

胶质瘤 p53、p16、bcl2、c-fos 蛋白表达和细胞凋亡

吴礼高^{1,2}, 何杰³, 王朝夫⁴, 吴强¹, 龚晓萌²

[摘要]目的: 探讨 p53、p16、bcl2、c-fos 基因在胶质瘤的表达水平和细胞凋亡与胶质瘤的发生、发展的关系。方法: 采用免疫组织化学和原位末端标记 (ISEL) 技术, 对不同组织学级别 150 例胶质瘤石蜡标本进行基因蛋白和细胞凋亡的检测。结果: 150 例胶质瘤中 p53、p16、bcl2、c-fos 蛋白的阳性率分别为 50.00%、38.67%、61.33%、46.67%; p53、p16、bcl2 蛋白表达差异在各组间均有统计学意义 ($P < 0.005$), c-fos 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 随胶质瘤级别升高, bcl2 蛋白表达水平增高, 瘤细胞凋亡减少, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论: p53、p16、bcl2、c-fos 基因的异常表达在胶质瘤的发生、发展过程中起重要作用。p53、p16、bcl2、c-fos 基因的协同作用促使细胞凋亡机制障碍, 细胞增殖和凋亡失控。p53、p16、bcl2、c-fos 基因蛋白的检测对判断预后、指导临床基因治疗有重要意义。

[关键词] 脑肿瘤; 胶质瘤; 癌基因蛋白类; 凋亡; 免疫组织化学; 原位末端标记

[中国图书资料分类法分类号] R 739.44; R 730.264 [文献标识码] A

Expression of p53 p16 bcl2 c fos protein and cell apoptosis in 150 cases of cerebral glioma

WU Li gao^{1,2}, HE Jie³, WANG Chao fu⁴, WU Qiang¹, GONG Xiaomeng²

(1. Department of Pathology Anhui Medical University, Hefei 230032; 2. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003; 3. Department of Pathology Zhongda Hospital Southeast University, Nanjing 210009; 4. Department of Pathology, Affiliated Cancer Hospital Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between p53 p16 bcl2 c fos gene expression level and cell apoptosis in cerebral glioma with the development and progression. **Methods** The expression of p53 p16 bcl2 c fos protein was detected in 150 cases of different grade cerebral glioma by immunohistochemistry and cell apoptosis by using *in situ* end labeling (ISEL) technique. **Results** The positive expression rate of p53 p16 bcl2 c fos protein in 150 cases of cerebral glioma was 50.00%, 38.67%, 61.33%, 46.67%, respectively. There was significant difference of the expression of p53 p16 bcl2 protein among I-IV grade glioma ($P < 0.005$), there was no significant difference of the expression of c fos protein ($P > 0.05$). With the higher of the positive intensity of bcl2 protein, cell apoptosis was decrease in the tumor but there was no significant difference of the cell apoptosis ($P > 0.05$). **Conclusions** The abnormal expression of p53 p16 bcl2 c fos protein played an important role in the development and progression of cerebral glioma. The cooperation of the p53 p16 bcl2 c fos protein may cause disorder of cell apoptosis and unbalance of cell proliferation and apoptosis. Then the detection of p53 p16 bcl2 c fos protein may play an important role in prognosis and clinic gene therapy.

[Key words] brain neoplasm; glioma; oncogene protein; apoptosis; immunohistochemistry; *in situ* end labeling

胶质瘤是最常见的颅内肿瘤, 约占颅内肿瘤 40%~50%。同其它肿瘤一样, 胶质瘤的发生也是多基因改变、多阶段发展的结果^[1~3]。为进一步探讨多基因变异在胶质瘤发生、发展中的意义, 我们检测了 150 例胶质瘤中 p53、p16、bcl2、c-fos 基因蛋白的表达, 并对其细胞凋亡进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集脑胶质瘤石蜡标本 150 例。男 80 例, 女 70 例; 年龄 3~80 岁。按最新 WHO 标

准进行组织学分级, 其中 I 级 1 例, II 级 34 例, III 级 60 例, IV 级 55 例。

1.2 方法 (1)免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC): 采用 SP 法, DAB 显色。即用型一抗 p53、p16、bcl2 为单抗, c-fos 为多抗。所有试剂均购自福州迈新公司。常规脱蜡后经微波修复抗原, 按照试剂盒说明进行操作, 以磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。(2)原位末端标记 (*in situ* end labeling, ISEL): 参照文献^[4]操作。TDT, biotin-dUTP, 10× buffer 购自上海华美公司, 其余购自福州迈新公司。以小鼠小肠组织作阳性对照。(3)结果判断标准: 阳性信号为棕黄色 (或棕褐色) 颗粒。IHC: bcl2 蛋白表达定位于胞膜上或胞质内, p53、p16、c-fos 蛋白表达定位于胞核内。“+”示阳性细胞数为 30% 以下, “++”示阳性细胞数为 30%~60%, “+++”示阳性细胞数为 60% 以上。ISEL: 多数阳性信号定位于胞核内, 少数定位于胞核及胞质内。

