

Western 印迹杂交分析 p53 蛋白在人鼻咽癌中的表达^①

郑美莲 区宝祥 龙江斌 邓满泉 陈丽珍 梁启万 李辉梅

(中山医科大学肿瘤防治中心; 广州, 510060)

摘要 目的: 探讨 p53 蛋白在人鼻咽癌中的表达及其临床意义。方法: 采用 Western 印迹法结合免疫沉淀技术, 检测鼻咽活检组织 p53 蛋白表达。结果: 104 例鼻咽癌活检组织中, 12 例(11.5%) p53 蛋白突变; 8 例鼻咽慢性炎症活检组织中, p53 蛋白表达未见异常。鼻咽癌病人中 IgA/VCA 抗体滴度 $\geq 1:160$ 者 p53 蛋白突变检出率 11.8% (11/93), IgA/VCA 抗体滴度 $\leq 1:80$ 者, p53 蛋白突变检出率 9.1% (1/11)。IgA/EA 抗体滴度阳性者, p53 蛋白突变检出率 14.1% (11/78), IgA/EA 抗体滴度阴性者, p53 蛋白突变检出率 3.8% (1/26)。p53 蛋白表达异常的鼻咽癌病人中, 有 2 例复发。结论: 鼻咽癌 p53 蛋白的异常表达多见于恶性程度较高, 分期较晚, IgA/VCA 滴度高和 IgA/EA 阳性的病例, 提示 p53 基因在鼻咽癌中可能发挥一定的作用。

关键词 鼻咽肿瘤; 基因, p53; 印迹法, 蛋白质

中图分类号 R 739.63

Western Blot Analysis of p53 Protein Expression in Human Nasopharyngeal Carcinoma

Zheng Meilian Ou Baoxiang Long Jianbin Deng Manquan Chen Lizhen Liang Qiwan Li Huimei

(Cancer Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Abstract Objective: To investigate the expression of p53 protein in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significant. **Methods:** Western blot hybridization and immunoprecipitation techniques were used to examine protein expression of p53 gene in human nasopharyngeal biopsy. **Results:** The 104 nasopharyngeal carcinoma biopsy 12 (11.5%) showed abnormal expression of p53 protein. Abnormal expression of p53 protein was not found in 8 biopsy of the nasopharyngeal chronic inflammation. The protein abnormal of p53 gene were 11.8% (11/93) and 9.1% (1/11) in nasopharyngeal carcinoma with EBV-IgA/VCA $\geq 1:160$ and EBV-IgA/VCA $\leq 1:80$, respectively. The p53 protein positive rates of mutation-type were 14.1% (11/78) and 3.8% (1/26), respectively in nasopharyngeal carcinoma with EBV IgA/EA positive and negative. 2 patients was found cancer recurrence in 12 patients of p53 protein abnormal expression. **Conclusion:** The study showed that the p53 protein abnormal expression in patients was frequent in higher malignant degree, later stage, higher IgA/VCA antibody titre and IgA/EA seropositive. It suggested that the p53 gene might play a certain role in nasopharyngeal carcinoma.

Subject headings nasopharyngeal neoplasms; genes, p53; blot, protein

野生型(wild type)p53 基因具有抑癌作用, 突变型(mutant type)p53 基因为致癌基因。p53 基因结构改变及表达异常是人类肿瘤中常见的现象之一^[1]。近年来, p53 蛋白在鼻咽癌中的研究大多采用免疫组织化学的方法。本实验采用 Western 印迹法结合免疫沉淀分子生物学技术检测 p53 蛋白在鼻咽癌中的表达, 旨在探讨 p53 蛋白表达与鼻咽癌

的关系及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本来源

鼻咽活检组织采自中山医科大学附属肿瘤医院怀疑为鼻咽癌的初诊患者鼻咽纤维镜的检测标

本。活检组织标本经病理检查确诊其中 104 例为鼻咽癌, 8 例为鼻咽粘膜慢性炎症。

1.2 组织蛋白的提取

活检组织取出后, 在冰浴下用玻璃研磨器磨碎标本, 然后加入细胞裂解液裂解细胞, 超声波处理, 离心, 取上清, 测定总蛋白含量。

1.3 免疫沉淀

用 Oncogene Science 公司小鼠抗人 p53 单克隆抗体 (CAT OP43) (DO-1), 根据抗体说明进行标本处理。p53 抗体 15 μ L 与细胞裂解物 1 mL 进行免疫沉淀。p53 抗体是一种与 Protein A agarose 结合的小鼠抗 p53 单克隆抗体, 可把裂解物中的 p53 抗原沉淀, 形成抗原抗体复合物。p53 靶蛋白沉淀后弃上清液, 沉淀物经洗涤后加入强阴离子去污剂 SDS 加样缓冲液, 使靶蛋白与抗体解离, 然后用 Western 印迹法检出特异的 p53 蛋白。

