基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0029-04

Maspin、P53、Skp2 蛋白在结直肠肿瘤中的表达及其意义

倪江涛,易永芬,石海鹏
(重庆医科大学病理教研室 分子医学及肿瘤研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 maspin、p53 及 skp2 蛋白在结直肠肿瘤组织中的表达及临床病理意义。方法:采用免疫组织化学法检测 maspin、p53 及 skp2 在 50 例结直肠腺癌,20 例结直肠腺瘤、20 例正常结直肠粘膜组织中的表达。结果:maspin 蛋白在结直肠腺瘤和正常结直肠粘膜组织中的表达均高于结直肠腺癌($P<0.05$);无淋巴结转移组 maspin 表达率高于淋巴结转移组($P<0.05$);Dukes C,D 期结直肠癌组织 maspin 表达率低于 Dukes A、B 期($P<0.05$)。在结直肠腺癌及腺瘤中 maspin 与 p53 的表达均呈负相关($P<0.01$),然而在 skp2 与 maspin、skp2 与 p53 之间没有发现相关性($P>0.05$)。结论:maspin 的表达可能受 p53 基因的调控。联合检测 maspin、p53 及 skp2 在结直肠肿瘤中表达水平,对判定结直肠癌恶性程度及预后可能具有重要参考价值。

【关键词】maspin;p53;skp2;结直肠肿瘤
【中国图书分类法分类号】R735.34 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-12

Protein expression of Maspin, P53 and Skp2 in colorectal tumors and their significance

NI Jiang-tao, et al
(*Department of Pathology, Molecular Medicine and Tumor Research Center, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of maspin, p53 and Skp2 expression in the progression of colorectal tumors, and to understand their clinicopathological significance. *Methods*: The expression of maspin, p53 and Skp2 in colorectal adenocarcinoma (n=50), adenoma (n=20) and normal tissue (n=20) were detected by immunohistochemistry and compared with the clinicopathological tumor parameters. The relationship among the expression of maspin, p53, and Skp2 was also analyzed in colorectal tumors. *Results*: Maspin expression was much lower in colorectal adenocarcinoma than in adenoma and normal tissues($P<0.05$). Maspin expression showed a negative association with lymphatic metastasis and higher Dukes stage($P<0.05$). Expression of maspin protein was negatively correlated with p53 expression ($P<0.01$). However, there was no significant correlation between expression of Skp2 and p53 or maspin($P>0.05$). *Conclusion*: Maspin might be regulated by the p53 pathway. Combined detection of the expression of maspin, p53, and skp2 may be useful for evaluating its infiltration, metastasis and prognosis.

【Key words】Maspin; P53; Skp2; Colorectal tumor

maspin 是通过对正常乳腺上皮与乳腺癌进行减数杂交和差异显示技术得到的一种肿瘤抑制基因。maspin 与丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族,如:PAI-1、PAI-2、α1-抗胰蛋白酶有高度的同源性,它们都与细胞外基质降解有着密切的关系[1];在体外,乳腺癌与前列腺癌细胞株中,maspin 显示出抑制肿瘤细胞运动与侵袭的能力,在动物模型中降低癌细胞株转移的能力[2]。大量的研究表明 maspin 抑制血管形成、诱导细胞凋亡、促进细胞与基底膜及细胞外基质粘附[3,6]。目前国内外对 maspin 在结直肠肿瘤中表达的研究报道较少。本实验采用免疫组化法检测 maspin、p53、skp2 蛋白在结直肠癌、结直肠腺瘤及正常组织中的蛋白表达,分析其临床病理意义,以探讨 maspin、p53 及 skp2 在结直肠癌发生、发展过程中的作用及其分子机制。

