肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0870-03

膀胱移行细胞癌细胞中心体异常与 p53 基因突变关系的实验研究

王连渠,王 明,谭 毅
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究膀胱移行细胞癌细胞中心体异常与 p53 基因突变的关系,探讨中心体异常在 p53 基因突变导致肿瘤发生发展过程中的作用及意义。方法:采用免疫组化方法,对 76 例膀胱移行细胞癌标本进行中心体异常和 p53 蛋白表达的检测。一抗分别为鼠抗人中心体周围蛋白单克隆抗体和鼠抗人 p53 单克隆抗体。结果:通过对样本统计分析证实,膀胱移行细胞癌中心体异常与 p53 蛋白表达均是预测肿瘤预后的指标,并且两者之间呈正相关($r=0.707$),具有高度统计学意义($P<0.01$)。结论:中心体异常可能是 p53 基因突变导致膀胱移行细胞癌发生发展过程中的一个重要中间环节。研究中心体异常可能会加深对肿瘤发生机制的了解,为临床上治疗肿瘤提供新的治疗方法和思路。

【关键词】中心体异常;染色体不稳;p53;膀胱移行细胞癌
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-03

The Experimental Study on the relation of Centrosome Hyperamplification and P53 genetic mutation in Bladder Cancer

WANG Lian-qu, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the relation of the abnormal condition of centrosome and p53 genetic mutation of bladder cancer cells, its effect on the onset and progress of the transitional cell carcinoma of bladder because of p53 genetic mutation. *Methods*: 76 transitional cell carcinoma of bladder were examined. The centrosome was stained by indirect immunofluorescence methods, and the primary antibody was monoclonal antibody against pericentrin. The p53 was stained by SP immunohistochemical methods and the primary antibody was monoclonal antibody against p53. *Results*: Through statistical analysis, detection of CH or p53 expression was useful in providing prognostic information in bladder cancer. There existed a positive correlated ($r=0.707$, $P<0.01$) between the CH and the p53 genetic mutation. *Conclusion*: CH may be an important middle link of the onset and progress of the transitional cell carcinoma of bladder because of p53 genetic mutation. Study of CH may help to deepen understanding of the mechanism of the tumorigenesis and provide new therapy for tumor in clinic.

【Key words】Centrosome hyperamplification(CH); Chromosome instability (CIN); p53; Transitional cell carcinoma of bladder(BTCC)

中心体异常是恶性肿瘤细胞的一个重要特征,它引起恶性肿瘤细胞极性的改变和染色体分离异常(非整倍体),越来越引起人们的重视,成为近年研究的热点。p53 基因是一种与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因,在多数肿瘤细胞中都有突变。p53 蛋白有多种功能,参与多个细胞周期调控事件,也可能与中心体复制调控有关。本项实验通过对膀胱移行细胞癌细胞中心体异常与 P53 蛋白表达的研究,探讨二者的关系及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料

从本院 2004.年 1 月至 2007 年 6 月收取的 263 例切除的膀胱移行细胞癌标本中随机选取 76 例进行中心体特性和 p53 蛋白表达的研究,同时选取其中 5 例标本的正常膀胱粘膜上皮作为正常对照。本组病例男 45 例,女 31 例,年龄 34 ~ 86 岁,平均 58.3 岁;病理分级根据世界卫生组织

作者介绍:王连渠(1973-),男,硕士,主治医师,研究方向:膀胱肿瘤的诊断与治疗。
通讯作者:王 明,男,副教授,E-mail: wangmxr@sohu.com。

（WHO）分类标准：G_1 级 16 例，G_2 级 41 例，G_3 级 19 例；临床分期根据国际抗癌协会（UICC）标准：浅表型（Ta～T_1）59 例，浸润型（T_2～T_4）17 例；其中单发肿瘤 43 例，多发 33 例；所有病例随诊 6～30 个月，平均 23.8 个月，其中发现肿瘤复发 39 例，有疾病进展 21 例。本组病例病理诊断均经过我校病理教研室专家组复核无误。外科手术切除的膀胱移行细胞癌标本，用 4%多聚甲醛液固定，常规石蜡包埋。

1.2 主要试剂和染色方法

第一抗体单克隆鼠抗人 γ- 微管蛋白抗体（GTU88，Sigma）是美国 Sigma 公司产品，第一抗体单克隆鼠抗人 P53 抗体。第二抗体 FITC 标记山羊抗鼠 IgG，SP-9002 免疫组化染色试剂盒，碘化丙啶（PI），DAB 显色试剂盒，封闭用正常山羊血清工作液，包被玻片用多聚赖氨酸均为北京中杉金桥生物试剂公司产品。中心体染色采用间接免疫荧光染色方法。P53 蛋白染色采用 SP 三步法，具体步骤根据说明书上进行。每一批染色同时从研究标本中随机抽取 2～4 张切片，以 PBS 代替一抗的同步染色作为阴性对照。

