

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.025

腮腺腺样囊性癌中 PTEN、MDM2 表达

张兴伟¹ 王建伟² 李 丽² 陈 东¹ 尹晓东¹ 焦晓辉^{1△}

(1 哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔颌面外科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 鹤岗市人民医院口腔科 黑龙江 鹤岗 154100)

摘要 目的:研究腮腺腺样囊性癌组织中抑癌基因 PTEN、癌基因 MDM2 蛋白表达,探讨 PTEN、MDM2 在腮腺腺样囊性癌中两者之间的相关性,为将来临床应用提供参考。**方法:**选取腮腺腺样囊性癌手术存档石蜡标本 30 例,另取 10 例腮腺腺样囊性癌癌旁正常组织石蜡标本作为对照组,采用免疫组化 SP 法检验 PTEN、MDM2 表达情况。**结果:**腮腺腺样囊性癌和癌旁正常组织中 PTEN 蛋白的阳性率分别为 20%(6/30)和 70%(7/10),二者存在显著性差异($P < 0.05$)。MDM2 蛋白在两种组织中阳性率分别为 66%(20/30)和 20%(2/10)($P < 0.05$),二者存在显著性差异($P < 0.05$)($r = -0.657$),在腮腺腺样囊性癌中 PTEN、MDM2 的表达负相关。**结论:**PTEN、MDM2 蛋白异常表达在腮腺腺样囊性癌的发生发展中起重要作用。

关键词: PTEN; MDM2; 腮腺; 腺样囊性癌; 免疫组化

中图分类号: R739.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)07-1300-04

Adenoid Cystic Carcinoma of Parotid Gland Expression of PTEN and MDM2

ZHANG Xing-wei¹, WANG Jian-wei², LI Li², CHEN Dong¹, YIN Xiao-dong¹, JIAO Xiao-hui^{1△}

(1 Harbin medical university affiliated stomatological hospital of oral and maxillofacial surgery, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Hegang people's hospital, director of the oral and maxillofacial surgery, Hegang, Heilongjiang, 154100, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of PTEN and MDM2 in the tissue of adenoid cystic carcinoma of parotid gland, investigate the correlation between PTEN and MDM2 to provide the reference for future clinical applications. **Method:** 30 cases of cancer tissues and 10 cases of noncancerous tissues were stained with PTEN and MDM2 by immunohistochemical method. **Result:** The positive rate of PTEN protein in cancerous tissue and normal tissue was 20% (6/30) and 70% (7/10), they exist significant difference ($P < 0.05$). The positive rate of MDM2 protein in the two kinds of organizations was 66% (20/30) and 20% (2/10) ($P < 0.05$), they exist significant difference ($P < 0.05$) ($r = -0.657$). The expression of PTEN and MDM2 in cancer tissues was negatively correlated. **Conclusion:** The expression of PTEN and MDM2 protein plays an important role in the occurrence and development with adenoid cystic carcinoma of parotid gland.

Key words: PTEN; MDM2; Parotid gland; Adenoid cystic carcinoma; Immunohistochemicing

Chinese Library Classification(CLC): R739.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1300-04

前言

PTEN 是一种抑癌基因,1997 年,由 Li 等^[1]用差别显示分析法(representationel differenc analysis,RDA)发现,PTEN 是现今发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因。人类 PTEN 定位于人染色体 10q23.3,具有双特异性磷酸酶活性,即脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶的作用。其作用方式有:① PI3K 途径即通过使 PI 3 去磷酸化,达到阻止细胞生长及促进细胞凋亡的目的;② FAK 途径即通过使 FAK 去磷酸化,抑制细胞转移及浸润,PTEN 通过对 FAK 的去磷酸化降低纤维粘连蛋白介导的 FAK 磷酸化水平从而抑制细胞转移及浸润;③ 促细胞分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)途径即通过抑制 MAPK 信号转导通路抑制细胞生长分化;PTEN 使 Shc 脱磷酸导致接头蛋白 Grb-2 抑制,最终下调 MAPK,从而抑制了细胞生长、增殖和分化;④ PTEN

