

• 临床研究 •

预后良好型肾母细胞瘤 p53 和低氧诱导因子-1 α 的表达及与肿瘤侵袭性的关系

张丽娟 刘伟 吴荣德

【摘要】 目的 研究小儿预后良好型(FH)肾母细胞瘤(Wilms 肿瘤)组织中 p53 和-1 α (HIF-1 α)表达水平及其与肿瘤侵袭性的关系。方法 采用免疫组化 S-P 法检测 57 例原发 Wilms 肿瘤组织、21 例侵袭灶和 10 例正常肾脏组织中 p53 和 HIF-1 α 的表达。结果 p53/HIF-1 α 在 78 例 Wilms 肿瘤组织和 10 例正常肾脏组织中的阳性表达分别为 29.5% (23/78)/39.7% (31/78) 和 0%/0%，其差异有统计学意义($\chi^2 = 3.992, P < 0.05; \chi^2 = 6.136, P < 0.05$)。p53 蛋白的表达差异在各临床分期间有统计学意义($\chi^2 = 13.152, P < 0.05$)；侵袭组原发灶和非侵袭组的原发灶中 p53 蛋白阳性率分别为 33.3% (7/21) 和 8.3% (3/36)，两组比较其差别有统计学意义($\chi^2 = 5.730, P < 0.05$)；而 HIF-1 α 在各临床病理因素中的表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。p53/HIF-1 α 蛋白在 21 例原发灶及其对应的侵袭灶中的表达差异均有统计学意义($Z = -2.093, P < 0.05; Z = -2.723, P < 0.01$)。在 78 例 Wilms 肿瘤组织中 p53 和 HIF-1 α 蛋白表达具有正相关性($\chi^2 = 36.210, P < 0.001, r = 0.681$)。结论 p53 和 HIF-1 α 与 Wilms 肿瘤的侵袭性相关，这为进一步了解 Wilms 肿瘤浸润、转移的机制及靶向治疗提供新的思路。

【关键词】 肾母细胞瘤；基因，p53；低氧诱导因子-1

The expressions of p53 and HIF-1 α in favorable-histology type of Wilms tumor ZHANG Li-juan, LIU Wei, WU Rong-de. Department of pediatric surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China

Corresponding author: WU Rong-de, E-mail: wrd2190@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the p53 and HIF-1 α expressions in favorable-histology type of Wilms tumor. Methods The expressions of p53 and HIF-1 α were detected in 57 primary Wilms tumors, 21 invasive lesions, and 10 normal renal tissues by S-P immunohistochemistry. Results Positive staining of p53 was 29.5% (23/78) in tumors while no positive staining could be found in normal tissues ($\chi^2 = 3.992, P < 0.05$). The positive staining of HIF-1 α was 39.7% (31/78) while no positive staining could be found in normal tissues ($\chi^2 = 6.136, P < 0.05$). The expression of p53 in different clinic stages had statistical difference ($\chi^2 = 13.152, P < 0.05$). Positive rate of p53 expression in the primary tumor tissues of invasive group and non-invasive group was 33.3% (7/21) and 8.3% (3/36), respectively ($\chi^2 = 5.730, P < 0.05$). There was no significant difference between HIF expression and clinicopathological factors ($P > 0.05$). Significant statistical difference was detected for p53 and HIF-1 α expressions in 21 primary Wilms tumors and matched invasive lesions ($Z = -2.093, P < 0.05; Z = -2.723, P < 0.01$). The expressions of p53 and HIF-1 α in 78 Wilms tumor tissues were positively correlated ($\chi^2 = 36.210, P < 0.001, r = 0.681$). Conclusions p53 and HIF-1 α expressions are correlated with the invasiveness of Wilms tumor. This provides us a new sight into the mechanism of the infiltration and metastases and therapeutic target of the Wilms tumor.

