

JC 病毒大 T 抗原在人结直肠腺癌中的表达及其与 P53、pRb 表达的关系

Expression of JC Virus Large Tumor Antigen in Human Colorectal Adenocarcinoma and Its Relationship with the P53, pRb Proteins

孟轶婷¹/万义增^{1,*}/赵丽娟²/

杨京京¹/何丽馥¹/李敬岩¹

(辽宁医学院附属第三医院: 1. 病理科,
2. 消化内科, 辽宁 锦州 121001)

MENG Yi-ting¹, WAN Yi-zeng^{1,*}, ZHAO Li-juan²,
YANG Jing-jing¹, HE Li-fu¹, LI Jing-yan¹

(1. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital
of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001;

2. Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital
of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

【摘要】背景与目的: 探讨 JC 病毒(JCV)早期基因编码产物大 T 抗原(large tumor antigen, T-Ag)的表达及与抑癌蛋白 P53、pRb 的关系及在人结直肠腺癌发生发展中的意义。材料与方法: 应用免疫组织化学 PV 二步法检测 77 例结直肠腺癌, 20 例结直肠腺瘤和 20 例正常肠粘膜中 JCV T-Ag、P53、pRb 的表达情况。结果: 77 例结直肠腺癌组织中 JCV T-Ag、P53 和 pRb 表达阳性率分别为 36.4%、61.0% 和 55.8%, 与腺瘤组织和正常肠粘膜比较差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05)。JCV T-Ag 在结直肠腺癌的表达与组织学分级和临床病理分期无关($P > 0.05$), P53 与组织学分级相关($P < 0.05$), pRb 与 TNM 分期、淋巴结转移有关($P < 0.05$)。JCV T-Ag 与 P53、pRb 表达之间存在明显相关性($r = 0.272$, $r = 0.237$, P 均 < 0.05)。结论: JCV 与人类结直肠腺癌发生密切相关, 其编码产物大 T 抗原在致癌过程中起重要作用。

【关键词】 JC 病毒; 大 T 抗原; P53; pRb; 结直肠腺癌

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2009)03-0226-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND AND AIM: To explore the role of JC virus early region gene encoding product large tumor antigen(T-Ag) and the interaction between T-Ag and tumor suppressors P53 and pRb in human colorectal adenocarcinoma. MATERIALS AND METHODS: The expression of JCV T-Ag and P53 and pRb proteins were evaluated by immunohistochemistry PV method in 77 cases of human colorectal adenocarcinoma, 20 colorectal adenomas and 20 normal colorectal mucosa. RESULTS: The positive rate of JCV T-Ag, P53 and pRb proteins were 36.4%, 61.0% and 55.8%, respectively, in 77 cases of human colorectal adenocarcinoma, and there was an obvious difference when compared with colorectal adenomas and normal colorectal mucosa ($P < 0.05$). There was no statistically significant links between the presence of T-Ag and pT, pN, pM or differentiation degree ($P < 0.05$). P53 was closely correlated to differentiation degree ($P < 0.05$), but was not correlated to the age, site, p-TNM and lymph node metastasis ($P > 0.05$). pRb was closely correlated to p-TNM and lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was statistically significant correlation among the expression of T-Ag and P53, pRb protein ($r = 0.272$, $r = 0.237$, $P < 0.05$). CONCLUSION: JCV was closely related to colorectal adenocarcinoma. Its encoding product in the large T antigen played an important role in the carcinogenic process.

【KEY WORDS】 JC virus; large tumor antigen; P53; pRb; colorectal adenocarcinoma

近年有关 JC 病毒 (JCV) 与人结直肠腺癌及其它某些类型肿瘤发生的病因学关系已成为肿瘤学研究的一

个新热点^[1-5]。但对于 JCV 是否存在于人结直肠腺癌组织中仍无统一认识。已知人体细胞是 JCV 的半容许性细

收稿日期: 2008-12-15; 修订日期: 2009-01-16

作者简介: 孟轶婷 (1980-), 女, 河北张家口, 硕士, 研究方向: 肿瘤病理,

E-mail: dlanxuan2000@sina.com

* Correspondence to: WAN Yi-zeng, E-mail: wyz_0905@yahoo.com.cn

胞,即使 JCV 确实存在于人结直肠腺癌组织中,其是否具有致癌性及其机理国外已有相关报道,而在我国还未见这方面的报道。因此,我们采用免疫组织化学方法检测了 JCV 早期基因编码产物大 T 抗原 (large tumor antigen, T-Ag) 在人结直肠腺癌组织中的表达,及其与抑癌蛋白 P53、pRb 表达的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