作者介绍:倪江涛(1979-),男,硕士,
研究方向:消化系统肿瘤。
通讯作者:易永芬,女,教授,E-mail: yiyongfen1953@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市教委科研基金资助(编号:040310)。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2002 年至 2007 年重庆医科大学第一附属医院手术切除的结直肠癌组织 50 例,20 例腺瘤组织,20 例正常粘膜。在这些标本中,26 例伴有淋巴结的转移。所有病人在手术前没有接受过化疗和放疗。所有肿瘤的组织学诊断都是根据 WHO 分类确定,肿瘤的分期由 Dukes 分期确定的,其它有

关临床病理参数见表 4。

1.2 免疫组织化学染色

手术标本均经 10%甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,贴附于涂有 100 g/L 多聚赖氨酸的载玻片上,采用免疫组化 SP 法。maspin、p53、skp2一抗均为鼠抗人单克隆抗体(即用型),一抗、SP 试剂盒和 DAB 显色剂均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。采用 1 μmol/L 枸橼酸微波抗原热修复,3%H_2O_2 溶液阻断内源性的过氧化物酶。全部操作过程按 SP 试剂盒说明书完成。用已知相应蛋白阳性的标本作为阳性对照,用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3 maspin,p53,skp2 染色结果判断

1.3.1 maspin 染色结果判断 maspin 阳性表达产物定位于细胞浆或细胞浆细胞核同时着色。随机观察 5 个高倍镜视野,染色强度阴性、弱、中、强分别积分为 0、1、2、3;阳性细胞率 0、<10%、<50%、>50%分别积分为 0、1、2、3。两项之和 0~2 分为阴性(-),3~6 分为阳性(+)[7]。

1.3.2 p53 染色结果判断 细胞核内出现棕黄色颗粒为染色阳性,认为 p53 阳性。如果是非肿瘤细胞或核周围着色,不认为 p53 阳性。当少于 10%的肿瘤细胞着色时,认为免疫组化结果阴性;当超过 10%的肿瘤细胞着色时,认为免疫组化结果阳性[7]。

1.3.3 skp2 染色结果判断 skp2 主要表达在结直肠癌细胞的细胞核或细胞浆。当少于 20%的肿瘤细胞着色时,认为免疫组化结果阴性;当超过 20%的肿瘤细胞着色时,认为免疫组化结果阳性[8]。

1.4 统计分析

使用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析。根据资料性质,采用四格表χ^2 检验、Spearman 等级相关分析,以 $P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 maspin,p53,skp2 蛋白表达

maspin 主要表达于结直肠正常上皮、结直肠腺瘤以及腺癌。maspin 在正常结直肠组织、结直肠腺瘤及腺癌的阳性表达率分别为:95%(19/20)、90%(18/20)、62%(31/50)。正常结直肠粘膜组织和结直肠腺瘤 maspin 阳性表达率明显高于结直肠癌组织($P<0.05$)(图 1)。

p53 在结直肠腺癌及腺瘤、正常结直肠组织的阳性表达率分别为:50%(25/50)、5%(1/20)、5%(1/20)。结直肠癌组织 p53 阳性表达率明显高于结直肠腺瘤和正常结直肠粘膜组织($P<0.05$)(图 2)。

skp2 在结直肠腺癌及腺瘤、正常结直肠组织的阳性表达率分别为:48%(24/50)、5%(1/20)、5%(1/20)。结直肠癌组织 skp2 阳性表达率明显高于结直肠腺瘤和正常结直肠粘膜组织($P<0.05$)(图 3)(表 1)。

2.2 maspin、p53 及 skp2 在结直肠腺癌与腺瘤表达的相关性分析

在结直肠腺癌和腺瘤中,p53 与 skp2 的表达没有相关性($P>0.05$)(表 2)

表 1 maspin、p53 及 skp2 分别在结直肠腺癌、腺瘤、正常组织的表达

组别	例数	maspin				p53				skp2			
		−	+	χ^2	P	−	+	χ^2	P	−	+	χ^2	P
腺癌	50	19	31			25	25			26	24		
腺瘤	20	2	18	5.33	P^a=0.021	19	1	12.39	P^a=0.001	19	1	11.51	P^a=0.001
正常组织	20	1	19	7.62	P^b=0.006	19	1	12.39	P^b=0.001	19	1	11.51	P^b=0.001