1.3 结果判定

中心体异常的计算：我们把具有以下特征之一的中心体判断为异常中心体：（1）1 个细胞内观察到 3 个或者多个中心体；（2）中心体的直径大于作为阴性对照的正常膀胱粘膜上皮细胞中心体直径的 2 倍及以上甚至出现巨块状中心体；（3）中心体形状异常，成长条形或线状。每 1 张切片（至少 5 个具有代表性的高倍视野）观察不少于 100 个细胞。细胞中心体异常数目<5%记为阴性（CH-），≥5%为阳性（CH+）[11]。P53 蛋白在 BTCC 组织中的表达判定：以细胞核中有棕黄色颗粒为阳性细胞，每 1 张切片（至少 5 个具有代表性的高倍视野）观察不少于 1 000 个细胞。将阳性细胞按其数量及显色强度分为 3 级：阳性细胞数 <10%，显色强度为淡黄色或个别细胞呈黄至棕黄色记为表达弱阳性（+）；阳性细胞数 >60%记为表达强阳性（+++），多数细胞呈黄至棕黄色；阳性细胞数（10%～60%）及显色强度介于弱阳性和强阳性之间为中度阳性（++）。凡显色强度与背景无明显差异者为阴性（-）。

1.4 统计学方法

膀胱移行癌细胞中心体异常和膀胱癌 P53 蛋白表达之间采用 SPSS13.0 统计分析软件进行配对卡方检验或 Fisher's 分析，统计数据用 P 值表示，P<0.05 有统计学意义，P<0.01 有高度统计学意义。

2 结　果

2.1 BTCC 中中心体异常和 P53 蛋白表达情况

在 76 例膀胱移行细胞癌标本中，中心体异常阳性（CH+）43 例，占 56.6%，阴性（CH+）33 例，占 43.4%；P53 蛋白阳性（+～+++）表达 48 例，占 63.2%，阴性（-）表达 28 例，占 36.8%。中心体异常阳性，P53 蛋白阳性表达分别如图 1、2 所示。

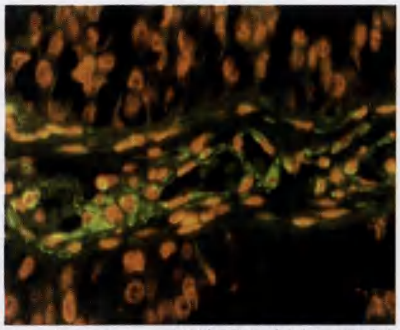


图 1　中心体 γ－微管蛋白表达于细胞核，呈绿色荧光（SP×200）

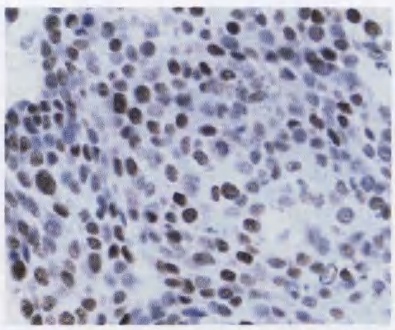


图 2　P53 阳性表达于细胞核，呈棕黄色颗粒（SP×200）

2.2 BTCC 中中心体异常和 P53 蛋白阳性表达与其他参数之间关系

76 例膀胱移行细胞癌中，中心体异常（CH+）和 P53 蛋白阳性（+～+++）表达与膀胱移行细胞癌的不同病理分级、临床分期、肿瘤数目（单发与多发）、肿瘤复发及疾病进展情况之间关系见表 1 所示。通过卡方检验或 Fisher's 分析表明：在不同病理分级、临床分期、肿瘤数目（单发与多发）、肿瘤有无复发及疾病是否进展之间，中心体异常（CH+）和 P53 蛋白阳性（+～+++）表达都存在着显著差异（P<0.05）。

2.3 BTCC 中中心体异常和 P53 蛋白阳性表达之间的关系

在 76 例膀胱移行细胞癌中，中心体异常（CH+）和 P53 蛋白阳性（+～+++）表达两者之间关系见表 1 所示。其中中心体异常和 P53 蛋白表达均阳性 40 例，占 52.6%；中心体异常表达阳性而 P53 蛋白表达阴性 3 例，占 4.0%；中心体异常表达阴性而 P53 蛋白表达阳性 8 例，占 10.5%；两者表达均阴性 25 例，占 32.9%。通过配对四格表卡方检验表明中心体异常（CH+）和 P53 蛋白阳性（+～+++）表达之间没有显著差异（P>0.05），通过相关性分析表明两者之间存在显著的相关性（χ^2= 37.961，r=0.707，P<0.01）。