【Key words】 Wilms tumor; Gene, p53; Hypoxia inducible factor-1

肾母细胞瘤是小儿腹部最常见的恶性实体瘤，偶见于成人，其发病率约为 0.01%。在过去的数十年中，综合治疗使患儿的长期生存率明显提高，但仍有 10%~15% 的肿瘤患儿因发生转移预后较差^[1]，

其中间变和 16 号染色体短臂发生突变与其转移和不良预后相关。部分预后良好型(favorable-histology, FH 型)Wilms 肿瘤亦因存在转移预后较差，其机制尚未完全阐明^[2]。目前对于转移的 Wilms 肿瘤仍缺乏有效的治疗手段。探讨原发癌和转移癌细胞生物学行为的关系，即有助于了解与肿瘤浸润或转移相关基因的变化规律，同时有助于研究原发肿瘤恶性变转化的规律，从而实现阻断肿瘤细胞恶性

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2011.10.012

作者单位: 250021 济南, 山东大学附属省立医院小儿外科

通信作者: 吴荣德, E-mail: wrd2190@163.com

变进程的目标,使靶向治疗成为可能。浸润或转移均与肿瘤的侵袭性相关,因此本课题将浸润或转移列为一组进行肿瘤侵袭性行为的研究,其中浸润或转移包括肾包膜、肾盂、输尿管、血管浸润,瘤栓形成、淋巴结转移和远处转移。

p53 和 HIF-1 α 是已知的与多种肿瘤生长及转移相关的基因。野生型 p53 基因在调控细胞周期中起了重要作用,当细胞受到损伤时能介导细胞的凋亡。50%以上的人类实体瘤发生该基因突变。突变型 p53 基因失去原有功能,具有显性癌基因的特点,它与多种肿瘤发生、发展相关,是肿瘤形成、转移的关键因素之一^[3]。低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是恶性肿瘤诱导新生血管形成的一个主要调节因子,其中 HIF-1 α 是它的活性单位,多数人类肿瘤中存在 HIF-1 α 的过表达,并与肿瘤的生长、浸润相关^[4]。p53 和 HIF-1 α 在小儿预后良好型(FH 型)Wilms 肿瘤中表达的相关研究甚少。本研究通过免疫组化方法检测 Wilms 肿瘤组织及其侵袭灶中 p53 和 HIF-1 α 表达水平并探讨其相互关系,揭示 Wilms 肿瘤进展的相关因素,为临床防治该肿瘤提供理论依据。

资料与方法

一、一般资料

2003 年至 2010 年山东省立医院小儿外科手术的肾母细胞瘤患儿共 57 例,年龄 3 个月 1 d~11 岁,中位年龄(35.95 \pm 4.02)个月,男 37 例,女 20 例;左侧 31 例,右侧 26 例。所有病例均经 HE 染色和免疫组化确诊为预后良好型 Wilms 肿瘤。临床病理分期依 NWTs(美国 WT 研究协作组)。57 例肾母细胞瘤中,Ⅰ期 29 例,Ⅱ期 14 例,Ⅲ期 10 例,Ⅳ期 3 例,Ⅴ期 1 例。收集到 21 例浸润或转移灶,其中肺转移、肾上腺转移各 1 例,淋巴结转移 7 例,浸润肾被膜 4 例,浸润肾门血管、输尿管、肾盂及瘤栓形成各 2 例。主诉以腹部包块为主,占 54.4%(31/57),其次是血尿、腹痛。

二、试剂和方法

1. 主要试剂 即用型免疫组化超敏 S-P 试剂盒;兔抗人 p53 多克隆抗体(购自美国 Santa cruz 生物有限公司,sc6243);鼠抗人 HIF-1 α 单克隆抗体(购自美国 Santa cruz 生物公司,sc53546)。

2. 方法 所有的肿瘤石蜡标本均来自病理科,并取 10 例正常肾脏组织作对照。石蜡包埋标本连续切片,厚 3 μ m,进行 H-E 染色和免疫组织化学染

色(SP 法),以 PBS(0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH=7.42)替代一抗为阴性对照。用已知阳性基因蛋白表达肿瘤标本作为阳性对照。免疫组化染色步骤按试剂盒说明书进行。

