

突变型 P53 和肿瘤易感基因 101 在肺癌组织中的表达及意义

郭 康^a, 范文艳^b

(新乡医学院 a. 第三附属医院肿瘤科; b. 形态学实验室, 河南 新乡 453003)

摘 要:探讨了 P53 基因突变对肺癌组织中 TSG101 基因的影响, 结果是: TSG101 在正常组织中呈强阳性表达 100%(30/30), 在高分化肺癌(包括肺鳞癌和肺腺癌)组织、低分化肺癌组织、淋巴结转移组织的表达分别为 77.97%(92/118)、25.37%(17/67)、18.95%(18/95); P53 的表达则相反, 在正常组织、高分化肺癌组织、低分化肺癌组织、淋巴结转移组织的表达分别为 6.67%(2/30)、67.80%(80/118)、86.57%(58/67)、94.63%(90/95); P53 基因 PCR-SSCP 分析谱检测 P53 第 5~8 外显子阴性 56 例占 30.27%, 阳性 129 例占 69.73%, 总突变率为 69.73%(127/180); P53 与 TSG101 呈现负相关. 这些结果提示 P53 和 TSG101 可能共同参与了肺癌的发生、发展和转移.

关键词: TSG101; P53; 免疫组织化学; PCR-SSCP; 肺癌

中图分类号: R574.62

文献标志码: A

肺癌是世界恶性肿瘤死亡的主要原因之一. 它的发生发展是一个复杂的、多步骤渐进演变的生物学过程, 并由多种因素参与. 其根本原因在于细胞核内 DNA 的损伤而激活或过表达癌基因、抑癌基因的丢失或其产物的失活, 导致了细胞周期的失控, 使细胞无限制生长而最终形成肺癌. 肺癌的演变是一系列分子变异的过程, 其中 P53 基因突变是肺癌发生的关键因素之一^[1]. 但 P53 基因和 TSG101 在肺癌发生发展中的相互作用如何, 尚不清楚. 本文采用免疫组织化学和分子生物学技术检测了抑癌基因 P53 和 TSG101 基因在非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer NSCLS)发生发展中的表达关系, 试图为肺癌的临床诊断和可能的基因治疗提供科学的理论依据和新的思路.

1 材料和方法

1.1 标本收集

收集 2005 年至 2014 年新乡第一、第三附属医院、郑州大学第一附院石蜡包埋标本及冰冻新鲜组织标本共 185 例, 其中包括 102 例肺鳞癌组织标本, 80 例肺腺癌组织标本, 30 例肺慢性炎症组织标本. 所有标本均为住院患者手术切除并经病理确诊的病例.

1.2 主要试剂和仪器设备

鼠抗人 TSG101 单克隆抗体(c-2, sc-7964)购自美国 Santa Cruz 公司; 鼠抗人 P53 单克隆抗体(DO-7)购自福州迈新生物技术开发有限公司; SABC 二抗试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司. 德国 Leica 公司生产的 RMZB5 型切片机; 日本 NIKON-200 显微照相系统.

1.3 方法

1.3.1 用 HE 染色法进行肺癌的类型及分期的对照诊断.

1.3.2 免疫组化方法

石蜡切片脱蜡至水, 微波高温修复 20 min, 3% H₂O₂ 10 min 以阻断内源性过氧化物酶, 血清封闭 20 min,

收稿日期: 2014-10-20

基金项目: 河南省科技厅资助项目(122102210065); 新乡市科技支持计划(09S084).

作者简介(通信作者): 郭 康(1982-), 男, 河南商丘人, 新乡医学院硕士研究生, 主要从事消化道肿瘤研, E-mail: gzck@xxmu.edu.cn.

分别滴加 1:100 的兔抗人 TSG101 和鼠抗人 P53 抗体,4℃冰箱过夜后取出恢复室温,磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)冲洗后分别滴加相应的生物素化酶和辣根过氧化物酶标记的多聚体.二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色 5 min,自来水终止反应,苏木素复染、脱水、透明后封片.对照组用 PBS 代替一抗工作液.