表 1 76 例膀胱癌中心体异常和 P53 蛋白阳性表达与其他参数的关系

			中心体异常阳性			P53 表达阳性		
		总例数	例数	百分率(%)	*P* 值	例数	百分率(%)	*P* 值
病理分级	G_1	16	4	25		5	31.3	
	G_2	41	23	56.1		26	63.4	
	G_3	19	16	84.2	0.001	17	89.5	0.001
临床分期	$T_{a\sim1}$	59	29	49.2		33	55.9	
	$T_{2\sim4}$	17	14	82.4	0.015	15	88.2	0.006
肿瘤数目	单发	43	16	37.2		19	44.2	
	多发	33	27	81.8	0.000	29	87.9	0.000
肿瘤复发	无	37	15	40.5		18	48.6	
	有	39	28	71.8	0.001	30	76.9	0.011
疾病进展	无	55	22	40.0		28	50.9	
	有	21	21	100	0.000	20	95.2	0.000
合计		76	43	56.6		48	63.2	

3 讨 论

3.1 中心体异常可作为膀胱移行细胞癌预后不良的一个预测因子

中心体是细胞内一种微小非膜型细胞器,由一对互相垂直的短筒状中心粒(Centrioles)和中心粒周围物质(Pericentriolar material,PCM)组成。它的功能是在间期及有丝分裂期的细胞中作为主要的微管组织中心。在正常细胞周期,中心体仅复制一次,产生两个中心体。在有丝分裂过程中它建立两级纺锤体,纺锤体的微管牵引染色体向两级运动,从而确保复制后的染色体分配到两个子细胞中去,以维持基因组的稳定[2]。目前中心体异常(扩增)的具体机制目前认不太清楚,主要涉及中心体相关激酶、泛素-蛋白酶降解途径相关物质、癌基因和抑癌基因等。但中心体结构和功能异常至少有两个功能性的后果可能在肿瘤发生、发展中起着重要作用:第一,导致细胞极性改变、细胞及组织的分化异常;第二,导致染色体分离错误,使复制后的两套染色体分配到两个以上的子细胞中去,使子细胞得到异常数目的染色体而形成非整倍体,即 CIN 表型[3]。染色体不稳定所致受累染色体区域基因改变,这些基因表达巨大变化可以打破多个细胞正常生长平衡系统,导致细胞恶变。目前已有许多学者分别在不同的恶性肿瘤中观察到中心体结构的异常。

本组实验的研究结果也表明:在膀胱移行细胞癌细胞中存在着中心体异常,在本组 76 例膀胱癌患者的标本中,其中 43 例发现有中心体异常,占 56.6%(43/76);并且中心体异常阳性 (CH+)表达,在膀胱癌的不同的病理分级、临床分期、肿瘤数目、肿瘤复发及疾病进展之间都存在着显著差异。这与 Kawamura K 和 Yamamoto Y 等[1,4]报道相一致。提示中心体异常可作为膀胱移行细胞癌预后不良的一个重要预测因子。

3.2 P53 蛋白阳性表达是膀胱癌高度恶性和预后不良的重要指标之一

p53 基因是 1 个抑癌基因,编码野生型 P53 蛋白。野生型 P53 蛋白的半衰期为 6~20 min,用一般的免疫组织化学方法难以检测到,当其突变后编码的突变型 p53 蛋白的半衰期为 6 h,用免疫组织化学方法可检测到,即用免疫组织化学方法可间接检测到 p53 基因的突变。本组实验的研究结果表明:在 76 例患者的标本中 P53 蛋白阳性表达 48 例(63.2%),在不同的病理分级、临床分期、肿瘤数目、肿瘤有无复发及疾病是否进展之间 P53 蛋白表达率都存在着显著差异($P<0.05$)。这与何卫阳等[5]报道相一致。提示 P53 可能亦是判断膀胱癌预后的重要指标。

3.3 膀胱移行细胞癌中中心体异常与 p53 基因突变的关系

近年来一些研究者提出 p53 功能的异常会导致中心体的异常。研究表明:P53 蛋白有多种功能,参与多个细胞周期调控,也与中心体复制调控有关,能在一轮细胞周期中触发多轮中心体复制[6]。说明肿瘤细胞中心体异常与 p53 基因突变有着密切的关系。

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0873-04

间歇性缺氧对 SW480 细胞生长及 HIF-1α 表达的影响

李明洋[1],傅仲学[1],吴星烨[2],李尚坤[2]

