

# 细胞周期调节因子在原发和复发鼻咽癌的表达

李锦添, 黄平, 肖永波, 周昕熙, 陈诗萍

(中山医科大学肿瘤防治中心肿瘤病理研究室, 广东 广州 510060)

**摘要:** 【目的】探讨细胞周期调节因子在鼻咽癌复发中的作用。【方法】采用 LsAB 法同时检测 69 例患者原发和复发鼻咽癌组织中 p53、MDM<sub>2</sub>、p21<sup>ras</sup>和 p21<sup>WAF1</sup>蛋白的表达。【结果】复发癌与原发癌相比: 阳性表达率方面, p53 蛋白(78%和 80%)或 MDM<sub>2</sub> 蛋白(84%和 83%)很相近, p21<sup>ras</sup>蛋白(73%和 93%)或 p21<sup>WAF1</sup>蛋白(52%和 84%)明显下降; 高表达率方面, p53 蛋白(42%和 51%)很相近, MDM<sub>2</sub> 蛋白(57%和 32%)明显升高, p21<sup>ras</sup>蛋白(16%和 65%)或 p21<sup>WAF1</sup>蛋白(17%和 46%)明显下降。其中, MDM<sub>2</sub> 蛋白表达水平在复发癌明显升高主要见于复发间期 < 34 个月患者组 ( $P < 0.05$ ), p21<sup>ras</sup>蛋白和 p21<sup>WAF1</sup>蛋白表达水平在复发癌明显下降见于复发间期 < 34 个月和 ≥ 34 个月患者组(均 < 0.02 以下)。【结论】原发鼻咽癌临床治愈后, p53 蛋白和 MDM<sub>2</sub> 蛋白过度表达以及 p21<sup>WAF1</sup>蛋白低表达或不表达可能仍然对鼻咽癌的复发起重要作用; MDM<sub>2</sub> 蛋白表达水平显著升高和 p21<sup>WAF1</sup>蛋白表达水平显著下降可能进一步加促鼻咽癌的复发过程。

**关键词:** 鼻咽肿瘤; 蛋白质 p53; MDM<sub>2</sub> 蛋白; 癌基因蛋白质 p21(RAS); p21<sup>WAF1</sup> 蛋白

中图分类号: R361.2; R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0184-03

## The Expression of Cell Cycle Regulators in Primary and Relapsing Nasopharyngeal Carcinoma

LI Jin-tian, HUANG Ping, XIAO Yong-bo, ZHOU Xin-xi, CHEN Shi-ping

(Research Department of Cancer Pathology, Cancer Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】To explore the role of cell cycle regulators in nasopharyngeal carcinoma (NPC) relapse. 【Method】To assay p53, MDM<sub>2</sub>, p21<sup>ras</sup> and p21<sup>WAF1</sup> proteins by LsAB immunohistochemical technique in 69 cases of primary and relapsing NPC tissues. 【Results】As compared with primary NPC, the expression rate of p53 or MDM<sub>2</sub> protein in relapsing NPC was similar (78% to 80%, 84% to 83%), and the expression rate of p21<sup>ras</sup> or p21<sup>WAF1</sup> protein in relapsing NPC was obviously descended (73% to 93%, 52% to 84%); the high-expression rate of p53 protein in relapsing NPC was similar (42% to 51%), the high-expression rate of MDM<sub>2</sub> protein in relapsing NPC was obviously risen (57% to 32%), and the high-expression rate of p21<sup>ras</sup> or p21<sup>WAF1</sup> protein in relapsing NPC was obviously descended (16% to 65%, 17% to 46%). Among of them, the significant rise of MDM<sub>2</sub> protein expression level in relapsing NPC mainly occurred in the patients of group 2 which relapsing-interval was shorter than 34 months,  $P < 0.05$ ; the significant descent of p21<sup>ras</sup> or p21<sup>WAF1</sup> protein expression level in relapsing NPC occurred in the patients of group 2 and group 1 which relapsing-interval was equal to or longer than 34 months,  $P < 0.02$ , respectively. 【Conclusions】The overexpression of p53 and MDM<sub>2</sub> proteins and the low or negative expression of p21<sup>WAF1</sup> protein after clinical cure might still play an important role in NPC relapse, the obvious rise of MDM<sub>2</sub> protein level and the obvious descent of p21<sup>WAF1</sup> protein level might further accelerate the process of NPC relapse.