免疫组化结果判定:P53 表达产物定位于细胞核,细胞核出现棕黄色颗粒为阳性结果;TSG101 表达产物定位于胞质和(或)胞核,阳性细胞表现在胞质和(或)胞核出现棕黄色颗粒.每张切片在显微镜 400 倍下,选定 10 个视野,每视野计数 100 个细胞,按着色强度将无、弱、中、强分别记为 0~3 分;按阳性细胞数<5%为阴性(0分),6%~25%为弱阳性(1分),26%~50%为中等强度阳性(2分),>51%为强阳性(3分),两者相加后分 4 级:0~2 分为(-),2~3 分为(+),3~4 分为(++),≥5 分为(+++).

1.3.3 DNA 制备

采用酚-氯仿提取法.切取 10 μm 厚石蜡包埋组织 5~10 片,分别放入 1.5 mL 离心管中,脱蜡及脱水后加入 400 μL Lysis buffer,8 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K,37℃彻底消化,12 000 r/min 离心 10 min.吸上清于另一离心管中,加等体积酚或氯仿(1:1)混匀,12 000 r/min 离心 10 min.吸上清于另一离心管中后再加入氯仿或异戊醇(24:1)混匀,12 000 r/min 离心 10 min.吸上清于另一离心管中,加入 1/5 体积 3 mol 醋酸钠(pH 5.2)和 2 倍体积的无水乙醇,混匀后-20℃过夜.12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 300 μL 70%乙醇,12 000 r/min 离心 5 min 弃上清,室温干燥 15 min 后,加入 100 μL TE 溶解 DNA,用紫外分光光度仪测 OD 值,以了解所提 DNA 的纯度和浓度.

1.3.4 PCR-SSCP 检测 PCR 扩增 P53 基因 5~8 外显子应用 4 对引物(由北京医科大学病理系分子生物室合成),其序列如下:

Exon 5:5'TACTCCCCTGCCCTCAACAAGA3'

5'CGCTATCTGAGCAGCGCTCAT3'

Exon 6:5'GATTGCTCTTAGGTCTGGCCCCT3'

5'CAGACCTCAGGCGGCTCATAGG3'

Exon 7:5'CTGGGTTGGCTCTGACTGTACCA3'

5'TGACCTGGAGTCTTCCAGTGTG3'

Exon 8:5'GTAGTGGTAATCTACTGGGACGGA3'

5'CTCGCTTAGTGCTCCCTGGGGGC3'

PCR 扩增反应条件:95℃ 2 min,95℃,40 s,55℃,40 s,72℃,30 s,30 个循环,72℃延伸 5 min.

1.3.5 PCR-SSCP 分析

取 5 μL PCR 扩增产物,加入 5 μL SSCP 上样液,100℃水浴 10 min,立即上样于垂直电泳槽中的 SSCP 胶孔中,50 V 恒压、15℃恒温,电泳液为 0.5TBE 约 800 mL,电泳的肿瘤标本与正常的相比较出现条带增多、减少或位置变动,即说明该样品存在基因突变.

1.4 统计学分析

数据处理应用 SPSS17.0 统计软件,χ² 检验分析各组计数资料,P53 与 TSG101 表达关系采用 Spearman 等级相关分析. $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组化表达结果

2.1.1 P53 蛋白的表达情况

185 例肺癌组织中 P53 蛋白++以上表达率 45.41% (84/185),P53 蛋白在非癌变肺组织、淋巴结转移组、低分化组、高分化组、肺癌组中的++以上表达率分别为 3.33% (图 1)、84.21%、80.60%、25.42%、45.41% (图 2).肺癌组和非癌变肺组织比较,P53 蛋白阳性表达差异有显著性 ($P<0.05$);淋巴结转移组与非癌变肺组织比较,P53 蛋白阳性表达差异有显著性 ($P<0.05$),见表 1.

表1 不同性质肺癌组织中 P53 的表达比较

	-(n)	+(n)	++(n)	+++ (n)	合计/n	阳性率/%
肺癌组	36	65	48	36	185	80.54 [#]
高分化	26	62	24	6	118	77.97
低分化	10	3	24	30	67	85.07
淋巴结转移	5	10	55	25	95	94.74 [*]
对照组	28	1	1	0	30	6.67

注:VS对照组[#] * $P < 0.05$.