（1. 重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016）

【摘 要】目的：研究间歇性缺氧(Intermittent hypoxia,IH)对 SW480 细胞生长及缺氧诱导因子 -1α(Hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)表达的影响,探讨肿瘤的间歇性缺氧现象及与 HIF-1α 的关系。方法：采用氯化钴($CoCl_2$)模拟缺氧环境,四甲基偶氮唑蓝（MTT）法观察间歇性缺氧对 SW480 细胞生长的影响，逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）及 Western blot 检测间歇性缺氧对 HIF-1α 表达的影响。细胞分组:A 组:常氧组;B 组:间歇性缺氧 2 h 组;C 组:间歇性缺氧 3 h 组;D 组:持续性缺氧 3 h 组。结果：MTT 结果显示 3 个缺氧组与常氧组相比,SW480 细胞增殖活性均受到抑制,C 组和 D 组较 B 组增殖活性亦降低,而 C 组和 D 组之间无差异。RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 发现 C 组高于 A 组、B 组及 D 组。而其余各组之间无差异。Western blot 检测 HIF-1α 蛋白发现 C 组高于其余各组,D 组高于 B 组及 A 组,而 B 组与 A 组无差异。结论：相同缺氧时间,不同缺氧方式使 SW480 细胞生长受到同等程度抑制。一定程度的间歇性缺氧可以上调 HIF-1α mRNA 及蛋白水平。

【关键词】间歇性缺氧;结肠肿瘤;缺氧诱导因子

【中国图书分类法分类号】R735.35 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-01

作者介绍:李明洋(1983-),男,硕士,
研究方向:胃肠肿瘤。

通讯作者:傅仲学,男,教授,E-mail:fzx990521@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金(30772547)。

本实验通过对膀胱移行细胞癌中心体异常与膀胱癌的 p53 基因突变关系的统计学分析表明:在 76 例膀胱移行细胞癌中,中心体异常与 P53 蛋白阳性表达,之间没有显著的差异($P>0.05$)。对两者行相关性分析也表明：两者之间存在着显著的相关性($\chi^2=37.961$,$r=0.707$,$P<0.01$)。结果表明:膀胱移行细胞癌中中心体异常与 p53 基因突变密切相关。这与Kawamura K 等[7-9]的报道相一致。因此可以假定:中心体异常可能是 p53 基因突变导致膀胱移行细胞癌发生发展中重要中间环节。p53 基因突变后,可能通过调控中心体复制异常，使细胞发生多极分裂，从而引起异常数目的染色体而形成非整倍体,即 CIN 表型,致使受累染色体区域基因改变,从而打破多个细胞正常生长平衡系统，导致细胞恶变。因此，研究中心体异常可能把原癌基因的激活、抑癌基因的失活和细胞周期检测点失调节和肿瘤染色体基因不稳定联系起来,进一步揭示肿瘤的发生和发展过程。

参 考 文 献

[1] Yamamoto Y,Matsuyama H,Furuya T,et al. Centrosome hyperamplification predicts progression and tumor recurrence in bladder Cancer[J]. Clinical Cancer Research,2004,10(19): 6449-6455.

[2] Doxsey S. The centrosome - a tiny organele with big potentia1[J]. Nat Genet,1998,20(2):104-106.

[3] Pihan GA,Purohit A,Wallace J,et al.Centrosome defects and genetic instability in malignant rumors[J]. Cancer Research,1998,58(17): 3974-3985

[4] Kawamura K,Moriyama M,Shiba N,et al. Centrosome hyperamplification and chromosomal instability in bladder cancer[J]. Eur Urol,2003,43(5):505-515.

[5] 何卫阳,苟 欣,祝海洲,等.凋亡抑制基因 survivin 在膀胱移行细胞癌中表达的初步研究[J].重庆医科大学学报,2004,29(1):41-44.

[6] Kramer A,Neben K,Ho AD. Centrosome replication,genomic instability and cancer[J] . Leukemia,2002,16(5):767-775.

[7] Kawamura K,Ikeda R,Suzuki K. The relationships among ploidy type determined by laser scanning cytometry,the overexpression of p53 protein and the numerical aberrations of chromosome 7 in bladder cancer [J]. Hinyokika Kiko,2000,46(6):377-383.

[8] Kawamura K,Moriyama M,Suga K,et al. Centrosome isolation from cultured bladder cancer cells-p53 mutation and centrosome hyperamplification[J] . Hinyokika Kiko,2003,49(2):69-74.

[9] Kawamura K,Izumi H,Ma Z,et al. Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression[J]. Cancer Research,2004,64(14): 4800-4809.

（责任编辑:关蕴良）