

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.11.008

泛素连接酶2和P53蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其意义

陈 希¹, 李颖霞¹, 陈奎生², 张 岚², 张 冰², 温洪涛¹

Expression and Significance of PIRH2 and P53 Proteins in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Tissues

CHEN Xi¹, LI Yingxia¹, CHEN Kuisheng², ZHANG Lan², ZHANG Bing², WEN Hongtao¹

1.Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China, 2.Department of Pathology

Corresponding Author: WEN Hongtao, E-mail: wenhongtao68@163.com

Abstract: Objective To study the expression and significance of PIRH2 and P53 in esophageal squamous cell carcinoma tissues. **Methods** SP method was used to examine the expression of PIRH2 and P53 in 44 tissues of esophageal squamous cell carcinom, atypical hyperplasia and normal esophageal mucosa. **Results** (1) Positive expression rates of PIRH2 were 88.64%, 68.18% and 25% in tissues of squamous carcinoma, atypical hyperplasia and normal esophageal mucosa, respectively. There were significant differences between any two groups ($P<0.016$). Expressions of P53 protein were 43.18%, 38.64% and 0 in tissues of squamous carcinoma, atypical hyperplasia, and normal esophageal mucosa, respectively. There were significant differences between normal esophageal mucosa and other groups ($P<0.016$). (2) The expression of PIRH2 had no relationship with the differentiation grade of carcinoma, invasion, lymph node metastasis, patient's age and gender ($P>0.05$). The expression of P53 protein had no relationship with the differentiation invasion, lymph node metastasis, patient's age and gender ($P>0.05$), but with significant correlation with the differentiation grade of carcinoma ($P<0.05$). (3) The expression of PIRH2 had no correlation with P53 in esophageal squamous cell carcinoma tissues. **Conclusion** The high expression of PIRH2 and P53 protein may play an important role in the development and evolution of esophageal squamous cell carcinoma, to be the new data to make judgment of esophageal carcinoma. PIRH2 could degrade wtP53 and inhibit the activity of wtP53, to promote the occurrence of esophageal squamous cell carcinoma, but without obvious effect on mtP53.

Key words: PIRH2; P53; Esophageal squamous carcinoma; Immunohistochemical

摘 要:目的 研究泛素连接酶2 (PIRH2) 和P53蛋白在食管鳞癌组织中的表达及意义。**方法** 采用SP法检测44例食管鳞癌组织、不典型增生组织和正常食管黏膜组织中PIRH2和P53蛋白的表达。**结果** (1) PIRH2在食管鳞癌组织、不典型增生组织和正常食管黏膜组织中表达率分别为88.64%、68.18%和25%, 组间两两比较, 差异均具有统计学意义 (P 均 <0.016); P53蛋白在食管鳞癌组织、不典型增生组织以及正常食管黏膜组织中表达率分别为43.18%、38.64%和0, 正常组织分别与癌组织及不典型增生组比较, 差异均具有统计学意义 (P 均 <0.016)。 (2) PIRH2在食管鳞癌组织中的表达与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移及患者年龄、性别等临床病理特征均无相关性 (P 均 >0.05); P53蛋白的表达与肿瘤患者的年龄、性别、癌组织的浸润深度、淋巴结转移均无相关性 (P 均 >0.05), 但与肿瘤的分化程度呈显著性相关 ($P<0.05$)。 (3) PIRH2和P53蛋白在食管鳞癌组织中的表达无明显相关性 ($P>0.05$)。 **结论** PIRH2与P53蛋白的高表达均与食管鳞癌发生发展相关, 可作为食管癌新的诊断指标。PIRH2可能主要通过促进P53蛋白 (野生型) 的降解从而降低P53蛋白 (野生型) 的抑癌活性, 促进食管鳞癌的发生, 而对P53蛋白 (突变型) 并无明显作用。

