维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0311-03

Delta N p63 蛋白在膀胱癌组织中的表达及意义

何云锋[1],吴小候[1],罗春丽[2],田代印[3],黄蜀康[4]

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016;2. 重庆医科大学检验系,重庆 400016;
3. 重庆医科大学儿童医院,重庆 400014;4. 重庆市第二人民医院病理科,重庆 400060)

【摘 要】目的:探讨 Delta N p63(ΔNp63)蛋白在膀胱移行细胞癌(TCCB)中的表达及意义。方法:采用 SP 免疫组织化学法检测 43 例 TCCB 患者肿瘤组织、11 例对照组膀胱组织 ΔNp63 蛋白的表达,并分析 ΔNp63 蛋白表达与 TCCB 临床分期、病理分级的关系。结果:43 例 TCCB 组织中 ΔNp63 蛋白表达阳性率为 100%(43/43),对照组膀胱组织中 ΔNp63 蛋白表达的阳性率为 18.2%(2/11),TCCB 组 ΔNp63 蛋白表达的阳性率明显高于正常组,差异有显著性($P<0.05$)。不同临床分期肿瘤组织中 ΔNp63 蛋白表达的阳性率及强度,各组间 ΔNp63 蛋白表达的阳性率及表达强度差异无显著性($P>0.05$)。不同病理分级肿瘤组织中 ΔNp63 蛋白表达的阳性率及强度,各组间 ΔNp63 蛋白表达的阳性率及表达强度差异无显著性($P>0.05$)。结论:TCCB 组 ΔNp63 蛋白表达水平均明显高于正常组,提示 ΔNp63 与 TCCB 的发生密切相关,可能为 TCCB 发生的重要促进因素,ΔNp63 蛋白表达水平与 TCCB 的临床分期、病理分级没有相关性,故 ΔNp63 在 TCCB 进展中的作用有待进一步研究。

【关键词】膀胱癌;ΔNp63
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文章标识码】A 【收稿日期】2005-11-07

Expression and clinical significance of delta N p63 protein in bladder transitional cell cancer

HE Yunfeng, et al

(*Department of Urological Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: to explore the expression and clinical significance of delta N p63 protein in transitional cell carcinoma of the bladder(TCCB). *Method*: The immunohistochemical staining assay was conducted to detect expression of delta N p63 protein in 43 cases of TCCB and 11 cases of normal bladder epithelium. The relationship between delta N p63 protein expression and pathological types, clinical stages of TCCB was analyzed. *Results*: The expression rates of delta N p63 protein in TCCB and normal bladder epithelium were 100%(43/43) and 18.2%(2/11) respectively. The difference between the two groups was significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression rate of delta N p63 protein in different pathological types and clinical stages of TCCB, The differences between groups were no significant. *Conclusion*: There is high expression of delta N p63 protein in TCCB, delta N p63 is associated with tumorigenesis in TCCB, but is not associated with pathological types and clinical stages of TCCB. Further studies will be necessary to explore the function of delta N p63 in the progression of TCCB.

【Key words】 Bladder cancer; DeltaN p63

ΔNp63 是新发现的肿瘤抑制基因 p63 的两种亚型之一,多数研究结果认为 ΔNp63 亚型在 TCCB (transitional cell carcinoma of the bladder) 中对肿瘤的发生有促进作用,尤其在 TCCB 的早期发生阶段 ΔNp63 可能是关键的肿瘤促进基因之一,但目前对 ΔNp63 蛋白在 TCCB 中的表达情况和与肿瘤分级分期的关系尚有争议,本研究采用 SP 免疫组织化学法,探讨 ΔN p63 在 TCCB 中的表达及与肿瘤分级分期的关系。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

临床资料:收集 2002 年 6 月～2005 年 4 月重庆市第二人民医院因膀胱移行细胞癌行膀胱部分切除术或膀胱全切术患者 43 例组织标本作为实验组,男性 37 例,女性 6 例,年

作者介绍:何云锋(1976-),男,博士研究生,
主要研究方向:泌尿系肿瘤。

基金项目:重庆市教委基金资助项目(040313)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

龄 30～81 岁，平均年龄 54 岁。患者术前均未接受过放疗、化疗，术后均经病理切片证实。按 UICC 临床分期 T_1 期 16 例，T_2 期 20 例，T_{3+4} 期 7 例。按 WHO 病理分级 G_1 15 例 G_2 22 例 G_3 6 例。11 例正常膀胱组织切片作为对照组。