组织标本选取 2007~2008 年间,辽宁医学院附属第三医院及附属第一医院手术切除的结直肠腺癌组织标本 77 例,患者术前未做过放疗和化疗。所有病例均由两位以上病理医师确诊。其中男性 44 例,女性 33 例,年龄 30~81 岁,中位年龄为 54.5 岁。按病理组织学分级,其中高-中分化 53 例,低分化 24 例。按 TNM 分期,其中标准 I 期 15 例,II 期 28 例,III 期 32 例,IV 期 2 例。另取腺瘤组织标本 20 例,非癌患者内窥镜活组织检查的正常肠粘膜 20 例作为正常对照。

1.2 试 剂

鼠抗人 SV40 T-Ag(Simian virus 40 large T antigen) 单克隆浓缩型抗体 PAb 416 与 JCV-Ag 具有交叉反应,购自美国 calbiochem 公司,工作浓度为 1:50。鼠抗人 P53 单克隆抗体(工作液)、鼠抗人 pRb 单克隆抗体(工作液)、浓缩型 DAB 显色液以及 PV-9000 染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免 疫 组 织 化 学 PV 法

石蜡切片脱蜡,脱水,柠檬酸高压热修复,滴加一抗 4 ℃ 过夜。顺次滴加试剂 1 及试剂 2,37 ℃ 孵育 20 min。DAB 显色剂显色,苏木素复染。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知标准阳性切片作为阳性对照。

1.4 判 断 结 果

免疫组织化学结果判定标准参照 ENAM^[6] 等报道的方法。P53 蛋白、pRb 和 T-Ag 蛋白均以肿瘤细胞的细胞核呈现棕黄色颗粒为其阳性细胞。采用半定量记分法判定结果,以连续观察 10 个高倍视野(×400)进行评价,先按细胞核染色强度评分:细胞核未见染色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;再按阳性细胞所占百分比评分:1%~10%为 1 分,>10%~30%为 2 分,>30%~60%为 3 分,>60%为 4 分。染色程度与阳性细胞百分比的乘积为细胞综合评分,乘积 ≥ 3 分为阳性,乘积 < 3 分为阴性。

1.5 统 计 学 方 法

采用 SPSS12.0 统计软件包进行 χ^2 检验、Fisher 精确概率法、Spearman 相关性分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结 果

2.1 JCV T-Ag、P53 和 pRb 在结直肠腺癌、腺瘤、正常肠粘膜中的表达

JCV T-Ag、P53 和 pRb 在结直肠腺癌组织中的阳性表达明显高于腺瘤组织和正常肠粘膜,其差异具有统计学意义($P < 0.05$)(见表 1,图 1~3)。

表 1 JCV T-Ag、P53、pRb 在结直肠腺癌、腺瘤、正常结肠组织中的表达情况

Table 1 The expression of JCV T-Ag,P53,pRb in colorectal adenocarcinoma, colorectal adenoma and normal colorectal mucosa.

Groups	Cases	JCV T-Ag			P53			pRb		
		+(%)	χ^2	P	+(%)	χ^2	P	+(%)	χ^2	P
Adenocarcinoma	77	28(36.4)	10.224	0.001*	47(61.0)	4.362	0.045*	43(55.8)	6.042	0.022*
Adenoma	20	0(0.00)	10.224	0.001 [▲]	7(35.0)	23.683	0.000 [▲]	5(25.0)	5.720	0.020 [▲]
Normal mucosa	20	0(0.00)			0(0.00)	8.485	0.008 [#]	17(85.0)	14.545	0.000 [#]

Adenocarcinoma compared with adenoma, * $P < 0.05$; adenocarcinoma compared with normal mucosa, [▲] $P < 0.05$; adenoma compared with normal mucosa, [#] $P < 0.05$.