关键词: 泛素连接酶2; P53; 食管鳞状细胞癌; 免疫组织化学

中图分类号: R735.1 文献标识码: A

收稿日期: 2012-12-03;修回日期:2013-04-15
作者单位: 1.450052 郑州, 郑州大学第一附属医院消化内科, 2.病理科
通信作者: 温洪涛, E-mail: wenhongtao68@163.com
作者简介: 陈希 (1987-), 男, 硕士在读, 主要从事消化系统肿瘤的研究

0 引言

食管癌是世界上最常见的六大恶性肿瘤之一^[1]。Bennett^[2], Wang^[3] 等研究提示, P53 基因突变及蛋白产物的高表达是食管癌的早期事件, P53基因有野生型 (wtP53) 和突变型 (mtP53) 两种, 分别表达

wtP53和mtP53蛋白，wtp53可使细胞阻滞于G₁/S期，抑制肿瘤增殖，当其转变为mtP53时，它就变成了一个促癌基因，失去对细胞生长的抑制作用，反而促进细胞的恶性转化和过度增殖^[4-5]。人PIRH2蛋白(P53 induced RINGH2 protein)是Leng等^[6]发现的一个新蛋白,它能促进P53蛋白的泛素化降解、抑制P53蛋白磷酸化，使P53蛋白处于无活性的状态，从而使P53蛋白的功能减弱或消失，导致肿瘤的发生发展。研究发现^[6-7]，PIRH2在多种癌中均高表达，但尚未见其与食管癌关系的报道，因此，本研究旨在探究PIRH2在食管癌组织中是否高表达及PIRH2与P53在食管癌发生发展过程中的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取郑州大学第一附属医院病理科2011年1月—12月间手术切除食管癌标本44例，其中男27例，女17例；年龄45~82岁，平均61.9岁，其中≤60岁的22例，>60岁的22例；所有病例在肿块切除前均未行放、化疗且临床资料完整。所有标本分别在癌组织、癌旁不典型增生组织（取自距离癌床组织的边缘3 cm以内）和正常食管黏膜（取自手术切缘或者癌组织边缘3 cm以外）三个部分取材，经10%福尔马林固定，石蜡包埋、连续切片（5 μm）分别用于HE染色及免疫组织化学染色。病理诊断均为食管鳞状细胞癌。高及中-高分化（Ⅰ/Ⅰ~Ⅱ）15例、中分化15例、低及中-低分化（Ⅲ/Ⅱ~Ⅲ）14例；有淋巴结转移25例，无淋巴结转移19例；全层浸润组23例（突破肌层至外膜），未全层浸润组21例（未突破肌层）。

1.2 方法

采用免疫组织化学SP法,兔抗人P53单克隆抗体购自北京中杉金桥生物公司,稀释浓度为1:150，兔抗人PIRH2多克隆抗体购自北京BIOSS生物技术公司，稀释浓度为1:400，SP染色试剂盒和DAB显色剂购自北京中杉金桥生物公司。详细步骤按SP试剂盒说明操

作，用试剂公司提供的阳性切片在同一条件下染色作为阳性对照；用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

高倍镜下随机选取10个视野，分别对阳性细胞数及阳性细胞染色强度计分，判断标准：阳性细胞数≤5%计0分，>5%~25%计1分，>25%~50%计2分，>50%计3分；阳性细胞染色强度：细胞无染色计0分，淡黄染色计1分，黄色计2分，棕黄色计3分；最后取两项评分的乘积作为总积分，0~1分为（-）、2~3分为（+）、4~6分为（++）、>6分为（+++）。

1.4 统计学方法

运用SPSS17.0软件，采用行平均得分差检验、非零相关的 χ^2 检验及Pearson相关分析等方法进行统计学分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P53蛋白和PIRH2蛋白在食管鳞癌组织中的表达

