

人脑星形细胞瘤中 p53、Fas/FasL 的表达及其与凋亡关系的研究 *

张丽红¹ 齐 蕾² 单丽辉² 柴翠翠² 韩 伟² 王立峰^{2△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院放射科 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学附属第一医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 探讨细胞凋亡在星形细胞瘤中的作用及其与 p53、Fas 和 Fas 配体(Fas ligand, FasL)的关系。方法 对 43 例星形细胞瘤的标本分别进行 HE 染色、TUNEL 及免疫组化分别标记 p53、Fas 和 FasL。结果:高级别肿瘤和低级别肿瘤间的凋亡无显著差异($P>0.05$)。高级别星形细胞瘤的 p53、Fas 和 FasL 的表达均显著高于低级别肿瘤(P 均 <0.05)。结论 突变型 p53 可作为评价星形细胞瘤生物学行为的参考指标。与低级别星形细胞瘤相比,高级别肿瘤中的细胞凋亡受到了抑制,且 Fas 与 FasL 的过表达对细胞凋亡可产生明显影响。

关键词 星形细胞瘤 细胞凋亡 p53、Fas/FasL

中图分类号 R739.41 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)18-3501-03

The expression of p53, Fas /FasL and their correlation with apoptosis in human brain astrocytomas*

ZHANG Li-hong¹, QI Lei², SHAN Li-hui², CHAI Cui-cui², HAN Wei², WANG Li-feng^{2△}

(1 Department of radiology, The First Hospital of the Harbin Medical University, 150001, Harbin, China;

2 Department of Pathology, The First Hospital of the Harbin Medical University, 150001, Harbin, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of apoptosis in the progression of astrocytomas and its correlation with the expression of p53 and Fas/FasL. **Methods:** Histopathological analysis, TUNEL labeling and immunohistochemical staining of p53 and Fas/FasL. **Results:** Apoptosis was not significantly different in the two groups($P>0.05$); Expression of p53, Fas and FasL was significantly higher in the high-grade astrocytomas than the low-grade ones ($P<0.05$). **Conclusion:** p53 can serve as an informative parameter to evaluate the biological behavior of astrocytomas, Apoptosis may be suppressed in high-grade astrocytomas, the expression of the Fas/FasL also exert remarkable influence on apoptosis in the astrocytomas.

Key words: Astrocytoma; Apoptosis; p53; Fas/FasL

Chinese Library Classification: R739.41 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3501-03

前言

在生理条件下,细胞死亡的主要形式是细胞凋亡(apoptosis),细胞凋亡机制的破坏与包括肿瘤在内的许多人类疾病有关,而 p53、Fas 和 Fas 配体(Fas ligand, FasL)是与细胞凋亡关系密切的基因。我们收集了 43 例不同组织学分级的脑星形胶质细胞瘤标本,旨在探讨细胞凋亡在星形胶质细胞瘤发生发展中的作用及其与 p53、Fas 和 FasL 的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

取自哈尔滨医科大学第一临床医学院 1999~2000 年胶质瘤手术标本的存档蜡块 43 例,分为两组:低级别组,包括星形细胞瘤 I~II 级 21 例;高级别组,包括星形细胞瘤 III 和 IV 级 22 例。

