短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)20-2240-03

ARHI和突变型P53在人脑星形胶质细胞瘤中的表达及与恶性程度的相关性

毛冲冲[1],辛艳超[2],翟 广[1],杨 斌[1],刘献志[1] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院神经外科[1];454002 河南 焦作,焦作市人民医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 初探ARHI和突变型P53在人脑星形胶质细胞瘤中的表达及与恶性程度的相关性。**方法** 采用免疫组织化学S-P法检测10例正常脑组织、30例低级别胶质瘤(Ⅰ、Ⅱ级)和39例高级别胶质瘤(Ⅲ、Ⅳ级)ARHI和突变型P53的表达情况,并分析二者之间的关系。**结果** 与正常脑组织相比,ARHI在人脑胶质瘤中的表达显著降低,突变型P53在人脑胶质瘤中的表达显著增加。通过阳性区平均积分光密度定量分析,结果显示,正常组、低级别胶质瘤组和高级别胶质瘤组ARHI和突变型P53分别为(176.41±5.37)和(104.52±4.57)、(148.73±3.82)和(126.68±2.46)、(123.59±3.74)和(147.23±4.97),各组之间ARHI和突变型P53的测定值有统计学差异($P<0.01$),并且二者在人脑胶质瘤中的表达呈负相关($r=-0.532$,$P<0.05$)。**结论** ARHI和突变型P53可能成为判断星形胶质细胞瘤恶性程度、侵袭性及预后的有效指标。

[关键词] 星形胶质细胞瘤;ARHI;P53;免疫组化
[中图法分类号] R394.3;R446.6;R739.41 [文献标志码] A

星形胶质细胞瘤是由发生转化的星形细胞组成的肿瘤,约占神经上皮组织肿瘤的75%,随着病理级别的增加,恶性程度增高,治疗差,易复发。ARHI基因为母源性印记肿瘤抑癌基因[1],是1999年由美国德克萨斯州癌症中心YU等从人卵巢和乳腺上皮细胞及其癌细胞中克隆出的一个新的肿瘤抑癌基因,又名ras同源基因家族成员Ⅰ(ras homolog gene,member Ⅰ)或NOEY2,在调节细胞的增殖、迁移等方面发挥重要作用[2]。P53基因亦是一种抑癌基因,定位于人类染色体17p13.1,P53基因分为野生型和突变型两种,其产物也有野生型和突变型。野生型P53蛋白极不稳定,半衰期仅数分钟,并具有反式激活功能和广谱的肿瘤抑制作用。突变型P53蛋白稳定性增加,半衰期延长,可被免疫组化方法检测出来。P53基因的突变(缺失)是人类肿瘤的常见事件,与肿瘤的发生、发展有关。本实验的目的是研究星形胶质细胞瘤中ARHI和突变型P53基因表达情况,并初探ARHI和P53蛋白表达与星形胶质细胞瘤恶性程度相关性,旨在为星形胶质细胞瘤的临床基因诊断和治疗提供新的路径和思路。

1 资料与方法

1.1 标本来源

2007年6月至2011年1月在郑州大学第一附属医院行手术切除、且保存完好的人脑星形胶质细胞瘤石蜡包埋标本69例,收集10例该科室同期因重度颅脑外伤行内减压而切除的脑组织作为正常脑组织(切片经病理科医师审定)。其中男性38例,女性41例,年龄5~77岁,平均年龄41岁。按照WHO(2000年)中枢神经系统肿瘤分类,其中Ⅰ级11例,Ⅱ级19例,Ⅲ级22例,Ⅳ级17例。把Ⅰ、Ⅱ级人脑星形细胞胶质瘤合并为低级别胶质瘤组,把Ⅲ、Ⅳ级人脑星形胶质细胞瘤合并为高级别胶质瘤组。选取标准:所有患者术前未进行化疗、生物免疫治疗和放疗等,行CT或MRI检查,且患者为第1次手术治疗,患者无严重肥胖、糖尿病、痛风等代谢疾病或严重高血压、冠心病、慢阻肺等心肺疾病以及无其他严重并发症等。排除标准:①颅脑的先天性疾病、栓塞、出血或合并非星形胶质细胞瘤等开颅手术,帕金森、癫痫等严重功能性颅脑疾病。②与选取标准不一致。所有标本在手术切除后去除出血、坏死、烧灼的组织,用生理盐水冲洗,2 h内用4%多聚甲醛固定,1周内用石蜡包埋,4~5 μm连续切片,留以备用。

