DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.023

文章编号:1000-5404(2000)04-0357-03

论著

MDM2蛋白和P53蛋白在骨肉瘤组织中的表达及意义

肖华亮,陈 俐,王 东 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨骨肉瘤MDM2和P53蛋白定位,表达水平,二者的相互关系及其对骨肉瘤转移及预后的影响。方法 应用免疫组织化学链菌素亲生物素蛋白过氧化酶连接法(S-P法),检测80例有随访资料的骨肉瘤MDM2和P53蛋白的表达,比较其与各病理指标之间的关系。结果 ①骨肉瘤组织MDM2蛋白总体阳性率为50%(40/80),P53蛋白总体阳性率为40%(32/80);MDM2蛋白和P53蛋白的异常表达呈显著负相关(P<0.01)。②骨肉瘤MDM2和P53蛋白表达与年龄、性别、肿瘤大小、Price分级及Dahlin分型均无关,而与骨肉瘤WHO新分型有关($P<0.05$),MDM2蛋白表达与肿瘤的复发或转移密切相关($P<0.05$)。③生存资料分析显示:MDM2或P53蛋白阳性表达组生存率明显低于阴性组($P<0.01$);MDM2和P53蛋白同时阳性表达者生存率最低,而二者共同阴性者生存率最高,两组相差极为显著(P<0.005)。结论 ①MDM2蛋白检测可能应用于预测骨肉瘤有无复发或转移;②用免疫组化方法联合检测MDM2和P53蛋白表达可能成为评价骨肉瘤预后的一项有价值指标。

关键词:骨肉瘤;MDM2;P53;免疫组织化学
中图法分类号: R394;R738.1 文献标识码:A

Expression of MDM2 and P53 protein in osteosarcoma and its significance

XIAO Hua-liang, CHEN Li, WANG Dong (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of MDM2 and P53 protein in osteosarcoma and its relation to the clinical-pathological parameters and prognosis of the tumor. **Method** The expression of MDM2 and P53 protein was detected immunohistochemically in specimens from 80 cases of osteosarcoma with follow-up data. **Results** ①The positive rates P53 and MDM2 were 40% and 50% respectively. There was inverse relationship between the expression of P53 protein and that of MDM2 ($P<0.01$). ②P53 protein and MDM2 were not significantly correlated to the sex, age, tumor size, grading or Dahlin's classification of the tumor. The expression of MDM2 was significantly correlated with tumor's recurrence and metastasis. ③Analysis of survival data showed that patients with positive reaction for both antibodies had the lowest survival rate and the poorest prognosis. **Conclusion** The detection of MDM2 can be used to predict the tumor's recurrence and metastasis and combined detection of MDM2 and P53 is valuable in evaluating the prognosis of osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma; MDM2; P53; immunohistochemistry

MDM2基因是1987年从自然转化的BALB/c小鼠成纤维细胞株中发现的一种癌基因,其表达产物为分子量90×10^3的核蛋白。该蛋白既可能与野生型(wt)p53结合,也可与突变型(mt)p53结合,因此起到一种对p53的负性调控作用[1]。近年的研究表明,人类多种肿瘤有p53基因突变及/或MDM2基因的扩增和过度表达,且二者相互影响,相互制约,形成一反馈调节环。本研究应用免疫组织化学染色方法,检测80例骨肉瘤MDM2及P53蛋白的表达,旨在探讨骨肉瘤MDM2的P53蛋白表达的相互关系及其对骨肉瘤预后的影响。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1968~1993年长骨中央型骨肉瘤80例,其中手术切除标本75例,活检5例。男52例,女28例,男女比为1.8∶1,年龄

作者简介:肖华亮(1973—),男,广东省大浦县人,医师,主要从事肿瘤病理方面的研究。电话:(023)68757374
收稿日期:1999-07-10;修回日期:1999-11-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

