文章编号:1000-5404(2006)08-0763-03

论著

P53和P63蛋白在人骨肉瘤组织及恶性转化细胞株中的表达变化及意义

李 懿,孟 刚,郭乔楠 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨人骨肉瘤组织及经硫酸镍恶性转化的永生化骨肉瘤样细胞系HOS中P53、P63蛋白的表达及意义。**方法** 采用免疫组织化学S-P法和图像分析技术检测35例骨肉瘤标本、经硫酸镍恶性转化前后的永生化骨肉瘤样细胞系HOS和永生化的人胚成骨细胞系hFOB中P53、P63蛋白的表达。**结果** P53、P63在35例骨肉瘤标本中的阳性表达率分别为42.9%、25.7%,不同组织学类型的骨肉瘤标本中阳性表达率无明显差异($P>0.05$),P53蛋白和P63蛋白阳性患者与其阴性患者间总生存率比较在统计学上差异无显著性($P>0.05$);在正常对照的人胚成骨细胞系hFOB中P53蛋白未见明显表达,P63蛋白表达呈弱阳性,未转化的HOS细胞株中可见P53、P63表达,而经硫酸镍恶性转化的HOS细胞株中P53、P63表达水平明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** P63蛋白及突变型P53蛋白的过表达在硫酸镍诱导的HOS细胞株恶性转化过程中起重要作用,是骨肉瘤发生早期的重要分子事件。

关键词: 骨肉瘤;P53蛋白;P63蛋白;免疫组织化学
中图法分类号: R341;R730.23;R738.1 **文献标识码:** A

Significance of P53 and P63 expression in human osteosarcoma and HOS cell line transformed by niekel sulfate

LI Yi, MENG Gang, GUO Qiao-nan (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the significance of P53 and P63 expression in the tissues of human osteosarcoma and the immortal osteosarcoma-like cell line HOS malignantly transformed by niekel sulfate. **Methods** Immunohistochemistry S-P method and computerized image analysis were used to detect the expressions of P53 and P63 in 35 human osteosarcoma tissues, an immortal non-tumoricgenic osteosarcoma-like cell line HOS, the HOS transformed by niekel sulfate and a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line hFOB. **Results** The positive rate of P53 and P63 was 42.9% and 25.7% respectively in 35 human osteosarcoma tissues. There was no significant difference between the protein expression and the pathological typing in osteosarcoma ($P>0.05$). There was no difference in overall survival rate between P53 or P63 positive patients and the negative counterparts ($P>0.05$). In hFOB, the expression of P53 was not detected, and that of P63 was weakly positive. The expression of P53 and P63 in HOS transformed by niekel sulfate were higher than that in normal HOS ($P<0.05$). **Conclusion** The overexpression of P63 and mutant P53 may play an important role in malignant transformation of osteosarcoma cell line induced by niekel sulfate, and may act as an early event in tumorigenesis of osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma; P53 protein; P63 protein; immunohistochemistry

p53做为广泛存在的肿瘤抑制基因,其编码的蛋白分别通过磷酸化、乙酰化等翻译后加工过程而调控下游许多靶基因,导致DNA损伤修复、暂时的和持续的细胞生长停滞、细胞衰老和细胞凋亡。p53维持基因组完整性、消除致瘤细胞等能力是通过细胞不同部分"串话"(crosstalk)的复杂过程完成的[1]。在80%的肿瘤组织中发现p53基因的突变。其家族成员p63与p53具有较大的同源性,推测p63可作为候选的肿瘤抑制基因,抑制肿瘤生长、诱导凋亡和控制细胞周

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371446)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371446)
作者简介: 李 懿(1983-),女,云南省昆明市人,硕士研究生,主要从事肿瘤病理学方面的研究。电话:13228686396
通讯作者: 郭乔楠,E-mail:qiaonan85@263.net
收稿日期: 2005-10-10;**修回日期:** 2006-01-20

