

p53、Ras 与 VEGF 在肝细胞肝癌中表达的关系

李海民,赵爱志,窦科峰

摘要:目的 研究肝细胞肝癌中血管内皮生长因子(VEGF,vascularendothelial growthfactor)的表达与 p53、Ras 之间的关系。方法 用免疫组化的方法研究了 45 例肝癌标本 VEGF、p53 及 Ras 的表达。结果 VEGF 的表达率为 64.4% (29/45), p53 的表达率为 48.9% (22/45), Ras 表达率为 53.3% (24/45)。经连续切片对比分析表明,在 VEGF 表达较高的区域,p53、Ras 的表达亦较强,但²检验仅发现 p53 突变与 VEGF 表达相关($\chi^2=5.65, P<0.05$),而未发现 Ras 与 VEGF 表达的相关性($\chi^2=0.90, P>0.05$)。结论 在肝细胞肝癌中,VEGF 的表达与 p53 的表达正相关,而与 Ras 不相关。

关键词: p53;Ras;VEGF; 肝细胞肝癌

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2002) 03-0187-02

The relationshi poftheex pressionof p53、RasandVEGF inhe patocellularcarcinoma

LI Hai -min, ZHAO Ai -zhi, DOU Ke -feng

Hepatobiliar y sur gical department of xi jin g hospital ,

The Fourth Militar y Medical Universit y, Xi 'an 710032, China

Abstract: Objective To investi gatetherelationshi poftheex preesionof p53,RasandVEGF inhe patocel- lularcarcinoma. **Methods** Theex pressionof p53,RasandVEGF wereinvesti gatedwiththeimmunohistoche - mistrystud y. **Results** Theex pressionratesofVEGF, p53andRaswas64.4% (29/45), 48.9% (22/45), 53. 3% (24/45) respectively. Com parativestud yoftheseriessectionsrevealedthatintheareaswithhi gherVEGF expressionthereweremoreintensive p53andRasex pressions. But ²testshowedthatVEGFex pressionwas correlatedonl ywith p53 ($\chi^2=5.65, P<0.05$) butnotRas ($\chi^2=0.90, P>0.05$). **Conclusion** VEGFex pres- sionwascorrelatedsi gnificantl ywiththeex pressionof p53, butnotwithRas.

Keywords: VEGF; p53; Ras; He patocellularcarcinoma

目前虽然关于 p53 和 Ras 对 VEGF 表达的调控研究相对较多,但很少有它们与 VEGF 之间对关于肿瘤临床方面的报道。为此,本研究采用了免疫组化染色的方法对肝癌组织中 p53、Ras 与 VEGF 表达之间的关系进行了探讨。

1 材料与方 法

1.1 45 例肝细胞肝癌标本取自 1994 ~ 1997 年西京医院行手术切除、病理诊断明确的标本,VEGF 兔抗人多克隆抗体购自北京中山公司,p53 (突变型)、Ras

单克隆抗体、APA 试剂盒购自武汉博士德公司,染色步骤按试剂盒说明进行。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2 结果判断及统计学分析 染色强度明显高于阴性对照者为阳性,p53、Ras 均为核阳性,VEGF 为细胞浆阳性。应用²检验, $P<0.05$ 为相差显著。

2 结果

VEGF 为棕褐色细胞浆阳性染色,阳性表达率为 64.4% (29/45), p53、Ras 的阳性染色为棕褐色核阳性染色,p53 阳性率为 48.9% (22/45), Ras 阳性率为 53.3% (24/45),经连续切片对比分析可以看出,在 VEGF 表达较高的区域,p53、Ras 的表达亦较强,但相关分析仅发现 p53 突变与 VEGF 表达相关,而未发现 Ras 与 VEGF 表达的相关性,见表 1、表 2。