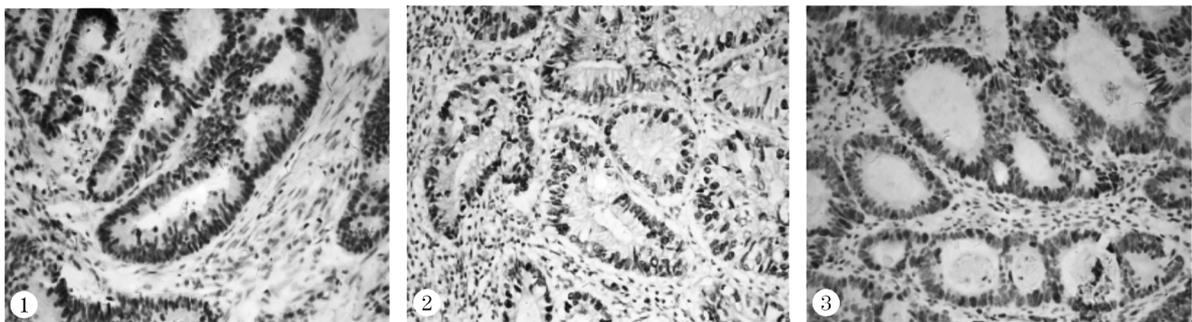


图 1 JCV T-Ag 在结直肠腺癌的表达(PV × 200) 图 2 P53 在结直肠腺癌的表达(PV × 200) 图 3 pRb 在结直肠腺癌的表达(PV × 200)
Figure 1 The expression of JCV T-Ag in colorectal adenocarcinoma(PV × 200) Figure 2 The expression of P53 in colorectal adenocarcinoma (PV × 200) Figure 3 The expression of pRb in colorectal adenocarcinoma(PV × 200)



2.2 JCV T-Ag、P53 和 pRb 的表达与结直肠腺癌临床病理特征之间的关系

JCV T-Ag 蛋白阳性表达与患者性别、年龄、肿瘤位置、组织学分级、临床病理分期无关 ($P > 0.05$)。P53 蛋白阳性表达与结直肠癌分化程度相关,高-中分化、低分化的阳性表达率分别为 49.1% (26/53)、87.5% (21/24),其差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 10.266, P < 0.05$),而与患者性别、年龄、肿瘤位置、临床病理分期无关 ($P > 0.05$)。pRb 蛋白阳性表达与 TNM 分期有关, I + II 期和 III + IV 期的阳性表达率分别为 44.2% (19/43)、70.5% (24/34),其差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 5.367, P < 0.05$); pRb 蛋白在有淋巴结转移的组织中阳性表达率为 73.5% (25/34),在无淋巴结转移的组织中阳性表达率为 41.8% (18/43),其差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 7.723, P < 0.05$)。

2.3 结直肠腺癌组织中 JCV T-Ag 与 p53、pRb 表达的相关性分析

如表 2 所示, 28 例 JCV T-Ag 阳性的结直肠腺癌中 P53、pRb 的阳性表达率分别为 78.6% (22/28)、71.4% (20/28),显著高于 JCV T-Ag 阴性的结直肠腺癌中 P53、pRb 的阳性表达率 51.0% (25/49)、46.9% (23/49)。经 Spearman 相关分析,结直肠腺癌组织中 JCV T-Ag 的表达与 P53 蛋白的表达之间存在显著相关性 ($r = 0.272, P = 0.017$),JCV T-Ag 的表达与 pRb 的表达之间存在显著相关性 ($r = 0.237, P = 0.038$)。

表 2 JCV T-Ag和P53、pRb在结直肠腺癌中表达的相关性

Table 2 Correlation between JCV T-Ag and P53, pRb in colorectal adenocarcinoma

		P53 [▲]		Rb [*]		Total
		+	-	+	-	
JCV T-Ag	+	22	6	20	8	28
	-	25	24	23	26	49
Total		47	30	43	34	77

[▲] $r = 0.272, P = 0.017$; ^{*} $r = 0.237, P = 0.038$

3 讨论

JCV 是一种 DNA 肿瘤病毒,属多瘤病毒家族。1971 年 Padgett 在进行性多灶性白质脑病 (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) 患者的神经胶质细胞核中分离到 JCV 的病毒颗粒^[7],血清学研究的数据显示,世界人口的 70%~80% 都存在 JCV 的潜伏性感染,但不同人种 JCV 的感染率间差异显著^[8-10],欧美人种的感染率远大于亚洲人种。近 20 年来人们一直认为 JCV 是一种嗜神经性病毒,与脑肿瘤的发生有关。近年国外研究结果发现,JCV 在体外可使人及动物多种组织类型正常细胞发生恶性转化,在仓鼠及转基因小鼠体内可