期，但是 p63 的某些亚型与 p53 具有截然不同的生物学功能，使其在肿瘤发生中的作用备受重视。本研究利用免疫组化 S-P 法和图像分析技术检测恶性转化的骨肉瘤样细胞系和骨肉瘤标本中 P53、P63 蛋白的表达，并探讨其在恶性转化过程中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 材料

随机选取第三军医大学西南医院病理科的存档蜡块，共 35 例，所有标本均于手术时取材，对全部资料进行随访。其中男性 20 例，女性 15 例，年龄中位数 20 岁。永生化骨肉瘤样细胞系 HOS（immortal non-tumoricgenic osteosarcoma-like cell line HOS），由中国科学院上海研究所提供。人胚成骨细胞系 hFOB（conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line hFOB）购于 ATCC（序号：CRL-11372）。

1.2 细胞培养及恶性转化

HOS 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中，37 ℃，5% CO_2，常规培养传代。hFOB 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，33.5 ℃，5% CO_2，常规培养传代。参照文献[2]，用硫酸镍持续作用 HOS 细胞株进行恶性转化，分离转化细胞，接种裸鼠，可见不具有致瘤性的 HOS 细胞株有明显肿瘤形成（见另文报告）。

1.3 免疫组织化学染色检测 P53、P63 的表达

采用免疫组织化学 S-P 法，检测骨肉瘤组织切片、HOS 细胞株、经硫酸镍恶性转化的 HOS 细胞株和 hFOB 细胞株中 P53 和 P63 蛋白的表达。鼠抗人 P53 单克隆抗体（即用型），S-P 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购于上海长岛生物技术有限公司，P63 单克隆抗体（即用型）购于北京中杉金桥生物技术有限公司，S-P 染色详细步骤严格按照说明书进行，用 PBS 代替一抗作阴性对照，以已知阳性片作阳性对照。

1.4 结果判断

在每张切片中随机选取 5 个高倍视野，Insightcolor 彩色图像分析仪测定每个视野中阳性细胞的光密度值，5 个视野光密度值的平均值即为该切片的平均光密度值。

1.5 统计学处理

采用配对资料 t 检验，spearman 相关分析，计数资料相关性分析、logrank 检验。所有数据均在 SPSS 10.0 统计软件包中进行。

2 结果

2.1 P53、P63 蛋白在骨肉瘤组织中的表达情况

P53、P63 蛋白免疫组化阳性产物呈棕黄色或棕褐色颗粒，定位于肿瘤细胞核。有时细胞质呈弱阳性表达（图 1、2）。除了在肿瘤细胞中表达外，我们注意到部分邻近骨肉瘤组织的癌旁部位也可出现阳性表达。

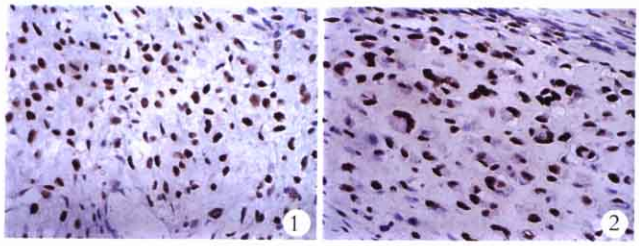


图 1 成骨型骨肉瘤中 P53 蛋白的表达 阳性表达位于细胞核（S-P×200）

图 2 成软骨型骨肉瘤中 P63 蛋白的表达 阳性表达位于细胞核（S-P×200）

2.2 骨肉瘤的 P53、P63 蛋白表达与临床病理关系

骨肉瘤组织学分型依据 2003WHO 分型标准，P53、P63 蛋白的表达与患者性别、年龄、病理分型的关系详见表 1。

表 1 P53、P63 蛋白在 35 例骨肉瘤中的表达

项目		n	P53			P63		
			+	−	阳性率(%)	+	−	阳性率(%)
性别	男	20	8	12	40.0	5	15	25.0
	女	15	7	8	46.7	4	11	26.7
年龄(岁)	≤20	12	5	7	41.7	3	9	25.0
	>20	23	10	13	43.5	6	17	26.1
病理类型	成骨型骨肉瘤	12	5	7	41.7	4	8	33.3
	成软骨型肉瘤	8	3	5	35.7	2	6	25.0
	成纤维型骨肉瘤	10	6	4	60.0	2	8	20.0
	其他	5	1	4	20.0	1	4	20.0