收稿日期:2001-07-05; 修回日期:2002-04-05

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院肝胆外科

表 1 p53 表达率与 VEGF 的关系

p53	VEGF	
	+	-
+	18	4
-	11	12

$$\chi^2 = 5.65 \quad P < 0.05$$

表 2 Ras 表达率与 VEGF 的关系

Ras	VEGF	
	+	-
+	17	7
-	12	9

$$\chi^2 = 0.90 \quad P > 0.05$$

3 讨论

Folkman 认为肿瘤的发生是一个多步骤的过程,而血管生成是肿瘤发展的限速步骤,在肿瘤进展中血管生成这一表型可能是原癌基因激活和抑癌基因失活的结果^[1],这一点在 Olga 的试验中得到了证实:p53 突变和 Ras 激活使 VEGF 的表达量升高,而血管生成抑制因子 TSP 则显著下降,说明 p53 突变和 Ras 激活在肿瘤血管生成开关中起到了重要作用^[2]。

p53 突变型蛋白较野生型蛋白在体内的半衰期长,所以可以用免疫组化的方法检测细胞中的突变型 p53 蛋白,而野生型 p53 用这种方法通常是不能检测到的。尽管存在一些争议,但许多研究表明,检测 p53 突变型蛋白的表达与其他方法(如 DNA 序列分析、原位杂交等)检测到的 p53 基因突变相符。本实验就采用了以检测 p53 突变蛋白的方式来评价 p53 基因突变与 VEGF 表达之间的关系。本研究发现,无论从连续切片对比分析 p53 和 VEGF 蛋白表达的部位还是从统计学的分析中,都可以看出 p53 突变与 VEGF 的表达显著相关。即当野生型 p53 发生突变后就失去了抑制 VEGF 转录及表达的功能,导致肿瘤血管的新生,这与目前大多数的研究结果相符^[3,4]。我们的研究还发现 p53 表达强度与 VEGF 的表达强度显著正相关,这与 Mukhopadhyay 等人的结果,即野生型 p53 以剂量依赖的方式抑制 VEGF 启动子的活性相符^[5]。这些结果说明,在肝癌的血管生成和 VEGF 表达的调控方面,可能与其他肿瘤没有较大的差异,野生型 p53 均起到重要作用。

本实验所用 Ras 抗体是鼠抗人 p53 Ras 单抗,可同

时识别突变的 K-Ras 和 H-Ras, 所以本实验研究的是所有 Ras 基因的突变。有研究表明突变的 K-Ras 和 H-Ras 癌基因均可上调 VEGF 的表达,从而参与肿瘤的血管生成^[6]。我们发现,虽然 Ras 的表达率高于 p53,而且经连续切片对比分析可以看出,Ras 阳性表达与 VEGF 的表达在分布上具有一定的一致性,但统计学分析未见差异性。关于 Ras 与 VEGF 的关系,我们的结果与一些报道不相符,这可能是由于免疫组化的局限性造成的,没有能很好地反应基因水平的改变,或者可能是肝癌的血管生成及 VEGF 表达的调控具有其特殊性,Ras 突变在这方面不起主要作用,而与肿瘤的致癌性或其他方面的特征相关。

迄今为止,未见关于肝癌的血管生成与 VEGF 表达,p53、Ras 突变间关系的报道,我们的研究表明,在这方面 p53 可能起更重要的作用,针对 p53 突变的基因治疗,不仅可以从其致癌性方面加以治疗,还可以纠正血管生成调节中的不平衡,抑制 VEGF 的表达,使肝癌血供减少,进而促进其坏死、凋亡、阻断转移。

参考文献:

- [1] Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical application of research on angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333: 1757-1763.
- [2] Olga V, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity [J]. *Oncogene*, 1997, 14: 1495-1502.
- [3] Takahashi Y, Bucana CD, Ckear y KR, et al. p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer [J]. *Int J Cancer*, 1998, 79: 34-38.
- [4] Bouvet M, Ellis LM, Niahizaki M, et al. Adenovirus-mediated wild p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 2288-2292.
- [5] Mukhopadhyay D, Bucana CD, Sukhatne VP. Wild p53 and v-src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression [J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 6161-6165.
- [6] Rak J, Mitsuhashi Y, Bakyko L, et al. Mutant ras oncogenes up-regulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 4575-4590.

(李奇明校对)