

多发性骨髓瘤骨髓组织中 p53 与血管新生的关系

孟建波,王金铠,王俊祥

Correlation of p53 expression and angiogenesis in bone marrow biopsies of multiple myeloma

MENG Jian-bo, WANG Jin-kai, WANG Jun-xiang

Department of Hematology, Hebei Medical University Third Hospital, Shijiazhuang 050051, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expression of p53, vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis in bone marrow biopsies of multiple myeloma. **Methods** The expression of VEGF, p53 and microvascular density (MVD) were examined by in situ hybridization and immunohistochemical staining in bone marrow biopsies of 42 multiple myeloma patients. **Results** The positive expression rate of VEGF was 52.4% (22/42), the positive expression rate of p53 was 21.4% (9/42). Comparative study of the series sections and statistical analysis revealed that p53 expression was correlated with VEGF ($P < 0.05$), MVD in p53 positive expression cases was significantly higher than MVD in passive cases ($P < 0.01$), and MVD in VEGF positive expression cases was significantly higher than MVD in passive cases ($P < 0.01$). **Conclusion** The mutant p53 might stimulate angiogenesis by upregulating VEGF expression in bone marrow of multiple myeloma.

Keywords: Multiple myeloma; p53; VEGF; Angiogenesis

摘要:目的 研究多发性骨髓瘤骨髓组织中 p53 基因和 VEGF 表达与血管新生的关系。方法 应用原位杂交及免疫组化染色技术对 42 例多发性骨髓瘤患者骨髓组织中 VEGF、p53 及微血管密度(MVD)进行检测。结果 VEGF 的阳性率为 52.4% (22/42), p53 的阳性率为 21.4% (9/42)。经连续切片对比及统计学分析显示, p53 的表达与 VEGF 的表达显著相关 ($P < 0.05$); 并且 p53 阳性组 MVD 显著高于阴性组 MVD ($P < 0.01$), VEGF 阳性组 MVD 显著高于阴性组 MVD ($P < 0.01$)。结论 多发性骨髓瘤骨髓组织中 p53 突变可以上调 VEGF 的表达, 促进血管新生。

关键词: 多发性骨髓瘤; p53; 血管内皮细胞生长因子; 血管新生

中图分类号: R733.302 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2003)06-0478-02

0 引言

血管新生在肿瘤的发生与发展过程中起着重要的作用, 血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 作为一种血管新生正调控因子, 其作用日益受到重视。最近研究证明某些实体肿瘤组织的 p53 表达与 VEGF 及微血管密度 (microvascular density, MVD) 密切相关^[1]。我们应用原位杂交及免疫组化染色技术对多发性骨髓瘤骨髓组织中 VEGF、p53 及 MVD 进行了研究, 现报道如下:

1 资料与方法

1.1 病例资料 1999 年 1 月 ~ 2002 年 11 月于河北医科大学第三医院就诊的多发性骨髓瘤初发患者髂后上嵴骨髓活检组织标本 42 例, 其中男性 31 例,

女性 11 例, 年龄 50 ~ 77 岁, 中位年龄 63 岁, Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期患者分别为 11、6、25 例, 诊断及分型均符合文献标准^[2]。

1.2 试剂与方法

1.2.1 VEGF 原位杂交试剂盒 购自武汉博士德生物工程有限公司, 采用针对人 VEGF mRNA 的特异性寡核苷酸探针, 经地高辛标记, DAB 显色。

1.2.2 因子相关抗原免疫组化试剂盒 购自北京中山生物技术有限公司, 一抗为兔抗人 α -RAg 的多克隆抗体, DAB 显色。

1.2.3 p53 免疫组化试剂盒 购自北京中山生物技术有限公司, 一抗为鼠抗人 p53 单克隆抗体, DAB 显色。操作按试剂盒说明书进行。

1.3 结果判定

1.3.1 MVD 测定 微血管用因子相关抗原来显示, 微血管判定和计数方法参照文献^[3]。每张切片于 100 倍光镜下选择 3 个微血管最多的区域作为

收稿日期: 2003-01-20; 修回日期: 2003-04-21

作者单位: 050051 石家庄, 河北医科大学第三医院血液科

科

“热点区”,于 400 倍光镜下(视野范围 0.2376 mm^2)计数每个“热点区”的微血管数,取其均值来表示 MVD。

1.3.2 VEGF 阳性判定 参照文献采用半定量计分方法^[4],由两名病理医师在不了解临床情况下计数每张切片的 5 个具有代表性的 400 倍视野,对每张切片阳性细胞着色强度 a(阴性、弱阳性、阳性、强阳性)和阳性细胞百分数 b(0、25%、50%、75%)按不同程度分为 0、1、2、3 分,确定 $a+b < 3$ 为阴性, $a+b \geq 3$ 为阳性。

