基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0527-03

FHIT 蛋白和 p21 蛋白在外阴尖锐湿疣、外阴上皮内瘤变中的表达

范余娟[1],罗雪慧[1],杨开选[2],徐 红[1],李 雷[2],刘 辉[2]
(1.广西医科大学附一院妇产科,南宁 530021;2.四川大学华西第二医院病理科,成都 610041)

【摘 要】目的:探讨 FHIT 和 p21 蛋白在外阴尖锐湿疣(Vulvar condyloma acuminatum,VCA)、外阴上皮内瘤变(Vulvar intraepithelial neoplasia,VIN)及正常外阴组织中的表达情况。方法:采用免疫组化(SP)法检测 51 例 VCA,39 例 VIN 及 20 例正常外阴组织中的脆性组氨酸三联体基因(Fagile histidine triad,FHIT),p21 的表达。结果:FHIT 在 VCA 组和 VINI~Ⅱ,VINⅢ中的阳性率明显低于正常组(P=0.000 1);FHIT 在 VCA 组和 VINⅢ组阳性率无统计学意义(P=0.592);p21 在正常外阴、VIN 和 VCA 组中阳性率差异有统计学意义(P=0.000 1);p21 在正常外阴、VIN 阳性率无统计学意义(P=0.793),而在 VIN 和 VCA 中差异有统计学意义(P=0.000 1)。结论:(1)FHIT 和 p21 基因异常表达与 VCA 和 VIN 的发生发展有关。(2)FHIT 基因异常是外阴癌变过程中的早期事件。

【关键词】外阴尖锐湿疣;外阴上皮内瘤变;FHIT;p21
【中国图书分类法分类号】Q786;Q711.72 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-27

The expression of FHIT protein and p21 protein in vulvar condyloma acuminatum and vulvar intraepithelial neoplasia

FAN Yu-juan, et al
(*Department of Gynecology, the First Affliated Hospital, Guangxi Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To probe the expression of Fragile histidine triad (FHIT) and p21 protein in Vulvar Condyloma acuminatum (VCA) and vulvar intraepithelial neoplasia (VIN). *Methods*: Immunohistochemistry was used to detect FHIT and p21 expression in 51 cases of VCA, 39 cases of VIN and 20 cases of normal vulvar epithelium. *Results*: The positive rate of FHIT in VCA and VIN Ⅰ~Ⅱ、VINⅢ was obviously lower than which in normal tissue(P=0.000 1); there was no statistic significance in the positive rate of FHIT expression between VINⅢ and VCA (P=0.592); the positive rate of p21 in normal vulva, VIN and VCA has statistic significance; there was no statistic significance in the positive rate of p21 expression between VIN and VCA (P=0.793). *Conclusion*: (1) FHIT and p21 expression are associated with the development and progression of VCA and VIN. (2) The abnormality of FHIT gene is a early event in the development and progression of vulvar cancer.

【Key words】*Vulvar condyloma acuminatum* (VCA); *Vulvar intraepithelial neoplasia* (VIN); *Fragile histidine triad* (FHIT); p21

外阴尖锐湿疣(Vulvar condyloma acuminatum,VCA)是人乳头状瘤病毒(Human papilloma vires,HPV)感染引起的一种常见的性传播疾病,该病临床表现为外生殖器附近及肛周鳞状上皮炎性增生性病变。目前研究认为引起尖锐湿疣的 HPV 感染与宫颈癌、皮肤鳞状细胞癌、外阴癌等恶性肿瘤的发生密切相关[1],因此,尖锐湿疣与癌变的关系日益受到关注。外阴上皮内瘤变(Vulvar intraepithelial neoplasia,VIN)是外阴鳞状上皮的不典型增生,属外阴癌的癌前病变,大部分 VIN 患者经治疗后可消退,有些则可发展为原位癌或浸润癌。近年,VIN 的发病率正在快速增长,越来越多的年轻患者被检出。美国 VIN 初次诊断的平均年龄已由 52.7 岁降至 35.8 岁[2]。寻找合适的生物学指标以预测 VIN 的发展趋势,使 VIN 患者获得恰当而不是过度的治疗,显得越发必要。

脆性组氨酸三联体基因(Fagile histidine triad,FHIT)是 1996 年 Ohta[3]等用定位克隆技术及外显子捕获技术发现的一个抑癌基因。大量资料表明,FHIT 基因在多种肿瘤中存在转录异常和表达缺失,与肿瘤的病理类型相关,且是一个与环境致癌因素相关的较早期事件[4],可能是真正癌前病变的标志。p21 基因是 p53 的下游基因,在功能上继承了 p53 基因的抑癌作用,因此也是一种重要的抑癌基因。有研究报道在宫颈癌、卵巢癌、食道癌等均存在 p21 的异常表达。FHIT