抑制肿瘤血管生成活性,PTEN 通过调节 PI3K /AKT 通路从而调节 VEGF /VEGF 受体信号途径。

MDM2 为小鼠双微体基因,是 1987 年 Cahilly- Snyder 等^[2]发现的一种癌基因,该基因最初是由 Cahilly-Snyder 等在自发肿瘤鼠 Balb/c 3T3 成纤维细胞系(3T3DM)中鉴定出来,在人和鼠的许多组织中都有表达,人类的 MDM2 定位于 12q13-14,编码区约为 1467bp,编码蛋白质分子量为 90kDa。MDM2 是一种能够抑制蛋白凋亡的基因,现研究证实多种恶性肿瘤中有此基因突变、扩增及过度表达^[3]。有研究证实 PTEN、MDM2 与肝癌、星形细胞瘤、急性白血病密切相关,本实验意在探讨在腮腺腺样囊性癌中 PTEN、MDM2 的表达情况,并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取哈尔滨医科大学附属第一医院 2008 年 10 月至 2011 年 10 月间病理科腮腺腺样囊性癌手术存档蜡块标本 30 例,另取 10 例癌旁正常组织蜡块标本作为对照组。所有病例临床资

作者简介:张兴伟,硕士研究生,E-mail:zhangxingwei007@163.com

△通讯作者:焦晓辉,教授,博士生导师,口腔颌面外科主任

(收稿日期:2013-07-05 接受日期:2013-07-28)

料完整,术前均未做放疗。

1.2 试剂抗体

一抗为鼠抗人 PTEN 多克隆抗体 (ZM-0221), 鼠抗人 MDM2 多克隆抗体(ZA-0425)。山羊血清、pv-9000 检测试剂盒, DAB 显色试剂盒, PBS 枸橼酸盐缓冲工作液(ZLI-9063), 多聚赖氨酸(ZLI-9005), 苏木素(hematoxylin), 伊红(eosin)均购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 方法

标本均经 10%中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续 4 μm 厚度切片, 分别用 HE 和免疫组化染色。

1.4 结果判定

PTEN 阳性染色主要定位在细胞浆, 呈棕黄色颗粒状; MDM2 蛋白主要在细胞核表达, 部分细胞胞浆也呈阳性反应, 呈棕黄色颗粒状。应用半定性体系, <10%为 -, 10%~50%为 +, >50%为 ++。分析时 - 归为阴性表达, +、++ 均归为阳性表达,

随机选择 10 个高倍视野($\times 400$), 每个视野计数 100 个细胞, 共计数 1000 个细胞, 计算阳性细胞百分率, 所有病理切片均由 3 位资深病理医师阅片。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 定性资料的组间比较选择卡方检验; 相关性分析选择 spearman 相关性分析, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 PTEN、MDM2 蛋白在腮腺腺样囊性癌和癌旁正常组织中表达情况

腮腺腺样囊性癌和癌旁正常组织中 PTEN 蛋白的阳性率分别为 20%(6/30)和 70%(7/10), 二者存在显著性差异($P < 0.05$)。MDM2 蛋白在两种组织中阳性率分别为 66%(20/30)和 20%(2/10)($P < 0.05$), 二者存在显著性差异($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 腮腺腺样囊性癌和癌旁正常组织中 PTEN、MDM2 蛋白的表达情况

Table1 The expression of PTEN and MDM2 protein in adenoid cystic carcinoma of parotid gland and peri carcinomar tissue

Tissue	PTEN		MDM2		n
	+	-	+	-	
Cancer tissue	6	24	20	10	30
Normaltissue	7	3	2	8	10
X^2	8.547		6.559		
P	0.003		0.010		

2.2 PTEN、MDM2 蛋白在腮腺腺样囊性癌中表达的相关性

在 MDM2 阳性表达的 20 例腮腺腺样囊性癌标本中 PTEN 的阴性表达为 19 例; 而在 MDM2 阴性表达的 10 例标本中 PTEN 的阳性表达为 5 例, 二者存在显著性差异($X^2=13.303$,

$P < 0.05$)。Spearman 相关分析显示 PTEN 蛋白表达与 MDM2 蛋白表达呈负相关($r=-0.657$, $P < 0.01$)。所以本研究认为 MDM2 蛋白在肿瘤细胞中的积聚与 PTEN 表达缺失有关。见表 2。

表 2 腮腺腺样囊性癌 PTEN、MDM2 蛋白表达的关系

Table 2 The expression of PTEN and MDM2 protein in adenoid cystic carcinoma of parotid gland

		MDM2		n	
		+	-		
PTEN	+	1	5	6	$X^2=13.303$
	-	19	5	24	
n		20	10	30	
r	-0.657				$P=0.000$
p	0.000				