1.3.3 p53 阳性判定 参照 1.3.2。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件包处理,p53 与 VEGF 相关性应用 χ^2 检验,p53、VEGF 阳性组与阴性组间 MVD 差异应用 t 检验, $P < 0.05$ 时有显著意义。

2 结果

VEGF 为棕褐色细胞浆阳性染色,阳性表达率为 52.4% (22/42)(见图 1);p53 为棕褐色细胞核阳性染色,阳性表达率为 21.4% (9/42)(见图 2);VEGF 与 p53 均阳性者表达率为 19.1% (8/42),均阴性者表达率为 45.2% (19/42)。经连续切片对比分析表明,在 p53 表达较多的区域,VEGF 表达高,MVD 计数也高(见图 3)。经统计学分析显示,p53 与 VEGF 表达有显著相关性 ($\chi^2 = 4.40, P < 0.05$);p53 阳性组 MVD 为 117 ± 19 ,阴性组 MVD 为 75 ± 19 ,两者比较有显著性差异 ($t = 5.736, P < 0.01$);VEGF 阳性组 MVD 为 95 ± 24 ,阴性组 MVD 为 68 ± 22 ,两者比较有显著性差异 ($t = 3.852, P < 0.01$)。

3 讨论

血管新生指机体内新血管形成的过程。1971 年,Folkman 提出肿瘤在新血管形成前可长期保持原位癌状态,只有在新血管形成后,肿瘤才迅速生长,即肿瘤的生长与转移依赖于血管新生,阻断血管新生可以抑制肿瘤生长。经过三十年来对血管新生的广泛研究,血管新生在肿瘤中的作用已得到了确认。现在普遍认为肿瘤的发生是一个多步骤的过程,血管新生是此过程中的限速步骤。最近几年,越来越多的研究表明血管新生与恶性血液系统疾病的发生、发展及预后密切相关。血管新生的过程是受正性及负性调节因子共同调控的,VEGF 作为最常见且强力的正性调节因子,在恶性血液系统疾病中的作用日益受到重视。对于多发性骨髓瘤,其患者

MVD 显著高于健康人,是影响多发性骨髓瘤患者生存的独立预后因素^[5]。研究还发现多发性骨髓瘤患者液体中 VEGF 的表达水平与多发性骨髓瘤进程密切相关^[7]。我们的研究发现多发性骨髓瘤骨髓中 VEGF 表达水平与 MVD 一致,这进一步证明 VEGF 作为血管新生因子,通过促进新血管生成,在多发性骨髓瘤发病过程中起着重要作用。

原癌基因激活与抑癌基因失活被认为是肿瘤血管新生的重要原因之一,p53 作为一种抑癌基因,它的突变在肿瘤的发生、发展中发挥着重要作用。实验室研究发现野生型 p53 以剂量依赖的方式抑制 VEGF 启动子的活性,而 p53 突变可使 VEGF 的表达量升高,且突变强度与 VEGF 的表达强度显著正相关^[8]。p53 野生型蛋白在体内的半衰期很短,而突变型蛋白半衰期长,所以免疫组化检测到的 p53 蛋白为突变型蛋白。我们的研究发现无论从连续切片对比还是从统计学分析中,多发性骨髓瘤骨髓组织中突变 p53 表达与 VEGF、MVD 相一致,这证明 p53 突变作为血管新生的启动因素,在多发性骨髓瘤发病过程中起着重要作用。所以在今后针对多发性骨髓瘤的抗血管新生治疗过程中,不仅可以抑制血管新生因子 VEGF,还可以在其上游进行 p53 的基因治疗,以阻断肿瘤细胞血供,达到治疗肿瘤目的。(本文图见封 2)

参考文献:

- [1] Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, et al. Inositol phosphatase 1 β is a novel growth factor for human gastric cancer cells. *Int J Cancer*, 1998, 77 (10): 1704-1709.
- [2] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].第 2 版.北京:科学出版社,1998.373-376.
- [3] Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 1994, 87 (3): 503-508.
- [4] Shibusawa T, Shijubo N, Abe S. Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in gastric adenocarcinoma. *J Clin Cancer Res*, 1998, 4 (6): 1483-1487.
- [5] Sezer O, Niemoller K, Eucker J, et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol*, 2000, 79 (10): 574-577.
- [6] Dankbar B, Padro T, Leo R, et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, 2000, 95 (8): 2630-2636.
- [7] Sezer O, Jakob C, Eucker J, et al. Serum levels of the bFGF, VEGF and HGF in multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 2001, 66 (22): 83-88.
- [8] Mukhopadhyay D, Bucana CD, Sukhatme VP. Wild-type p53 and Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Cancer Res*, 1995, 55 (24): 6161-6165.