三、结果判断

显微镜下观察,p53 阳性为细胞核染色;HIF-1 α 阳性为细胞质或核染色。细胞核(质)内染色呈淡黄色、桔黄色和棕黄色分别为弱强度(W)记 1 分、中等强度(M)记 2 分、高强度(S)记 3 分。计算标记指数(label index, LI):每张切片先在低倍镜(40 \times)下选取最强着色区域,然后高倍镜下(400 \times)随机选 5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,数出阳性细胞数目,换算成百分比。定性判断上,标记指数 $<$ 10%为(-)记 0 分,10%~25%为(+)记 1 分,26%~50%为(++)记 2 分, $>$ 50%为(+++)记 3 分;染色强度和阳性细胞数的总分为最后评分。评分 \leq 2 分的定义为阴性表达, $>$ 2 分定义为阳性表达。

四、统计学处理

应用 SPSS13.0 软件做统计分析,并取双侧检验水准 $\alpha = 0.05$ 。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,p53 和 HIF-1 α 蛋白表达与临床病理资料的关系用 χ^2 检验;p53 和 HIF-1 α 蛋白在原发灶和侵袭灶的比较用 Wilcoxon Signed Ranks 检验。p53 和 HIF-1 α 蛋白表达相关性分析采用 χ^2 检验,并计算 Pearson 列联系数 r 。

结 果

一、p53 和 HIF-1 α 蛋白在 Wilms 肿瘤组织的表达

p53/HIF-1 α 的染色细胞数及染色强度在不同肿瘤组织差别较大,表达在(-)~(+++)不等(图 1~4)。78 例 Wilms 肿瘤组织和 10 例正常肾脏组织中的阳性表达分别为 29.5%(23/78)/39.7%(31/78)和 0%/0%,其差异有统计学意义($\chi^2 = 3.992$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 6.136$, $P < 0.05$)。

二、p53 和 HIF-1 α 蛋白表达与临床病理资料的关系

p53 蛋白在 I~V 期的表达率分别为 6.9%(2/29)、14.3%(2/14)、30.0%(3/10)、66.7%(2/3)、100%(1/1),其差异有统计学意义($\chi^2 = 13.152$, $P < 0.05$);HIF-1 α 蛋白在 I~V 期的表达率分别为 20.7%(6/29)、28.6%(4/14)、40.0%(4/10)、66.7%(2/3)、100%(1/1),其差异无统计学意义($\chi^2 = 5.960$, $P > 0.05$);p53 和 HIF-1 α 蛋白的表达

均与性别、年龄、部位、肿瘤的大小及病理组织类型无关($P>0.05$,表 1)。

三、p53 和 HIF-1 α 蛋白的表达与侵袭性的关系

侵袭组原发灶中 p53 阳性占 33.3%(7/21),非侵袭组为 8.3%(3/36),两者比较其差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.730, P<0.05$);侵袭组原发灶中 HIF-1 α 阳性占 38.1%(8/21),非侵袭组为 25.0%(9/36),两者比较其差异无统计学意义($\chi^2 = 1.087, P>0.05$)。21 例原发灶与其对应的侵袭灶配对研究结果显示,p53 和 HIF-1 α 蛋白在原发灶及侵袭灶中的表达差异均有统计学意义($Z = -2.093, P<0.05; Z = -2.723, P<0.01$,表 2)。

四、p53 和 HIF-1 α 蛋白在 Wilms 肿瘤组织表

达的相关性分析

78 例肿瘤组织(包括 57 例原发 Wilms 肿瘤和 21 例侵袭灶)中 p53 和 HIF-1 α 蛋白表达成正相关性($\chi^2 = 36.210, P<0.001, r = 0.681$,表 3)。

讨 论

浸润或转移是恶性肿瘤的一个重要特征,两者均与肿瘤细胞的侵袭性密切相关,往往预示着肿瘤患者的不良预后。部分 FH 型 Wilms 肿瘤亦存在浸润或转移而预后较差。目前对肿瘤转移的机制尚未完全阐明。本研究通过检测原发肾母细胞瘤及其侵袭灶中相关基因产物的表达,有利于了解肾母细胞瘤浸润、转移的分子生物学机制,从而对进一步研究针对浸润或转移的靶向治疗提供理论依据。