11~68岁,平均23岁,最高峰段10~19岁54例,占62.5%。肿瘤直径5~25 cm,平均10 cm。组织学分级采用Price三级法,组织学分型采用1993年WHO新分型及Dahlin分型。肿瘤侵犯软组织者74例(92.5%),全部病例均有随访,随访时间5~25年,总体2年存活率33.8%,5年存活率18.3%。随访期内肿瘤复发或转移者15例。

1.2 免疫组化染色

标本经10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋,5 μm厚连续切片,行链菌素亲生物素蛋白过氧化酶连接法(S-P法)免疫组化染色,按微波炉抗原修复的方法进行。所用p53单克隆抗体Do-7及MDM2单克隆抗体SMP-14均系Santa Cruz公司产品。以PBS液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定及统计学处理

P53蛋白及MDM2蛋白染色以胞核有明显棕褐色细颗粒为阳性细胞,光镜下观察10个高倍视野,阳性细胞≥10%即为阳性病例。P53蛋白及MDM2蛋白表达的关系,以及二者与各临床病理指标之间的关系,应用χ^2检验。绘制Kaplan-Meier生存曲线,并行Log-rank检验,以进行生存率比较。

2 结果

2.1 P53蛋白阳性表达

P53蛋白定位于肿瘤细胞核,呈棕褐色细胞颗粒状,见图1,总阳性表达率40%(32/80)。P53蛋白过度表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、Price分级、Dahlin分型无关,而与骨肉瘤WHO新分型有关($P<0.05$)。15例复发或转移性骨肉瘤P53阳性表达率为46.7%(7/15),65例原发肿瘤P53阳性率为38.4%(25/65),二者之间差异不显著。

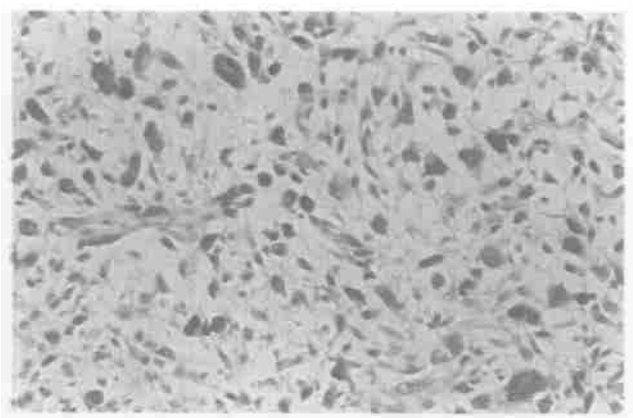


图1 骨肉瘤**P53**蛋白单克隆抗体**Do-7**免疫组化染色,阳性产物定位于肿瘤细胞胞核 (S-P×200)

Fig 1 Immunohistochemical staining for monoclonal antibody Do-7 of P53 protein, the positive product was localized in the nuclei of tumor cells (S-P×200)

2.2 MDM2蛋白阳性表达

MDM2蛋白阳性表达定位于肿瘤细胞核,呈棕褐色细颗粒状,少数肿瘤细胞胞浆及胞膜可呈弱阳性,见图2,MDM2阳性细胞可呈弥漫性,灶性或散在分布,在间质细胞及边缘反应性新生骨为阴性。80例骨肉瘤中40例MDM2蛋白阳性(50%),MDM2蛋白阳性表达与年龄、性别、肿瘤大小、Price分级及Dahlin分型无关,与骨肉瘤WHO新分型有关。15例复发或转移骨肉瘤MDM2阳性表达率为80%(12/15),而原发性骨肉瘤MDM2蛋白阳性率仅为43%(28/65),二者之间差异有显著性($\chi^2=6.65$, $P<0.05$)。