收稿日期: 2000-11-26

基金项目: 卫生部科学研究基金资助项目(96-2-076)

作者简介: 李锦添(1946-), 女, 广东南海人, 硕士, 教授。

**Key words:** nasopharyngeal neoplasms; protein p53; MDM<sub>2</sub> protein; oncogene protein p21(ras); p21<sup>WAF1</sup> protein

肿瘤的发生与发展是多基因、多步骤异常改变的结果,与细胞周期失控密切相关。先前的研究已显示在鼻咽中~重度异型增生上皮和原发鼻咽癌中p53、p21<sup>ras</sup>、MDM<sub>2</sub>等蛋白阳性表达率均在50%以上,而正常上皮或单纯性增生上皮均为阴性<sup>[1,2]</sup>。上述研究初步提示p53、p21<sup>ras</sup>和MDM<sub>2</sub>蛋白可能在鼻咽癌的发生中起重要作用。我们则通过对同一患者原发和复发鼻咽癌组织中p53等蛋白表达状况的对比研究,探讨这些细胞周期调节因子在鼻咽癌复发过程中的可能作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

连续收集1995~1998年在本中心病理诊断为复发性鼻咽癌,且原发癌同时在本中心进行病理诊断和根治性放射治疗的患者69例。患者男性50例,女性19例;初发病平均年龄46.7岁(24~69岁);初发病临床分期根据长沙会议标准划分,I~II期28例,III~IVa期39例,删失2例;患者平均复发间期为34.1个月(6~101个月)。

### 1.2 细胞周期调节因子的检测

采用LSAB免疫组织化学法,同时检测每一患者原发与复发癌组织p53、p21<sup>ras</sup>、MDM<sub>2</sub>和p21<sup>WAF1</sup>蛋白表达。这些蛋白抗体分别为DAKO公司的p53(DO-7)(M7001)和p21<sup>ras</sup>(NCC-RAS-001)(M0637),Oncogene Research公司的MDM<sub>2</sub>(Ab-1)(OP46)和WAF1(Ab-1)(OP64),稀释度分别为1:160、1:200、1:200和1:120。实验时设阳性和阴性对照。

### 1.3 细胞周期调节因子表达的判断

p53、MDM<sub>2</sub>和p21<sup>WAF1</sup>蛋白表达位于肿瘤细胞核,p21<sup>ras</sup>蛋白表达位于细胞浆。各蛋白阳性表达时呈不同程度的棕色,参照Carauqui's的双记分法<sup>[3]</sup>,把染色强度记分为3分(深棕色)、2分(棕色)、1分(淡棕色)和阴性;把阳性肿瘤细胞数记分为3分(60%以上)、2分(60%~20%)、1分(20%~5%)和阴性(5%以下)。两记分相乘积为各蛋白表达状况:高表达为≥4分,低表达为3~1分,阴性<1分。

### 1.4 统计学分析

采用 $\chi^2$ 检验和配对资料的秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 原发和复发鼻咽癌组织形态的变化

根据WHO(1991年)对鼻咽癌组织学分类,69例原发癌除2例为角化性鳞状细胞癌外,其余均为非角化性癌。当肿瘤复发时,67例非角化性癌中的46例形态保持不变;而5例转变为角化性鳞状细胞癌,其余16例转变为与原来形态有差异的非角化性癌。

### 2.2 细胞周期调节因子在原发和复发鼻咽癌的表达

p53、MDM<sub>2</sub>、p21<sup>ras</sup>和p21<sup>WAF1</sup>蛋白阳性表达率在复发癌或原发癌均超过50%。p53蛋白阳性表达率和高表达率在复发癌与原发癌较相近(分别 $P>0.05$ );MDM<sub>2</sub>蛋白阳性表达率在复发癌与原发癌较相近( $P>0.05$ ),但高表达率在复发癌明显高于原发癌( $P<0.005$ );p21<sup>ras</sup>或p21<sup>WAF1</sup>蛋白无论阳性表达率或高表达率在复发癌均明显低于原发癌(分别 $P<0.005$ 或 $P<0.001$ )(图1)。

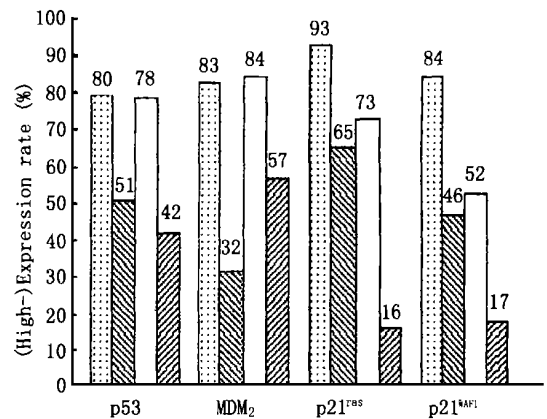


图1 P53、MDM<sub>2</sub>、P21<sup>ras</sup>、和 P21<sup>WAF1</sup> 蛋白在原发和复发鼻咽癌的表达

Fig1 The expression of p53, MDM<sub>2</sub>, p21<sup>ras</sup> and p21<sup>WAF1</sup> proteins in primary and relapsing nasopharyngeal carcinoma