3 讨论

PTEN 蛋白表达异常存在于人类多种疾病, 如部分良性肿瘤及大多数恶性肿瘤。野生型 PTEN 通过对 PI3K 下调诱导 G1 期阻滞促进细胞凋亡, 发挥对乳腺癌的抑制并引起细胞凋亡^[4]。目前的研究已经证实 PTEN 蛋白表达异常可存在于前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、膀胱癌、肝脏肿瘤、星型细胞瘤、白血病等。Hua-Chuan Zheng 等^[5]研究证实 PTEN 蛋白表达的下调在胃癌的恶性变中起着关键的作用, 它与肿瘤的侵袭、转移、生长方式

密切相关。Xie SM 等^[6]在对口腔鳞癌组织的研究中发现 PTEN 表达下降, 提示 PTEN 基因的突变或缺失在口腔鳞癌发生发展过程中起重要作用。SquizeCH 等^[7]对 22 例口腔鳞状细胞癌标本进行免疫组化染色, 研究发现 PTEN 阳性染色位于细胞浆, 低分化鳞状细胞癌阳性率 40.9%, 而高分化鳞状细胞癌阳性率为 59.1%。PTEN 的阳性表达与肿瘤的分化程度及生物学特性相关, PTEN 可以做为口腔鳞状细胞癌预后判断的指标。Punnya 等^[8]发现 PTEN 在口腔粘膜下纤维化组织表达, 这个发现说暗示 PTEN 对口腔粘膜下纤维化的癌变存在某些作用, 对于今后

研究口腔黏膜下纤维化的恶变具有指导意义。Angadi PV 等^[8]通过免疫组化染色对 30 例口腔鳞癌与 30 例口腔黏膜纤维化的病例和 10 例口腔正常黏膜比较,口腔鳞癌与腔黏膜纤维化两者没有显著性差异,而与正常口腔黏膜之间有显著性差异,认为 PTEN 表达缺失是两种疾病的重要的分子生物学事件。与本研究结果接近,这表明在腮腺腺样囊性癌的发生发展中 PTEN 基因的失活或低表达可能起重要作用。

MDM2 蛋白的扩增和 / 或过度表达可见于多种肿瘤,如口腔癌、乳腺癌、子宫癌等。学者们研究证明在不同类型的肿瘤中,MDM2 的过表达与病人的预后不良有很大关系或者增加肿瘤发生的风险,Pan 等^[10]研究发现 MDM2 能增加胃癌患病风险,Ying 等^[10]研究发现 MDM2 能增加卵巢癌的发病风险。Mei-Fang Zhang 等^[12]通过对 181 例原发性肝癌患者癌及癌旁组织进行免疫组化和 western blot 发现 MDM2 在原发性肝癌中呈现高表达,染色主要集中于癌细胞的细胞核中,统计分析显示其阳性率为 52.5%,而在相应的癌旁组织中其阳性率为

32.6%。MDM2 在原发性肝癌的表达显著高于癌旁组织。可以作为肝癌发生的预测因素,同时还可以用于估计其生存率。通过 PCR 技术及免疫组化对 35 例口腔鳞状细胞癌和 15 例正常口腔黏膜组织的 cDNA 进行检测,发现 MDM2 在肿瘤细胞中表达水平较正常黏膜组织明显升高^[12]。Souichi Yanamoto 等^[13]曾对 69 例口腔鳞癌进行免疫组化发现 MDM2 染色呈现强阳性,主要在细胞核上,少量在细胞浆中。结果显示 MDM2 在口腔鳞癌的发展过程中起着重要的作用,同时可以作为预后预测的因素之一。此外,Jung 等^[14]研究发现 MDM2 能促进恶性肿瘤细胞的侵袭性,分析其机制可能是通过与 Slug mRNA 的结合而引发。本研究分别统计了腮腺腺样囊性癌与旁正常组织中 MDM2 的表达水平,二者存在显著性差异($P < 0.05$),这提示 MDM2 蛋白的表达与腮腺腺样囊性癌的危险性存在密切的关系,可作为判断腮腺腺样囊性癌诊断的重要参考。

国内外许多研究证明 PTEN、MDM2 是肿瘤发生发展中的重要因素,Zhou M 等^[15]通过细胞培养后分离蛋白对其进行

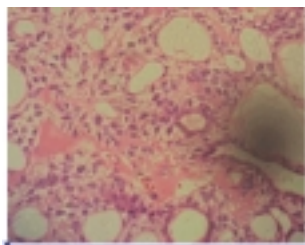


图 1 腮腺腺样囊性癌 HE 染色× 400

Fig.1 Adenoid cystic carcinoma of parotid gland(HE staining× 400)