1.2 主要实验试剂与仪器

1.2.1 实验试剂 羊抗人ARHI单抗原液购于Santa Cruz公司,鼠抗人P53单克隆抗体购于美国ZYMED公司,S-P 9000试剂盒及DAB显示增强剂均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 实验仪器 图像采集:德国Lecia显微照相系统;分析系统:Biosens Digital Imaging System v1.6(上海山富科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

标本以4%多聚甲醛固定1 h,采用常规石蜡包埋,预先用防脱片剂多聚赖氨酸进行载玻片处理,然后连续行4μm切片。采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶(streptavidin peroxdase conjugated method,S-P)免疫组化方法进行ARHI和突变型P53蛋

[通信作者] 刘献志,E-mail:lxz@zzu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130726.1058.017.html(2013-07-26)

白检测,操作严格按照试剂盒说明书进行。羊抗人 ARHI 单抗原液和鼠抗人 P53 单克隆抗体均用 PBS 稀释为 1∶100 的浓度;PBS 代替一抗作为阴性对照;采用已知阳性表达的脑星形胶质细胞瘤标本作为阳性对照。简要步骤如下:切片烤片;二甲苯脱蜡及乙醇梯度水化;高温抗原修复;滴加羊抗人 ARHI 单抗原液及鼠抗人 P53 单克隆抗体;EliVision 试剂 A、B;DAB 显色;苏木精复染;乙醇梯度脱水;中性树胶封片后固定。

1.4 免疫组织化学结果分析

采用 Biosens Digital Imaging System v1.6 分析系统在统一光强,统一放大倍数(400 倍)下测量表达情况,以染色最淡的视野为起点。随机选取 5 个视野测定其阳性区平均积分光密度作为(ARHI 和突变型 P53)阳性表达的量化指标[3]。实验采用配对设计的方法,将(ARHI 和突变型 P53)按照编号进行配对,并排除其他可能影响因素,从而便于相关性分析。

1.5 统计学处理

根据 Biosens Digital Imaging System v1.6 分析系统分析示阳性区平均积分光密度。平均积分光密度反映了 ARHI 和突变型 P53 阳性表达情况。应用 SPSS 16.0 统计软件,样本均数的比较行方差分析,以及 LSD-t 检验和 Bonferroni 法检验。两者相关性采用 Spearman 相关性分析。

2 结果

2.1 ARHI 蛋白在不同胶质瘤组织中的表达

ARHI 蛋白表达阳性信号位于细胞质中,呈棕黄色颗粒。正常组平均积分光密度为(176.41 ±5.37),低级别胶质瘤组为(148.73 ±3.82),高级别胶质瘤组为(123.59 ±3.74),方差分析结果显示整体差异有统计学意义($P<0.01$),提示阳性区平均积分光密度在正常组、低级别胶质瘤组、高级别胶质瘤组中不全相同,再行 LSD-t 检验和 Bonferroni 法检验,结果显示各组之间差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

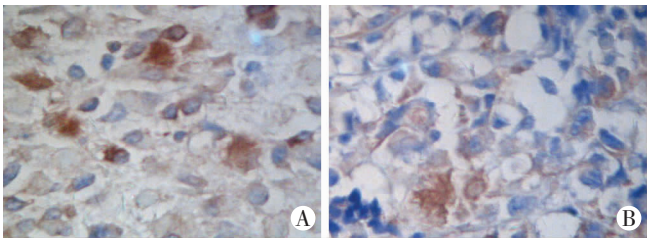


图 1 ARHI 在低级别(A)和高级别(B)星形胶质细胞瘤中的表达 (S-P ×400)

2.2 突变型 P53 在各组人脑胶质瘤中的表达

突变型 P53 表达位于细胞质或核中,呈棕黄色或棕黑色颗粒。正常组平均积分光密度为(104.52 ±4.57),低级别胶质瘤组为(126.68 ±2.46),高级别胶质瘤组为(147.23 ±4.97),方差分析结果显示整体差异有统计学意义($P<0.01$),提示阳性区平均积分光密度在正常组、低级别胶质瘤组、高级别胶质瘤组中不全相同,再行 LSD-t 检验和 Bonferroni 法检验,结果显示各组之间差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