P53蛋白的阳性表达主要位于细胞核，呈棕黄色颗粒，见图1A、1B；PIRH2的阳性表达主要位于细胞质，呈棕黄色颗粒，见图1C、1D、1E。P53蛋白在癌组织、不典型增生组织及正常组织中的阳性表达率分别为43.18%、38.64%、0，三组间比较，差异具有统计学意义（ $P<0.0001$ ），两两比较中，癌组织与正常组织、不典型增生组织与正常组织间差异均有统计学意义（ $P<0.0001$ ），但癌组织与不典型增生组织间差异无统计学意义（ $P=0.5215$ ）；PIRH2在癌组织、不典型增生组织及正常组织中的阳性表达率分别为88.64%、68.18%、25%，三组间比较，差异具有统计学意义（ $P<0.0001$ ），两两比较中，癌组织与正常组织间（ $P<0.0001$ ）、不典型增生组织与正常组织间（ $P=0.0002$ ）、癌组织与不典型增生组织间（ $P=0.0043$ ）差异均有统计学意义，见表1。

2.2 PIRH2及P53蛋白的表达与食管鳞癌临床病理特征的关系

表 1 PIRH2及P53蛋白在食管鳞癌组织、不典型增生组织及正常组织中的表达

Table 1 Positive expression rates of PIRH2 and P53 protein in tissues of esophageal squamous cell carcinoma, atypical hyperplasia and normal esophageal mucosa

Tissue groups	n	P53					χ^2, P	PIRH2					χ^2, P
		-	+	++	+++	%		-	+	++	+++	%	
Normal	44	44	0	0	0	0	$\chi^2=22.2848$	33	6	5	0	25	$\chi^2=36.3829$
Atypical hyperplasia	44	27	3	4	10	38.64	$P<0.0001$	14	16	10	4	68.18	$P<0.0001$
Cancer	44	25	3	2	14	43.18		5	16	9	14	88.64	

Note：comparison between any two groups, use $\alpha=0.016$ as inspection level, (1)P53, Cancer tissue groups vs. Normal tissue groups: $\chi^2=21.6351, P<0.0001$; atypical hyperplasia tissue groups vs. Normal tissue groups: $\chi^2=18.4865 P<0.0001$; cancer tissue groups vs. atypical hyperplasia tissue groups: $\chi^2=0.4110, P=0.5215$; (2)PIRH2, Cancer tissue groups vs. Normal tissue groups: $\chi^2=33.0101 P<0.0001$; Atypical hyperplasia tissue groups vs. Normal tissue groups: $\chi^2=14.1679, P=0.0002$; Cancer tissue groups vs. Atypical hyperplasia tissue groups: $\chi^2=8.1355, P=0.0043$

表 2 PIRH2、P53蛋白的表达及与食管鳞癌临床病理参数的关系

Table 2 Relationship of PIRH2 and P53 protein expression and clinical pathological parameters of esophageal squamous cell carcinoma

Groups	n	P53						P	PIRH2						P
		-	+	++	+++	%			-	+	++	+++	%		
Gender															
Male	27	16	2	2	7	40.74	0.4926		4	8	6	9	85.19	0.9140	
Female	17	9	1	0	7	47.06			1	8	3	5	94.12		
Age (years)															
≤60	22	12	1	0	9	45.45	0.4460		3	9	6	4	86.36	0.1481	
>60	22	13	2	2	5	40.91			2	7	3	10	90.91		
Lymph node metastasis															
No	19	14	1	0	4	26.32	0.0729		2	8	4	5	89.47	0.5955	
Yes	25	11	2	2	10	56.00			3	8	5	9	88.00		
Tumor invasion depth															
<full-thickness	21	13	0	1	7	38.10	0.9329		4	7	3	7	80.95	0.5105	
≥full-thickness	23	12	3	1	7	47.83			1	9	6	7	95.65		
Histological grades of carcinoma															
I / I - II	15	12	0	1	2	20.00	0.0426★		3	8	1	3	80.00	0.1685★	
II	15	8	1	0	6	46.67			0	4	5	6	100.0		
III / II - III	14	5	2	1	6	64.29			2	4	3	5	85.71		