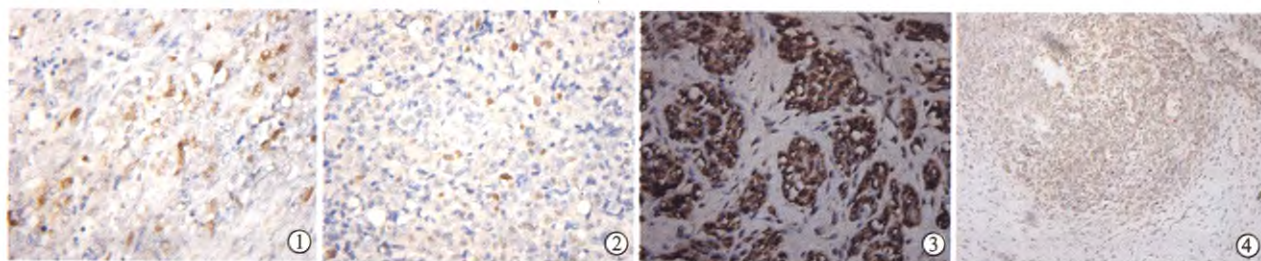


图 1 原发灶 p53 蛋白表达阳性(SP, ×400) 图 2 淋巴结转移灶中 p53 蛋白表达阳性(SP, ×400)
图 3 原发灶 HIF-1 α 蛋白表达阳性(SP, ×400) 图 4 瘤栓中 HIF-1 α 蛋白表达阳性(SP, ×200)

表 1 FH 型肾母细胞瘤临床病理资料与 p53 和 HIF-1 α 蛋白表达的关系

临床病理资料	p53 蛋白表达(例数)		χ^2 值	P 值	HIF-1 α 蛋白表达(例数)		χ^2 值	P 值
	阴性	阳性			阴性	阳性		
性别 男	29	8	1.212	0.271	27	10	0.394	0.530
女	18	2			13	7		
年龄 ≥ 3 岁	15	4	0.243	0.622	14	5	0.168	0.682
< 3 岁	32	6			26	12		
部位 左	25	6	0.154	0.695	21	10	0.192	0.661
右	22	4			19	7		
大小 ≥ 10 cm	32	7	2.214	0.331	25	14	2.207	0.332
6~9 cm	8	3			9	2		
≤ 5 cm	7	0			6	1		
临床 I	27	2			23	6		
分期 II	12	2			10	4		
III	7	3	13.152	0.011	6	4	5.960	0.202
IV	1	2			1	2		
V	0	1			0	1		
病理 上皮	18	5			14	9		
组织 间胚叶间质	17	3	2.655	0.265	15	5	4.403	0.111
类型* 胚芽	12	7			8	11		
侵袭 有	14	7	5.730	0.017	13	8	1.087	0.297
无	33	3			27	9		

注:*混合型中的肿瘤成分并入上皮、间胚叶性间质和胚芽成分中

表 2 p53 和 HIF-1 α 蛋白在 21 例 Wilms 肿瘤原发灶及其对应侵袭灶中表达评分

病例	p53 蛋白表达评分(分)		HIF-1 α 蛋白表达评分(分)	
	原发灶	侵袭灶	原发灶	侵袭灶
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	3	0	3
9	0	3	0	3
10	0	3	0	4
11	0	3	0	4
12	0	3	0	5
13	0	3	2	5
14	0	4	3	3
15	3	3	3	4
16	3	3	3	5
17	3	4	3	5
18	3	4	4	4
19	3	0	4	5
20	5	4	4	6
21	5	4	6	4

表 3 78 例 Wilms 肿瘤组织中 p53 和 HIF-1 α 蛋白表达的相关性比较

p53 蛋白	HIF-1 α 蛋白		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
阳性	21	2	36.210	<0.001
阴性	10	45		