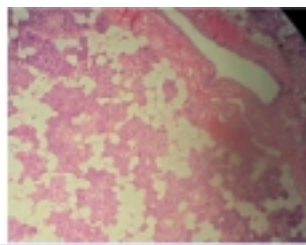


图 2 正常腮腺 HE 染色× 400

Fig.2 Normal parotid gland (HE staining× 400)

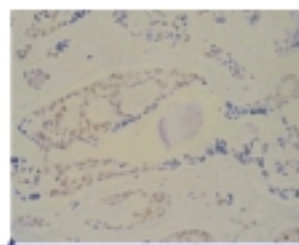


图 3 腮腺腺样囊性癌 MDM2 HE 染色阳性× 400

Fig.3 MDM2-positive in adenoid cystic carcinoma of parotid gland (HE staining× 400)

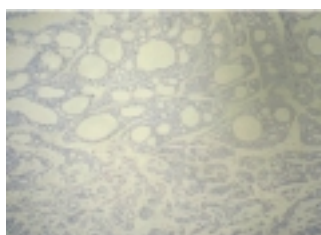


图 4 腮腺腺样囊性癌 PTEN HE 染色阴性× 400

Fig.4 PTEN-negative in adenoid cystic carcinoma of parotid gland (HE staining× 400)

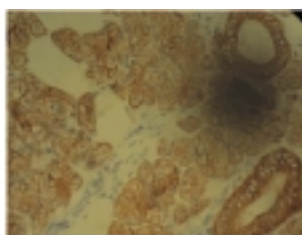


图 5 正常腮腺 PTEN HE 染色阳性× 400

Fig.5 PTEN-positive in normal parotid gland(HE staining× 400)

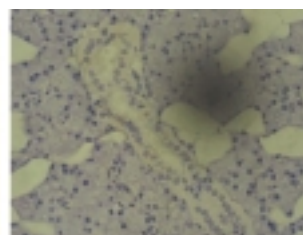


图 6 正常腮腺 MDM2 HE 染色阴性× 400

Fig.6 MDM2-negative immunostaining in normal parotid gland(HE staining× 400)

Western Blot 试验发现 MDM2mRNA 高表达而 PTEN 表达率较低。为了定位,选取了 PTEN+(EU-3)和 PTEN—(EU-1)细胞系进行 MDM2 的检测,同时对 PTEN—细胞系植入 PTEN (EU-1/PTEN)后进行检测,结果显示 EU-3 和 EU-1/PTEN 细胞质中 MDM2 高表达。这些结果证实了 PTEN 能够抑制 MDM2 的表达,还有 PTEN 的丢失通过活化 MDM2 介导的抗凋亡机制来抑制细胞的凋亡。PTEN 是具有磷酸酶活性的抑癌基因,该基因的编码产物能够使被 PI3K 激活的细胞内第二信使 PIP3 去磷酸化,从而影响细胞内 PI3K/Akt 信号转导途径^[16]。最近研

究表明,PI3K/Akt 信号转导途径可以激活细胞的磷酸化过程,导致 MDM2 癌蛋白由胞质进入胞核,而 PTEN 可以通过对 PI3K/Akt 信号转导途径激活细胞的磷酸化过程的影响,阻止 MDM2 癌蛋白由胞质进入胞核,从而加速该蛋白的降解^[17]。这些均表明 MDM2、PTEN 的表达与星形细胞瘤的组织病理分级,同时抑癌基因 PTEN 可以下调 MDM2 的水平。在分析本实验的结果时发现,PTEN 蛋白表达与 MDM2 蛋白表达呈负相关($r = -0.657, P < 0.01$)。在腮腺腺样囊性癌中 PTEN 的低表达可能与 MDM2 高表达有关,推测肿瘤发生过程中可能是 PTEN 失