(周永红校对)

脑胶质瘤 bFGF 蛋白表达与增殖活性的研究

(正文见 464 页)

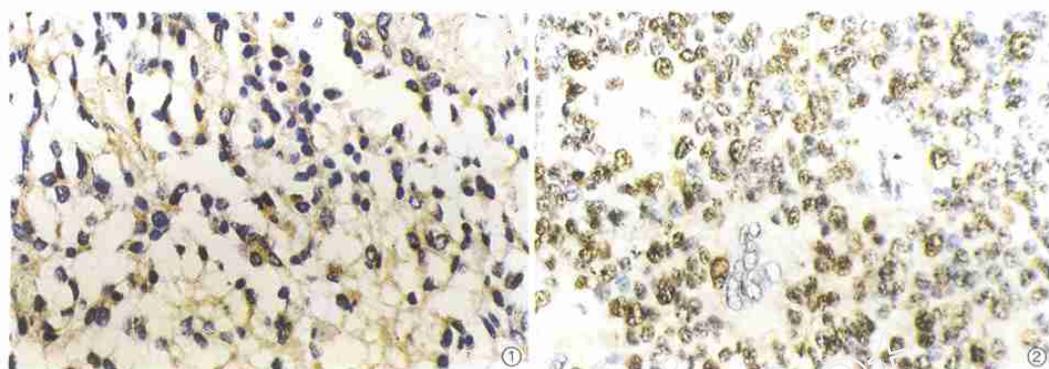


图1 bFGF 免疫组化染色, 胞浆呈棕黄色为阳性细胞 (DAB 染色, $\times 400$)

图2 PCNA 免疫组化染色, 胞核呈棕黄色为阳性细胞 (DAB 染色, $\times 400$)

多发性骨髓瘤骨髓组织中 p53 与血管新生的关系

(正文见 478 页)

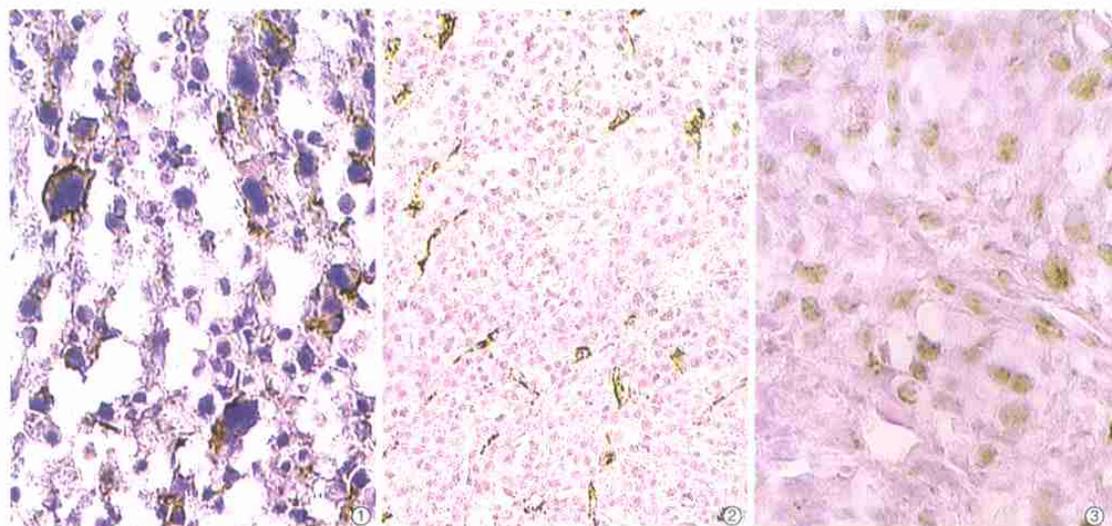


图1 多发性骨髓瘤骨髓组织 VEGF mRNA 原位杂交染色 (DAB 显色, $\times 400$)

图2 多发性骨髓瘤骨髓组织 VEGFR 因子相关抗原免疫组化染色 (DAB 显色, $\times 100$)

图3 多发性骨髓瘤骨髓组织 p53 免疫组化染色 (DAB 显色, $\times 400$)