材料：p63（4A4）ΔN p63 鼠抗人单克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology 公司），SP－9002 羊抗鼠 IgG 免疫组化试剂（北京中杉试剂公司），ZLI－9032DAB 显色试剂（北京中杉试剂公司）。

1.2 方法

组织用 4%缓冲甲醛固定，常规石蜡包埋、切片，切片厚度 5 μm，免疫组化采用链酶素－过氧化物酶（SP）法，热修复抗原。正常血清孵育 37℃孵育 30min 后，滴加 ΔN p63 单克隆抗体（按 1∶200 配制），4℃过夜。二抗为 SP－9002 羊抗鼠 IgG 免疫组化试剂盒。DAB 显色剂、苏木精复染，封片。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果分析

ΔN p63 抗原阳性反应位于细胞核，表现为肿瘤细胞核内棕黄色均匀细颗粒，细胞浆及其他组织无阳性反应。判定标准：随机选取 5～10 个高倍视野，计数 100 个肿瘤细胞中阳性反应细胞数，阳性表达率（PI）=（阳性细胞数/100）×100%，PI＜5% 为阴性，PI 6%～25% 为弱阳性，PI 26%～50% 为中阳性，PI＞50 为强阳性。

1.4 统计学分析

采用 χ^2 检验，应用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析。

2 结 果

2.1 ΔNp63 蛋白在 TCCB 组织和对照组膀胱组织中的表达（附图 1）

ΔNp63 蛋白在 TCCB 组织和对照组膀胱组织中的表达见表 1，TCCB 组 ΔNp63 蛋白表达的阳性率明显高于对照组，有显著性差异（$P<0.05$），组内表达强度无显著性差异（$P>0.05$）。

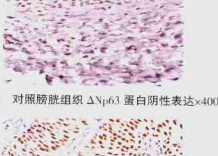


图 1-1 对照膀胱组织 ΔNp63 蛋白阴性表达×400



图 1-2 TCCBΔNp63 蛋白阳性表达×400

2.2 不同临床分期肿瘤组织中 ΔNp63 蛋白的表达

不同临床分期的 TCCB 组织中 ΔNp63 蛋白的表达见表 2，各组间 ΔNp63 蛋白表达的阳性率无显著性差异（$P>0.05$）各组内表达强度无显著性差异（$P>0.05$）。

2.3 不同病理分级肿瘤组织中 ΔNp63 蛋白的表达

不同病理分级 TCCB 组织中 ΔNp63 蛋白的表达见表 3，各组间 ΔNp63 蛋白表达的阳性率及表达强度差异无显著性（$P>0.05$）。

表 1 ΔNp63 蛋白在 TCCB 组织和对照组膀胱组织中的表达 例(%)

Group	sample number	The expression of delta N p63 protein			
		−	+	++	+++
Control	11	9(81.8)*	1(9.1)	1(9.1)	0(0.0)**
TCCB	43	0(0.0)	15(34.9)	16(37.2)	12(27.9)

* $P<0.05$, vs.the expression rate between two groups; ** $P>0.05$, vs.the expression rate in each group

表 2 ΔNp63 蛋白在不同临床分期的 TCCB 组织中的表达

Group	sample number	The expression of delta N p63 protein			
		−	+	++	+++
T_1	16	0(0.0)*	5(31.25)	6(37.5)	5(31.25)**
T_2	20	0(0.0)	7(35.0)	8(40.0)	5(25.0)
T_{3+4}	7	0(0.0)	3(42.8)	2(28.6)	2(28.6)

* $P>0.05$, vs.the expression rate among three groups; ** $P>0.05$, vs.the expression rate in each group

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 ΔNp63 蛋白在不同病理分级的 TCCB 组织中的表达

Group	sample number	The expression of delta N p63 protein			
		–	+	++	+++
G_1	15	0(0.0)*	6(40.0)	5(33.3)	4(26.7)**
G_2	22	0(0.0)	8(36.4)	8(36.4)	6(27.3)
G_3	6	0(0.0)	2(33.3)	2(33.3)	2(33.3)

* $P>0.05$, vs.the expression rate among three groups; ** $P>0.05$, vs.the expression rate in each group

