表达与肿瘤的浸润程度关系密切 ($P < 0.05$), mt-P53 还与 Dukes' 分期和淋巴结转移有关 ($P < 0.01$). Aurora-A 在大肠癌组织中的表达与 mt-P53 表达呈显著正相关 ($r = 0.776, P < 0.01$). 结论: Aurora-A 蛋白的过表达与 P53 的突变在大肠癌的发生、发展中发挥着重要作用. Aurora-A 和 mt-P53 蛋白的表达对大肠癌的早期诊断及预后判断具有重要价值.

【关键词】 Aurora-A 基因; P53 基因组不稳; 组织芯片; 结直肠肿瘤

【中图分类号】R735.3

【文献标识码】A

0 引言

有丝分裂过程的偏差会导致基因组不稳定从而引发肿瘤. 研究发现, Aurora-A 是维持基因组稳定性所必需的、关键的有丝分裂调节因子, 这个中心体相关激酶在肿瘤细胞中过度表达^[1]. 突变型 P53 (mt-P53) 在维持基因组稳定方面同样发挥着重要作用, 它参与 DNA 的复制和修复. 我们利用组织芯片和免疫组化技术检测 Aurora-A 和突变型 mt-P53 蛋白在大肠癌组织、癌旁组织和正常大肠组织中的表达, 旨在探讨它们在大肠癌发生、发展中的作用及相互关系.

1 对象和方法

1.1 对象 收集甘肃省肿瘤医院 2003/2005 年和兰州石化医院 2001/2005 年外科手术切除大肠腺癌石蜡包埋标本 51 (男 29, 女 22) 例, 年龄 26 ~ 74 (平均 59.7) 岁. 入选条件 ① 病史资料齐全; ② 术前未经放疗及化疗患者. 组织学类型: 管状腺癌 31 例, 乳头状腺癌 13 例, 黏液腺癌 7 例. 组织分化: 高分化 24 例, 中分化 19 例, 低分化 8 例. 浸润程度: 黏膜及黏膜下层 5 例, 肌层 13 例, 浆膜层 33 例. 有淋巴结转移 12 例, 无淋巴结转移 39 例. 另取该组大肠腺癌病

收稿日期 2007-05-29; 接受日期 2007-07-08

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (3ZS061-A25-105)

通讯作者: 张 煦. Tel: (0931) 8289565 Email: zhangxu1964@sohu.com

作者简介: 苏晓路. 硕士生(导师张 煦). Tel: (0931) 8289565

Email: Suxd2004@126.com

例中肿瘤手术切除标本切缘处正常大肠黏膜(病理证实)石蜡包埋标本 15 例作为对照。在大肠癌组织蜡块相应部位标记大肠癌旁组织黏膜,在组织芯片制作时取出,共选取 14 例。兔抗人 Aurora-A 多克隆抗体(英国 AbD seroTec 公司);鼠抗人 mt-P53 mAb SP 超敏试剂盒,DAB 显色试剂盒,PBS 缓冲液,柠檬酸盐抗原修复缓冲液,防脱片(福州迈新公司);石蜡切片机(德国 Leica 仪器厂);电热恒温水浴箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片设计和制备 将大肠腺癌石蜡包埋标本重新切片,HE 染色。由病理专家复查 HE 切片,在显微镜下分别用标记笔画圈标记出典型癌灶(富有肿瘤细胞且无坏死出血的区域)及癌旁组织黏膜(距肿瘤 2 cm 的正常组织),然后在组织蜡块上相应的区域标记选取组织点,并参照文献[2]的方法应用组织芯片仪制备组织芯片。

1.2.2 免疫组织化学染色 采用 SP 法,染色步骤按说明书进行。抗体 Aurora-A 工作液浓度为 1:100, P53 为即用型,二者都需要抗原修复,DAB 显色,苏木素复染。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,已知阳性片作为阳性对照。

