

星形细胞瘤中 Mdm2、p53 的表达及调控机制探讨

孙艳花¹, 钟雪云², 陈运贤³, 关弘¹

Study of the Expression and Regulation Mechanisms of Mdm2, p53 in Human Astrocytoma

SUN Yan-hua¹, ZHONG Xue-yun², CHEN Yun-xian³, GUAN Hong¹

1. Department of Pathology, The Second Renmin Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518035, China; 2. Department of Pathology, Medical College of Ji'nan University; 3. The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Science

Abstract: Objective To study the incidence of PTEN, Mdm2 and p53 expression in different histopathological grades of astrocytoma and show the reason of the p53/Mdm2 autoregulatory feedback-loop model is abnormal in tumor cell. **Methods** The surgical specimens from 68 brain astrocytoma patients were analyzed to detect Mdm2 and p53 expression with immunohistochemical method. **Results** The incidence of Mdm2 and p53 expression was 41.2% (28/68) and 45.6% (31/68) respectively in astrocytoma. With the grade of astrocytoma increasing, the level of Mdm2, p53 protein increased. There was a positive correlation between Mdm2, p53 expression and grade of astrocytoma by using Spearman Correlation test to analyze the data. 18 cases exhibited both Mdm2 and p53 positive expression and 27 cases exhibited both Mdm2 and p53 negative expression, so the incidence of simultaneous staining was 66.2% (45/68). In statistics, a positive correlation was found between Mdm2 and p53 expression. **Conclusion** There was a positive correlation between histopathological grades of astrocytoma and Mdm2 accumulation, p53 expression. Mdm2 accumulation was in accordance with p53 expression. Mdm2 and p53 co-expression was the biological characteristic of high grade tumor.

Keywords: Brain astrocytoma; Mdm2 protein; p53 protein; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨不同组织病理分级的星形细胞瘤中 Mdm2、p53 的表达水平,并从蛋白质水平分析在肿瘤细胞中 p53/Mdm2 负反馈调节机制紊乱的原因。方法 采用免疫组织化学方法检测 68 例星形细胞瘤标本中 Mdm2 和 p53 的表达水平。结果 星形细胞瘤中 Mdm2 和 p53 的表达率分别是 41.2% (28/68) 和 45.6% (31/68),随着肿瘤恶性程度的增加,Mdm2、p53 的表达率呈上升趋势,Spearman 等级相关分析显示,Mdm2、p53 的表达与肿瘤分级呈正相关。Mdm2 表达和 p53 一致表达符合率达 66.2% (45/68),两者的表达密切相关 ($P < 0.05$),Spearman 等级相关分析 Mdm2 表达与 p53 表达呈正相关 ($P < 0.01$)。结论 Mdm2、p53 的表达与星形细胞瘤组织病理分级呈正相关。Mdm2 的表达与 p53 的表达存在一致性,两者的联合表达是肿瘤高度恶性的生物学标志。

关键词: 脑星形细胞瘤; Mdm2 蛋白; p53 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: 1000-8578(2004)08-0477-03

0 引言

细胞 p53/Mdm2 负反馈调节环^[1]在生理状态下既可调节 p53 蛋白活性又可调节 Mdm2 基因的表达,但在机体发生肿瘤的情况下,p53/Mdm2 负反馈调节机制紊乱,肿瘤细胞中 Mdm2 和 p53 蛋白大量积聚。本研究通过检测不同级别的星形细胞瘤中 Mdm2、突变型 p53 的表达情况,探讨它们与肿瘤分级的相关性,并从蛋白质水平分析在肿瘤细胞中

p53/Mdm2 负反馈调节机制紊乱的原因。

1 材料与方法

1.1 样本 收集暨南大学医学院附属华侨医院神经外科 1993 年 1 月~2001 年 1 月间临床资料完整的手术切除脑星形细胞瘤标本 68 例,男性 42 例,女性 26 例,年龄 9~67 岁,平均年龄 37.1 岁,患者术前均未接受化疗和放疗。按照 1993 年 WHO 星形细胞瘤分类标准,根据 HE 染色和 GFAP 免疫组化染色对 68 例星形细胞瘤标本进行组织病理学分类,其中级 10 例,级 2 例,级 17 例,级 12 例,级 29 例。对照组为 10 例患者非肿瘤部位的正常脑组织。