3 讨 论

ΔN p63 是 p63 基因的两个亚型之一，ΔN p63 蛋白是 p63 在肿瘤中的主要表达形式，ΔN p63 在肿瘤中的作用代表了 p63 蛋白在肿瘤中的主要作用[1]。由于 p63 的转录剪切不同，会产生两种不同的亚型，若剪切从 3 号内含子的启动子开始，便会产生 N 端被截短的缺乏酸性 N 端反式启动区的截短异构体 p63 (ΔN p63)，由上游启动子引发 p63 mRNA 的不同剪切会产生有酸性 N 端反式启动区的全长 p63（TAp63）[2]，目前的研究表明三种 ΔN 亚型可能阻止 p53 或 TAp63 调控的细胞周期停滞和细胞凋亡，而三种反式启动亚型（TA）可能充当肿瘤抑制基因的角色，充当致癌基因的角色[3]。

已经有学者研究发现 ΔN p63 蛋白在卵巢癌、鼻咽癌、鳞癌和其他上皮来源的良性肿瘤、软垂疣、平疣中有强烈的表达[4,5]。本研究通过对 ΔN p63 蛋白在 TCCB 中和对照组膀胱组织中的表达发现，44 例 TCCB 全部阳性表达 ΔN p63 蛋白，阳性表达率为 100%，11 例对照组膀胱组织中仅有 2 例阳性表达 ΔNp63 蛋白，阳性表达率仅为 18.2%（2/11），可以看出 TCCB 组 ΔNp63 蛋白表达的阳性率明显高于对照组（$P<0.05$），说明了 ΔNp63 蛋白对 TCCB 的生长具有一定的促进作用，这与 Bum-Joon Park[6]等的结果类似。对于正常对照组亦有部分阳性表达，考虑原因如下：实验所用方法为免疫组化，该方法本身存在一定的假阳性，故对照组的阳性表达部分可能为实验方法假阳性造成。对于 ΔNp63 促进 TCCB 发生的机制可能有：①ΔNp63 不具有转录启动活性，但可以抑制 TA p63 和 p53 依赖的靶基因的转录，不诱导凋亡，充当致癌基因的角色，ΔNp63 参与肿瘤的发生发展，与 p53 的表达呈负相关，抑制 p53 调节的转录活性，促进肿瘤的发生和发展[7]。②高表达的 ΔNP63 通过直接竞争、蛋白与蛋白间交互作用，异构体形成从而阻碍野生型 p53 的功能，从而可促进肿瘤的发生[4,5]。③ΔNp63 亚型在肿瘤中持续表达，从而导致不成熟细胞亚型增多并促进肿瘤生长，推测 ΔNp63 可能通过抑制肿瘤细胞成熟而促进肿瘤发展[8]。

对 ΔN p63 蛋白在不同临床分期和病理分级表达研究可以看出，不同临床分期和病理分级各组间 ΔNp63 蛋白表达的阳性率及组内 ΔNp63 蛋白表达强度均无显著性差异，ΔNp63 蛋白的表达不随临床分期和病理分级增高而增加，说明 ΔNp63 的表达强弱和肿瘤的分级、分期没有相关性，推测 ΔNp63 对 TCCB 的促进作用是在肿瘤的发生阶段[9]，而在肿瘤的恶性进展中的作用尚不明确，需进一步研究证实。也有少数学者认为 ΔN p63 在 TCCB 中高表达，但随临床分期和病理分级增高而减少，在侵袭性肿瘤 ΔN p63 蛋白的表达减弱，并随肿瘤恶性程度的增加而减少，认为 ΔN p63 的表达下降对 TCCB 有促进作用[10]。因此，对 ΔN p63 蛋白在 TCCB 进展中的作用还需进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] Christopher E.Barbierri, Carmen A.Perez, Kimberly N.Johnson, et al. IGFBP－3 is a direct target of transcriptional regulation by ΔNp63α in squamous epithelium [J]. Cancer Res, 2005;65(6):2314–2320.

[2] Dohn M, zhang S, Chen x. p63 alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and poptosis and differentially regulate p53 target genes [J]. Oncogene, 2001;20(25): 3193–3205.

[3] Robert P. Dellavalle, Patrick Walsh, Angela Marchbank, et al. CUSP/p63 expression in basal cell carcinoma[J]. Experimental Dermatology, 2002;11(3):203.