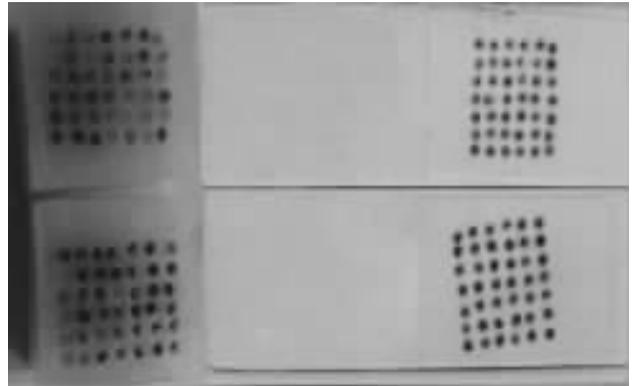
1.2.3 阳性结果判定 Aurora-A 和 mt-P53 阳性染色为黄色、棕黄色或棕褐色颗粒,Aurora-A 定位于细胞质,mt-P53 定位于细胞核。采用二级计分法,染色强度分类 0 分为无色,1 分为黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色(深浅与背景色相对比)。阳性细胞计数:在 400 倍镜下选定 10 个视野肉眼显微镜下观察,每个视野计数 100 个肿瘤细胞,共计 1000 个细胞,计算阳性细胞所占百分比。阳性细胞(%) = 阳性细胞数/所计数细胞总数 × 100%。1 分为阳性细胞 ≤ 10%, 2 分为 11% ~ 50%, 3 分为 51% ~ 75%, 4 分为 > 76%。两者记分相乘后 0 ~ 3 分为阴性; > 3 分为阳性^[3]。

统计学处理:计数资料采用 χ^2 检验,相关分析采用 Spearman 等级相关分析。统计学软件采用 SPSS 10.0 软件包, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

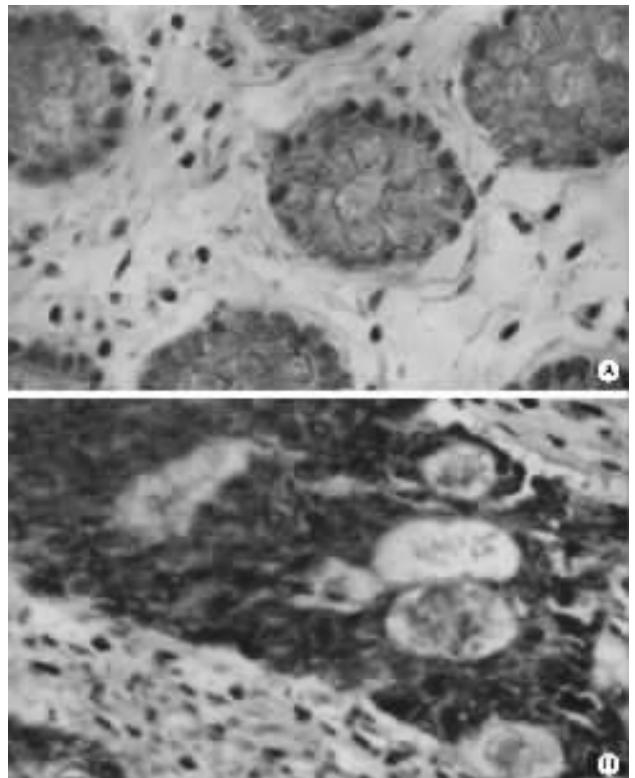
2.1 Aurora-A, mt-P53 在大肠癌组织、癌旁组织、正常大肠组织中的表达 构建两张组织芯片分别含 42 个位点(包括 2 个标记点,图 1)。其中个别脱落位点用常规切片补充。在正常大肠组织中,Aurora-A 低表达,个别腺细胞胞质中出现黄色颗粒并呈散在分布,mt-P53 无 1 例表达。在癌旁组织中,Aurora-A 和 mt-P53 染色阳性细胞胞质或胞核呈黄色或棕黄色颗粒

并散在或片状分布,阳性表达率分别为 36%(5/14)和 21%(3/14),阳性细胞主要见于异型增生的上皮,成纤维细胞、平滑肌细胞和血管内皮细胞中未见表达。Aurora-A 和 mt-P53 在大肠癌组织中的表达明显增强,染色强度均强于正常大肠组织和癌旁组织,阳性细胞胞质或胞核出现棕褐色颗粒并呈片状和/或弥漫分布,阳性表达率分别为 69%(35/51)和 57%(29/51),明显高于癌旁组织($P < 0.05$,图 2,3)和正常大肠组织($P < 0.01$)。



所构建的两张组织芯片分别含 42 个位点,每张右上方第 1 行的 2 个点为标记点,病例共 80 个点,分别代表 51 例大肠癌组织,15 例正常大肠组织和 14 例癌旁组织。