1.4 Western 印迹法

已溶解于加样缓冲液的沉淀物进行 SDS-PAGE (150 g/L) 电泳, 电转移至硝酸纤维素膜上, 用 1:30 稀释 p53 抗体 (小鼠抗人单克隆抗体) 进行 Western blot, 然后用 1:300 稀释的二抗 (碱性磷酸酶偶联的抗小鼠 IgG) 处理, 用 DAB 显色试剂盒检测、摄影。

2 结果

2.1 鼻咽癌组织 p53 蛋白的表达

104 例鼻咽癌活检组织中, 12 例出现 p53 蛋白表达异常条带 (见图 1), 突变检出率为 11.5%。8 例鼻咽慢性炎症活检组织中 p53 蛋白表达未见异常。

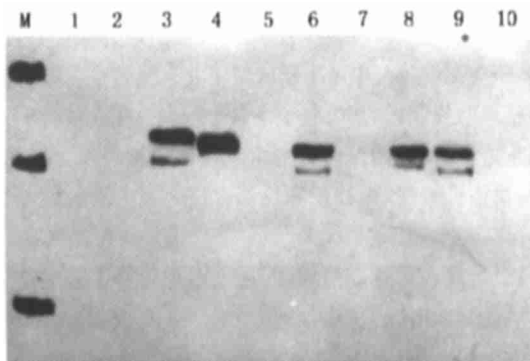


图 1 鼻咽癌组织 p53 蛋白 Western 印迹分析

Fig. 1 Western blot analysis of p53 proteins in NPC biopsies

M: maker; 1~9: NPC biopsies; 3 4 6 8 9: abnormal expression of p53 protein; 10: normal control

2.2 鼻咽癌 p53 蛋白的异常表达与病理类型和临床分期

104 例鼻咽癌标本中, 除 2 例鼻咽未分化癌, 1 例泡状核细胞癌, 其余均为鼻咽低分化鳞癌。12 例出现 p53 蛋白异常表达的标本, 病理诊断均为鼻咽低分化鳞癌。104 例鼻咽癌标本中包括了 I ~ IV 期的病人。出现 p53 蛋白异常表达的 12 例标本中 I 期为 1 例, II 期 3 例, III 期 5 例, IV 期 2 例, 另外有 1 例分期不明。

2.3 p53 蛋白异常表达与 EB 病毒感染

104 例鼻咽癌中, IgA/VCA 滴度 $\geq 1:160$ 有 93 例, 其中 p53 蛋白表达异常者有 11 例, 突变检出率为 11.8%; IgA/VCA 抗体滴度 $\leq 1:80$ 有 11 人, 其中 p53 表达异常者 1 例, 突变检出率为 9.1%。104 例鼻咽癌检测标本中, IgA/EA ≥ 10 有 78 例, 其中 p53 蛋白异常者有 11 例, 占 14.1%, IgA/EA 阴性者 26 例, 其中 p53 蛋白表达异常者 1 例, 占 3.8%。

2.4 鼻咽癌 p53 蛋白表达异常与预后

104 例鼻咽癌病人中, 发现有 2 例复发。这 2 例病人均为 p53 蛋白表达异常。其中 1 例为 II 期病人, 放疗结束后 14 个月复发。另外 1 例为 IV 期病人, 放疗结束后 10 个月复发。追踪观察 3~4 年这 104 例病人均未发现有肿瘤转移。