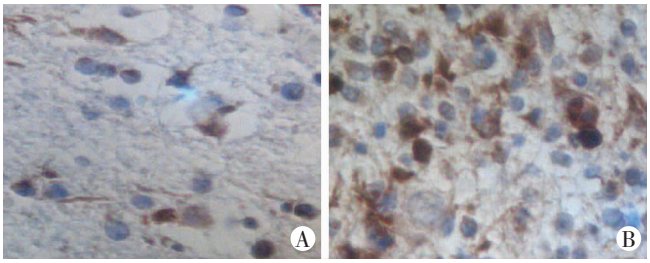


图 2 突变型 P53 蛋白在低级别(A)和高级别(B)星形胶质细胞瘤中的表达 (S-P ×400)

2.3 正常脑组织和胶质瘤中 ARHI 蛋白与突变型 P53 蛋白表达的相关性

根据阳性区平均积分光密度测定结果行 Spearman 相关性分析,提示 ARHI 与突变型 P53 的表达存在负相关($r=-0.532$,$P<0.05$)。在正常脑组织和不同级别胶质瘤中,ARHI 蛋白表达水平随病理级别的增高呈下降趋势,而突变型 P53 蛋白表达水平随病理级别的增高呈上升趋势,两者在人脑胶质瘤中的表达呈现负性相关,同时,随着胶质瘤级别的增加,两者的差异越大。

3 讨论

ARHI 为母源性印记肿瘤抑癌基因,是 1999 年由美国德克萨斯州癌症中心 Yu 等从人卵巢和乳腺上皮细胞及其癌细胞中克隆出的一个新的肿瘤抑癌基因。该基因定位于人染色体 1p31,大约 8kb,其中包括两个外显子,一个内含子。ARHI 基因中包括了 3 个 CpG 岛,它的异常甲基化对该基因的表达产生影响。ARHI 基因是 RAS/RAP 同源基因超家族成员(the member of RAS/RAP homology gene)之一,它属于小 G 结合蛋白,但与 RAS 超家族中的成员不同,它不促进细胞的指数生长或细胞分裂,相反抑制细胞的增生,属于抑癌基因,是成人恶性肿瘤或癌中第 1 个被描述的候选印迹基因[3-5]。ARHI 基因相关的信号转导与抑癌作用的相关途径如下:①参与信号转导和转录激活因子 3(STAT3)抑制癌细胞的增生、及分化 Ras/MAPK 和 PI-3K-AKT 的信号通路,能够被 JNK 所抑制,而 ARHI 基因能够诱导 JNK 表达,从而 ARHI 基因间接地抑制了此信号通路。②通过作用于细胞周期运动的动力蛋白 Cyclin D1 或促使 p21 WAFI/CIP 1 高表达,从而抑制 CDK 活性,使细胞生长停滞。③通过依赖需钙蛋白酶(calpain)和凋亡蛋白酶(caspase)两条途径,触发凋亡信号转导,启动凋亡执行器,而诱导细胞凋亡或自发性程序性死亡。ARHI 基因编码的蛋白在人类多种组织表达,而该基因在人类卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、肝癌等多种肿瘤中表达下调或缺失,提示其与上述肿瘤的发生、发展密切相关[6]。本实验结果也表明,ARHI 表达随着胶质瘤恶性级别的提高而降低。ARHI 蛋白表达的异常或缺失与人脑星形胶质细胞瘤的发生、发展及

星形胶质细胞瘤细胞的恶性进展程度密切相关,推测ARHI抑制了人脑星形胶质细胞瘤发生、发展和恶性程度的进展。

野生型P53具有“基因卫士”称号[7],蛋白能够抑制恶性肿瘤增殖并维持细胞生长、监控着基因完整性,当细胞DNA遭到损害时,P53蛋白可参与DNA的复制与修复。一旦P53突变,活化中心结构的改变使空间构象发生改变,致使P53蛋白的磷酸化过程[8]及转录活化功能降低或消失;最终使P53失去自身的作用即:野生型P53失去抑制肿瘤增殖的作用和突变型P53被激活,突变性P53蛋白与野生型P53蛋白相结合形成的空间构象不能与DNA相应部位结合,使P53整体上具备癌基因作用和功能,最终使得一些癌变基因转录失控导致肿瘤的发生。本实验结果表明,EGFR表达随着胶质瘤恶性级别的提高而增加。推测野生型P53基因在人脑星形胶质细胞瘤组织中的表达降低即突变型的P53基因在星形胶质细胞瘤组织中的表达升高与人脑星形胶质细胞瘤发生、发展的关系密切。