1.2 试剂

鼠抗人 p53 蛋白单克隆抗体、鼠抗人 Fas 蛋白单克隆抗体及兔抗人多克隆抗体 FasL 购自 Maxium 公司。SP 试剂盒购自

福州迈新公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 辣根过氧化物酶标记的 SP 法。即:石蜡切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢-甲醇封闭 5min, PBS(pH7.2)漂洗后置 EDTA(pH8.0)中,微波炉抗原修复 5min, PBS 漂洗后依次滴加一抗 4℃ 过夜,二抗 37℃ 15min,辣根酶标记的链酶卵白素工作液 15min, PBS 漂洗后 DAB 显色,自来水充分冲洗终止反应,苏木素复染,脱水,透明,封片。以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3.2 TUNEL (POD 法) 切片常规脱蜡入水,新鲜配制 3% H_2O_2 。标本片加 TBS1:200 新鲜稀释 Proteinase K 37℃ 消化 15min。加标记缓冲液。按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μl 加入 18 μl 标记缓冲液中,混匀。加标记液。置样品于湿盒中,37℃ 标记 2h。加封闭液,室温 30min。用封闭液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体,加至标本片上。置样品于湿盒中,37℃ 反应 30min。用 TBS1:100 稀释 SABC,去 1ml TBS 加 SABC10 μl,混匀后加至切片。37℃ 反应 60min, TBS 洗。DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。

* 基金项目 哈尔滨市科技创新人才专项资金项目(RC2010XK004048)

作者简介 张丽红,女,硕士,副主任医师,主要研究方向 肿瘤学

△通讯作者 王立峰 电话:Tel:13604805297 E-mail: hljwlf@yahoo.cn

(收稿日期 2011-05-25 接受日期 2011-06-21)

1.4 结果判定

1.4.1 免疫组化染色结果的判断标准 p53 以肿瘤细胞核呈棕褐色染色定义为阳性 ,Fas 和 FasL 以肿瘤细胞胞浆呈棕褐色染色定义为阳性。每张切片随机取三个高倍视野(400) ,计数至少 1000 个肿瘤细胞中的阳性肿瘤细胞数 , 计算阳性肿瘤细胞百分比 ,即阳性肿瘤细胞百分比 阳性细胞数 / 计数肿瘤细胞数 100%。按组织切片中肿瘤细胞的显色比例进行半定量 :(无阳性细胞) ,-(阳性细胞 25%) ,+(阳性细胞 25%~50%) ,++(阳性细胞 75%)。

1.4.2 TUNEL 细胞核出现棕黄色染色为阳性细胞 ,计数方法同上。但阳性细胞必须周围组织无坏死及炎症 ,如果为弱阳性 ,且 HE 染色未出现凋亡的形态特征 ,不认为该细胞是阳性细

胞 ;少数肿瘤细胞中由其他原因引起的棕黄色色素沉着 ,可借助 HE 染色加以鉴别。

1.5 统计学处理

用 SPSS10.0 统计分析软件进行数据处理和统计学分析。计数资料采用 χ^2 检验 ,检验水准 $\alpha =0.05$, $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 p53 在人脑星形细胞瘤中的表达(图 1 表 1)

p53 在 L 组和 H 组星形细胞瘤中的阳性表达率分别为 52.38%和 81.82% ,二者间差异具有统计学意义($P= 0.041$)。

表 1 p53 在人脑星形细胞瘤中的表达
Table 1 Expression of p53 in human brain astrocytomas

WHO grade	p53				total	positive rate(%)
	-	+	++	+++		
grade I~II(L group)	10	5	5	1	21	52.38*
grade III~IV(H group)	4	8	2	8	22	81.82*

Note : * $P= 0.041$ L group compared with H group

2.2 Fas/FasL 在人脑星形细胞瘤中的表达(图 2,3 表 2)

Fas/FasL 是参与细胞凋亡的正调节因子。本组免疫组化结果显示 ,Fas 表达于细胞膜及细胞浆 ,呈散在分布 ,在 L 组及 H

组中的阳性率分别为 57.14 %和 81.82% ,二者间表达无差异 ($P=0.067$)。FasL 表达于细胞浆 ,在 L 组及 H 组中的阳性率分别为 42.46%和 72.73% ,二者间的表达有差异($P=0.046$)。

表 2 Fas/FasL 在人脑星形细胞瘤中的表达
Table 2 Expression of Fas/FasL in human brain astrocytomas

WHO grade	n	the number of positive Fas/FasL(%)	
		Fas(+)	FasL(+)
grade I~II(L group)	21	12(57.14)	9 (42.46)
grade III~IV(H group)	22	18 (81.82)	16 (72.73)
Fisher's Exact Test		$P=0.067^*$	$P=0.046^{\#}$

