

p53 和 p16 蛋白在星形细胞瘤中的表达及其意义

席桂发,陈 坚,董 震,王代旭,柯 超

Expression and Significance of p53, p16 Protein in Astrocytomas

XI Gui-fa, CHEN Jian, DONG Zhen, WANG Dai-xu, KE Chao

Department of Neurosurgery, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To study the expression and significance of p53, p16 protein in astrocytomas. **Methods** To assess the expression of p53, p16 of 56 astrocytomas with S-P method of immunohistochemistry comparing to the placebo and at the same time compared with the control group. **Results** As the rank increased, p53 protein expression increased, comparison between the groups, there are significant difference ($P < 0.05$), but the deletion of p16 protein increased, comparison between the groups, there are also significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of p53 protein and deletion of p16 protein may be one of the major causes in the occurrence and becoming malignant of astrocytomas, and p53 protein may be one of the major events in the multiphase of tumor genesis and malignant progression of astrocytomas, but p16 may be the key protein in the rise and development of astrocytomas.

Keywords: Astrocytoma; p53 protein; p16 protein; Immunohistochemistry

摘要:目的 研究 p53、p16 蛋白在星形细胞瘤中的表达及其意义。方法 应用 S-P 法检测 56 例星形细胞瘤 p53 及 p16 蛋白,并同时行组间对照。结果 p53 蛋白随肿瘤级别增高表达明显增加,各级别间差异性显著($P < 0.05$)。而 p16 蛋白则随级别增高其缺失率增加,各级别间差异性显著($P < 0.05$)。结论 p53 蛋白高表达和 p16 蛋白的缺失是星形细胞瘤发生和恶变的重要原因之一。p53 表达增高可能是星形细胞瘤恶变的信号,但 p16 在星形细胞瘤的发生和恶变的过程中可能起更重要的作用。

关键词:星形细胞瘤;p53 蛋白;p16 蛋白;免疫组化

中图分类号:R730.264 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)08-0474-03

0 引言

星形细胞瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤。因手术不易完全切除,而且有的恶性程度高、易复发且死亡率高日益受到重视;尽管采用了包括手术、放疗、化疗、免疫治疗以及目前正在深入研究的基因治疗在内的综合治疗,但效果仍然并不理想。近年来,随着分子生物学实验技术的发展,认为 p53 和 p16 基因在星形细胞瘤的发生发展过程中起着重要的作用。本实验采用免疫组织化学对星形细胞瘤 p53 蛋白和 p16 蛋白进行测定和比较,并结合临床预后和病理分级进行相关研究,全面、客观地反映 p53 蛋白和 p16 蛋白在星形细胞瘤中的作用,为其诊断、分级、分类及预后估价提供有价值的参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

56 例星形细胞瘤标本来源于 2001 年 1 月 ~ 2003 年 3 月华中科技大学同济医学院附属同济医院病理科石蜡切片,厚度为 4 ~ 5 μm 。其中男性 34 例,女性 22 例,年龄范围 14 ~ 72 岁,平均年龄 47.5 岁。根据 1999 年 WHO 对星形细胞瘤的分级将其分为 I、II、III 级,并将级别较高的归于高级别组。其中 I 级 14 例, II 级 22 例, III ~ IV 级 20 例。

1.2 方法及步骤

1.2.1 试剂 10% 山羊血清, S-P 生物素标记二抗(工作浓度 1:100)为美国 Zymed 公司提供; p53 一抗(鼠单克隆抗体,工作浓度为 1:50)和 p16 一抗(鼠单克隆抗体,工作浓度为 1:50)均购自美国 NEOMARKS 公司; DAB 为美国 DAKO 公司提供。

1.2.2 免疫组织化学染色 采用 S-P 法按常规步骤进行染色, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水透明, 封片。

1.2.3 对照 用 PBS 代替一抗作阴性对照, 试剂

收稿日期:2003-08-29; 修回日期:2004-02-18

基金项目:湖北省科技厅基金资助项目(2002AA305B08)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科

盒内阳性片作阳性对照。

1.3 结果判断及半定量方法

p53、p16 均为胞核表达,阳性细胞染色呈棕黄色。高倍显微镜下(×400)观察 10 个视野计数。按阳性细胞所占比例分为 + (阳性细胞 <25%)、++ (阳性细胞 <50%)、+++ (阳性细胞 >50%)。

1.4 统计分析方法 应用 χ^2 检验进行分析。

2 结果

p53、p16 蛋白在 56 例星形细胞瘤 ~ 级中的表达见表 1、2, 两者的表达关系,见表 3。

表 1 星形细胞瘤 p53 蛋白表达

病理分级	例数	阴性例数	阳性例数			阳性率 %
			+	++	+++	
级	14	14	0	0	0	0
级	22	18	1	3	0	18.2
~ 级	20	10	2	3	5	50.0
总计	56	42	3	6	5	