诱发多种肿瘤形成,但其致瘤机制尚不清楚。

本研究结果显示 JCV 早期基因编码产物 T-Ag 在人结直肠腺癌组织中有表达,这不仅间接证明了 JCV 的存在,而且其早期基因具有转录和翻译的功能,提示 JCV 与人结直肠腺癌发生密切相关。T-Ag 蛋白在结直肠腺癌的表达阳性率为 36.4% (28/77),显著高于腺瘤及正常肠粘膜,提示 JCV 可能在结直肠腺癌发生中起重要作用。Enam^[6]采用免疫组织化学技术检测 27 例结直肠腺癌组织,其 T-Ag 蛋白阳性 22 例,阳性率为 81.4%。本研究 T-Ag 表达水平较之偏低,可能缘于我国人群中 JCV 感染率较低。郭铮^[11]在国内调查的结果显示:从尿中用 PCR 法检测病毒的感染率,高者达 66%、低者仅 14%,平均为 31%,证实了 JCV 在中国也有感染。本实验 36.4% 的阳性率与郭铮报道一致。日本学者 Hori^[12]报道的 JCV 感染率为 25%,与本实验报道的数据相近,进一步说明亚洲人种 JCV 感染率低于欧美。Nosho^[13]采用免疫组织化学技术检测 22 例隆起型腺瘤和 28 例平坦型腺瘤,T-Ag 蛋白阳性例数均为 8 例,阳性率分别为 36.3% 和 28.6%。本研究 20 例腺瘤中无 T-Ag 蛋白表达,这可能与检测标本数量较少有关,因此尚不能排除 JCV 在腺瘤发生中的作用。本研究还发现在高-中分化和低分化的腺癌中均有 JCV T-Ag 蛋白的表达,两者相比差异无统计学意义,提示 JCV 与肿瘤的恶性程度无关,这与日本学者 Hori 报道一致。

有研究表明,JCV 致癌分子机理复杂多样,包括整合至细胞基因组破坏其正常结构及稳定性,反式激活细胞基因异常表达,早期区域基因编码大 T 抗原 (T-Ag),与抑癌蛋白 P53 结合,使其抑癌活性丧失等。体外实验证实,野生型 P53 蛋白半衰期短,性能不稳定,免疫组化方法难以测出如此微量的蛋白。当 T-Ag 与野生型 P53 形成特异性复合物,使其不仅丧失原有的抑癌活性,而且还转变为一种类似于突变型 P53 的功能获得性癌蛋白,促进细胞转化^[14],并可进一步激活 T-Ag C 端转化结构域的表达。复合物型 P53 代谢稳定性增强,半衰期可延长至 4 h^[15];在 T-Ag 转化的细胞中尚存在高于 T-Ag 数倍的游离型 P53,也表现为抑癌活性的丧失和半衰期的延长。因此,一般认为免疫组化测定到的 P53 蛋白表达,即表明该细胞 P53 蛋白抑癌活性丧失或 p53 基因已发生突变。同样,T-Ag 与 pRb 形成特异性复合物使 pRb 调节细胞增殖分化的功能受到抑制^[16],其半衰期的延长和量的累积,使之可用免疫组化的方法进行测定。本研究结果显示 28 例 JCV T-Ag 阳性的结直肠腺癌中 P53、pRb 的阳性表达率分别为 78.6% (22/28)、71.4% (20/28),显著高于 JCV T-Ag 阴性的结直肠腺癌中 P53、