作者介绍:范余娟(1965-),女,副教授,博士,
研究方向:妇科肿瘤。

基金项目:广西自然科学基金资助(编号:桂科自 0640106)。

和 p21 基因在 VIN 和外阴尖锐湿疣中的表达情况在国内外研究中少有报道。本研究采用免疫组化法（Immunohistochemistry，IHC）检测 VCA、VIN 和正常外阴皮肤组织中 FHIT 和 p21 蛋白的表达情况，探讨 FHIT 和 p21 基因与 VCA 和 VIN 的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本研究标本资料选自 2001~2007 年华西第二医院病理科存档的石蜡标本，其中外阴尖锐湿疣组织 51 例，外阴上皮内瘤变组织 39 例（其中Ⅰ~Ⅱ级 22 例，Ⅲ级 17 例）和正常外阴组织 20 例，所有标本均经 2 位病理专家复核确认。

1.2 主要试剂

兔抗人 FHIT 多克隆抗体，鼠抗人即用型 p21 单克隆抗体，SP 试剂盒，均购自北京中山生物公司。

1.3 检测方法

采用辣根过氧化物酶标记链酶卵白素免疫组化法（SP 法），FHIT 抗体和 p21 抗体稀释浓度均为 1:100，实验按试剂盒要求进行，以磷酸盐缓冲液（PBS）代替一抗作空白对照，以已知阳性组织作为阳性对照，DAB 显色。

1.4 结果判断

FHIT 蛋白表达阳性细胞表现为细胞浆中出现黄色或棕黄色着色，p21 蛋白表达阳性细胞表现为细胞核和（或）细胞浆中出现黄色或棕黄色着色。每张切片在 400 倍个光学显微镜下计数 5 个视野，每个视野数 100~200 个细胞，蛋白阳性表达率 = 阳性细胞数/观察总细胞数 × 100%。采用计分的方法。

染色强度：1 分，无染色或淡黄色；2 分，棕黄色；3 分，棕褐色。

染色范围：1 分，阳性细胞数 < 10%；2 分，阳性细胞数 10%~50%；3 分，阳性细胞数 > 50%。

把计分相乘得每个标本的分值（1~9 分），总分 ≤ 3 分为阴性，总分 > 3 分为阳性。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包分析数据，统计资料按计数资料处理，用阳性细胞百分率来表示。对于多样本之间的比较采用行 × 列表 χ^2 检验（α=0.05 为检验水准），对于多样本整体检验有差别的两两之间的比较，采用四格表 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法（α=0.008 3 为检验水准）。

2 结 果

2.1 FHIT 蛋白的表达情况

FHIT 蛋白在正常外阴上皮、VINⅠ~Ⅱ、VINⅢ、VCA 中的阳性率分别为 100.0%（20/20）、63.6%（14/22）、11.8%（2/17）、5.9%（3/51），经统计学处理，4 组间差异有统计学意义（χ^2=67.704，P=0.000 1）；VINⅠ~Ⅱ与 VINⅢ组，VINⅠ~Ⅱ与 VCA 组比较差异有统计学意义（χ^2=10.665，P=0.001；χ^2=28.697，P=0.000 1）；VINⅢ与 VCA 组比较差异没有统计学意义（P=0.592）。见表 1。

2.2 p21 蛋白的表达情况

P21 蛋白在正常外阴上皮、VIN、VCA 中的阳性率分别为 75.0%（15/20）、71.8%（28/39）、27.5%（14/51），经统计学处理，3 组间比较，差异有统计学意义（χ^2=22.667，P=0.000 1）；VIN 组与 VCA 比较，差异有统计学意义（χ^2=17.746，P=0.000 1）；而 VIN 组与正常外阴组比较，差异无统计学意义（χ^2=0.069，P=0.793）。见表 2。

3 讨 论

3.1 外阴上皮内瘤变、外阴尖锐湿疣组织中 FHIT 蛋白的异常表达

外阴癌的发生、演变过程是多因素、多阶段的复杂过程。组织学上从正常经过增生，不典型增生到原位癌，最终发展为浸润癌的时间变迁过程支持这一点。肿瘤中许多遗传学异常在癌前病变中即出现，尽管有时候这些异常在癌前阶段发