[收稿日期] 2006-08-07

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目 (00044302)

[作者单位] 1. 安徽医科大学 病理学教研室, 安徽 合肥 230032; 2. 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233003; 3. 东南大学附属中大医院 病理科, 江苏 南京 210009; 4. 复旦大学附属肿瘤医院 病理科, 上海 200032

[作者简介] 吴礼高 (1970-), 男, 讲师。

1.3 统计学方法 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 胶质瘤中 p53, p16, bcl2, c fos蛋白的检测结果 阳性率分别为 50.00%、38.67%和 61.33%、46.67%；p53, p16, bcl2蛋白阳性表达差异在各组间均有统计学意义 ($P < 0.005$)，c fos蛋白阳性表达差异在各组间无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 1、2 及表 1)。

2.2 胶质瘤中细胞凋亡检测结果 总阳性率为 38.00%。随 bcl2蛋白表达强度的增加，阳性率依次为 41.3%、39.39%、23.81%和 20.00%，组间阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 3及表 2)。

表 1 胶质瘤分级与 p53, p16, bcl2, c fos蛋白表达的关系

组织学 分级	n	p53				p16				bcl2				c fos			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
I	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
II	34	24	6	4	0	7	18	8	1	20	10	4	0	21	11	2	0
III	60	33	16	9	2	44	12	3	1	20	28	8	4	32	24	2	2
IV	55	17	17	12	9	41	8	4	2	18	28	8	1	26	25	4	0
合计	150	75	39	25	11	92	39	15	4	58	67	20	5	80	60	8	2
Hc	-	17/97				30/23				57/35				5/40			
P	-	<0.005				<0.005				<0.005				>0.005			

表 2 Bcl2蛋白表达水平与肿瘤细胞凋亡的关系 (n)

bcl2蛋白 表达强度	ISEL		合计	阳性率 (%)	Hc	P
	-	+				
-	33	25	58	43.10		
+	40	26	66	39.39		
++	16	5	21	23.81	3/16	>0.05
+++	4	1	5	1.5		
合计	93	57	150	38.00		

3 讨论

抑癌基因 p53位于人染色体 17p13.1，其编码蛋白分野生型和突变型，一般免疫组织化学仅能检测突变型蛋白。其野生型蛋白与细胞周期的调控、DNA 修复、细胞凋亡等重要生物学功能有关。p53可下调 bcl2的表达，诱导 DNA 损伤的细胞或损伤不能修复的细胞凋亡，从而保证基因组的稳定性。p53突变，使 DNA 损伤的细胞逃过监控机制；再者，突变的 p53抑制细胞内转录因子活性的作用减弱，使转录因子 (如 c fos蛋白) 的活性增强，进而基因组不稳定的细胞不断增殖形成肿瘤。随着 p53突变程度不断增加，达到足以维持肿瘤恶性表型，肿瘤由良性转为恶性。文献报道，p53基因突变是星形胶

质细胞瘤演变过程中的一个常见遗传事件，是胶质瘤恶性转变的信号之一^[5]。本组 150例胶质瘤中 p53蛋白的阳性率达 50.00%，各组间表达差异有统计学意义 ($P < 0.005$)，与大多数文献报道相近，其蛋白的表达水平与肿瘤组织学分级有密切的联系。因此，认为 p53基因突变是胶质瘤发生、发展的重要因素之一。p53作为判断预后的重要指标，而且对指导临床治疗也有意义^[6,7]。