1.2 抗体和试剂 一抗为鼠抗人 Mdm2 单克隆抗体(工作浓度 1:100,NeoMarkers 公司)和鼠抗人突

收稿日期:2003-07-08;修回日期:2003-11-04

基金项目:广州科技局重点攻关项目(2001-Z-037-01-2);广东省自然科学基金研究团队项目(015012)

作者单位:1. 518035 广东省深圳市第二人民医院病理科;2. 暨南大学医学院病理教研室;3. 中山大学附属第一医院

变型 p53 单克隆抗体(工作浓度为 1:200, Santa Cruz 公司)。10% 非免疫动物血清、生物素化小鼠 IgG、抗辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素及 DAB 显色试剂盒均购自美国 Maxim 公司。

1.3 方法 按免疫组化 S-P 染色法进行。每批染色均以已知阳性片做阳性对照,以 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.4 判断标准 Mdm2 蛋白主要在细胞核表达,部分细胞胞浆和胞膜也呈阳性反应,呈棕黄色颗粒状;p53 阳性部位定位于细胞核,呈棕黄色颗粒状。根据阳性染色细胞的量将免疫组化染色分为 4 个等级:(1)阴性(-):阳性细胞数 <5%;(2)阳性(+):阳性细胞数在 5% ~ 25%;(3)中度阳性(++):阳性细胞数在 25% ~ 50%;(4)强阳性(+++), > 50%。

1.5 统计方法 在 SPSS 10.0 统计软件包上采用 χ^2 检验和 Spearman 等级相关分析对实验数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 免疫组化染色特征 Mdm2 阳性细胞呈灶性或散在分布,多见于坏死组织和增生血管周围,坏死周围呈栅栏状排列的瘤细胞呈强阳性表达,部分肿瘤细胞胞核染成深褐色。p53 阳性表达定位于胞核,为棕黄色颗粒,细胞膜及细胞浆不着色。在高度异型和间变瘤细胞中 p53 蛋白呈强阳性表达,尤其见于一些大核瘤巨细胞,胞核免疫组化染色呈深褐色。

2.2 Mdm2 表达与星形细胞瘤病理分级的关系 Mdm2 蛋白总阳性率为 41.2% (28/68)。其中 级 10.0% (1/10)、级 23.5% (4/17)、级 41.7% (5/12)、级 62.1% (18/29)。Spearman 等级相关分析显示,Mdm2 阳性表达与瘤组织病理分级呈正相关 ($r=0.417$, $P=0.000$, $P<0.01$)。随着肿瘤级别升高,Mdm2 阳性表达率呈上升趋势。28 例 Mdm2 阳性表达标本中有 8 例表现强阳性(+++) ,多形性胶质母细胞瘤(级)占了 5 例(5/8, 62.5%) ,这说明 Mdm2 强阳性表达主要见于高级别星形细胞瘤,统计结果见表 1。

表 1 Mdm2 阳性表达与星形细胞瘤病理分级的相关性

病理分级	例数	Mdm2				阳性率(%)	P 值
		-	+	++	+++		
星形细胞瘤 级	10	9	1	0	0	10.0	<0.01
星形细胞瘤 级	17	13	2	1	1	23.5	
星形细胞瘤 级	12	7	1	2	2	41.7	
星形细胞瘤 级	29	11	5	8	5	62.1	

2.3 p53 表达与星形细胞瘤病理分级的关系 p53 蛋白总阳性率为 45.6% (31/68)。其中 级 10.0% (1/10)、级 35.2% (6/17)、级 50.0% (6/12)、级 62.1% (18/29), Spearman 等级相关分析显示 p53 阳性表达与瘤组织病理分级呈正相关 ($r=0.391$, $P=0.001$, $P<0.01$)。级与级、级与级、级与级的阳性表达率相比均无统计学差异 ($P>0.05$) ,提示 p53 突变在肿瘤发生早期就存在,随着肿瘤恶性程度增加,其表达率有上升趋势,统计结果见表 2。