□ Expression rate of primary NPC, ▨ High-Expression rate of primary NPC, □ Expression rate of relapsing NPC, ▨ High-Expression rate of relapsing NPC

### 2.3 细胞周期调节因子在不同复发间期的原发和复发鼻咽癌的表达

根据肿瘤复发间期的长短,进一步把患者分为 $\geq 34$ 个月和 $< 34$ 个月组两组, p53 蛋白表达水平

在两组患者的原发癌和复发癌之间无显著差异; MDM<sub>2</sub> 蛋白表达水平仅在 $< 34$ 个月组患者复发癌的表达明显高于原发癌; p21<sup>ras</sup>和 p21<sup>WAF1</sup>蛋白表达水平则在两组患者的复发癌明显低于原发癌(表 1)。

表 1 p53、MDM<sub>2</sub>、p21<sup>ras</sup>和 p21<sup>WAF1</sup>蛋白在不同复发间期组原发和复发癌的表达

Table 1 The expression of p53, MDM<sub>2</sub>, p21<sup>ras</sup> and p21<sup>WAF1</sup> proteins in primary and relapsing nasopharyngeal carcinoma with different relapse-interval

			High-expression	Low-expression	Negative	<i>u</i> value	<i>P</i> value
p53	Group 1	Primary NPC	10(37)	11(41)	6(22)	0.97	$> 0.05$
		Relapsing NPC	10(37)	9(33)	8(30)		
	Group 2	Primary NPC	25(60)	9(21)	8(19)	1.76	$> 0.05$
		Relapsing NPC	19(45)	15(36)	8(19)		
MDM <sub>2</sub>	Group 1	Primary NPC	5(19)	18(67)	4(15)	1.13	$> 0.05$
		Relapsing NPC	13(48)	7(26)	7(26)		
	Group 2	Primary NPC	17(41)	16(38)	9(21)	2.18	$< 0.05$
		Relapsing NPC	26(62)	12(29)	4(10)		
p21 <sup>ras</sup>	Group 1	Primary NPC	19(70)	6(22)	2(7)	3.80	$< 0.001$
		Relapsing NPC	1(4)	18(67)	8(30)		
	Group 2	Primary NPC	26(62)	13(31)	3(7)	4.00	$< 0.001$
		Relapsing NPC	10(24)	21(50)	11(26)		
p21 <sup>WAF1</sup>	Group 1	Primary NPC	17(63)	7(26)	3(11)	3.46	$< 0.002$
		Relapsing NPC	5(19)	14(52)	8(30)		
	Group 2	Primary NPC	15(36)	19(45)	8(19)	2.51	$< 0.02$
		Relapsing NPC	7(17)	10(24)	25(60)		

Group 1(27 cases) relapsing-interval  $\geq 34$  months, Group 2(42 cases) relapsing-interval  $< 34$  months

### 3 讨论

p53 蛋白是细胞周期调控的核心成员,其中与 MDM<sub>2</sub> 蛋白形成自动调节的反馈环。一方面, p53 蛋白能激活 MDM<sub>2</sub> 基因转录与表达<sup>[4]</sup>;另一方面 MDM<sub>2</sub> 蛋白能结合 p53 蛋白,从而封闭 p53 负调节细胞周期作用和加促其降解<sup>[5]</sup>。p53 蛋白积聚在免疫组化法检测时呈阳性反应,这意味着 p53 蛋白失活有利于肿瘤发生与发展。本实验显示复发癌中 p53 蛋白阳性表达率(78%)及高表达率(42%)与原发癌相近(80%和 51%),说明 p53 蛋白过度表达对鼻咽癌复发仍然起重要作用。MDM<sub>2</sub> 蛋白作为 p53 蛋白的负调节因子而显示癌基因蛋白的功能,MDM<sub>2</sub> 蛋白过度表达同样地利于肿瘤发生与发展。本实验显示复发癌中 MDM<sub>2</sub> 蛋白阳性表达率(84%)与原发癌(83%)相近,高表达率(57%)则

明显高于原发癌(32%),说明 MDM<sub>2</sub> 蛋白过度表达,尤其是高表达对鼻咽癌复发可能起重要作用。此外,在较短复发间期组( $< 34$ 个月)复发癌的 MDM<sub>2</sub> 蛋白表达水平明显高于原发癌,从另一角度说明 MDM<sub>2</sub> 蛋白促鼻咽癌复发作用,MDM<sub>2</sub> 蛋白表达水平越高复发间期越短。

p21<sup>ras</sup> 蛋白作为细胞内生长信息转导通道的分子开关,调控着细胞增生与分化<sup>[6]</sup>。当 p21<sup>ras</sup> 蛋白过度表达时能促进鼻咽上皮异型增生,它协同异常表达的 p53 蛋白对鼻咽癌发生可能起重要作用<sup>[7]</sup>。本实验显示原发癌有高 p21<sup>ras</sup> 蛋白阳性表达率和高表达率,亦支持这一看法。但在复发癌 p21<sup>ras</sup> 蛋白阳性表达率,尤其是高表达率有明显下降,似乎说明 p21<sup>ras</sup> 蛋白对鼻咽癌复发作用不如对发生作用重要。

p21<sup>WAF1</sup> 蛋白是负调节细胞周期因子,通过封

(下转第 237 页)

