DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.005

骨肉瘤 p53蛋白过度表达与微血管密度的关系*

王 东** 陈 俐 高奉浔 王爱民*** (第三军医大学附属大坪医院病理科) 重庆,400042

提 要 目的:研究骨肉瘤 p53蛋白过度表达与肿瘤内微血管密度(MVD)的关系,以及它们对骨肉瘤预后的影响。方法:应用免疫组化和形态计量的方法检测80例骨肉瘤 p53蛋白表达以及 MVD计数。结果:p53蛋白过度表达与 MVD密切相关,而且两者均为影响骨肉瘤预后的重要因素,依相对危险度大小依次为 p53 > MVD。结论:结果证实 p53基因对 MVD有调节作用,p53蛋白过度表达是肿瘤重要的血管生成表型之一。p53蛋白和 MVD是判估骨肉瘤预后有价值的生物学指标。

关键词 骨肿瘤;p53;血管生成

中图法分类号 R738.1

实体肿瘤的生长和转移都是血管依赖性的,血管生成作为肿瘤生态系统中的一个重要因素,与肿瘤细胞相互作用,影响着肿瘤的生物学行为[1]。诸多细胞因子,包括刺激因子,如血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)[2]和抑制因子,如血小板反应素-1(TSP-1)等,控制和调节着这一过程。而这两类细胞因子之间的平衡是由肿瘤细胞和间质组份的基因结构决定的。肿瘤抑制基因 p53的突变在人类众多肿瘤中均有报道[3]。最近有研究表明 p53基因在调节肿瘤血管生成中发挥重要作用[4,5],而且在头颈部肿瘤[6]和大肠癌[7]中 p53蛋白的过度表达与肿瘤血管生成有关。

本研究应用免疫组化方法检测80例骨肉瘤 p53蛋白的表达,并定量检测肿瘤微血管密度(Microvessel density, MVD),旨在探讨 p53蛋白过度表达与 MVD的关系,以及它们对骨肉瘤预后的影响。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选用1968~1993年间长骨髓内型骨肉瘤80例,其中手术切除标本75例,活检标本5例。截肢加化疗35例(43.8%),单纯性截肢24例(30%),瘤段切除灭活再植或断端融合17例(21.2%),活检未治4例(5%)。全部病例均有随访。总体2年存活率为33.8%,5年存活率为18.3%。

本组80例骨肉瘤中,男性52例,女性28例,男女之比为1.8:1。年龄11~68岁,平均23岁,最高峰10~19岁54例,占62.5%。肿瘤侵犯软组织者74例(92.5%)。肿瘤直径5~25 cm,平均10 cm。组织学分级参照 Price级组法,组织学分型参照 Dahin氏标准。

1.2 免疫组化染色

全部标本均经10%福尔马林液固定,石蜡包埋切片。p53蛋白检测应用单克隆抗体 Pab 1801(英国 ICRF Crowford博士馈赠)及 p53多克隆抗体 CM-1(英国 Dundee大学 Lane博士馈赠),按微波炉抗原修复的方法进行[8]。所用单克隆抗体Ⅷ因子相关抗原及 CD31为 Dako公司产品。LSAB试剂盒为 Dako公司产品,染色方法参照试剂盒说明进行。切片加一抗 FⅧ-RA和 CD31之前胰酶消化20 min,PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 肿瘤内 MVD计数[9]

应用 CMIAS真彩色图像分析系统测定。首先选取具有代表性的组织切片,排除肿瘤出血区及边缘反应区。低倍镜(40×)观察确定每例切片中3个血管密度最高区域(热点区域),然后在高倍镜(200×)下,计数每个区域的 MVD,其平均值即作为该例肿瘤的 MVD值。

1.4 结果判定和统计学处理

p53蛋白染色以细胞核有明确棕褐色颗粒为阳性细胞,整个切片观察10个高倍视野,阳性细胞>10%即为阳性病例。p53蛋白与微血管密度的关系应用 χ^2检验。采用寿命表法计算生存率,多因素 COX模型分析各因素与预后的关系。$P < 0.05$为相差显著。

* 全军"九五"青年基金资助项目

** 王 东,男,33岁,副主任医师,副教授,博士

*** 骨科

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

2 结果

2.1 骨肉瘤组织 p53蛋白的表达

80例骨肉瘤标本经微波炉抗原修复免疫组化染色,30例 p53蛋白阳性,阳性率为 37.5%。阳性反应物呈棕褐色细颗粒状,主要定位于肿瘤细胞核,见图 1,2 Pab 1801和 CM-1两种抗体染色结果基本一致,只是后者的染色有时略强些。骨肉瘤边缘反应性新生骨及间质细胞未见着色。p53蛋白表达与肿瘤体积、Price分级和 Dahlin氏分型无关。