表 2 p53 阳性表达与星形细胞瘤病理分级的相关性

病理分级	例数	p53				阳性率(%)	P 值
		-	+	++	+++		
星形细胞瘤 级	10	9	1	0	0	10.0	<0.01
星形细胞瘤 级	17	11	3	2	1	35.2	
星形细胞瘤 级	12	6	2	2	2	50.0	
星形细胞瘤 级	29	11	4	7	7	62.1	

2.4 Mdm2 表达与 p53 表达的关系 Mdm2 和 p53 表达均为阳性的标本有 18 例,均为阴性者有 27 例,一致表达符合率达 66.2% (45/68),统计学分析显示两者的表达密切相关 ($\chi^2=6.709$, $P=0.01$, $P<0.05$)。等级相关分析结果提示 Mdm2 表达与 p53 表达呈正相关 ($r=0.555$, $P=0.000$, $P<0.01$) ,统计结果见表 3。

表 3 Mdm2 表达与 p53 表达的相关性

p53	Mdm2				P 值
	-	+	++	+++	
-	27	4	6	0	<0.01
+	10	0	0	0	
++	3	5	3	0	
+++	0	0	2	8	

2.5 Mdm2/p53 联合表达与星形细胞瘤病理分级的相关性 68 例脑星形细胞瘤中,Mdm2/p53 联合表达 18 例,其中 级 1 例(6%), 级 4 例(22.2%), 级 13 例(72.2%)。表明 Mdm2/p53 联合表达主要见于多形性胶质母细胞瘤,是肿瘤高度恶性的生物学标志。

3 讨论

Mdm2 高表达在人类软组织肿瘤如肉瘤、骨肉瘤、白血病中非常常见,也见于食管癌、高级别星形细胞瘤和神经母细胞瘤。Mdm2 高表达标志着肿瘤的高度恶性、侵袭性、转移性、化疗药物耐药性等生物学特征,也是预后不好的指标^[2]。有关 p53 基因在人脑星形细胞瘤中的突变及表达异常,国内外有较多研究报道,但存在很多争议,其中争论最多的是

p53 基因的异常是发生在肿瘤的晚期还是早期。有些研究认为 p53 基因异常在星形细胞瘤发生早期就存在,它不但见于多形性胶质母细胞瘤也见于低级别星形细胞瘤。在他们的实验中,p53 突变在高级别和低级别星形细胞瘤中均存在^[3]。但有些学者在研究中发现 p53 基因突变仅见于胶质母细胞瘤和间变型星形细胞瘤,而未见于低度恶性星形细胞瘤,因而认为 p53 基因异常是星形细胞瘤发生晚期的分子事件^[4]。本研究检测了不同级别的星形细胞瘤中 Mdm2、突变型 p53 蛋白的表达水平,发现随着星形细胞瘤恶性程度的增加,Mdm2、突变型 p53 蛋白表达率也上升,Mdm2、突变型 p53 蛋白表达与星形细胞瘤病理分级呈正相关。本研究结果还提示,p53 突变在肿瘤发生早期就存在,是肿瘤发生早期的分子事件,随着肿瘤恶性程度增加,其表达率有上升趋势。