Note : * $P=0.067$ L group compared with H group; # $P=0.046$ L group compared with H group

2.3 TUNEL

L 组 57.1%及 H 组 84.4%的肿瘤出现阳性细胞 ,阳性细胞散在分布(图 4) ,H 组的阳性细胞较 L 组多见 ,可有 / 无典型的

凋亡细胞的形态。偶见阳性细胞或阳性颗粒位于其他形态正常的细胞胞浆 ,即所谓的凋亡小体 ,也作为阳性细胞计数(见表 3)。

表 3 人脑星形细胞瘤中细胞凋亡 TUNEL 法的检测结果
Table 3 The result of cell apoptosis in human brain astrocytomas using TUNEL labeling

WHO grade	n	(+)	positive rate(%)
grade I~II(L group)	21	12	57.14*
grade III~IV(H group)	22	18	81.82*

Note : * $P=0.078$ L group compared with H group

3 讨论

细胞凋亡是一种主动的细胞死亡形式 ,它通过消除异常细胞达到内环境的稳定。细胞凋亡及其调控基因异常是肿瘤发生的重要机制之一^[1]。许多组织如乳腺、唾液腺、甲状腺、直肠、肺及肝 ,其恶性肿瘤中发生细胞凋亡较其良性肿瘤多见。研究证实多种基因参与细胞凋亡的调控 ,其中包括 p53 ,Fas 和 FasL

基因。

p53 是控制细胞增殖的主要因子 ,既抑制细胞生长又抑制细胞转化。对 p53 的主要观点为 p53 充当 " 基因组的护卫者 " ,预防细胞增殖过程中 DNA 损伤。DNA 损伤可以增加 p53 的表达水平 ,结果导致 p21^{CIP1/WAF1} 介导的细胞周期阻滞在 G1 期 ,直到 DNA 修复完成 ,如果损伤不可逆 ,则诱导细胞凋亡。在缺乏野生型 p53 蛋白时 ,p53 的 " 护卫者 " 功能丧失 ,细胞累积基因

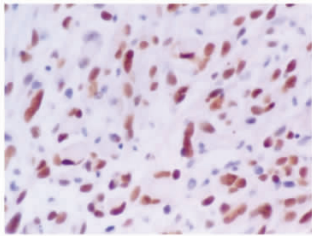


图1 人脑星形胶质细胞瘤 IV 级 (WHO 分类)p53 免疫组化染色 阳性产物定位于肿瘤细胞的细胞核 (400)

Fig.1 Brain astrocytomas IV (WHO) the positive expression of p53 was in the nuclei of tumor cells (400)

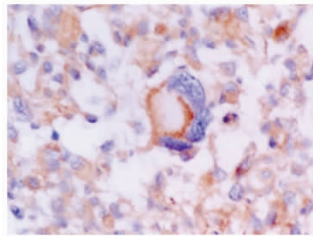


图2 人脑星形胶质细胞瘤 III 级 (WHO 分类)Fas 免疫组化染色 阳性产物定位于肿瘤细胞的细胞浆 (400)

Fig.2 Brain astrocytomas III (WHO) the positive expression of Fas was in the cytoplasm of tumor cells(400)

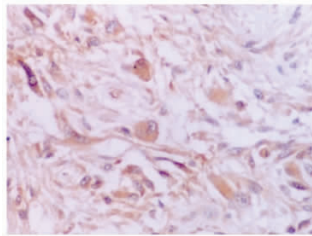


图3 人脑星形胶质细胞瘤 IV 级 (WHO 分类)FasL 免疫组化染色 阳性产物定位于肿瘤细胞的细胞浆(400)

Fig.3 Brain astrocytomas IV (WHO) the positive expression of FasL was in the cytoplasm of tumor cells(400)

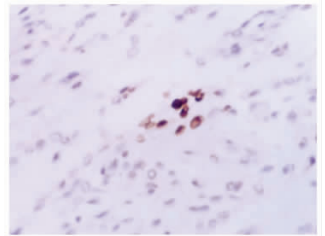


图4 人脑星形胶质细胞瘤 III 级 (WHO 分类)中原位细胞凋亡的检测(POD) 阳性细胞三五成群 (TUNEL 400)