2.2 肿瘤 MVD计数

FⅧ-RA和 CD31阳性产物定位于血管内皮细胞浆,见图 3,4 80例骨肉瘤中 50例两种抗原皆为阳性,另外 30全中 FⅧ-RA阳性 16例,CD31阳性 14例。因此,本组肿瘤微血管密度是综合 FⅧ-RA和/或 CD31免疫组化染色结果计数的。80例骨肉瘤中 MVD值范围为 7.3~93,中位数为 31.1,平均值为 35.4 MVD与肿瘤体积、Price分级和 Dahlin氏分型无关。

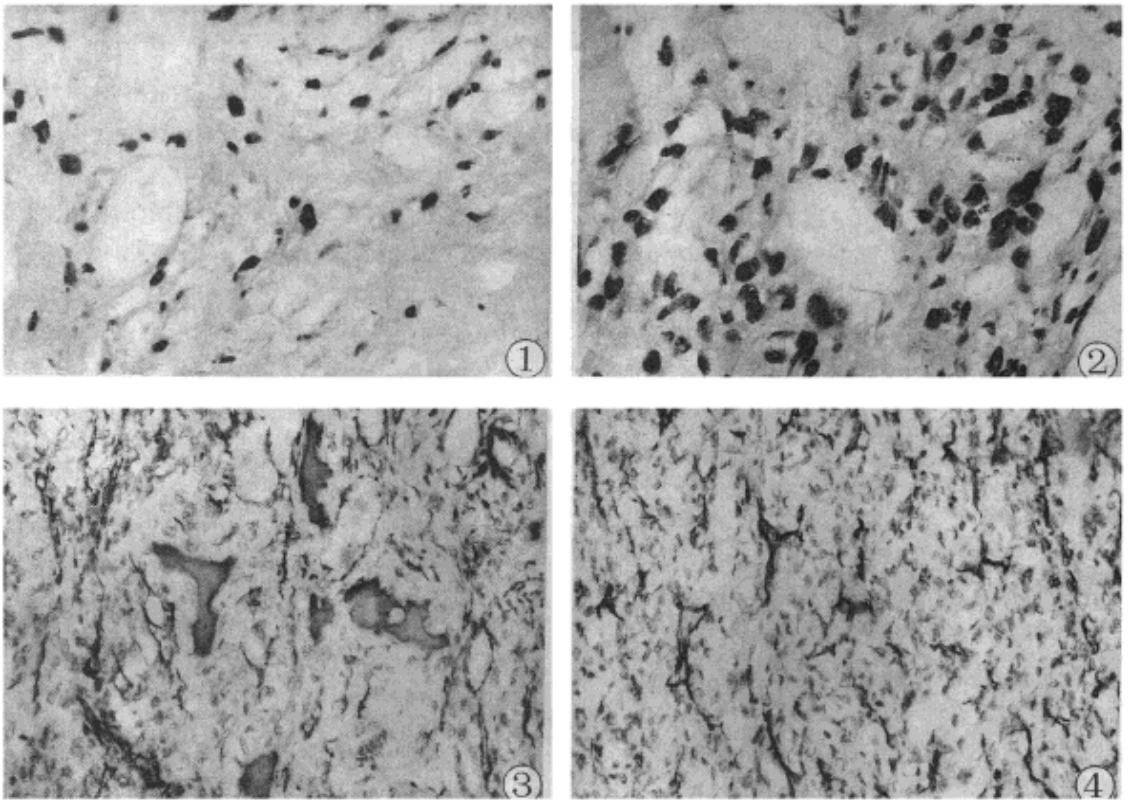


图 1　骨肉瘤 p53蛋白单克隆抗体 Pab 1801免疫组染色,阳性产物定位于肿瘤细胞核　(LSAB× 200)

Fig 1　Immunohistochemical staining for p53 protein with monoclonal antibody Pab1801, the positive product was localized in the nuclei of tumor cells　(LSAB× 200)

图 2　骨肉瘤 p53蛋白多克隆抗体 CM-1免疫组化染色,阳性产物定位于肿瘤细胞核　(LSAB× 200)

Fig 2　Immunohistochemical staining for p53 protein with polyclonal antibody CM-1, the positive product was localized in the nuclei of tumor cells　(LSAB× 200)

图 3　骨肉瘤 FⅧ-RA免疫组化染色,示肿瘤内微血管密度　(LSAB× 200)

Fig 3　Immunohistochemical staining for endothelial cell with FⅧ-RA in osteosarcoma, showing the microvessel density in osteosarcoma　(LSAB× 200)