Mdm2 蛋白与 p53 结合并抑制 p53 的功能,这是 Mdm2 促进癌细胞生长的主要机制之一。Mdm2 抑制 p53 蛋白的活性主要是通过以下两种方式:形成 Mdm2-p53 蛋白复合物;或促进 p53 蛋白的降解。此外,Mdm2 还作为一种穿梭蛋白介导 p53 蛋白的核浆转运。在非应激的情况下,Mdm2 维持 p53 蛋白低水平,主要是通过增强 26S 蛋白小体的蛋白降解作用。在应激的情况下,Mdm2 连接到 p53 蛋白的能力被阻断或改变,防止了 Mdm2 介导的降解作用,p53 蛋白被激活^[1,5]。本研究在同一星形细胞瘤病例中同时检测 Mdm2 和 p53 蛋白的表达,结果表明一致表达符合率达 66.2%,显示两者的表达具有协同性。在 18 例 p53/Mdm2 联合表达的星形细胞瘤病例中,Ⅱ级 13 例占 72.2%,可见 p53/Mdm2 联合表达主要见于高级别星形细胞瘤,是肿瘤高度恶性的生物学标志。p53 与 Mdm2 之间存在负反馈调节机制,Mdm2 高表达能够介导 p53 蛋白的降解,两者的表达应该具有拮抗性,而不是表现为协同性,这与我们的研究结果似乎相互矛盾。我们认为细胞内突变型 p53 蛋白大量积聚激活 Mdm2 基因转录,从而导致 Mdm2 蛋白表达增加。但由于突变型 p53 蛋白稳定性增强,它能抵抗 Mdm2 蛋白对它的降解

作用而继续刺激 Mdm2 基因的转录,最终引起肿瘤细胞内 p53 和 Mdm2 蛋白的大量积聚。Kubbutat 等^[6]也认为 Mdm2 或 p53 蛋白被修饰如磷酸化后,蛋白的稳定性增强,Mdm2 对 p53 蛋白的降解作用会受到抑制。

实验中我们还发现 Mdm2 蛋白在细胞浆和细胞膜中表达的现象。尽管有文献把 Mdm2 蛋白在胞浆和胞膜的表达归为非特异染色^[7],但我们认为 Mdm2 在胞浆和胞膜的表达也有研究意义。它可能提示 Mdm2 基因大量转录但蛋白入核运动受阻,积聚在胞浆,从而引起胞浆和胞膜的阳性染色。Mdm2 蛋白在胞浆合成后,在核定位信号的引导下从胞浆进入胞核,这一过程需要 PI3K/Akt 信号转导通路的参与^[8]。PTEN 是一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,它对 PIP3 的 3'磷酸特异去磷酸阻滞 PI3K/Akt 信号转导通路^[9]。有研究表明,野生型 PTEN 基因转染可以阻滞 Mdm2 蛋白的入核过程^[8],肿瘤细胞中 Mdm2 蛋白在胞浆的积聚是否与 PTEN 基因有关尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Ch ⑤eP. Inhibitin gthe p53-MDM2interaction:anim portant targetforcancerthera py[J]. NatRevCancer,2003,3 (2):102-109.
- [2] FreedmanDA,WuL,LevineAJ. FunctionsoftheMDM2onco - protein[J]. CellMolLifeSci,1999,55 (1):96-107.
- [3] SarkarC,RalteAM,SharmaMC,etal. Recurrentastroc ytictu - mours:astud yof p53immunoreactivi yandmali gnant progression [J]. BrJNeurosurg,2002,16 (4):335-342.
- [4] FultD,Brockme yerD,TullousMW,etal. p53mutationand lossofheteroz ygosityonchromosomes17and10durin ghuman astrocytoma progression[J]. CancerRes,1992,52 (3):674-679.
- [5] MichaelD,OrenM. The p53-Mdm2moduleandtheubi quitin system[J]. SeminCancerBiol,2003,13 (1):49-58.
- [6] KubbutatMH,JonesSN,VousdenKH. Re gulationof p53sta - bilityb yMdm2[J]. Nature,1997,387 (6630):299-303.
- [7] 浣孝强,孟斌,邓卓霖. MDM2、p53 和 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在胃癌中的表达及意义[J]. 广西医科大学学报,2002,19 (1):35-38.
- [8] MayoLD,DixonJE,DurdenDL,etal. PTEN protects p53 fromMdm2andsensitizescancercellstochemothera py[J]. JBiol Chem,2002,277 (7):5484-5489.
- [9] 孙艳花,钟雪云. PTEN 与信号转导及肿瘤[J]. 中国病理生理杂志,2002,18 (3):326-329.

[编辑校对:安凤]