Fig.4 Brain astrocytomas III (WHO) the detection of cell apoptosis in suit using TUNEL labeling ,the positive cell distribute as cluster (TUNEL 400)

损伤可显示出标志性基因的不稳定性。有研究报道显示,在胶质母细胞瘤细胞系中表达外源性野生型 p53 可以抑制细胞的生长^[2]。野生型 p53 蛋白的半衰期很短,很多点突变可大大增加其稳定性,因而临床标本中用免疫组化可以检测到突变型 p53 蛋白。突变型 p53 蛋白失去了本身已有的生物化学功能(如促进 DNA 修复完成以及细胞凋亡),而呈现出使癌细胞过度增殖。此外 Natalie^[3]等在线粒体上发现 p53 蛋白的碎片,可启动 p53 介导的细胞凋亡。已有研究报道 p53 基因的突变与星形胶质细胞瘤的预后不良存在正相关,且大约 25% 的星形胶质细胞瘤中发现 p53 的突变^[4]。本实验结果表明,随着星形细胞瘤恶性程度的增加,p53 蛋白的表达亦逐渐增多,瘤细胞的凋亡也逐渐增多,这与 Khattab AZ 的研究结果一致^[5]。p53 的表达受多种信号通路的调节。Kim CK 等人发现 Ebp1 作为致癌基因,其亚型之一 p48 与 HDM2 结合可以下调 p53 的表达,进而促进胶质瘤的形成^[6]。DNA 损伤时可活化 p53 和 NF- κ B 信号通路,而 p53 和 NF- κ B 信号通路可能在应激/炎症诱发癌症中发挥重要作用。Park S 等人在恶性胶质瘤中研究发现,RIP1(receptor interacting protein 1,NF- κ B 信号通路中重要成分)过表达通过上调 mdm2 可以抑制 p53 的肿瘤抑制信号,进而活化 NF- κ B 信号通路^[7]。因此,深入研究 p53 的信号通路对于了解胶质瘤的发生发展有着积极的作用。

Fas/FasL 是介导细胞凋亡的一对膜蛋白,在维持正常组织发育、控制免疫反应、调节机体生理平衡中起重要作用。Barnhart 等^[8]根据一些淋巴细胞系 Fas 介导凋亡信号途中是否依赖线粒体的信号放大效应把细胞分为 Type I 和 Type II 两种类型。FasL 以同三聚体形式和 Fas 分子交联,导致 Fas 的死亡功能区成簇,Fas 相关死亡区蛋白(FADD)的死亡功能区与活化态 Fas 的死亡功能区可直接结合,形成死亡诱导信号复合物,同时 Fas 相关死亡区蛋白氨基端的死亡效应区与 FLICE(FADD-homologous ICE/CDE-3-like protease,又称 caspase-8)的死亡效应区相互结合形成另一异源二聚体,继而依靠 FLICE 羧基端激活下游 caspase,从而导致细胞发生凋亡(Type I 细胞作用途径);在 Fas/FasL 凋亡信号途径中,Fas/FasL 还可以通过另一条通路而引起细胞凋亡,FasL 结合到 Fas 上导致 Bid(一种促凋亡蛋白)裂解,引起线粒体释放细胞色素 C 到胞浆中,细胞色素 C 可以活