P^a:腺癌与腺瘤比较;P^b 腺癌 与正常组织比较

表 2 p53 与 skp2 在结直肠腺癌与腺瘤表达的相关性

		P53(腺癌)		r	P	P53 (腺瘤)		r	P
		+	−			+	−		
Skp2	+	12	12	0.000	1.000	0	1	-0.053	0.826
	−	13	13			1	18		

r:Spearman 相关系数

表 3 maspin 与 p53、skp2 在结直肠腺癌与腺瘤表达的相关性

		maspin(腺癌)		r	P	maspin (腺瘤)		r	P
		+	−			+	−		
P53	+	9	16	-0.536	0.001	0	1	-0.668	0.001
	−	22	3			18	1		
Skp2	+	15	9	0.010	0.946	1	1	-0.444	0.051
	−	16	10			17	1		

r:Spearman 相关系数

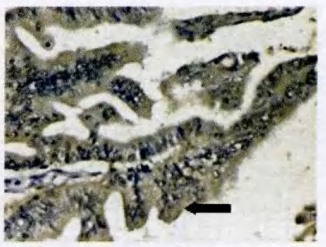


图 1A maspin 在大肠腺癌中的阳性表达(SP × 200)

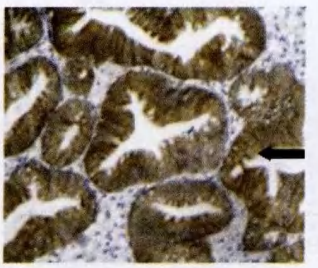


图 1B maspin 在大肠腺瘤中的阳性表达(SP × 100)

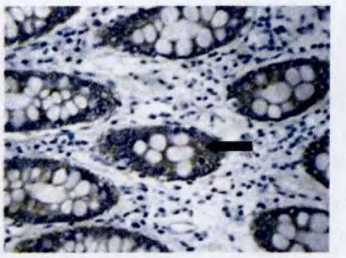


图 1C maspin 在正常大肠黏膜中的阳性表达(SP × 200)

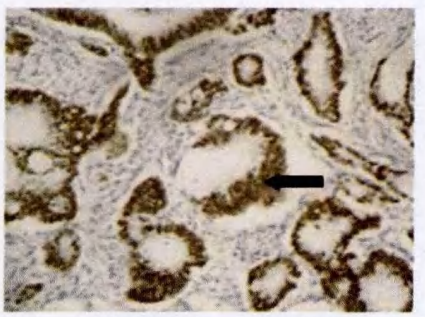


图 2A p53 在大肠腺癌中的阳性表达(SP × 100)

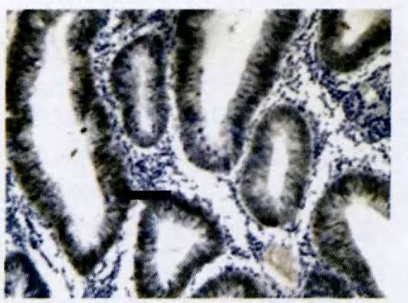


图 2B p53 在大肠腺瘤中的阳性表达(SP × 100)

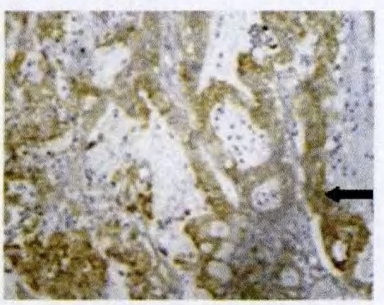


图 3A skp2 在大肠腺癌中的阳性表达(SP × 200)

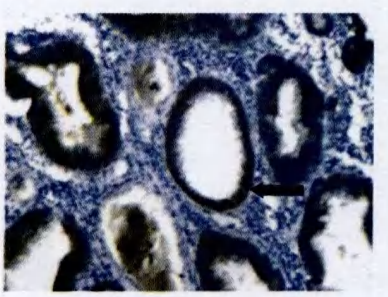


图 3B skp2 在大肠腺瘤中的阳性表达(SP × 200)