图 4　骨肉瘤 CD31免疫组化染色,示肿瘤内微血管密度　(LSAB× 200)

Fig 4　Immunohistochemical staining for endothelial cell with CD31 in osteosarcoma, showing the microvessel density in osteosarcoma　(LSAB× 200)

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

2.3 骨肉瘤 p53蛋白表达与 MVD的关系,见表 1

表 1 80例骨肉瘤 p53蛋白表达与 MVD和 VEGF表达的关系

Tab 1 Correlation of p53 protein overexpression with MVD in 80 cases of osteosarcomas

MVD	n	p53(+)	p53(-)	P
< 31	40	8	32	< 0.05
> 31	40	22	18	

如表 1所示,骨肉瘤 MVD高的病例中多见 p53蛋白阳性,表明 p53蛋白表达与 MVD与 VEGF表达显著相关。

2.4 骨肉瘤 p53蛋白表达、MVD与预后的关系

将病人性别、年龄肿瘤体积、Price分级、Dahlin氏分型、p53蛋白表达、MVD等指标进行 COX模型多因素分析。如表 2所示,p53蛋白和 MVD均为骨肉瘤预后的重要因素,根据相对危险度(RR)的大小,两者对预后的反映程度依次为 p53> MVD

表 2 COX模型多因素分析

Tab 2 Risk factors affecting overall survival rate determined by COX proprotional hazards model

Variable	Group	β	$S_{\bar{x}}$	WALDχ^2	P	RR
MVD	< 31,≥ ++	0.02	0.01	16.98	0.0001	1.02
p53	< 10%, > 10%	0.94	0.28	11.39	0.0007	2.55

RR: risk ratio

3 讨论

肿瘤抑制基因 p53蛋白半衰期很短,用免疫组化方法不能检测到,而当 p53基因发生突变时,突变型 p53蛋白半衰期延长,集聚在细胞核内,即可用免疫组化方法进行检测。Costa等[10]在结肠腺癌的研究中比较 p53蛋白免疫组化染色和 p53基因突变,发生两者的符合率为 95%。我们对人体肝细胞癌的比较结果,两者符合率为 88.9% [11]。因此,用免疫组化方法检测 p53蛋白在一定程度上可以间接反映 p53基因突变。多克隆抗体 CM-1和单克隆抗体 Pab 1801均可识别野生型和突变型 p53蛋白。阳性反应产物定位于细胞核,细胞浆未见着色。我们过去的研究表明 p53蛋白表达与骨肉瘤细胞增殖活性和病人预后有关[12]。

1994年 Dameron等[4]通过对 Li-Fraumeri综合征病人的成纤维母细胞的研究发现,野生型 p53蛋白表达水平极低,当转染含有显性突变型 p53的表达质粒后,可以使细胞表达 VEGF mRNA水平提高 50%,而野生型 p53对 VEGF表达没有影响,实验中还证实 p53基因对 VEGF表达的调节是特异的[5]。上述体外实验结果表明了 p53基因对血管生成具有直接的调节作用。Gasparini等[6]对头颈部鳞癌的研究证实几乎所有 p53蛋白阳性的肿瘤微血管计数都高于分界值水平,同时血管密度较高的肿瘤中 71% p53染色阳性。最近 Vermeulen[7]等亦证实结肠癌中 p53蛋白的表达和肿瘤 MVD密切相关。本组结果中 p53蛋白阳性与肿瘤 MVD显著相关,与上述报道基本一致,进一步证实 p53基因对肿瘤血管生成具有调节作用。p53基因可通过调节细胞增殖活性及血管生成因子的表达,直接和间接地影响肿瘤的血管生成。值得注意的是,当比较 p53蛋白阳性和阴性组 MVD的平均值时(而不用分界值 MVD= 31),前者 $\bar{x}$ = 40.31(s = 21.86),后者 $\bar{x}$ = 36.74(s = 19.94),两者没有显著性差异,提示肿瘤血管生成除 p53基因外亦可能有其它肿瘤基因的调节。本组 80例骨肉瘤均有随访结果,应用 COX模型分析表明 p53和 MVD均为影响骨肉瘤预后的重要因素,依相对危险度大小,两者对预后的反映程度依次为 p53> MVD

本文通过 80例骨肉瘤 p53蛋白和 MVD的检测进一步证实了体外实验研究的结果,表明 p53基因对 MVD具有明显的调节作用,亦为重要的肿瘤血管生成表型。此外,两者对骨肉瘤预后均有显著影响,可能成为判估骨肉瘤预后有价值的生物学指标。