注: Pearson 列联系数 $r = 0.681$

野生型 p53 基因参与 DNA 的修复,同时它还可以引起细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡^[5,6]。而突变型 p53 基因则具有显性癌基因的特点。p53 基因异常与多种肿瘤发生、发展相关,是肿瘤形成、转移的关键因素之一^[7,8]。野生型 p53 蛋白半衰期较短,免疫组化法不易检测到,而突变型 p53 蛋白因半衰期延长,免疫组化法常可检测到。研究表明^[9],免疫组化法检测到的 p53 蛋白的表达可间接用于表明 p53 基因的突变水平。p53 蛋白表达异常在 Wilms 肿瘤中并不少见,但其与 Wilms 肿瘤的关系尚存在争议。D' Angelo 等^[10]对 63 例 FH 型 Wilms 肿瘤的研究发现 p53 蛋白阳性表达与其临床分期及生物学浸润无关。而 Simone 等^[11]对 97 例 Wilms 肿瘤的免疫组织化学研究提示 p53 蛋白表达上调与疾病进展及肿瘤转移或复发相关,与肿瘤组织间变无关。Huang 等^[12]的研究亦提示 FH 型 Wilms 肿瘤中

p53 蛋白的高表达与肿瘤血管生成及疾病的临床进展相关。本研究结果显示 FH 型 Wilms 肿瘤组织中, p53 蛋白的阳性表达与肿瘤的临床分期相关($\chi^2 = 13.152, P < 0.05$),且在侵袭组中的表达高于非侵袭组($\chi^2 = 5.730, P < 0.05$),说明了 p53 蛋白表达上调在 Wilms 肿瘤的进展中起到了一定作用, p53 蛋白阳性的 Wilms 肿瘤易于发生浸润或转移,提示 p53 蛋白的检测在一定意义上可以作为 Wilms 肿瘤侵袭性的预测因子。关于 p53 导致肿瘤浸润或转移的机制,有研究表明^[13]野生型 p53 可以通过调节血管生成抑制因子(thrombospondin, TSP)来抑制血管生成的,突变型的 p53 失去其抗血管生成的作用,致使 TSP 显著下降,血管内皮生长因子(vascular epithelial growth factor, VEGF)表达上调,因此 p53 蛋白异常可通过促进血管生成加快肿瘤的浸润与转移。

低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)由功能亚单位 HIF-1 α 和结构亚单位 HIF-1 β 组成, HIF-1 功能主要由 HIF-1 α 体现^[14]。HIF-1 α 作用于下游基因产生一系列的生理效应,一方面能改善组织的缺氧状态,另一个面能增加组织对缺氧的耐受性。它主要是通过调节与血管生成相关因子促进肿瘤血管生成和增加糖酵解酶活性来获取能量来实现的^[15]。因此即使在低氧、缺氧的状态下,肿瘤仍能继续生长并发生浸润和转移。HIF-1 α 在多种肿瘤组织中高表达并与肿瘤的转移密切相关^[16]。本研究结果显示 HIF-1 α 在侵袭组中的表达高于对照组,但其差异无统计学意义($\chi^2 = 1.087, P > 0.05$)。

21 例原发灶及其对应的侵袭灶的配对研究中发现 p53 和 HIF-1 α 蛋白在侵袭灶中的表达均高于原发灶,且其差异具有统计学意义($Z = -2.093, P < 0.05; Z = -2.723, P < 0.01$),这提示 Wilms 肿瘤细胞在浸润或转移后,受局部微环境的影响, p53 和 HIF-1 α 表达上调,从而更有利于肿瘤细胞在新环境生长、增殖,提示 p53 和 HIF-1 α 蛋白高表达在 Wilms 肿瘤的生长及其浸润、转移过程中起到一定作用。

野生型 p53 基因具有调节 HIF-1 α 蛋白表达的功能。但目前对低氧/缺氧条件下 p53 与 HIF-1 α 蛋白表达情况及其相互关系尚未完全阐明。低氧条件下低表达的野生型 p53 基因能促进 HIF-1 α 的激活,使细胞适应缺氧环境继续生长;随着缺氧的加重,野生型 p53 蛋白的稳定性逐渐增加而活性降低,