表 4 在结直肠腺癌中 maspin 蛋白表达与临床病理参数的关系

		maspin		χ^2 值	P 值
		−	+		
浸润深度	T_1,T_2	12	20	0.009	P=0. 923
	T_3,T_4	7	11		
淋巴结转移	无	3	21	12.738	P=0.001
	有	16	10		
分化程度	中到高分化	13	19	0.260	P=0.610
	低分化	6	12		
Dukes 分期	A,B 期	2	22	17.241	P=0.001
	C,D 期	17	9		

在结直肠腺癌及腺瘤中 maspin 与 P53 的表达均呈负相关(P<0.01),然而在 maspin 与 skp2 之间没有发现相关性(P>0.05)(表 3)。

2.3 maspin 蛋白表达与临床病理参数的关系

maspin 蛋白表达与临床病理参数的关系统计分析结果见表 4。maspin 的表达与淋巴结转移及 Dukes 分期有关(P<0.05),但是与浸润深度和肿瘤分化程度无关(P>0.05)。

3 讨 论

结直肠癌在消化系统恶性肿瘤的发病率中位居第三,是我国恶性肿瘤致死的主要原因之一。结直肠癌的发生是一个多阶段的过程,这个过程包括遗传和表观遗传的变化,涉及到原癌基因、肿瘤抑制基因、细胞周期调节基因、组织浸润相关基因、错配修复基因改变等。maspin 是一个属于 serpin 家

族的丝氨酸蛋白酶抑制剂。maspin 基因最初是在正常人乳腺上皮中发现的，编码 42 kD 细胞质蛋白，由于它能抑制乳腺癌细胞运动、侵袭和转移，被认为具有抑制肿瘤活性的能力[9-11]。与之相似的是，抑制肿瘤活性的能力同样也在前列腺癌[12]、口腔癌[13]及结肠癌[14]中发现。在 1974 年，Morson 提出了结直肠癌发生的“腺瘤－癌”顺序，这一观点正在逐步被接受。流行病学、病理学以及临床研究等均说明结直肠腺瘤为结直肠癌主要的癌前病变。目前认为结直肠癌 80%以上由腺瘤癌变而来，腺瘤与结直肠癌的平行关系亦已被认定，腺瘤恶性变亦已被化学诱癌研究所证实。本研究检测了 maspin 蛋白在正常结直肠粘膜、结直肠腺瘤、结直肠癌组织中的表达情况，旨在从翻译水平探讨 maspin 基因表达在结直肠癌发生、发展中的作用。在本实验中，maspin 蛋白的阳性表达率在正常组织为 95%，腺瘤组织中为 90%，然而在腺癌组织中的阳性表达率为 62%(31/50)，这与 Boltze 等(69%，193/280)[15]报道的相似，但低于 Song 等(75.5%，37/49)报道的。本实验数据揭示了 maspin 蛋白表达从正常组织到癌组织是逐渐降低的。在胰腺导管腺癌[16]中发现 maspin 表达上调，可能是器官特异性、所用抗体类型、免疫组化方法、阳性判断标准、统计分析以及病人遗传背景的差异造成结果不一致。通过检测 maspin 表达与临床病理参数之间的相关性，发现 maspin 的表达与淋巴转移及 Dukes 分期有关，但是与浸润深度和肿瘤分化程度无关。虽然需要大样本及随访研究，但是我们的研究结果提示：在结直肠癌中 maspin 的低表达与侵袭表型有关，maspin 表达下调可能在结直肠上皮细胞恶性转化的早期阶段起着重要作用。