多肿瘤抑制基因 p16 (又名 CDKN₂) 位于人染色体 9p²¹，编码细胞周期依赖性激酶 (CDK4) 的抑制蛋白，该蛋白能特异性地同 cyclinD 竞争，与 CDK4 结合，并抑制其活性，可阻止细胞由 G1 期进入 S 期，从而抑制细胞增殖。当 p16 异常，不能正常表达，cyclinD 与 CDK4 优势结合，可导致细胞生长失控，细胞表型改变。因而 p16 既是细胞周期有效调节者，又是抑制肿瘤细胞生长的关键因子。本组 150例胶质瘤总表达阳性率为 38.67% (58/150)，而缺失率达 61.33%，随组织学级别升高，缺失率亦升高，各组间差异有统计学意义 ($P < 0.005$)。p16 的缺失与脑胶质瘤的组织学分级及预后有密切的关系，有学者认为 p16 蛋白可更加准确估计预后^[8]。说明 p16 基因表达异常也是胶质瘤发生的重要原因之一。而 p53 在高度恶性组的高表达和 p16 蛋白在高度恶性组的低表达似乎表明它们在脑胶质瘤恶性演进中有某种协同作用。

抗凋亡基因 bcl2 定位于人染色体 18q21，正常情况下其编码蛋白与野生型 p53, cmyc 蛋白等共同参与细胞增殖与凋亡动态平衡的调控。但其异常表达单独存在不足以引起肿瘤，却是其它基因异常事件累积导致细胞转化和肿瘤形成的必要前提。而且可能提高胶质瘤细胞浸润性生长的能力^[9]。本组 150例中，bcl2 蛋白表达阳性率达 61.33% (92/150)，各组间差异有统计学意义 ($P < 0.005$)。并且随着 bcl2 蛋白表达水平的递增，瘤细胞的凋亡率递减 (虽然差异无统计学意义)，与于士柱等^[10] 报道一致。因而 bcl2 基因也是胶质瘤的分子特征之一，bcl2 蛋白与 p53 的协同作用在胶质瘤发生及恶性进展过程中也起重要作用。

c fos 基因是一种可以诱导的早期快速反应基因，在静止细胞受刺激后，如 p53 突变，可诱导 c fos 基因表达产物 c fos 蛋白活性增强。c fos 蛋白作为核内第三信使，促进细胞 DNA 合成，使细胞进入 S 期，从而增强细胞代谢和细胞增殖^[11]。另外，MyoD 蛋白是与细胞分化有关的转录因子，而 c fos 可阻止 MyoD 基因转录，从而影响细胞的分化。本组 150例胶质瘤中有 70 例表达 c fos 蛋白，阳性率达

46.67%。虽然各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但随着肿瘤恶性程度的增加,其阳性率有增高趋势。因此, c-fos蛋白的高表达在胶质瘤的发生、发展过程中,尤其在肿瘤发生的早期起重要作用。

综上所述,胶质瘤的发生、发展是多种遗传因素共同作用的结果,其中癌基因的激活和抑癌基因的失活是最重要的因素,同时细胞周期的失控和细胞凋亡与增殖的失衡也起着重要作用^[2]。野生型 p53对 bcl-2, c-fos基因有抑制转录活性作用。突变的 p53蛋白的积聚增强了细胞分裂和增生能力,加上对 bcl-2, c-fos基因转录活性抑制作用的减弱和 bcl-2的异常表达及 c-fos的激活,同时, p16表达缺失,使细胞凋亡机制障碍,细胞增殖和凋亡失控,导致肿瘤发生发展。因此, p53, p16, bcl-2, c-fos基因异常是胶质瘤重要的分子特征,其蛋白表达的检测对判断胶质瘤患者预后,并指导临床治疗有重要的参考价值。

(本文图 1~3见封四)

[参 考 文 献]

[1] Brat DJ, Castellano Sanchez A, Kaur B, *et al*. Genetic and biologic progression in astrocytomas and their relation to angiogenic dysregulation[J]. *Adv Anat Pathol* 2002, 9(1): 24 - 36

[2] 甘怀勇. 胶质瘤抑癌基因的研究进展[J]. 蚌埠医学院学报,

2005, 30(3): 275 - 277

[3] Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, *et al*. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression[J]. *Neuro Oncol* 1999, 1(2): 124 - 137.

[4] 王朝夫, 朱明利. 结核菌 L型感染诱导小鼠生精细胞凋亡的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(3): 59.

[5] Fu L D, Brockmeyer D, Tulbus MW, *et al*. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression[J]. *Cancer Res* 1992, 52(3): 674 - 679

[6] Horowitz J. Adenovirus mediated p53 gene therapy: Overview of preclinical studies and potential clinical applications[J]. *Curr Opin Mol Ther* 1999, 1(4): 500 - 509.

[7] Alavi JB, Eck SL. Gene therapy for high grade gliomas[J]. *Expert Opin Biol Ther* 2001, 1(2): 239 - 252.