结果表明: 级星形细胞瘤与 级组阳性率比较, 级组与 ~ 组阳性率比较, 级组与 ~ 组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$)

表 2 星形细胞瘤 p16 蛋白表达

病理分级	例数	阴性例数	阳性例数			阳性率 %
			+	++	+++	
级	14	2	4	4	4	85.7
级	22	8	5	4	5	63.6
~ 级	20	14	0	2	4	30.0
总计	56	24	9	10	13	

结果表明:p16 蛋白在不同级别的星形细胞瘤中表达有显著性差异

表 3 星形细胞瘤 p53 和 p16 蛋白表达

病理分级	p53		p16	
	+	-	+	-
级	0	14	12	2
级	4	18	14	8
~ 级	10	10	6	14
总计	14	42	32	24

结果表明:p53 蛋白和 p16 蛋白在不同级别的星形细胞瘤中表达有显著性差异

3 讨论

肿瘤抑癌基因的突变是许多人类神经源性肿瘤常有的特点,目前,许多研究证明这些野生型抑癌基因的产物在肿瘤的细胞增殖和肿瘤形成过程中起负调节作用。p53 和 p16 被认为是在这些基因中能调控 pRb 蛋白最重要的群体之一,并得到广泛的研究。

1979 年,Lane 等发现在用 SV40 转化的鼠

NIH3T3 细胞核中存在一种分子量为 53KD 的磷酸化蛋白,称为 p53 蛋白。编码 p53 蛋白的基因称为 p53 基因。p53 与细胞分化和抑制非正常细胞增殖的几条关键途径相关^[1]。p53 通过 p21 对 DNA 损伤作出反应从而控制 DNA 复制,促进其分化。起初人们认为该基因是一种原癌基因,后来的实验研究证明 p53 基因是一种抑癌基因。p53 基因位于人类 17p 染色体上。正常组织中 p53 蛋白含量极低,且半衰期极短,常规的免疫组化方法不能将其检测出来,而突变型的则相反,容易用免疫组化,ELISA 和流式细胞术检出,从而间接反映 p53 基因突变的发生。本文采用免疫组化方法对 p53 蛋白进行检测,发现在 级星形细胞瘤中没有发现 p53 蛋白阳性表达,在 级中有 18.2% 的阳性表达,在 ~ 级中有 50.0% 的阳性表达,各组间存在显著性差异 ($P < 0.01$)。这表明 p53 蛋白的表达水平与星形细胞瘤的恶性程度有很明显的相关性,与其组织学分级相一致。提示 p53 蛋白可以作为星形细胞瘤恶性程度和病理分级的重要参考指标。

抑癌基因 p16 是近几年来发现的与细胞周期调控和癌变密切相关基因。p16 基因属于 INK4 (inhibitorsofCDK4) 家族成员,其定位于人类染色体 9p21 位置,全长 8.5kb,由两个内含子和三个外显子组成,三个外显子共同编码一种已知的细胞周期依赖性激酶(CDK4)的抑制蛋白。p16 被认为是细胞周期依赖性激酶抑制因子(CDKIs),它能够证明 Rb 蛋白的磷酸化能力,因为 p16 和 D 族细胞周期素(CyclinD)竞争性地与 CDK4 结合,防止形成 Cyclin D-CDK4 复合物,从而阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期。因此,p16 被认为是细胞增殖的负调控因子。分子生物学资料及 p16 基因图的研究已经证明它们两者或其中的某一调控系统的破坏对大多数肿瘤的发生起重要作用^[2]。p16 既是细胞周期的有效调控者,又是抑制肿瘤细胞生长的关键因子。当 p16 基因变异而不能正常表达时,cyclinD 则与 CDK4 优势结合,使细胞生长失去控制,细胞表型产生变化^[3]。Costello^[4]发现约 50% 的胶质瘤细胞中 p16 基因没有转录或表达。免疫组织化学方法测定实体瘤组织中 p16 蛋白表达缺失率:恶性肿瘤高于良性肿瘤,恶性程度越高或组织分化越差,其 p16 蛋白缺失率越高^[5]。本实验中,p16 蛋白在 级星形细胞瘤中缺失率为 14.3%, 级为 36.4%, ~ 级为 70.0%,提示 p16 亦可以作为星形细胞瘤恶性程度和病理分级的指标。

目前,p53 基因和 p16 基因与星形细胞瘤基因治疗的研究尚处于实验研究阶段,还未见到临床实

践的报道。有关 p53 基因与星形细胞瘤的基因治疗的实验研究比较少,其原因可能是:p53 基因的分子量大约是 p16 的 4 倍,用于基因治疗不便于操作;