### 2.3 PA317/pDOR-myb 细胞产病毒滴度的测定

PA317/pDOR-myb 细胞经多次传代、冻存、复苏,在含 G418 的 DMEM 培养基中生长良好。应用 NIH3T3 进行病毒滴度测定,病毒滴度为  $5.2 \times 10^4$  CFU/mL  $\sim 9.5 \times 10^4$  CFU/mL。

## 3 讨论

本实验中采用的 TA 载体克隆方法简单易行,而先将目的基因插入测序载体,有助于更准确了解目的基因两端的序列。采用 DOTAP 阳离子脂质体,具有转染效率高,对细胞损害小等优点。实验结果表明,pDOR-myb 经 DOTAP 方法转染病毒包装细胞后可达到较高的病毒滴度,也说明 pDOR-myb 经 PA317 包装后已形成了具有感染能力的重组逆转录病毒。这有助于进一步研究 c-myb 在 HSC 激活的复杂网络中的作用,探索 HSC 激活的关键环节,最终为研究抗肝纤维化治疗的有效途径打下基础。

#### 参考文献:

[1] Macejak D G, Lin H, Webb S, *et al.* Adenovirus-mediated expression of a ribozyme to c-myb mRNA inhibits

smooth muscle cell proliferation and neointima formation *in vivo* [J]. *J Virology*, 1999, 73(9):7745.

- [2] Moon I J, Lee Y, Kwak C S, *et al.* Target site search and effective inhibition of leukaemic cell growth by a covalently closed multiple anti-sense oligonucleotide to c-myb [J]. *Biochem J*, 2000, 346 (pt 2): 295.
- [3] Friedman S L. The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328 (25): 1828.
- [4] Kitada T, Seki S, Nakatani K, *et al.* Hepatic expression of c-myb in chronic human liver disease [J]. *Hepatology*, 1997, 26(6): 1506.
- [5] Buck M, Kim D J, Houghlum K, *et al.* C-myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278(2): G321.
- [6] Lee K S, Buck M, Houghlum K, *et al.* Activation of hepatic stellate cells by TGF $\alpha$  and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(5): 2461.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 16~69.

(编辑 黄小延)

(上接第 186 页)

闭 CDK 激酶活性而中止细胞周期,最终达到抑制肿瘤的作用<sup>[7]</sup>。本实验显示复发癌阳性表达率及高表达率均明显低于原发癌,说明 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白不表达或低表达有利于鼻咽癌复发。进一步分析不同复发间期患者该蛋白在复发癌与原发癌之间的表达状况,两组复发癌 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白表达水平均明显低于原发癌,尤其是在较短期复发组 (< 34 个月),复发癌的 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白阴性表达率更高达 60%,从另一角度提示该蛋白有抑癌作用。因此,当 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白水平阴性或低下时鼻咽癌较易复发。

我们的研究结果显示 p53 等 4 个调节因子的阳性表达率无论是原发癌或复发癌均在 50% 以上,再次证明这些调节因子在鼻咽癌发生中的重要作用;同时还提示它们可能在鼻咽癌复发中发挥作用。

#### 参考文献:

[1] 李锦添,云径平,萧振德,等. p21<sup>ras</sup> 和 p53 蛋白在鼻咽癌发生过程的表达和意义 [J]. *癌症*, 1997, 16(增刊):

[2] 李锦添,龙江斌,梁启万,等. 鼻咽癌 p53 蛋白表达与 p53 基因结构改变及 MDM<sub>2</sub> 蛋白表达的关系和意义 [J]. *癌症*, 1999, 18(2): 176.

[3] Carcangiu M L, Chambers J T, Voynick I M, *et al.* Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part 1: Clinical and histological correlations [J]. *Am J Clin Pathol*, 1990, 94(3): 247.

[4] Zauberman A, Flusberg D, Haupt Y, *et al.* A functional responsive p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(14): 2584.

[5] Lane D P. Exploiting the p53 Pathway for cancer diagnosis and therapy [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(suppl 1): 1.

[6] Bos J L. p21<sup>ras</sup>: An oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction [J]. *Eur J Cancer*, 1995, 31A(7-8): 1051.

[7] 粟厚仪,梁立治. 细胞周期调控基因 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 与肿瘤 [J]. *国外医学肿瘤学分册*, 1998, 25(6): 323.

(编辑 黄小延)