3 讨论

p53 基因作为一种细胞检查点 (check point) 调控子, 在控制细胞 DNA 复制过程中起重要作用。野生型 p53 蛋白可以发现细胞分化过程中 DNA 损伤, 通过启动修复系统, 进行 DNA 修复, 亦可通过诱导细胞凋亡来触发细胞死亡。突变型 p53 蛋白则功能失活。研究表明, 鼻咽癌的发生、发展与 EB 病毒感染相关。为了了解 p53 基因与 EB 病毒的关系, 我们研究了鼻咽癌病人 p53 基因表达产物与 EB 感染的关系。93 例 IgA/VCA 抗体滴度 $\geq 1:160$ 的病人中有 11 例存在突变型 p53 蛋白表达, 11 例 IgA/VCA 抗体滴度 $\leq 1:80$ 病人中只有 1 例存在突变型 p53 蛋白表达。78 例 IgA/EA 抗体滴度阳性的鼻咽癌病人中有 11 例 p53 蛋白突变, 而 26 例 IgA/EA 抗体滴度阴性的鼻咽癌病人中只有 1 例 p53 蛋白突变。因为 EB 病毒早期抗原 (EA) 是 EB 病毒周期的早期产物, EA 抗体能反映 EB 病毒在体内感染的活动程度。检出的 p53 蛋白突变者绝大

多数是 EA 抗体阳性的鼻咽癌病人。上述结果显示 p53 蛋白表达异常者大多数是 IgA/VCA 抗体滴度高, IgA/EA 抗体滴度阳性的病人。迄今已发现许多恶性肿瘤存在 p53 基因突变^{1,2}, 本实验检测 104 例鼻咽癌活检标本中, 有 12 例标本显现突变型 p53 蛋白条带, 全部是鼻咽癌病人, 而对临床怀疑鼻咽癌, 病理确诊为鼻咽粘膜慢性炎症病人未发现 p53 蛋白异常表达现象。本结果还显示, 鼻咽癌不仅在晚期(III、IV期), 而且在早期(I、II期)也有 p53 蛋白异常表达存在。从我们初步的实验结果看, 鼻咽癌 p53 蛋白的异常表达多见于恶性程度较高, 分期较晚, IgA/VCA 滴度高和 IgA/EA 阳性的病例, 但尚未发现 p53 蛋白异常表达与病程进展的关系。有文献报道⁴鼻咽癌中 p53 基因突变率小于 10%。本实验的 104 例鼻咽癌均为原发性, p53 蛋白突变检出率(12/104)为 11.5%, 结果相近。目前, 基因蛋白的检测方法有多种, 本实验采用 Western blot 结合免疫沉淀检测技术检出的蛋白条带均为突变型 p53 蛋白, 此法检测基因表达产物较为特异和客观。值得一提的是, 在这 104 例鼻咽癌活检组织中, 经过 3~4 年追踪观察发现有 2 例病人鼻

咽癌复发, 这 2 例均为 p53 蛋白表达异常者, 其中 1 例为 II 期病人, IgA/VCA 为 1:1280, 放疗治愈后 16 个月复发, 另 1 例为 IV 期病人, IgA/VCA 为 1:320, 放疗治愈后 10 个月复发。p53 基因突变与鼻咽癌预后可能有一定关系, 值得进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, *et al.* p53 mutation in human cancer. *Science*, 1991, 253(5019): 491
- 2 Gimenez-Conti I B, Collet A M, Lanfranchi H, *et al.* p53 Rb and cyclin D1 expression in human oral verrucous carcinomas. *Cancer*, 1996, 78(1): 17
- 3 Gao H, Wang L O, Zhou Q, *et al.* p53 tumor suppressor gene mutation in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high-risk population in Henan China. *Cancer Res*, 1994, 54(16): 4342
- 4 Sun Y, Hegamyer G H, Cheng Y J, *et al.* An infrequent point mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89(14): 6516

(1999-04-20 收稿 1999-06-23 修回)

· 简 讯 ·

国际儿童恶性实体瘤专业委员会专家 应邀来我校举办学习班

5月15~20日, 国际儿童恶性实体瘤专业委员会顾问委员 Dr. William W. Newton、中国工程院院士北京儿童医院教授张金哲等著名专家应邀来穗举办“儿童恶性实体瘤新进展学习班”。丰富而精彩的授课内容, 吸引了来自全国九省 130 多名小儿外科、儿内科、病理科专业医生。本学习班由附一院小儿外科医生及研究生进行口译, 授课内容的重点资料还被翻译为中文, 印刷成相关资料, 提高了授课效果, 受到了学员们的欢迎。同时, 本校校长黄洁夫教授、副校长陈汝筑教授代表中山医科大学正式聘请 Dr. William W. Newton 为学校儿童恶性实体瘤研究组小儿外科客座教授。

据附一院小儿外科刘唐彬教授介绍, 双方就培养儿童恶性实体瘤高级研究人员达成协议, 同意为本校培养 5 名中青年研究人员。目前, 本校病理科朱全胜副教授、附一院放射科陈伟副主任医师已获准出国学习。

(吴金泉)