另外根据阳性区平均积分光密度测定结果:提示ARHI与突变型P53的表达存在相关性($r = -0.532$, $P < 0.05$)。ARHI与突变型P53呈负性相关的机制尚不明确,但有研究表明,ARHI基因可以抑制PI-3K/AKT的信号转导通路,而基因卫士P53是检测DNA损伤的关键因素,在监测点即G_1/S的交界处调控。因子MDM2能被AKT影响,同时也能调节P53,因此,AKT间接地调控了P53的活性,同时说明ARHI基因也抑制了突变型P53的活性。

综上所述,随着ARHI与突变型P53及其相关性研究的逐渐深入,二者可能成为判断星形胶质细胞瘤恶性程度、侵袭性及预后的有效指标,然而当前ARHI和P53的相关机制、协调作用、相互制约机制及如何联合靶点治疗等问题有待解决,但为联合检测、评估人脑星形胶质细胞瘤的诊疗提供了新的途径和思路。

参考文献:

[1] Lu X, Qian J, Yu Y, *et al*. Expression of the tumor suppressor ARHI inhibits the growth of pancreatic cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest[J]. Oncol Rep, 2009, 22(3): 635-640.

[2] Janssen E A, Ovestad I T, Skaland I, *et al*. LOH at 1p31 (ARHI) and proliferation in lymph node-negative breast cancer[J]. Cell Oncol, 2009, 31(5): 335-343.

[3] Luo R Z, Fang X, Marquez R, *et al*. ARHI is a Ras-related small G-protein with a novel N-terminal extension that inhibits growth of ovarian and breast cancers[J]. Oncogene, 2003, 22(19): 2897-2909.

[4] 杨斌, 刘献志, 李进军, 等. ANXA 2和EGFR在人脑胶质瘤中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(3): 274-276.

[5] Weber F, Aldred M A, Morrison C D, *et al*. Silencing of the maternally imprinted tumor suppressor ARHI contributes to follicular thyroid carcinogenesis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(2): 1149-1155.

[6] Huang J, Lin Y, Li L, *et al*. ARHI, as a novel suppressor of cell growth and downregulated in human hepatocellular carcinoma, could contribute to hepatocarcinogenesis[J]. Mol Carcinog, 2009, 48(2): 130-140.

[7] 唐海灵,陈建民. 抑癌基因ARHI研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(20): 1291-1294.

[8] Melino G. p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant P53[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(9): 1487-1499.

(**收稿**:2013-04-05;**修回**:2013-06-09)

(编辑 王小寒)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)20-2242-03

改良Charles法治疗晚期肢体淋巴水肿的临床疗效分析

柴琳琳,李 喆,毕 胜,戴 霞,陶 灵,王珍祥,李世荣 (400038 重庆,第三军医大学西南医院整形美容外科)

[**摘要**] **目的** 探讨改良Charles法在晚期肢体淋巴水肿治疗中的应用及疗效。**方法** 2004年1月至2012年10月,我科采用改良Charles法治疗的晚期肢体淋巴水肿患者共8例,均表现为单侧下肢淋巴水肿,术后均获随访,平均随访时间平均为16.8(2月至4年)个月,回顾性分析其临床资料、手术结果和随访效果。**结果** 术后8例患者移植皮片存活率均大于90%,其中6例患者移植皮片全部存活(存活率为100.0%),1例患者术后部分切口愈合不良,经对症治疗后均好转。患者术后双侧小腿中段周径差异均小于4 cm,患侧小腿组织水肿基本消失、大腿组织水肿情况较前明显改善,双侧患肢基本对称,外观及功能均得到明显改善。术后1年内,3例患者返院接受大腿部脂肪抽吸术,均恢复良好。随诊时间

[**通信作者**] 李世荣,电话:(023)65410744,E-mail:lishirong.cqzx@yahoo.com.cn

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1600.024.html(2013-06-19)