[8] 蔡斌, 刘占川. 抑癌基因 p16蛋白在脑胶质瘤中的缺失及意义[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2000, 5(4): 227 - 228

[9] Wick W, Wagner S, Kerkans S, *et al*. bcl-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells[J]. *FEBS Lett* 1998, 440(3): 419 - 424.

[10] 于士柱, 浦佩玉, 江德华, 等. 胶质瘤 bcl-2基因表达水平与其细胞增殖和凋亡关系的研究[J]. 中华病理学杂志, 2002, 29(1): 12 - 15.

[11] Luo W, Shafrir TR, Houghton PJ, *et al*. CGP41251 and tamoxifen selectively inhibit mitogen activated protein kinase activation and c-fos phosphoprotein induction by substance P in human astrocytoma cells[J]. *Cell Growth Differ* 1997, 8(11): 1225 - 1240.

[文章编号] 1000-2200(2006) 06-0574-01

· 短篇报道 ·

乳腺、肺异时多原发癌 1例

蒋 慧

[关键词] 乳腺肿瘤; 肺肿瘤; 多原发癌

[中国图书资料分类法分类号] R 737.9 R 734.2 [文献标识码] B

患者女性, 50岁。2003年4月因左侧乳腺肿块, 外院穿刺病理提示腺癌, 在南京某医院行左侧乳腺根治术, 术后给予化疗。2004年11月出现右侧胸部疼痛不适, 呈持续性, 渐出现胸闷, 有刺激性干咳。无发热、盗汗, 无声音嘶哑, 无恶心呕吐。全身有乏力、不适。有系统性红斑狼疮5年。入院查体: 精神营养一般, 浅表淋巴结无肿大。胸廓无畸形, 左侧乳房缺如, 留下手术瘢痕。叩诊呈清音, 左肺呼吸音清, 右肺呼吸音稍低, 右肺底吸气末可闻及少量湿罗音。腹部体检阴性。CT检查提示右肺中央型肺癌伴阻塞性肺炎, 右侧胸腔积液。胸腔积液生化常规检查提示渗出液, 未见肿瘤细胞。纤维支气管镜检查提示: 右前段轻度充血, 右上段管口肉芽组织阻塞, 表面少量坏死组织覆盖, 活检病理提示鳞状细胞癌。住院期间给予化疗、抗感染、营养支持治疗, 患者渐出现纵膈、腹腔转移, 治疗245天, 因为恶液质、呼吸衰竭, 心力衰竭死亡。

讨论 多原发癌是指同一宿主的单个或多个器官同时或先后发生两个以上的原发癌。其诊断标准: (1) 每个肿瘤需是恶性的; (2) 每个肿瘤有独特病理形态; (3) 必须排除互为转移可能。异时多原发癌发病率低, 国内外报道不一, 其在全部恶性肿瘤中占10.6%, 国内为0.52%~2.45%^[1]。多原发癌病因不清。多数学者认为, 可能与个体易感性、免疫缺陷、遗传、环境因素和医源性因素有关。结合本例特点, 考虑个体易感性及机体免疫力缺陷可能性大。值得注意的是, 异时多原发癌临床上易误诊为复发和转移癌而放弃手术治疗时机, 导致治疗失败。因此应对多原发癌有足够认识, 并要采取正确、积极治疗手段, 取得更好效果^[2]。刘锦霞报道罕见四脏器重复癌1例, 每次采取积极手术治疗, 存活10年以上^[3]。

[参 考 文 献]

[1] 张春山, 武红英. 食管癌与肾癌并存1例报告[J]. 实用肿瘤杂志, 2001, 16(5): 291.

[2] 叶红卫, 曾宪鸿. 肾食管膀胱异时多重癌1例[J]. 赣南医学院学报, 2004, 24(2): 223.

[3] 刘锦霞. 罕见四脏器四重癌1例[J]. 肿瘤, 2000, 20(6): 434.

[收稿日期] 2006-02-14

[作者单位] 安徽省皖北矿务局总医院 呼吸科, 安徽 宿州 234011

[作者简介] 蒋 慧(1977 -), 女, 住院医师.