p53 是已确认了的 maspin 表达调节因子。Zou 等[17]研究揭示 p53 能结合到 maspin 基因的启动子上，并把 maspin 视为 p53 的一个新的靶点。实验结果提示 p53 与 maspin 表达呈负相关，这与在胃癌、甲状腺癌、原发性前列腺癌、乳腺癌[18-21]中的研究结果一致。然而，本研究局限之一是仅用免疫组化来检测突变型 p53 与 maspin 表达，虽然我们运用了表达计数系统，但还是需要在将来的研究中采用 Northern blot 和 Western blot 针对野生型 p53 与 maspin 表达做定量分析。

skp2 是一种 F-box 蛋白，它在协调哺乳动物细胞周期 G_1/S 转化及通过 S 期起着关键性的作用[22-26]。它主要负责细胞周期调节蛋白的泛素化和后续的降解，尤其是细胞周期抑制物 p27kip1 的降解。在本实验中，我们发现结直肠腺癌 skp2 阳性表达率明显高于结直肠腺瘤和正常组织，skp2 与 p53、skp2 与 maspin 之间在结直肠腺瘤与腺癌中没有相关性，提示 maspin 和 p53 的降解可能与 skp2 无关。从腺瘤到腺癌，skp2 表达显著增加提示它潜在的致肿瘤作用以及它的过表达与晚期淋巴转移有关[27]。

综上所述，从正常结直肠粘膜—结直肠腺瘤—结直肠癌的变化中，maspin、p53 及 skp2 的表达相应发生变化，推测其均参与结直肠肿瘤的发生和发展，其蛋白的检测可为判断大肠癌恶性程度和预后提供重要参考。

参 考 文 献

[1] Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Maspin expression in normal lung and non-small cell lung cancers: cellular property-associated expression under the control of promoter DNA methylation [J]. Oncogene, 2004, 23: 4041-4049.

[2] Maass N, Hojo T, Zhang M, et al. Maspin-a novel protease inhibitor with tumor-suppressing activity in breast cancer[J]. Acta Oncol, 2000, 39: 931-934.

[3] Zhang W, Shi H Y, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 50.

[4] Liu J, Yin S, Reddy N, et al. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin[J]. Cancer Res, 2004, 64: 1703-1711.

[5] Odero-Marah V A, Khalkhali-Ellis Z, Chunthapong J, et al. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2: 389-403.

[6] Ngamkitidechakul C, Warejcka D J, Burke JM, et al. Sufficiency of the reactive site loop of maspin for induction of cell-matrix adhesion and inhibition of cell invasion. Conversion of ovalbumin to a maspin-like molecule[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 31796-31806.

[7] Doo-Young Lee, Chang-Soo Park, Hyung-Seok Kim, et al. Maspin and p53 protein expression in gastric adenocarcinoma and its clinical applications[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16: 14-15.

[8] Drobnjak M, Melamed J, Taneja S, et al. Altered expression of p27 and Skp2 proteins in prostate cancer of African-American patients[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9: 2613-2619.

[9] Sheng S, Pemberton P A, Sager R. Production, purification, and characterization of recombinant maspin proteins[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 30988-30933.

[10] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix M J, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. Science, 1994, 263: 526-529.

[11] Seftor R E, Seftor E A, Sheng S, et al. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma[J]. Cancer Res, 1998, 58: 5681-5685.

[12] Umekita Y, Hiipakka RA, Liao S. Rat and human maspins: structures, metastatic suppressor activity and mutation in prostate cancer cells [J]. Cancer Lett, 1997, 113: 87-93.

[13] Xia W, Lau Y K, Hu M C, et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma[J]. Oncogene, 2000, 19: 2398-2403.

[14] Song S Y, Lee S K, Kim D H, et al. Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density[J]. Dig Dis Sci, 2002, 47: 1831-1835.

[15] Boltze C. Loss of maspin is a helpful prognosticator in colorectal cancer: a tissue microarray analysis[J]. Pathol Res Pract, 2005, 200: 783-790.