表 1 FHIT 蛋白在 VIN、VCA 中的表达

项目	n	FHIT		P 值
		阳性数	阳性率(%)	
正常外阴	20	20	100.0▲	0.000
VINⅠ~Ⅱ	22	14	63.6*	<0.008 3
VINⅢ	17	2	11.8*☆	0.001
VCA	51	3	5.9*#	0.592

注：*. VCA、VINⅠ~Ⅱ、VINⅢ与正常外阴比较 P<0.008 3；#. VCA 与 VINⅢ比较 P=0.592；☆. VINⅠ~Ⅱ与 VINⅢ比较 P=0.001；▲. 4 组间比较 P<0.05

表 2 p21 蛋白在 VIN、VCA 中的表达

项目	n	p21		P 值
		阳性数	阳性率(%)	
正常外阴	20	15	75.0▲	0.000 1
VIN	39	28	71.8☆	0.79
VCA	51	14	27.5*#	0.000 1

注：*. VCA 与正常外阴比较 P=0.000；#. VCA 与 VIN 比较 P=0.000；☆. VIN 与正常外阴比较 P=0.793；▲. 3 组间比较 P=0.000 1

生的频率较在肿瘤中发生的频率低,但它可以随着肿瘤的发展不断递增,通过分析不同组织学分级中的分子异常,很可能探索出从增生到肿瘤发生的一些基因的异常,为外阴癌的诊断、治疗提供一些有价值的参考。

1996 年 Ohta 等[3]利用外显子捕捉法在人类染色体3p14.2处确定了 1 个新的基因。该基因编码的蛋白质与具有组氨酸三联体结构的 HIT (Histidinetriad)蛋白高度同源,又因为该基因跨越脆性位点,故命名为脆性组氨酸三联体(FHIT)。FHIT 基因定位于 3p14.2,在染色体上占据 1 Mb 的位置,包括肾细胞癌相关性断裂点 t(3;8)易位断裂点、人类染色体最常见的脆性部位 FRA3B、抑癌基因 γ 蛋白质 - 酪氨酸磷酸酶基因(Protein-tyrosine phosphatase γ gene,PTPRG)的 5' 末端和 HPV16 整合位点。FHIT 基因发挥抑癌作用的机制尚未完全清楚,目前认为主要有以下 3 种机制:①以 FHIT-ApnA 复合物为活性形式:ApnA 是参与细胞内增殖和凋亡信号传导的重要因子,ApnA 的磷酸根可以共价键形式结合在 FHIT 蛋白的带正电荷的"分子沟"中形成 FHIT-ApnA 复合物,进而激活 FHIT 蛋白的活性。Trapasso 等[5]设计了一系列的 FHIT 突变体,这些突变体在底物结合能力和二腺苷磷酸水解活性方面有缺陷,将这些突变体导入到 FHIT 基因缺乏的细胞系中,以验证它们与细胞凋亡的关系,结果证实 FHIT 蛋白诱导的细胞凋亡与 FHIT-ApnA 复合物的形成有关, 而与其二腺苷磷酸水解酶的活性无关。②参与细胞周期调控,诱导细胞凋亡:Campiglio 等[6]认为 FHIT 诱导细胞凋亡有两个通路:一是细胞质的外部通路,它与膜受体信号密切相关,并且由 caspase-8 启动;另一个是线粒体的内部通路,在线粒体水平主要由 Bcl-2 家族成员调节并且依赖于 caspase-9 的激活。这两个通路在细胞内紧密联系在一起,在细胞凋亡反应的晚期阶段可观察到介导细胞凋亡的这两个通路。③参与微管形成:FHIT 蛋白与微管的结合可能与其抑癌功能有关。Chaudhuri 等[7]在体外研究发现,野生型和突变型 FHIT 蛋白(无水解活性但有抑癌活性)对微管蛋白都有较强的结合力,当微管连接蛋白不存在时,野生型和突变型的 FHIT 蛋白不能够组装微管;但当连接蛋白存在时,野生型和突变型的 FHIT 蛋白都可以促进微管的组装,而且电镜下显示组装的微管的结构是正常的。两者都能大大增强微管相关蛋白的聚核作用,通过限制微管动态或干扰微管分散而阻止细胞有丝分裂过程,抑制细胞过度增殖,从而发挥抑癌功能,但在体实验中还没有证实。