解脲脲原体垂直传播动物模型的建立(正文见 567 页)

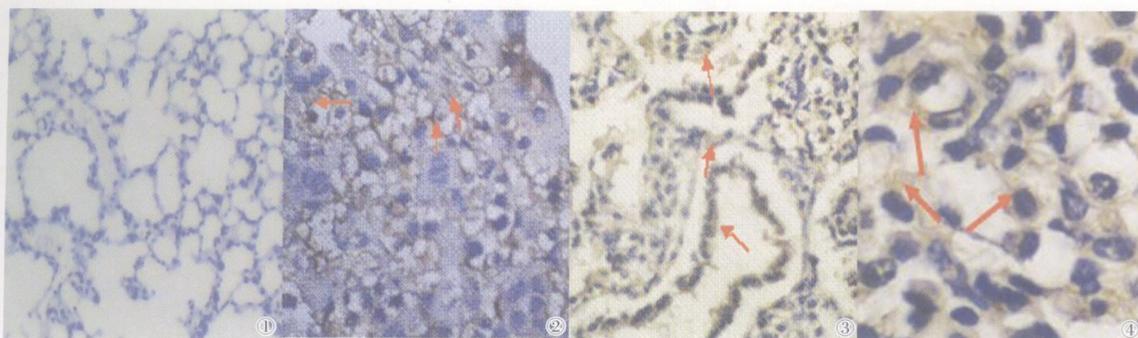


图1 免疫组化染色阴性对照 ×100 图2 C组母鼠胎盘组织免疫组化染色,可见 UU 抗原 ×1 000
图3 C组仔鼠肺脏组织免疫组化染色,可见大量 UU 抗原 ×1 00 图4 C组仔鼠脾组织免疫组化染色,可见大量 UU 抗原 ×1 000

胶质瘤 p53、p16、bcl-2、c-fos 蛋白表达和细胞凋亡(正文见 572 页)

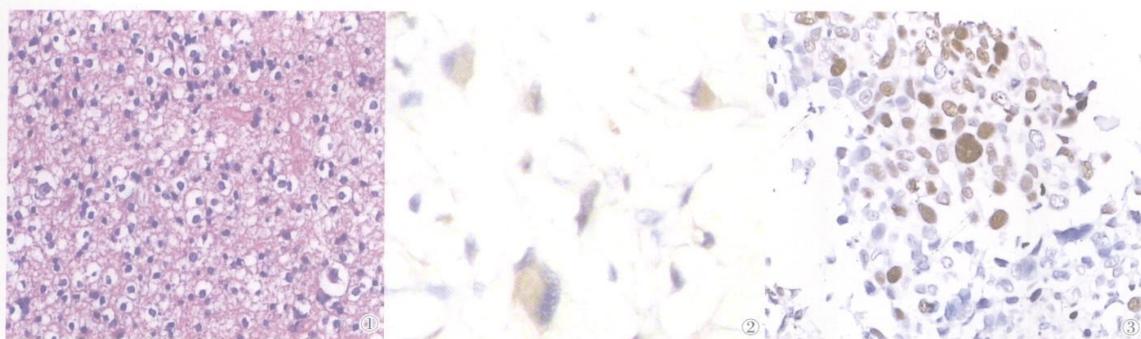


图1 胶质瘤Ⅱ级 HE 染色 ×100 图2 胶质瘤Ⅲ级,胞质内 bcl-2 蛋白表达阳性 IHC ×400 图3 胶质瘤Ⅳ级,核内阳性信号 ISEL ×200

蚌埠医学院学报

双月刊(1976年3月创刊)
2006年第31卷第6期(总第144期)
2006年11月15日出版

Journal of Bengbu Medical College

Bimonthly(Founded in March 1976)
2006, Vol.31, No.6 (Sum 144)
November 15, 2006

主管单位:安徽省教育厅
主办单位:蚌埠医学院
主 编:祝 延
编辑出版:蚌埠医学院学报编辑部
(安徽省蚌埠市东海大道 2600 号 233030)
电话:(0552)3175456

电子信箱:bang@chinajournal.net.cn
印 刷:蚌埠市光大彩色制印有限公司
国内订阅:全国各地邮政局
国内总发行:蚌埠市邮政局
国外总发行:中国国际图书贸易总公司
(北京 399 信箱)

Responsible Institution The Education Department of Anhui Province
Sponsored by Bengbu Medical College
Editor in Chief ZHU Yan
Edited and Published by The Editorial Board of Journal of
Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China
Tel:(0552)3175456

E-mail bang@chinajournal.net.cn
Printed by Bengbu Guangda Color Printing Co.Ltd
Domestic Subscription Local Post Offices
Domestic Distribution Bengbu Post Office
Foreign Distribution China International Book Trading Corporation
(P.O.Box 399, Beijing, China)

ISSN 1000-2200
CN 34-1067/R

邮发代号:26-37 国外代号:BM 6535 广告经营许可证:皖蚌广字 039 号 国内定价:8.00 元