化 caspase-9,进而再激活下游分子(Type II 细胞作用途径)。Fas/FasL 表达失调可诱发过敏性肺炎^[9]。Fas/FasL 通过诱导免疫细胞的凋亡,可使肿瘤细胞逃避免疫细胞的杀伤作用^[10]。本研究结果表明,随着星形细胞瘤恶性程度的增高,Fas/FasL 的表达也增加,即星形细胞瘤中高级别组凋亡阳性率高于低级别组,且 FasL 的表达在两组星形细胞瘤中有显著性差异。但 FasL 在胶质瘤中的表达低于 Fas,原因有待于进一步探讨。最新研究表明,Fas/FasL 系统还具有一系列非促凋亡功能。肺癌中 Fas 信号通过癌细胞源性 PGE2 促进骨髓来源的抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSC)的募集,进而促进肺癌的生长,从而也为炎症在癌症演进中的作用以及免疫逃逸提供了新的理论依据^[11]。Fas/FasL 系统通过 NF- κ B-TIMP-2 信号通路调节 MMP-2 的表达,促进胶质瘤细胞侵袭的能力^[12]。由此可见,Fas/FasL 系统在肿瘤演进中扮演的角色是多样化的。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自我消亡过程,肿瘤不仅是一种细胞增殖异常疾病,同时也是一种细胞死亡异常疾病。本组 43 例星形胶质细胞瘤标本中 30 例胶质瘤出现凋亡细胞,低级别星形胶质细胞瘤与高级别星形胶质细胞瘤的凋亡无显著性差异。周捷等^[13]也发现胶质瘤组织的凋亡随着肿瘤恶性程度的增加而增高。胶质瘤细胞凋亡随着组织学分级的增高而增高并不意味着肿瘤的生长速度减慢,因为相应的其增殖活性也增强,由于其增殖能力增加的程度大于凋亡增加的程度,肿瘤的生长速度还是增加了。也就是说,与低级别组相比,高级别组中的细胞凋亡相对受到了抑制。

总之,细胞凋亡是一个重要的生物学过程,对许多细胞生物物的完整性、体内平衡以及肿瘤的发生均有重要的生物学意义。人脑胶质细胞瘤中,胶质瘤细胞凋亡可通过 bcl-2 介导的线粒体途径、p53 介导的细胞周期和 Fas 介导的 FADD 途径,但三者细胞凋亡进程中的关系如何,还有待进一步研究。因此,通过一定的途径利用某些因子(如转染等方法)来诱导肿瘤细胞凋亡,有可能成为治疗神经胶质瘤的一种颇有前景的选择。

参考文献(References)

- [1] Beldi A, Pasricha PJ, Akhtar, et al. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer [J]. Cancer Res,1995,55:1811-1816

(下转第 3539 页)

性病预防与控制,2004,2(12):17-19

Zuo Huijuan, Yao Chonghua, Deng Liquan. The chronic disease prevention and investigation capability in Beijing [J]. Chin J Prev Contr Chron Dis,2004,2 (12):17-19

- [12] 国家卫生服务研究 1998 年第二次国家卫生服务调查分析报告 [Z]. 卫生部,1999:161

An analysis report of national health services research in the second national health services in 1998 [Z]. Ministry of health of people's republic of China,1999:161

- [13] 王永东,李芳健,梁景荣,等.中山市某镇农村社区慢性病实施健康教育效果评价[J].中国农村卫生事业管理,2007,27(5):390

Wang Yongdong, Li Fangjian, Liang Jingrong, et al. The evaluation of the effects of health education in chronic disease in the Zhongshan rural communities [J]. China's rural health service management, 2007,27(5):390

- [14] 张春生.农村社区的慢性病健康教育[J].中国慢性病预防与控制, 2003,11(1):32

Zhang Chunsheng. The health education of chronic disease in rural communities[J]. Chin J Prev Contr Chron Dis, 2003,11(1):32

- [15] 马丽萍,张颖.余姚市慢性病社区防治现状与对策[J].中国初级卫生保健,2009,23 (5):78-79

Ma Liping,Zhang Ying. Chronic disease prevention of community status and countermeasures of Yu Yao City. Chinese Primary Health Care,

2009,23 (5):78-79

- [16] 郭丽,袁长海.发展农村社区卫生服务完善基层卫生保健[J].卫生软科学,2009,23 (2):156-157

Guo Li,Yuan Changhai. Community health services development of rural primary health care [J]. Soft Science of Health,2009,23 (2): 156-157