大量资料表明,FHIT 基因在多种肿瘤中存在转录异常和表达缺失,与肿瘤的病理类型相关,且是一个与环境致癌因素相关的较早期事件[4],可能是真正癌前病变的标志。冉桂萍等[8]检测了 66 例乳腺癌组织中 FHIT 蛋白表达率发现,59.1%的 FHIT 表达明显下降,提示 FHIT 蛋白低表达是乳腺癌发生中的高频事件,且 FHIT 基因微卫星不稳定性与 FHIT 蛋白表达缺失有关。wu 等[9]的研究也证实 FHIT 的甲基化是其在宫颈癌中失活的重要机制,同时发现 DNA 甲基化的基因表达改变是可逆的,特别是在癌变的早期,提出对于那些基因结构无改变,仅发生了 CpG 岛甲基化的肿瘤逆转其启动子的高甲基化是治疗宫颈癌的一个有效途径。还有很多研究发现,FHIT 基因在宫颈、乳腺、肺、胃等多种肿瘤细胞中,呈现高频率的纯合性缺失、杂合性缺失或者异常转录[10-12]。以上研究说明 FHIT 基因是一个重要抑癌基因,它在多种恶性肿瘤的发生发展中以缺失为主。FHIT 蛋白表达下调或缺失可能是恶性肿瘤发生的早期事件,在恶性肿瘤的发生机制中起一定的作用。

本研究发现 FHIT 在正常外阴上皮组织中均呈阳性表达,无缺失发生。VIN Ⅰ~Ⅱ组的阳性表达率为 36.6%,VIN Ⅲ组其阳性表达率为 11.8%,在 VCA 组其阳性表达率为 5.9%,4 组比较差异有统计学意义(P=0.000 1),说明 FHIT 表达异常与外阴上皮内瘤变和外阴尖锐湿疣的发生发展有关。本研究中,VIN Ⅰ~Ⅱ和 VIN Ⅲ中均有 FHIT 的异常表达,VIN Ⅰ~Ⅱ与 VIN Ⅲ组比较差异有统计学意义,说明在外阴癌前病变的早期阶段就已出现 FHIT 基因的异常,且高级别外阴上皮内瘤变中 FHIT 基因的异常更加明显,提示 FHIT 基因的异常可能是外阴癌变的早期事件,与外阴癌前病变的不良预后有关,FHIT 蛋白的检测可作为外阴癌前病变转归的生物学指标;FHIT 蛋白在 VIN Ⅲ与在 VCA 中的阳性表达率差异无统计学意义,说明外阴尖锐湿疣中 FHIT 基因的异常频率接近高级别外阴上皮内瘤变中 FHIT 基因的异常频率,提示部分外阴尖锐湿疣可能是外阴癌的癌前病变。

3.2 外阴上皮内瘤变、外阴尖锐湿疣组织中 p21 蛋白的异常表达

p21 基因定位于人染色体 6p21.2,全长约 85 kb。p21 基因的表达产物 p21 蛋白是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白。最主要的生物学功能在于 DNA 损伤时介导细胞周期抑制及损伤修复,维持细胞遗传信息的稳定性,其产物 P21 蛋白定位于细胞核中,由 164 个氨基酸构成,富含精氨酸,p21 蛋白还因其 C_2 末端对 PCNA 的抑制作用,更直接地抑制细胞 DNA 的合成,通过抑制应激激活蛋白激酶活性,阻碍信号传导通路参与细胞的生长、分化、衰老及死亡。p21 作为一种抑癌基因,对多种肿瘤细胞的生长有抑制作用,p21 的表达减弱或消失可能使抑制细胞增殖的作用减弱,或细胞正常增生转变为增生分化不良,导致肿瘤发生。

王言飞等[13]的研究显示,P21 蛋白在食管鳞癌、远癌组织中表达的阳性率分别为 31.25%、93.75%,食管癌组织 P21 蛋白阳性表达率明显低于远癌组织,P21 蛋白在食管鳞癌中低表达,在远癌组织中高表达,提示 p21 基因失活是食管癌发生发展过程中的早期分子事件。说明 p21 基因在食管癌的调控机制中起负性调控作用,其调节通路障碍可能参与了食管癌的发生。本研究显示,p21 蛋白在正常外阴组、VIN 组及 VCA 组表达的阳性率分别是 75.0%,71.8%,27.5%,3 组比较有统计学意义(P=0.000 1),p21 在正常外阴、VIN 及 VCA 中也呈逐渐降低的趋势,说明 p21 蛋白表达的下调与外阴尖锐湿疣及外阴上皮内瘤变的发生有关。

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0530-05

间充质干细胞移植对兔颈动脉损伤后的内皮修复作用研究

许官学,赵然尊,石 蓓,郭 艳,王冬梅,沈长银
(遵义医学院附属医院心内科,贵州 563003)