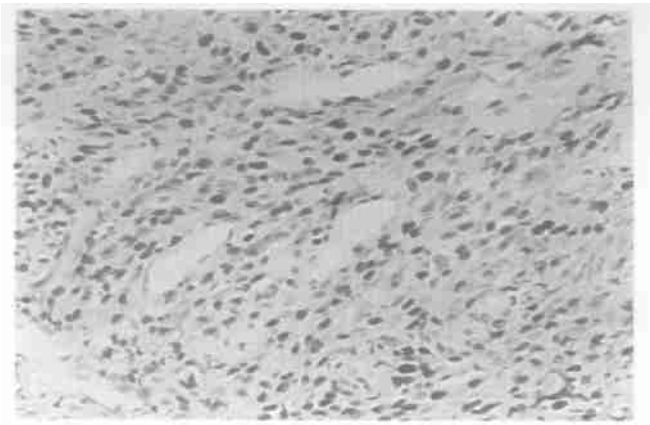


图2 骨肉瘤**MDM2**蛋白单克隆抗体**SMP-14**免疫组化染色,阳性产物主要定位于肿瘤细胞胞核 (S-P×200)

Fig 2 Immunohistochemical staining for monoclonal antibody SMP-14 of P53 protein, the positive product was mainly localized in the nuclei of tumor cells (S-P×200)

2.3 P53蛋白与MDM2蛋白表达相关性分析

32例P53蛋白表达阳性的病例,MDM2蛋白表达阴性者22例;40例MDM2蛋白表达阳性的骨肉瘤中,P53表达阴性者30例,两者均阳性表达10例。MDM2蛋白与P53蛋白的异常表达呈显著负相关($\chi^2=7.50$, $P<0.01$)。

2.4 肿瘤P53蛋白及MDM2蛋白水平与预后的关系

分别统计P53及MDM2蛋白阳性组与阴性组的存活期,经Log-rank检验,均有显著差异($P<0.01$);分析MDM2基因蛋白和P53蛋白不同表达组合与预后之间的关系,发现MDM2(+)/P53(+)组生存率最低;MDM2(−)/P53(−)组生存率最高,两组之间比较相差显著($P<0.01$)。

3 讨论

肿瘤是一种由癌基因激活和抑制基因失活而产生的基因病。骨肉瘤的发生及演进,也同其它许多恶性肿瘤一样,是以癌基因激活和/或抑癌基因失活的多基

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因异常累加的结果,业已证实,多种抑癌基因,如 DCC、p16、p15、p53、Rb 基因,以及多种癌基因,如 MDM2、C-erb B2、SAS(Serum amyloid A-activating sequence)、C-myc、fos 基因等均参与了骨肉瘤的发生和演进。

p53 基因定位于 17p13,是多种肿瘤的重要相关基因,骨肉瘤中 p53 基因改变主要包括缺失,重排和点突变。最近 Lonardo 等[2]总结前人文献,发现骨肉瘤中 p53 改变为 18%~42%。本研究 P53 蛋白总体阳性率为 35%,亦在此范围内。至于骨肉瘤 P53 蛋白表达与骨肉瘤转移及预后的关系,目前尚存在争论,Wadayama 等[3]认为 P53 蛋白表达与组织学类型及肿瘤转移无关。Nishikawa 等[4]用免疫组化方法检测 35 例骨肉瘤,证实 P53 蛋白过度表达,主要是染色类型与肿瘤侵袭性生长和转移有关。本研究表明 P53 蛋白表达与骨肉瘤的 Price 分级、Dahlin 分型及有无复发和转移无关,与骨肉瘤 WHO 新分型有关。P53 蛋白阳性表达组存活率明显低于阴性组,提示 P53 蛋白免疫组化检测可作为判断骨肉瘤预后的一项指标。

1992 年 Oliner 等[5]用小鼠 MDM2 cDNA 为探针,克隆出人的 MDM2 基因,位于染色体 12q13~14,编码一种分子量为 90×10^3 的核蛋白。在人类许多肿瘤中,如软组织肉瘤、骨肉瘤、恶性胶质细胞瘤及一些乳腺肿瘤中,都有 MDM2 基因的扩增和 MDM2 蛋白产物的过量表达。Ladanyi 等[6]研究 28 例骨肉瘤,16 例原发性骨肉瘤未发现 MDM2 基因扩增,而 12 例转移或复发性骨肉瘤中有 4 例 MDM2 扩增。本组结果显示:15 例复发或转移性骨肉瘤中 MDM2 蛋白阳性率(66.7%)明显高于原发性骨肉瘤(30.7%),二者之间有显著性差异。提示 MDM2 基因扩增或过表达可以作为骨肉瘤侵袭和转移的一项指标。