- [17] 苏玲玲,李士雪.潍坊市社区卫生服务现状与发展对策[J].社区医学杂志,2007,5(6):5

Su Lingling,Li Shixue. Community health status and countermeasures of Wei Fang City[J]. Journal of Community Medicine,2007,5(6):5

- [18] Milagros C.Rosal, Judith K.Ockene, Thomas G. Hurley, et al. Prevalence and co-occurrence of health risk behaviors among high-risk drinkers in a primary care population [J].Prev Med,2000,31,232-240

- [19] 姜垣.发达国家以社区为基础的慢性病综合干预经验[J].中国慢性病预防与控制,2002,10 (5):235-237

Jiang Yuan. The intervention experience of chronic diseases in developed contries based on Community [J]. Chin J Prev Contr Chron Dis, 2002,10 (5):235-237

- [20] 井珊珊,尹爱田,孟庆跃.农村居民慢性病患者的就医选择行为研究[J].中国卫生经济, 2010,29(2) :32-34

Jing Shanshan, Yin Aitian, Meng Qingyue. The research of treatment behaviour of chronic disease patients in the rural areas [J]. China's health and economic, 2010,29(2):32-34

(上接第 3503 页)

- [2] Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors [J]. Toxicol Pathol, 2000,28(1):164 -170

- [3] Natalie DM, Alexander Z, Ute MM, et al. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling [J]. J Biol Chem ,2000,275:16202-16212

- [4] Phatak P, Selvi SK, Divya T, et al. Alterations in tumor suppressor gene p53 in human gliomas from Indian patients [J]. J Biosci,2002,27 (7):673-678

- [5] Khattab AZ, Ahmed MI, Fouad MA, et al. Significance of p53 and CD31 in astroglomas [J]. Med Oncol , 2009, 26:86-92

- [6] Kim CK, Nguyen TL, Joo KM, et al. Negative Regulation of p53 by the Long Isoform of ErbB3 Binding Protein Ebp1 in Brain Tumors [J]. Cancer Res,2010, 70(23): 9730-9741

- [7] Park S, Hatanpaa K J ,Xie Y, et al. The Receptor Interacting Protein 1 Inhibits p53 Induction through NF- κ B Activation and Confers a Worse Prognosis in Glioblastoma [J]. Cancer Res ,2009,69 (7): 2809-2816

- [8] Barnhart BC , Alappat EC , Peter ME. The CD95 Type I Type model [J]. Semin Immunol 2003, 15:185-193

- [9] Hwang SJ, Kim HS, Chung DH et al. Fas/Fas Ligand-mediated Apoptosis Promotes Hypersensitivity Pneumonitis in Mice by Enhancing Maturation of Dendritic Cells [J].Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(11):1250- 1261

- [10] Xu G,Zhang J. Suppression of FasL expression in tumor cells and preventing TNF-induced apoptosis was better for immune cells survival [J].J Cancer Res Clin Oncol ,2008, 134(10):1043-1049

- [11] Zhang YL,Liu QY,Zhang MG, et al. Fas Signal Promotes Lung Cancer Growth by Recruiting Myeloid-Derived Suppressor Cells via Cancer Cell-Derived PGE2 [J]. The Journal of Immunology, 2009, 182: 3801-3808

- [12] Pawel Wisniewski, Aleksandra Ellert-Miklaszewska. Non-apoptotic Fas signaling regulates invasiveness of glioma cells and modulates MMP-2 activity via NF κ B-TIMP-2 pathway [J]. Cellular Signalling, 22 (2010) 212-220.

- [13] 周捷, 徐庆中, 卢德宏. 星形细胞肿瘤中的细胞凋亡及其与 p53, bcl-2 的关系 [J].诊断病理学杂志 2001, 8: 90-92

Zhou Jie, Xu Qing-zhong, Lu De-hong. Apoptosis and Its Correlation with Expression of p53 and bcl-2 in Astrocytic Tumors [J]. J Diag Pathol,2001, 8 :90-92(In Chinese)