2.3 骨肉瘤的 P53、P63 蛋白表达与患者预后

对 35 例骨肉瘤患者进行随访，随访期为 1～10 年，平均随访为 3.5 年。总生存率 40.8%，3 年生存率为 45.9%，经 logrank 检验，P53 阳性组与阴性组患者的累计生存率无显著差异，P63 阳性组与阴性组患者总生存率差异亦无统计学意义（$P>0.05$）。

2.4 骨肉瘤细胞株中 P53、P63 蛋白的表达及相关性

做为正常对照的 hFOB 细胞株中 P63 呈弱阳性表达，P53 无明显阳性表达。HOS 细胞株中 P53、P63 蛋白的平均光密度值均低于恶性转化后的 HOS 细胞株（图 3～6），差异有统计学意义，P 值分别为 $P=0.006$、$P=0.004$。骨肉瘤样细胞株 HOS 中 P63 与 P53 蛋白表达相关（$r=0.973$，$P<0.05$），而恶性转化后的 HOS 细胞株中，P63 与 P53 蛋白表达没有相关性（$r=0.137$，$P>0.05$）（表 2）

表 2 P53 和 P63 在骨肉瘤细胞系中的表达

标本	平均光密度值	
	P53	P63
恶性转化的 HOS	0.733 ± 0.068^a	0.525 ± 0.041
HOS	0.718 ± 0.056^b	0.518 ± 0.042

a：$P>0.05$，P63 和 P53 蛋白表达没有相关性，b：$P<0.05$，P63 和 P53 蛋白表达相关

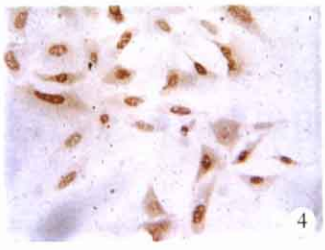
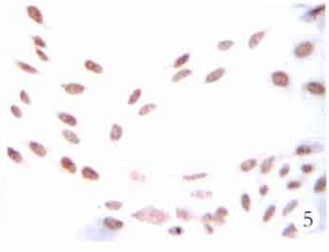
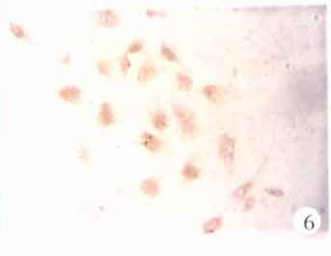





图 3　经硫酸镍转化后的 HOS 细胞株中细胞核 P53 呈强阳性表达　(S-P×200)
图 4　未经硫酸镍转化的 HOS 细胞株中细胞核 P53 呈阳性表达　(S-P×200)
图 5　经硫酸镍转化 HOS 细胞株中细胞核 P63 呈强阳性表达　(S-P×200)
图 6　未经硫酸镍转化 HOS 细胞株中细胞核 P63 呈弱阳性表达　(S-P×200)