从 p53 基因和 p16 基因对细胞周期的调控来看,p16 要比 p53 更为直接。因此,就两者用于基因治疗的前景而言,p16 基因则要优越得多。有学者曾将 p16 基因的 cDNA 片段引入胶质瘤细胞,发现原来 p16 基因纯合缺失的瘤细胞的生长受到明显的抑制。随后的进一步研究发现原来没有 p16 蛋白表达的胶质瘤细胞在转入 p16 基因后有 p16 蛋白表达,且大多数胶质瘤细胞滞留于 G₀/G₁ 期^[6]。这为 p16 基因用于星形细胞瘤的基因治疗奠定了理论基础。

同时有学者对 p53 与星形细胞瘤的放疗及化疗敏感性进行了研究,发现如果是 p53 突变率高,则其对于放疗或化疗敏感度大大增加^[7]。我们的实验结果提示,随肿瘤级别的增加 p53 表达增加,那么这意味着高级别的星形细胞瘤对于放疗或化疗的敏感性要高得多。也有研究表明 p16 与星形细胞瘤的化疗敏感性相关,并且其相关性与药物密切相关^[8]。就这一点而言,对于临床选用合适的化疗药物有重要的指导意义。

长期以来,关于星形细胞瘤中 p53, p16 蛋白表达与预后的关系,也一直是人们所关注的问题,有学者对一千多例组织学标本进行了回顾性的研究分析,发现 40% 以上的恶性肿瘤组织可以见到 p53 阳性染色细胞,进一步研究发现肿瘤组织中 p53 高度表达的患者,其预后常常不良^[9]。Tihan^[10] 认为如果 p53 标记指数大于 15% 则往往提示预后不良。Hilton 等^[11] 认为星形细胞瘤中 p16 蛋白缺失率越高,预示患者的存活期越短。Wang 等^[12] 在另外一项实验研究中发现 p16 抑制星形细胞瘤细胞生长的能力比 p53 要强得多,这说明 p16 在星形细胞瘤的发生发展中起的作用要比 p53 大得多。本实验同样证实在星形细胞瘤中,p16 的缺失率要高得多,提示 p16 对星形细胞瘤的发生、发展及预后起更重要的作用。

总而言之,p53 和 p16 的缺失、变异是星形细胞

瘤发生和恶性变的主要原因之一。但是,对 p53 和 p16 表达调控,缺失或变异的机制,对临床分期,疗效判断,基因诊断以及如何利用其特点进行基因治疗是一个还有待进一步深入探讨的问题。

参考文献:

- [1] Costanzi StraussE, StraussBE, NaviauxRK, et al. Restoration of growth arrest by p16INK4, p21^{WAF1}, pRB and p53 independent on the integrity of the endogenous cell-cycle control pathways in human glioblastoma cell lines[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 238 (1): 51-62.
- [2] Sanding V, Brand K, Herwig S, et al. Adenoviral transfer of p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperatively to induce cell death[J]. *Nat Med*, 1997, 3 (3): 313-319.
- [3] Marx J. New tumors suppressor p16[J]. *Science*, 1994, 264 (5157): 344-345.
- [4] Costello JF, Berger MS, Huang HJ, et al. Silence of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and condensation[J]. *Cancer Res*, 1996, 56 (10): 2405-2410.
- [5] Araq W, Niishikawa R, Fumari FB, et al. Reexpression of p16/CDKN2 genes suppresses human glioma cell growth[J]. *Cancer Res*, 1995, 56 (6): 1351-1354.
- [6] Simon M, Simon C, Koster G, et al. Conditional expression of the tumor suppressor p16 in heterotopic glioblastoma models results in loss of pRB expression[J]. *J Neurooncol*, 2002, 60 (1): 1-12.
- [7] Iwate Y, Mochizuki S, Fujimoto S, et al. Alteration of CDKN2/p16 in human astrocytic tumors is related with increased susceptibility to antimetabolite anticancer agents[J]. *Int J Oncol*, 2000, 17 (3): 501-505.
- [8] Takahashi A, Ohnishi K, Wang X, et al. The dependence of p53 on radiation enhancement of thermosensitivity at different let[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 47 (2): 489-494.
- [9] Batsakis JG. p53: fifteen years after discovery[J]. *Adv Anat Pathol*, 1995, 2 (1): 71.
- [10] Tihan T, Davis R, Elowitz E, et al. Practical value of Ki-67 and p53 label indices in stereotactic biopsies of diffuse and pilocytic astrocytomas[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124 (1): 108-113.
- [11] Hilton DA, Penney M, Evans B, et al. Evaluation of molecular markers in low-grade diffuse astrocytomas: loss of p16 and retinoblastoma protein expression is associated with short survival[J]. *Am J Surg Pathol*, 2002, 26 (4): 472-478.
- [12] Wang T, Huang M, Hong CY, et al. Comparison of tumor suppressor p53, p21 and p16 gene therapy effect on glioblastoma tumorigenicity in situ[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287 (1): 173-180.

[编辑:刘红武;校对:安凤]