近年来,有关 p53 基因在骨肉瘤中的研究热点主要集中在 p53 和 MDM2 的联合作用上。MDM2 基因产物与 p53 结合,使其功能失活,解除细胞 G_1 期的阻滞,使细胞重新进入细胞周期,当 MDM2 过量时,可使所有的 p53 活性均丧失,导致细胞产生恶性转化。Chen 等[7]发现 MDM2 有引起细胞凋亡的功能。Barak 等[8]研究表明,野生型 p53 也可诱导 MDM2 mRNA 的水平升高。大量研究表明,p53 基因和 MDM2 基因相互影响,相互制约,相互调控,构成一反馈调节环。本研究结果显示,32 例 P53 蛋白表达阳性的病例,MDM2 蛋白表达阴性者 22 例,40 例 MDM2 蛋白表达阳性的骨肉瘤中,P53 表达阴性者 30 例,呈显著负相关($P<0.01$)。

生存资料统计学分析结果显示,MDM2 基因蛋白阳性表达组生存率明显高于 MDM2 基因蛋白阴性组,提示 MDM2 基因蛋白免疫组化检测可能成为评估骨肉瘤预后的一项指标。对 MDM2 蛋白及 P53 蛋白不同表达组合生存率分析显示 MDM2 基因蛋白与 p53 基因蛋白同时阳性者生存率最低,而两者同时阴性者生存率最高。提示 MDM2 和 P53 蛋白免疫组化联合检测可能成为评价骨肉瘤预后的一项有价值的指标。其可能机制是 MDM2 基因在调控细胞周期中有非依赖于 p53 的途径,已有研究发现除抑制 p53 的功能外,MDM2 还抑制肿瘤抑制基因 Rb,阻止 Rb 诱导细胞进入 G_1 期阻滞的能力[9],此外,MDM2 还可与 E2F1 的激活区域结合,刺激 E2F1/DP1 复合物转录活性[10],使细胞从 G_1 期进入 S 期。

参考文献:

[1] 郭洪涛,刘彤华 . MDM2 癌基因的发现及研究进展[J]. 国外医学:遗传学分册,1994,17(5):320—322.

[2] Lonardo F, Ueda T, Huvos A G, *et al*. p53 and MDM2 alteration in osteosarcoma: Correlation with clinicopathologic features and proliferative rate[J]. Cancer, 1997, 79(8): 1 541—1 547.

[3] Wadayama B, Toguchida J, Tamaguchi T, *et al*. P53 expression and its relationship to DNA alteration in bone and soft tissue sarcomas[J]. Br J Cancer, 1993, 68(5): 1 134—1 139.

[4] Nishikawa T, Yamaoto T, Mieuno K, *et al*. Expression of the P53 protein in human osteosarcoma[J]. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1994, 68(2): 400—403.

[5] Oliner J D, Kinzler K W, Meltzer P S, *et al*. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas [J]. Nature, 1992, 358(1): 80—83.

[6] Ladanyi M, Cha C, Lewis R, et al. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma[J]. Cancer Res, 1993, 53(1): 16—18.

[7] Chen J, Wu X, Lin J, *et al*. MDM2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(5): 2 445—2 448.

[8] Barak Y, Juve T, Haffner R, *et al*. MDM2 expression is induced by wild type p53 activity[J]. EMBO J, 1993, 12(2): 461—468.

[9] Xiao Z X, Chen J, Levine A J, *et al*. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2[J]. Nature, 1995, 375(3): 694—698.

[10] Cordon Cardo C, Latere E, Drobnjak M, *et al*. Molecular abnormalities of MDM2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas[J]. Cancer Res, 1994, 54(3): 794—799.

(编辑　刘　鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net