大量积聚的野生型 p53 蛋白能抑制 HIF-1 α 基因的转录并促进其降解^[17,18]。而突变型的 p53 基因失去对 HIF-1 α 的调节功能。Zhong 等^[19]用免疫组化法对 179 例人类不同实体瘤组织的研究发现 HIF-1 α 蛋白的过表达与 p53 蛋白的积聚具有一致性。本研究结果提示 HIF-1 α 与 p53 在肾母细胞瘤中的表达呈正相关($\chi^2 = 36.210, P < 0.001, r = 0.681$), 提示二者与 Wilms 肿瘤浸润或转移的生物化进程相关, 并且两者在此过程中具有协同作用。

总之, 本研究表明, p53 和 HIF-1 α 在 FH 型 Wilms 肿瘤中的浸润或转移过程中起到一定作用, 并且两者在肾母细胞瘤进展过程中有协同作用, 提示可通过根植野生型 p53 基因、抑制 HIF-1 α 的表达或阻断 HIF-1 α 的功能来遏制肿瘤的浸润或转移, 使靶向治疗成为可能。本研究样本均取自本院病理科, 再加上样本例数较少, 最终的统计结果可能存在偏倚。另外仅采用免疫组织化学的方法, 只能从蛋白水平进行定性描述, 其蛋白表达上调可能是由于基因突变引起, 亦可能是因其他因子的调节使正常蛋白降解减慢而产生的堆积, 具体的机制仍需基因水平上的进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Bhatnagar S. Management of Wilms tumor: NWTS vs SIOP. *J Indian Assoc Pediatr Surg*, 2009, 14(1): 6-14.
- [2] Huang CC, Gadd S, Breslow N, et al. Predicting relapse in favorable histology Wilms tumor using gene expression analysis: a report from the renal tumor committee of the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(5): 1770-1778.
- [3] Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(10): 701-713.
- [4] Gillies RJ, Gatenby RA. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(2): 311-317.
- [5] Tsipis A, Athanassiadou AM, Athanassiadou P, et al. Apoptosis-related factors p53, bcl-2 and the defects of force transmission in dilated cardiomyopathy. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(9): 625-630.
- [6] Brooks CL, Gu W. New insights into p53 activation. *Cell Res*, 2010, 20(6): 614-621.
- [7] Chang YL, Wu CT, Shih JY, et al. Comparison of p53 and epidermal growth factor receptor gene status between primary tumors and lymph node metastases in non-small cell lung cancers. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(2): 543-550.
- [8] Pancione M, Forte N, Fucci A, et al. Prognostic role of beta-catenin and p53 expression in the metastatic progression of sporadic colorectal cancer. *Hum Pathol*, 2010, 41(6): 867-876.
- [9] Soussi T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 1777-1788.
- [10] D'Angelo MF, Kausik SJ, Sebo TJ, et al. P53 immunopositivity in histologically favorable Wilms tumor is not related to stage at presentation or to biological aggression. *J Urol*, 2003, 169(5): 1815-1817.
- [11] Simone ST, de Camargo B, Lopes LF, et al. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor. *Med Pediatr*, 2001, 7(5): 455-458.
- [12] Huang JZ, Soffer SZ, Kim ES, et al. P53 accumulation in favorable-histology Wilms tumor is associated with angiogenesis and clinically aggressive disease. *J Pediatr Surg*, 2002, 7(3): 523-527.
- [13] Noranizah W, Siti-Aishah MA, Munirah MA, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 in breast lesions. *Clin Ter*, 2010, 161(2): 129-137.
- [14] Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 2010, 9(5): 625-634.
- [15] Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-Inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 294-309.
- [16] Liao D, Corle C, Seagroves TN, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res*, 2007, 7(2): 563-572.
- [17] Hammond EM, Giaccia AJ. Hypoxia-inducible factor-1 and p53: friends, acquaintances, or strangers? *Clin Cancer Res*, 2006, 12(17): 5112-5117.
- [18] Achison M, Hupp TR. Hypoxia attenuates the p53 response to cellular damage. *Oncogene*, 2003, (22): 3431-3440.
- [19] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*, 1999, 9(22): 5830-5835.

(收稿日期: 2011-01-04)