2.1.2 TSG101 蛋白的表达情况

免疫组织化学表达结果显示, TSG101 在非癌变中强表达率为 100% (30/30) (图 1B), TSG101 蛋白十以上表达率 18.38% (34/185), 在高分化肺鳞癌和高分化肺腺癌中十以上表达率 25.42% (30/118) (图 1D), 在低分化肺鳞癌和肺腺癌中十以上表达率仅为 5.97% (4/67), 在淋巴结转移中表达率为 18.95% (18/95)、十以上表达率仅为 5.26% (5/95). 由此可见, TSG101 在非癌变组织中表达明显, 而在癌变组织中呈低水平表达, 而且分化程度越低其表达越低, 临床分期越晚其表达水平越低. 与对照组相比, TSG101 的表达与肺癌组织的分化程度和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$) 见表 2.

表2 TSG101 在肺癌组和对照组中的表达情况

	+(n)	+(n)	++(n)	+++ (n)	合计/n	阳性率/%
肺癌组	76	75	28	6	185	58.92 [*]
高分化	26	62	24	6	118	77.97
低分化	50	13	4	0	67	25.37
淋巴结转移	77	13	5	0	95	18.95 [*]
对照组	0	0	12	18	30	100

注:VS对照组^{**} $P < 0.05$.

2.2 mtp53 PCR-SSCP 结果

P53 基因 PCR-SSCP 分析谱显示肺癌组织中呈强阳性表达. 突变率的出现情况为: 185 例肺癌 (104 例鳞状细胞癌, 81 例腺癌) 中, 检测 P53 第 5~8 外显子, 阴性 56 例 (30.27%), 阳性 129 例, 5~8 外显子, 突变率分别为 37.21% (48/129); 23.26% (30/129); 24.81% (32/129); 14.73% (19/129), 总突变率为 69.73% (129/185), 见图 2.

2.3 相关性分析

依据突变型 P53 蛋白的表达情况将肺癌组分为 p53 阳性组 (P53+ 组) 和 P53 阴性组 (P53- 组), 比较两组中 TSG101 的关系 (表 3). 可以看出, P53 和 TSG101 表达同为阳性者为 58 例, P53 表达阳性而 TSG101 表达阴性者 72 例; P53 和 TSG101 表达同为阴性者为 4 例, P53 表达阴性而 TSG101 表达阳性者 51 例. Person's r 相关系数分析 $P < 0.05$.

表3 P53 与 TSG101 的相关性表达

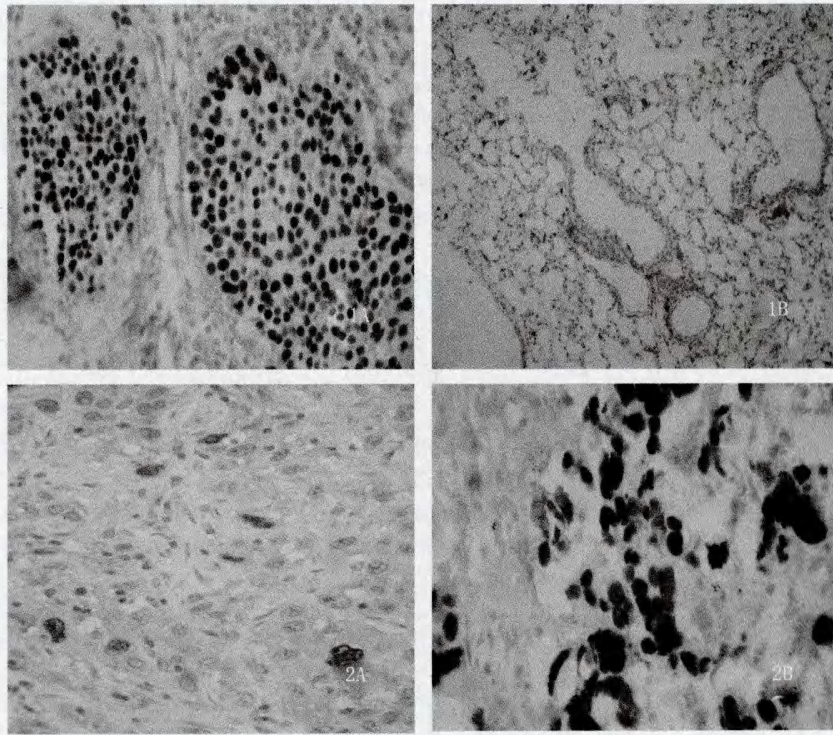
P53	TSG101		合计
	+	-	
+	58	72	130
-	51	4	55
合计	109	76	185