活失去对细胞的增值的抑制功能,MDM2 基因过表达可以使细胞处在异常增值的状态。

MAO 研究小组发现 PTEN 与 MDM2 的信号传导通路 $PTEN \rightarrow PI3K \rightarrow AKT/PKB \rightarrow MDM2 \rightarrow p53 / PRb/E2F^{[18]}$ 。首先是 PTEN 基因缺失,失去抑制功能,进而原癌基因 MDM2 激活,使 p53 功能丧失,细胞停留在某一阶段并异常增殖,最终导致肿瘤发生。所以本研究认为在腮腺腺样囊性癌中 PTEN、MDM2 的表达负相关,MDM2 蛋白扩增与 PTEN 的表达缺失有关,PTEN 对 MDM2 表达起一定的下调作用,抑癌基因 PTEN 下调癌基因 MDM2 的表达水平是通过 PI3K/AKT 信号转导途径的负调控实现的。MDM2、PTEN 在功能上密切相关这一结论与国内外学者已有实验结果基本一致。Zhong XY 等^[19]研究了 MDM2、PTEN 在 68 例星形细胞瘤中的表达及其相关性。结果显示 MDM2、PTEN 染色主要集中在细胞核和细胞浆中,而在细胞浆中也有少量 MDM2 的表达,差异具有显著性。统计学分析显示 MDM2、PTEN 的表达呈负相关。这些均表明 MDM2、PTEN 的表达与星形细胞瘤的组织病理分级,同时抑癌基因 PTEN 可以下调 MDM2 的水平。

综上所述,PTEN、MDM2 蛋白在肿瘤发生发展过程中起重要作用,本实验应用免疫组化方法从蛋白表达水平上证明 PTEN、MDM2 在腮腺腺样囊性癌中的表达情况,为腮腺腺样囊性癌临床的有价值的科学依据,本实验临床标本较少并且没有对淋巴结转移,病理类型,生存率等进行分析,有待于更深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947
- [2] Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, et al. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line[J]. Somat Cell Mol Genet, 1987, 13(3): 235-244
- [3] Miwa S, Uchida C, Kitagawa K, et al. Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(1): 54-61
- [4] Weng L P, Smith W M, Patricia L, et al. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death[J]. Cancer Research, 1999, 59(15): 5808-5814
- [5] H Zheng, H Takahashi, Y Murai, et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2006, 26(5A): 3579-3583
- [6] Xie S M, Shen L J, Yin C, et al. Expression of tumor suppressor gene PTEN, PIP3 and cyclin D1 in oral squamous cell carcinoma and their correlations[J]. Chinese Journal of Stomatology, 2006, 41(7): 407-410
- [7] Squarize C H, Castilho R M, Santos P D J. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system [J]. J Oral Pathol Med, 2002, 31(7): 379-384
- [8] Angadi P V, Krishnapillai R. Evaluation of PTEN immunoexpression in oral submucous fibrosis: role in pathogenesis and malignant transformation[J]. Head Neck Pathol, 2012, 6(3): 314-321
- [9] Pan X, Li Y, Feng J, et al. A functional polymorphism T309G in MDM2 gene promoter, intensified by Helicobacter pylori lipopolysaccharide, is associated with both an increased susceptibility and poor prognosis of gastric carcinoma in Chinese patients [J]. BMC Cancer, 2013, 13: 126
- [10] Ma Y Y, Guan T P, Yao H B, et al. The MDM2 309T>G polymorphism and ovarian cancer risk: a meta-analysis of 1534 cases and 2211 controls[J]. PLoS One, 2013, 8(1): 55019
- [11] Zhang MF, Zhang ZY, Fu J, et al. Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma [J]. Transl Med, 2009, 22, 7: 110
- [12] Chen H, Kolman K, Lanciloti N, et al. p53 and MDM2 are involved in the regulation of osteocalcin gene expression [J]. Exp Cell Res, 2012, 318(8): 867-876
- [13] Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, et al. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002, 94(5): 593-600
- [14] Jung CH, Kim J, Park JK, et al. Mdm2 increases cellular invasiveness by binding to and stabilizing the Slug mRNA. [J]. Cancer Lett, 2013 21. pii: S0304-3835(13)00161-00164
- [15] Zhou M, Gu L, Findley H W, et al. PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(19): 6357-6362
- [16] Li Y, Guessous F, Kwon S, et al. PTEN has tumor-promoting properties in the setting of gain-of-function p53 mutations [J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1723-1731
- [17] Choi H J, Chung T W, Kang S K, et al. Ganglioside GM3 modulates tumor suppressor PTEN-mediated cell cycle progression-transcriptional induction of p21(WAF1) and p27(kip1) by inhibition of PI-3K/AKT pathway[J]. Glycobiology, 2006, 16(7): 573-583
- [18] Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, et al. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(34): 35510-35517
- [19] Zhong XY, Sun YH, Chen YX, et al. Relationship of PTEN, Mdm2 and p53 expression in astrocytoma. [J]. Chinese Journal of Tumors, 2003, 25(5): 478-481