图 1 组织芯蜡块和组织芯片



A 正常大肠组织;B 中分化大肠腺癌组织。

图 2 Aurora-A 在正常大肠组织和中分化大肠腺癌组织中的表达 SP × 400

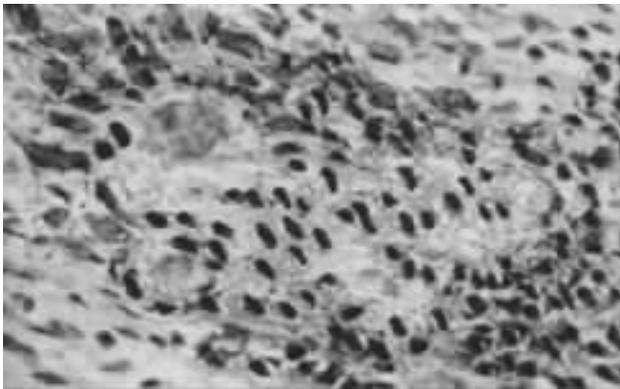


图3 mt-P53 在低分化大肠腺癌组织中的表达 SP x 400

2.2 Aurora-A mt-P53 的表达与大肠癌组织临床病理特征的关系 Aurora-A mt-P53 的表达与性别、年龄、组织学分型及病理学分级无关 ($P > 0.05$, 表1), 但均与浸润程度有关 ($P < 0.05$) , mt-P53 还与淋巴结转移和 Dukes' 分期密切相关 ($P < 0.01$) , 而 Aurora-A 则与淋巴结转移和 Dukes' 分期无关 ($P > 0.05$) .

表1 Aurora-A mt-P53 蛋白表达与大肠癌组织临床病理特征的关系

项目	n	Aurora-A			mt-P53		
		阳性	阴性	P	阳性	阴性	P
性别							
男	29	21	8	0.503	16	13	0.780
女	22	14	8		13	9	
年龄(岁)							
<60	24	17	7	0.749	13	11	0.714
≥60	27	18	9		16	11	
组织类型							
管状腺癌	31	20	11	0.550	19	12	0.266
乳头状腺癌	13	9	4		5	8	
黏液腺癌	7	6	1		5	2	
组织分化							
高	24	15	9	0.672	12	12	0.160
中	19	14	5		10	9	
低	8	6	2		7	1	
Dukes' 分期							
A, B	39	26	13	0.586	18	21	0.005
C, D	12	9	3		11	1	
浸润程度							
黏膜和黏膜下层	5	2	3	0.022	1	4	0.034
肌层	13	6	7		5	8	
浆膜层	33	27	6		23	10	
淋巴结转移							
有	12	9	3	0.586	11	1	0.005
无	39	26	13		18	21	

2.3 Aurora-A mt-P53 在大肠癌组织中表达的关系

Aurora-A 和 mt-P53 蛋白共同表达阳性者 29 例 , 共阴性者 16 例 , Aurora-A 表达阳性而 mt-P53 表达阴性者 6 例 , Aurora-A 表达阴性而 mt-P53 表达阳性者 0 例. Aurora-A 与 mt-P53 表达呈正相关 ($r = 0.776$, $P < 0.01$) .

3 讨论

中心体作为细胞的微管组织中心 , 当出现扩增等异常现象时可导致错误的纺锤体装配和染色体分离 , 从而造成基因组不稳定. 研究表明几乎所有的肿瘤组织及肿瘤细胞系都存在中心体异常现象^[4]. 人类 Aurora-A 属于 Aurora 家族 , 是一个和中心体相关的丝氨酸/苏氨酸激酶 , 在有丝分裂间期位于中心体 , 而在有丝分裂前期和后期位于纺锤体 , 说明它与中心体的分离、成熟以及纺锤体装配都密不可分 , 当 Aurora-A 过表达时可导致中心体扩增、染色体不稳定和细胞转化. 有研究^[1,5]发现 , Aurora-A 基因位于染色体 20q13 这个区域在许多恶性肿瘤中都存在基因扩增. 因此 , 当 Aurora-A 过表达时它可能是一种潜在的癌基因 , 并通过多种途径参与肿瘤的发生、发展. wt-P53 蛋白在维持基因组稳定方面同样发挥重要作用 , 研究^[6]发现 wt-P53 下调、缺失或突变都会导致中心体扩增和基因组不稳定. 虽然已有研究^[5]证实 Aurora-A 在乳腺癌及胃癌等实体肿瘤中存在过表达 , 但应用组织芯片技术检测 Aurora-A 和 mt-P53 在大肠癌、癌旁组织和正常大肠组织中的表达 , 目前国内外还鲜有报道. 我们的结果显示 , 与大肠癌旁及大肠正常组织相比 , Aurora-A 和 mt-P53 在大肠癌组织中的表达明显增强 ($P < 0.05$) , 提示 Aurora-A 和 mt-P53 蛋白表达的升高与大肠癌的发生有关.