Person's $r = 0.616, x^2 = 41.362, P = 0.000$.

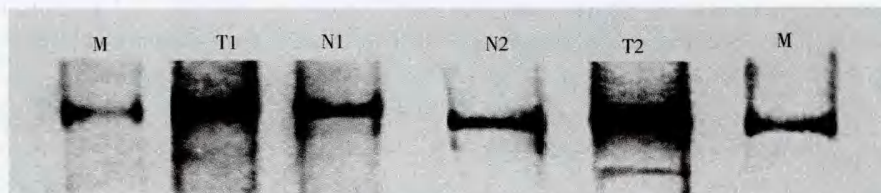
3 讨论

P53 基因是目前肿瘤界研究最多的抑癌基因之一, 分为野生型和突变型两种. 因野生型 P53 蛋白极不稳定, 半衰期仅数分钟. 我们检测到的均是蛋白生物半衰期延长, 稳定性增加并可在组织细胞中堆积的突变型 P53, 所以 P53 过表达通常提示有 P53 基因突变^[2-3]. 突变型 P53 不但失去抑癌作用, 同时还具有促进正常细胞恶性转化的作用, 促进肿瘤的发生^[4-5], 有研究显示, P53 基因在 50% 以上的肺癌中存在突变而失去抑

癌作用^[6].本研究免疫组化结果显示,P53蛋白在非癌变肺组织、肺癌组、高分化组、低分化组、淋巴结转移组中的阳性表达率分别为6.67%、80.54%、77.97%、85.07%、94.74%,而++以上表达率分别为3.23%、84.21%、80.60%、25.42%、45.40%.肺癌组与淋巴结转移组比较,差异有显著性($P<0.05$);肺癌组与非癌变肺组织比较,P53蛋白阳性表达差异有显著性($P<0.05$).有淋巴结转移的肺癌组与非肺癌组织比较差异有显著性($P<0.05$).推测:P53的高表达与肺癌的生物学行为相关,恶性度越高其表达水平越高,反之也反,这充分说明P53参与了肺癌的发生发展过程.PCR-SSCP检测结果显示,肺癌中P53在5~8外显子中的突变率为:69.73%的高突变,更进一步提示P53参与肺癌的发生过程,是肺癌发生过程中的一个重要基因.



1A P53在正常肺组织中的表达(×400);1B P53在肺癌组织中的表达(×400)
2A TSG101在正常肺组织中的表达(×200);2B TSG101在肺癌组织中的表达(×200)
图1 P53和TSG101在肺癌组织中的表达



T1, T2: 肺癌组织; N1, N2: 正常对照。M: marker
图2 肺癌P53 PCR-SSCP检测结果

在恶性肿瘤的发生中,TSG101基因的作用目前仍无最后定论.TSG101与乳腺癌、脑癌和结肠癌密切相关,乳头状甲状腺癌、卵巢癌中过表达,尽管在结肠癌中持续上调,但TSG101基因不发生突变^[7].本研究中免疫组化结果显示TSG101在肺癌组织中的表达水平明显低于其在非癌组织中的表达水平,且随着病变发展呈现逐渐减少的趋势,这提示TSG101在肺癌的发生中其重要的抑制作用,本文结果与Bennett等的报道相似^[8],说明在肺癌发生、发展过程中TSG101具有负调节作用,但其具体的作用机制尚待研究,大多研究

认为^[9], TSG101可能作为一个蛋白降解的调控因子去影响其他肿瘤抑制因子和细胞周期调控因子的半衰期而发挥显性负性调节作用. 研究表明 TSG101参与泛化素调节、胞内体的运输、细胞迁移、转录调节、抗凋亡、细胞间信号传导、细胞增殖等活动, 在任何一种活动中 TSG101与 P53都有可能存在着某种通路调控的影响, 如 TSG101可减少 P53的信号^[10]. 通过活化 P53能引起存活素下调, 而维持 Mdm2/存活素水平, 对肺癌细胞寿命发挥显著作用^[11]. 说明 TSG101和 P53相互作用可能对肺癌的发生和演进具有一定的内在联系, 从而导致了肺癌的发生和发展.