pRb 的阳性表达率 51.0% (25/49)、46.9% (23/49)。经 Spearman 相关分析, 结直肠腺癌组织中, JCV T-Ag 与 P53 的表达存在显著相关性 ($r = 0.272, P = 0.017$), 同样 JCV T-Ag 与 pRb 的表达也存在显著相关性 ($r = 0.237, P = 0.038$)。推测 T-Ag 可能与 P53、pRb 结合形成特异性复合物, 导致 P53、pRb 抑癌活性丧失, 稳定性增加, 半衰期延长。结直肠腺癌组织中 P53 阳性率随癌细胞分化程度增高而增高, pRb 阳性表达与 TNM 分期与局部淋巴结转移有关, 间接提示 JCV T-Ag 介导的 P53、pRb 失活可能是 JCV 在结直肠腺癌发生、发展中起作用的重要机制^[17], 而 P53、pRb 的失活方式还包括点突变、缺失、重排等, 其与 JCV 感染及在结直肠腺癌演进中的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, et al. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(13): 7484 - 7489.

[2] Krynska B, Del Valle L, Croul S, et al. Detection of human neurotrophic JC virus DNA sequence and expression of the viral oncogenic protein in pediatric medulloblastomas[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(20): 11519 - 11524.

[3] Murai Y, Zheng HC, Mei H, et al. High JC virus load in gastric cancer and adjacent non-cancerous mucosa[J]. Cancer Sci, 2007, 98(1): 25 - 31.

[4] Del Valle L, White MK, Enam S, et al. Detection of JC virus DNA sequences and expression of viral T antigen and agnoprotein in esophageal carcinoma[J]. Cancer, 2005, 103(3): 516 - 527.

[5] Abdel-Aziz HO, Murai Y, Mei H, et al. Detection of the JC virus genome in lung cancers: possible role of the T-antigen in lung oncogenesis[J]. Appl Immunohisto-chem Mol Morphol, 2007, 15(4): 394 - 400.

[6] Enam S, Del VL, Lara C, et al. Association of human

polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and β -catenin[J]. Cancer Res, 2002, 62(23): 7093 - 7101.

[7] Padgett B, Zu RG, Walker D, et al. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy[J]. Lancet, 1971, 1(7712): 1257 - 1260.

[8] Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, et al. Asian genotypes of JC virus in native Americans and in a Pacific Island population: markers of viral evolution and human migration [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(26): 14542 - 14546.

[9] Ikegaya H, Iwase H. Trial for the geographical identification using JC viral genotyping in Japan[J]. Forensic Sci Int, 2004, 139(2/3): 169 - 172.

[10] Jeong BH, Lee KH, Choi EK, et al. Genotyping of the JC virus in urine samples of healthy Korean individuals[J]. J Med Virol, 2004, 72(2): 281 - 289.

[11] 郭 铮, 王跃岭, 柳雅深, 等. JC 病毒在中国感染状况的研究[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(1): 22 - 23.

[12] Hori R, Yoshihiro M, Tsuneyama K, et al. Detection of JC virus DNA sequences in colorectal cancers in Japan[J]. Virchows Arch, 2005, 447(4): 723 - 730.

[13] Noshio K, Yamamoto H, Takahashi T, et al. Correlation of laterally spreading type and JC virus with methylator phenotype status in colorectal adenoma[J]. Human Pathology, 2008, 39(5): 767 - 775.

[14] Pipas JM, Levine AJ. Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis[J]. Sem Cancer Biol, 2001, 11(1): 23 - 30.

[15] Moens U, Ghelue Van M, Johannessen M, et al. Oncogenic potentials of the human polyomavirus regulatory proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(13): 1656 - 1678.

[16] Caracciolo V, Reiss K, Khalili K, et al. Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus[J]. Oncogene, 2006, 25(38): 5294 - 5301.

[17] Eash S, Manley K, Gasparovic M, et al. The human polyomaviruses[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(7/8): 865 - 876.

(上接第 217 页)

(2) 植物多糖与膜脂质代谢 磷脂和胆固醇构成细胞膜的脂质双层骨架结构。文献报道认为肿瘤细胞磷脂增多。牛膝多糖能引起 S180 的膜磷脂减少, 而且对荷瘤 S180 小鼠的抑瘤率为 58%。

8. 大蒜

大蒜是一种十分有前途的肿瘤化学预防物质。有机硫化物是大蒜抗癌的活性成分, 其中又以二烯丙基二硫氧化物即大蒜辣 (allicin) 的抗癌活性最强。

(摘自 印木泉. 遗传毒理学[M]. 北京 科学出版社, 2002: 510 - 513)