【摘 要】目的:探讨经骨髓动员后自外周血分离培养的间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs)移植对模型兔颈动脉损伤后的修复作用及可能机制。方法:建立兔动脉粥样硬化狭窄模型,粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)动员 5 d 后采集外周血,用密度梯度离心法结合反复贴壁法培养获得纯化的 MSCs,增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein,EGFP)报告基因标记。对模型兔颈动脉进行球囊损伤,术毕立即耳缘静脉内分别注入标记的 MSCs(移植组)或培养液(对照组),分别于术后 7、14、28 d 处死动物,取颈动脉血管标本进行形态学和内皮化程度分析,并对归巢的 MSCs 进行鉴定和分化跟踪。结果:各个时段血管形态学分析均显示移植组内膜增殖程度显著低于对照组($P<0.01$);内皮化程度分析显示移植组明显优于对照组($P<0.01$)。MSCs 移植组于各个时间段均可见血管组织中有 EGFP(+)细胞分布,且部分细胞同时为 EGFP 和 CD31 阳性,对照组则无。结论:静脉移植 MSCs 能促进模型兔颈动脉球囊损伤血管的内皮修复,并抑制内膜增生。

【关键词】间充质干细胞;内皮;颈动脉;兔
【中国图书分类法分类号】R543.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-18

Effect of transplantation of mesenchymal stem cells on endothelium repair in rabbits with balloon-induced injury carotid

XU Guan-xue, et al
(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Zunyi Medical College*)

【Abstracts】*Objective*: To investigate the effect and its possible mechanism of peripheral blood mesenchymal stem cells (MSCs) on endothelium repair in Rabbits with balloon-induced injury carotid. *Methods*: Purified MSCs were Obtained from peripheral blood through combining density gradient centrifugation with repeating adherence cultivation after the application of Granulocyte

作者介绍:许官学(1971-),男,副主任医师,
研究方向:冠心病介入治疗学。
通讯作者:石 蓓,女,教授,E-mail: shibei2147@yahoo.com.cn。
基金项目:贵州省教育厅重点项目(编号:黔教科 2007-040 号)。

参 考 文 献

[1] 肯尼思 A 博哈特,迈克尔 A 诺布尔.性传播疾病:流行病学、病理学、诊断和治疗[M].北京:科学技术文献出版社,2000.262-266.

[2] Jones R W. Vulval intraepithelial neoplasia:current perspectives[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2001,22(6):393-340.

[3] Ohta M,Inoue H,Cotticelli M G,et al. The FHIT gene,spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma2associated t (3; 8) breakpoint is abnormal in digestive tract cancers[J]. Cell,1996,84(4):587-597.

[4] Yuan B Z,Keck-Waggoner C,Zimonjic D B,et al. Alterations of the FHIT gene in human hepatocellular carcinoma [J].Cancer Res,2000,60(4):1049-1053.

[5] Trapasso F,Krakowiak A,Cesari R,et al.Designed FHIT alleles establish that Fhit-induced apoptosis in cancer cells is limited by substrate binding[J].Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(4):1592- 1597.

[6] Campiglio M,Bianchi F,Andriani F,et al.Diadenosines as FHITF HIT-ness instructors[J].J Cell Physiol,2006,208(2):274-281.

[7] Chaudhuri A R,Khau I A,Prasa D V,et al.The tumor suppressor protein Fhit,A novel interaction with tubulin[J].J BioChem,1999,274(34):24378-24382.

[8] 冉桂萍,朱 岷,杨文秀,等.乳腺癌 FHIT 基因微卫星不稳定性及其蛋白表达的研究[J].山东医药,2007,47(27):7-9.

[9] Wu Y,Meng L,Wang H,et al.Regulation of DNA methylation on the expression of the FHIT gene contributes to cerical carcinoma cell tumorigenesis[J].Oncol Rep,2006,16(3):625-629.

[10] liopoulos D,Guler G,Han S Y,et al. Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer[J].Cancer Lett,2006,232(1):27- 36.

[11] Stam R W,den Boer M L,Passier M,et al. Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia[J]. Leukemia,2006,20(2):264-271.

[12] Bragantini E,Barbi S,Beghelli S,et al.Loss of Fhit expression is associated with poorer survival in gastric cancer but is not an independent prognostic marker[J].Cancer Res Clin Oncol,2006,132(1): 45-50.

[13] 王言飞,刘玉芝,李莲娜.p21 蛋白在食管鳞癌中表达的临床意义[J].实用诊断与治疗杂志,2008,22(2):108-111.

(责任编辑:冉明会)