关于 Aurora-A 和 mt-P53 与大肠癌临床病理特征的关系 , 我们发现 Aurora-A 的表达只与肿瘤的浸润程度有关. 其浸润程度越深 , Aurora-A 的阳性表达率越高 , 提示 Aurora-A 蛋白表达的升高可能在大肠癌的进展中起一定作用. mt-P53 在既往研究^[7]中被认为与肿瘤的发展有关 , 我们发现 mt-P53 蛋白的阳性表达率与肿瘤的浸润程度有关 , 并且与淋巴结转移和 Dukes' 分期关系密切 , 说明 mt-P53 也参与了肿瘤的发展 , 这可能是由于 mt-P53 对大肠癌细胞的调控作用减弱或消失 , 从而导致癌细胞的浸润和转移. 淋巴结转移是目前公认的大肠癌预后不良的重要指标 , 因此 , 共同检测 Aurora-A 和 mt-P53 蛋白的表达水平可有助于大肠癌的早期诊断和预后判断^[8-9].

而对于 Aurora-A 和 mt-P53 在大肠癌演变过程中

的相互关系,有研究^[10]报道 wt-P53 蛋白对 Aurora-A 起负调控作用,在细胞内以转录活化非依赖的方式 (transactivation-independent) 直接结合在 Aurora-A 的 N 端并抑制其活性,从而阻止 Aurora-A 过表达所诱导的中心体扩增和细胞转化;另一方面,Aurora-A 高度活化又可抑制 wt-P53 所介导的负性调节,其重要机制是 Aurora-A 对 P53 的 Ser315 磷酸化,从而促进 Mdm2 介导的 P53 通过泛素化途径降解,也可对 P53 的 Ser215 磷酸化,抑制 P53 的转录活性,并以同样方式抑制 P53 下游基因的活性,比如 P21CIP/WAF1 和 PTEN,最终使 P53 失去正常功能^[11-12]。这些发现都提示 Aurora-A 可能是 wt-P53 通路中的一个重要调节因子,过表达或过度激活 Aurora-A 会打破细胞内的 Aurora-A-P53 平衡,造成细胞恶性增殖。我们采用同一组病例作了两种蛋白表达的检测,结果显示,Aurora-A 与 mt-P53 在大肠癌中的表达显著正相关 ($P < 0.01$),并且随着肿瘤细胞浸润程度的加深,两者的表达都有所增强,这些都提示 Aurora-A 和 mt-P53 在大肠癌的发生发展过程中存在一定联系,它们可能共同参与了肿瘤的进展。然而,Aurora-A 和 mt-P53 也有个别表达不一致,说明 Aurora-A 和 mt-P53 有相关性但又可能都是独立的致瘤因子。

我们发现从正常大肠组织、癌旁组织到大肠癌组织,这个进程与 Aurora-A 和 mt-P53 表达的递增密切相关,两者在肿瘤的发生、发展中起着相互促进的作用。由于 Aurora-A 与肿瘤的发生有关,因此,Aurora-A 有可能成为肿瘤治疗的一个靶点。

【参考文献】

- [1] Kamada K, Yamada Y, Hirao T, et al. Amplification/overexpression of Aurora-A in human gastric carcinoma: Potential role in differentiated type gastric carcinogenesis [J]. *Oncol Rep*, 2004, 12: 593-599.
- [2] Kallioniemi OP, Wagner V, Kononen J, et al. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 657-662.
- [3] 许良中. 实用肿瘤病理方法学 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1997: 123-124.
- [4] Dutertre S, Descamps S, Prigent C. On the role of aurora-A in centrosome function [J]. *Oncogene*, 2002, 21: 6175-6183.
- [5] Meraldi P, Honda R, Nigg EA, et al. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14: 29-36.
- [6] Chen SS, Chang PC, Cheng YW, et al. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function [J]. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4491-4499.
- [7] 王伴青, 肖风, 温永顺, 等. 胃癌组织 P53, P16 和 P73 表达的意义 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(2): 184-185.
- [8] Katayama H, Sasai K, Kawai H, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53 [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(1): 55-62.
- [9] Liu Q, Kaneko S, Yang L, et al. Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine-215 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 52175-52182.
- [10] Harrington EA, Bebbington D, Moore J, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo [J]. *Nat Med*, 2004, 10(3): 262-267.
- [11] Gadea BB, Ruderman JV. Aurora kinase inhibitor ZM447439 blocks chromosome-induced spindle assembly, the completion of chromosome condensation, and the establishment of the spindle integrity checkpoint in xenopus egg extracts [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(3): 1305-1318.
- [12] Manfredi MG, Ecsedy JA, Meetze KA, et al. Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(10): 4106-4111.

编辑 王睿