[16] Dengfeng Cao, Qian Zhang, Lee Shun-Fune Wu, et al. Prognostic

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0033-04

移植胰岛血管内皮细胞 GIPR 表达的实验研究

尹昌生,杜成友

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科、重庆市器官移植中心肝脏移植外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究葡萄糖依赖性胰岛素刺激多肽受体(Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor,GIPR)在移植胰岛血管内皮细胞的表达情况。方法:用胰管内灌注、V 型胶原酶消化,Ficoll-400 梯度离心纯化的方法,获取较纯胰岛后通过门静脉途径移植到糖尿病大鼠肝脏,术后每天给于免疫抑制剂他可莫斯(Tacrolimus,FK506)和氯芬酸酯(Mycophenolate mofetil,MMF)灌胃。移植模型分别饲养 7、14、40、60 d 后取材,用免疫组化方法研究 GIPR 在胰岛血管的表达。结果:移植胰岛内部分血管内皮细胞表达 GIPR。结论:GIPR 阳性内皮细胞参与了移植物血管重建;新生的胰岛血管具备肝脏血管某些特征,能够被 GIP 影响。

【关键词】胰岛;移植;血管再生;GIPR

【中国图书分类法分类号】R587 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-29

The expression of GIPR in vasculature endothelial cell in transplanted islets

YIN Chang-sheng ,et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery & Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of GIPR in vasculature endothelial cells in transplanted islets. *Methods*: Pancreas of SD rat were digested by collagenase V after the common bile ductal injection of collagenase V. Islets were purified by Ficoll discontinuous density gradient-centrifugation. Then the high-quality islets were immediately transplanted intraportally into the liver of recipient SD rats with streptozotocin-induced diabetes.The recipient rats were randomly devided into 4 groups based on time points that recipients were killed : group A(7 days)、group B(14 days)、group C (40 days), and group D (60 days). The immunosuppressive tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil(MMF) were administered to recipients by intragastric administration aftertransplantation.

作者介绍:尹昌生(1980-),男,硕士,
研究方向:器官移植,肝胆外科。

通讯作者:杜成友,男,教授,E-mail:duchengyou@126.com。

基金项目:重庆市教委课题(编号:KJ070306)。

significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of 223 surgically resected cases[J]. Modern Pathology, 2007,20: 570-578.

[17] Zou Z,Gao C,Nagaich A K,et al. P53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin[J]. J Biol Chem,2000,275: 6051-6054.

[18] Ito R,Nakayama H,Yoshida K,et al. Loss of maspin expression is associated with development and progression of gastric carcinoma with p53 abnormality[J]. Oncol Rep,2004,12:985-990.

[19] Machtens S,Serth J,Bokemeyer C,et al. Expression of the p53 and maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features[J]. Int J Cancer,2001,95:337-342.

[20] Boltze C,Schneider-Stock R,Meyer F,et al. Maspin in thyroid cancer: its relationship with p53 and clinical outcome[J]. Oncol Rep,2003, 10:1783-1787.

[21] Umekita Y,Ohi Y,Sagara Y,et al. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients[J].Int J Cancer,2002,100: 452-455.

[22] Catzavelos C,Bhattacharya N,Ung YC,et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 inhibitor protein: prognostic implications in primary breast cancer[J]. Nat Med,1997,3:227-230.

[23] Esposito V,Baldi A,De Luca A,et al. Prognostic role of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 in non-small lung cancer[J]. Cancer Res, 1997,57:3382-3385

[24] Loda M,Cukor B,Tam S W,et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas[J]. Nat Med,1997,3:231-234

[25] Mori M,Mimori K,Shiraidhi T,et al. p27 expression and gastric carcinoma[J]. Nat Med,1997,36:593.

[26] Guo Y,Sklar G N,Borkowsky A,et al. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in human prostate cancer correlates with tumor grade[J]. Clin Cancer Res,1997,3:2269-2274.

[27] Li J Q,Wu F,Masaki T,et al. Correlation of Skp2 with carcinogenesis,invasion,metastasis,and prognosis in colorectal tumors[J]. Int J Oncol,2004,25:87-95.

(责任编辑:冉明会)