参 考 文 献

- [1] Minna D. Tumor suppressor genes and oncogene sin lung cancer; potential clinical applieations[J]. Advaneesin Oncololgy, 1996, 12(1): 3-7.
- [2] Brattstrom D, Bergqvist M, Wester K, et al. Endothelial markers and circulating angiogenic factors and p53 may be potential markers for recurrence in surgically resected non-small cell lung cancer patients[J]. Med Sci Monit, 2004, 10(9): 331-338.
- [3] Watanabe M, Yanagi Y, Masuhiro Y, et al. A putative tumor suppressor, TSG101, acts as a transcriptional suppressor through ist coiled-coil domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998; 254(3): 900-905.
- [4] Ruland J, Sirard C, Elia A, et al. p53 accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking tsg101[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(4): 1859-64.
- [5] 王建功, 王晓红, 杨俊泉, 等. 重组人 P53 腺病毒联合化疗治疗局部晚期非小细胞肺癌[J]. 贵阳医学院学报, 2014, 39(2): 225-228
- [6] Li L, Liao J, Ruland J, et al. A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(4): 1619-24.
- [7] Ma XR1, Edmund Sim UH, Pauline B, et al. Overexpression of WNT2 and TSG101 genes in colorectal carcinoma[J]. Trop Biomed, 2008, 25(1): 46-57.
- [8] Bennett NA, Pattillo RA, Lin RS, et al. TSG101 expression in gynecological tumors: relationship to cyclin D1, cyclin E, p53 and p16 proteins[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2001, 47(7): 1187-93.
- [9] 陆平, 张道荣, 高艳华, 等. TSG101与 P21及 P300/CBP在肺鳞癌和肺腺癌中的表达及意义[J]. 中国肺癌杂志, 2007, 10(3): 196-202.
- [10] Gray TA, Alsamman K, Murray E, et al. Engineering a synthetic cell panel to identify signalling components reprogrammed by the cell growth regulator anterior gradient-2[J]. Mol Biosyst, 2014, 10(6): 1409-1425.
- [11] Seo S K, Hwang C S, Choe T B, et al. Selective inhibition of histone deacetylase 2 induces p53-dependent survivin downregulation through MDM2 proteasomal degradation[J]. Oncotarget, 2014, 31(2): 20-25.

Expressions of Mutant P53 and Tumor Susceptibility Gene 101 in Lung Cancer

GUO Kang^a, FAN Wenyan^b

(a. Tumor Department of Third Affiliated Hospital; b. Morphologival Laboratory, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: To investigate the effect of P53 gene mutation affecting on TSG101 gene in lung cancer tissues. Results: TSG101 expression was strongly positive in normal tissue, expression rate of 100% (30/30); In high differentiated lung cancer (including lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung tissue), low differentiated lung cancer tissue, lymph node expression of metastasis tissues were 77.97% (92/118), 25.37% (17/67), 18.95% (18/95). On the contrary, the expression of P53 is different. Expression in normal tissue, differentiated lung cancer tissue, low differentiated lung cancer tissue, metastatic lymph node tissues were 6.67% (2/30), 67.80% (80/118), 86.57% (58/67), 94.63% (90/95). P53 gene PCR-SSCP analysis spectya revealed that P53 exons 5-8 were negative in 56 cases (30.27%) and positive in 129 cases (69.73%). The total mutation rate was 69.73% (127/180). P53 is negatively correlated with TSG101. These results suggest that P53 and TSG101 could be participated in the occurrence, development and metastasis of lung cancer

Keywords: TSG101; P53; immunohistochemistry; PCR-SSCP; lung cancer