3　讨论

骨肉瘤是常见的高侵袭性恶性骨肿瘤,在青少年中高发,多数病例在原发灶较小的早期即可发生广泛的肺转移。已证明骨肉瘤的发生与基因异常表达有一定相关性。p53 作为广泛存在的肿瘤抑制基因,在细胞增殖、凋亡和分化过程中起关键作用。p53 基因功能丢失多引起软组织肉瘤和淋巴瘤,若同时伴随印迹基因 HIC1 启动子的高甲基化,则与骨肉瘤的发生相关联[3]。p63 基因转录后产生两类产物:TAp63 和 △Np63,由于每种类型的 C 端不同剪切各产生 3 种异构体,共用一个开放阅读框[4]。△Np63 异构体以显性失活的方式抑制 TAp63 和 p53 依赖的靶基因转录[5]。p63 异构体在人体组织中呈广泛而有选择性地表达,对于各种上皮组织的正常发育、分化及形态发生具有重要作用。正常细胞内,p53、p63 达到动态平衡、功能互补的共同完成对细胞生长的调节,一旦平衡被破坏,细胞就可能出现不可逆的恶性转化。

一般认为免疫组化方法检测出 P53 蛋白表达增高可间接反映 p53 基因点突变。本研究表明,35 例骨肉瘤组织切片中,P53 蛋白的阳性表达率(42.9%)较 P63 蛋白(25.7%)高,该结果与文献报道 p53 基因在恶性肿瘤中的突变率平均为 50% 一致。韩壮等[6]发现在恶性骨肿瘤中 p53 高表达,而 p63 低表达,在良性骨肿瘤中则相反,与本研究结果相似。本研究结果表明 P53、P63 蛋白的表达与骨肉瘤患者的性别、年龄、病理分型无关,与预后亦无统计学差异,该结论与前期研究结果一致[7]。本研究还表明,这两个基因在邻近骨肉瘤的癌旁组织有阳性表达,我们认为 p53 和 p63 基因可能在骨肉瘤发生的早期阶段起作用。

实验中用硫酸镍恶性转化 HOS 细胞株,体外模拟骨肉瘤发生的早期过程。实验中发现 P63 在恶性转化细胞中高表达,与以往的研究结论相符,提示在肿瘤发生过程中这一基因可能为癌基因[8],p63 基因可能是 p53 基因的一种模拟突变体,在细胞内模拟 p53 分子而行使 p53 分子的功能,从而使 p53 分子失效,造成细胞恶变。实验显示在正常对照的人胚成骨细胞系 hFOB 中 p53 基因未见明显表达,p63 基因表达呈弱阳性,未转化的 HOS 细胞株中可见 P53、P63 表达,而经硫酸镍恶性转化的 HOS 细胞株中 p53、p63 基因表达水平明显增高,差异有统计学意义,该结果表明随着细胞恶性度的增加,P53、P63 蛋白表达呈增高趋势,p53、p63 基因异常在恶性转化过程中起重要作用,是骨肉瘤发生的早期事件。

参考文献:

[1] BARGONETTI J, MANFREDI J J. Multiple roles of the tumor suppressor p53[J]. Curr Opin Oncol, 2002, 14(1): 86-91.

[2] RANI A S, QU D Q, SIDHU M K, *et al*. Transformation of immortal, non-tumorigenic osteoblast-like human osteosarcoma cells to the tumorigenic phenotype by nickel sulfate[J]. Carcinogenesis, 1993, 14(5): 947-953.

[3] CHEN W, COOPER T K, ZAHNOW C A, *et al*. Epigenetic and genetic loss of HIC1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2004, 6(4): 387-398.

[4] WU G, NOMOTO S, HOQUE M O, *et al*. DeltaNp63alpha and Tap63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development[J]. Cancer Res, 2003, 63(10): 2351-2357.

[5] BENARD J, DOUC-RASY S, AHOMADEGBE J C. TP53 family members and human cancers[J]. Hum Mutat, 2003, 21(3): 182-191.

[6] 韩　壮, 王　敏, 吕　刚, 等. p73 在骨巨细胞瘤中表达的意义[J]. 中国医科大学学报, 2001, 30(2): 135-136.

[7] 郭乔楠, 陈意生. 骨肉瘤患者 p53 基因的改变及其与预后的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(6): 474-476.

[8] DI-COMO C J, URIST M J, BABAYAN I, *et al*. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(2): 494-501.

(编辑　张大春)