[4] Zeimet–A–G, Marth–C. Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer [J]. Lancet–Oncol, 2003; 4(7): 415–422.

（下转第 317 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

病毒。其联合常规化疗治疗 30 例难治性头颈部肿瘤病人，19 例病人肿瘤缩小一半以上，其中 8 例完全缓解[4]。然而，单独使用 ONYX－015，对肿瘤的疗效仍较差[5]，且不能在该病毒的基因序列中插入外源治疗基因。

如在肿瘤治疗方面以这种缺乏 E1B 55kD 蛋白的肿瘤增殖型腺病毒为载体，则可具有以下优点：1.使外源性目的基因选择性地在肿瘤细胞内高效复制，可使治疗剂量大大减少；2.病毒在肿瘤细胞内复制，最终溶解肿瘤细胞；3.由于病毒只选择性地在肿瘤细胞中复制，减少了对正常细胞的细胞毒反应和对宿主的免疫反应。因此，可使外源基因特异性转染进入肿瘤细胞，可结合病毒治疗和基因治疗两者的优势，增强抗肿瘤效果。

在本研究中，我们通过基因重组将编码 E1B-55kD 蛋白的基因区中的 2279～3326bp 区域缺失，并通过二步法 PCR 将 pXC1 基因序列中第 2024 位碱基 C 点突变为 T，第 2252 位碱基 C 点突变为 T 及第 2261 位碱基 G 点突变为 T，从而在该区域插入了终止密码子 TGA、TAG 和 TAA，使 E1B-55kD 蛋白不能有效翻译，并使插入的外源性基因的表达不受其上游序列的影响[6]。在终止密码子下游，保留了一个 Bgl II 酶切位点，以便插入外源性基因。这样，我们构建了肿瘤特异增殖型腺病毒穿梭质粒载体 pAd-delE1b55kD，通过与骨架质粒共转染 293 细胞包装成毒，能携带外源性治疗基因特异性感染肿瘤细胞（大多数肿瘤细胞的 P53 基因突变或缺失），并使外源性基因在肿瘤细胞中高效表达，为肿瘤的基因治疗提供了一种对肿瘤细胞有特异靶向性的高效载体。

（通讯作者 傅仲学 Tel:(023)89012302
E-MAIL:fzx990521@sina.com）

参 考 文 献

[1] Bischof JR, Kirn DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. Science, 1996;274:373-376.

[2] Heise CC, Williams AM, Xue S, et al. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy[J].Cancer Res,1999;59(11):2623-2628.

[3] Goodrum FD, Ornelles DA. The early region IB 55-kilodalton oncoprotein of adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle[J]. J Virol, 1997;71:548-561.

[4] Fhuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. Nature Medicine, 2000;6:879-885.

[5] Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, et al. Selective Replication and Oncolysis in p53 Mutant Tumors with ONYX-015, an E1B-55kD Gene-deleted Adenovirus, in Patients with Advanced Head and Neck Cancer: A Phase II Trial[J]. Cancer Res,2000;60: 6359-6366.

[6] Zilai Z, Weiguo Z, Chunxia L, et al. An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy[J]. Cell research, 2003;13(6):481-489.

（上接第 313 页）

[5] Zeimet-A-G, Dellavalle, Patrick Walsh, et al. CUSP/p63 expression in basal cell carcinoma[J]. Experimental Dermatology, 2002;11(3):203.

[6] Bum-Joon Park, Seung-Jae Lee, Jin Il Kim, et al. Frequent Alteration of p63 Expression in Human Primary Bladder Carcinomas [J]. Cancer Research, 2000;60:3370-3374.

[7] Karin Nylander, OhiliP J, Coates, et a1. Chracterization of the expression Pattern if P63 α and ΔNP63 α in being and malignant oral epithelial lesions [J]. Int, J Cancer, 2000;87:368-372.

[8] Yamaguchi K, Wu L, Caballero OL, et al. Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2000;86:684-689.

[9] Marshall J. Urist, Charles J. Di Como, Ming-Lan Lu, et al. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer [J]. Am-J-Pathol, 2002;161(4):1199-1206.

[10] F Koga, S Kawakami, J Kumagai, et al. Impaired ΔN p63 expression associates with reduced β-catenin and aggressive phenotypes of urothelial neoplasms[J]. British Journal of Cancer, 2003;88:740-747.