参考文献

1 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4

2 Bicknell R, Harris A L. Novel growth regulatory factors and tumor angiogenesis. Eur J Cancer, 1991, 27(6): 781

3 Editors. p53 sweeps through cancer research. Science, 1993, 262(24): 1958

4 Dameron K M, Volpert O V, Tainsky M A *et al*. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science, 1994, 265(20): 1582

5 Kieser A, Weich H A, Brandner G *et al*. Mutant p53 potentates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. Oncogene, 1994, 9(3): 963

6 Gasparini G, Weidner N, Maluta S *et al*. Intratumoral microvessel density and p53 protein: Correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. Int J Cancer, 1993, 55(5): 739

7 Vermeulen P B, Roland L, Mentens V *et al*. Correlation of intratumoral microvessel density and p53 protein overexpression in human colorectal carcinoma. Microvasc Res, 1996, 51(2): 164

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

8 王 东,史景泉.石蜡切片 ARF免疫组化检测 p53蛋白的初步报告.第三军医大学学报,1994,16(1):52
9 Hollings Worth H C, Kohn E C, Steinberg S M *et al*. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol, 1995, 147(1): 33
10 Costa A, Mranca K, Vmentinis B *et al*. p53 gene point mutations in relation p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancer. J Pathol, 1995, 176(1): 45
11 Wang D, Shi J Q. Overexpression and mutations of tumor suppressor gene p53 in hepatocellular carcinoma. Chin Natl J New Gastroenterol, 1996, 2(3): 161
12 王 东,陈 俐,高奉浔.骨肉瘤 p53过度表达与预后的关系.临床与实验病理学杂志,1997,13(1A):45

(收稿:1997-05-23;修回:1997-10-07)
(编辑 王 红)

Relationship between overexpression of p53 protein and intratumoral microvessel density in osteosarcoma

Wang Dong, Chen Li, Gao Fengxun, Wang Aimin (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract **Objective**: To study the relationship between overexpression of p53 protein and intratumoral microvessel density (MVD) and their prognostic significance in osteosarcoma. **Methods**: The expression of p53 protein and MVD count in 80 cases of osteosarcoma were determined with immunohistochemistry and morphometry. **Results**: The overexpression of p53 protein was significantly associated with MVD count and the two parameters were important in evaluation of the prognosis of osteosarcoma. p53 positivity was the most important index to predict the overall survival rate in patients with osteosarcoma. **Conclusion**: It is indicated that p53 protein involves in angiogenesis and its overexpression is an important angiogenic phenotype in neoplasm. Meanwhile, p53 protein and MVD may be useful prognostic indicators for patients with osteosarcoma.

Key words bone tumor; p53; angiogenesis

反义核酸抑制 TGFβ1表达及对肝纤维化调节的研究* 博士生论文摘要

Study of inhibition of TGF-β1 expression and regulation of hepatic fibrogenesis by antisense RNA

梁志清** 何振平 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心)重庆,400038

肝纤维化是由肝细胞的损伤以及相继持续发生的炎症反应所启动,结果不仅导致细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的堆积,还使 ECM 成分发生永久的分子和组织结构的重新分布,结果出现严重临床并发症。因此,肝纤维化的治疗一直是困绕人们的难题,到目前为止,仍无一种有效的治疗方法。

已经证明,纤维化肝脏的 ECM 主要由 Ito细胞合成。人和动物的肝纤维化肝脏产生的大量转化生长因子-β1(Transforming growth factor, TGFβ1)是刺激 Ito细胞激活、产生过量 ECM 的主要因子。

为了探讨能否通过抑制 Ito细胞和实验性肝纤维化 TGF-β1的产生来抑制 ECM 堆积,我们采用脂质体和逆转录病毒相结合的方法将反义 TGFβ1基因导入 Ito细胞株 LI90及 CCl4诱导的大鼠纤维化肝脏内,以研究反义 TGFβ1在抑制 ECM 产生及抗肝纤维化中的作用。

(1)反义 TGFβ1逆转录病毒载体的构建及其包装和滴度测定:将人的转化生长因子 β1 cDNA(1467bp)反向插入逆转录病毒载体 pLXSN,筛选转化菌,挑取抗性克隆,用限制性内切酶酶切鉴定重组子。用脂质体介导反义 TGFβ1重组逆转录病毒载体和空载体转染包装细胞 PA317,筛选 G418抗性细胞克隆,并用 NIH3T3细胞测定病毒滴度,空载体感染细胞和重组病毒感染细胞分泌的病毒颗粒效价分别为 4.23×10⁵CFU/ml 和 3.75×10⁶CFU/ml

(下转 512页)

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39570686
** 梁志清,男,30岁,主治医师,博士研究生

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