Note:★ :comparison among in three groups

P53蛋白的表达均与肿瘤的分化程度有关（ $P<0.05$ ），见表2；与患者的性别、年龄、肿瘤浸润深度、淋巴结转移无关（ $P>0.05$ ）。PIRH2蛋白的表达与患者的性别、年龄、肿瘤浸润深度、分化程度以及淋巴结转移均无关（ $P>0.05$ ），见表2。

2.3 PIRH2与P53蛋白表达的相关性

在44例食管鳞癌组织中，PIRH2与P53蛋白的阳性表达无相关性（ $P>0.05$ ），见表3。

3 讨论

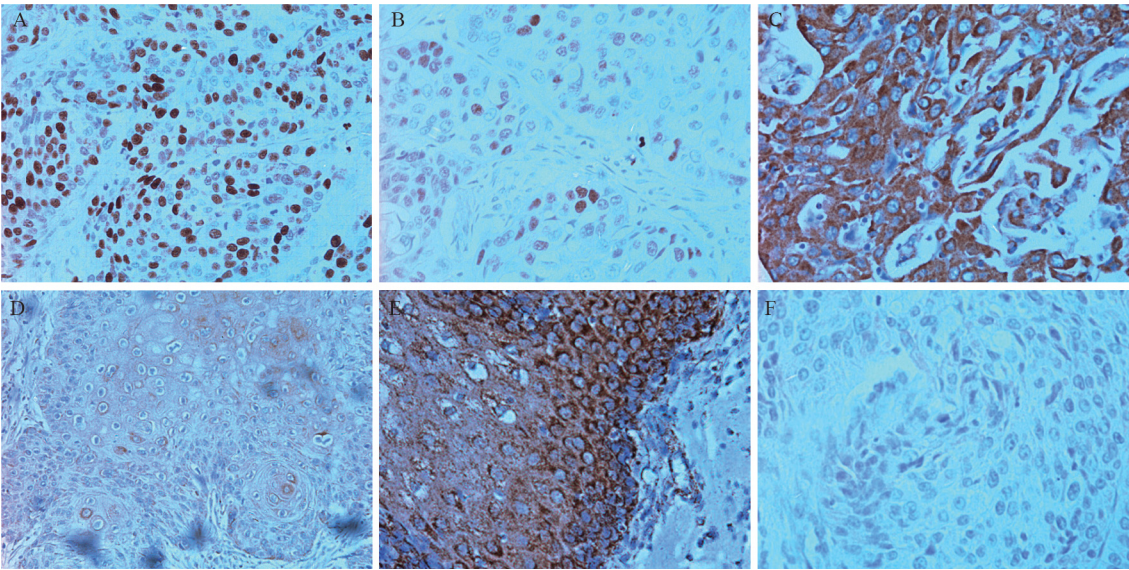
WtP53蛋白抑制细胞的分裂和增殖,同时使损伤

表 3 PIRH2与P53蛋白表达的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of PIRH2 and P53 protein expression

P53	PIRH2		Total	χ^2, P
	-	(+)-(+++)		
-	2	23	25	$\chi^2=0.6503$ DF=1
(+)-(+++)	3	16	19	
Total	5	39	44	$P=0.42$

的DNA有充分的时间修复,在不能修复时,可诱导细胞的程序性凋亡,防止转化为恶性细胞,阻止畸变传递给子细胞,在抑制肿瘤过程中起着重要作用,称为细胞周期中的“分子警察”,但mtP53是促癌基因,因此当wtP53



A: P53 positive expression of cancer tissue; B: P53 positive expression of atypical hyperplasia; cell nucleus stained yellow, staining intensity: A >B; C: PIRH2 positive expression of cancer tissue; D: PIRH2 positive expression of atypical hyperplasia; E: PIRH2 positive expression of normal esophageal mucosa; cytoplasm stained yellow, Staining intensity: C>D>E; F: PBS instead of primary antibodies

图 1 PIRH2 和P53蛋白在食管鳞癌和癌旁非典型增生和正常组织中的表达 (SP ×400)

Figure 1 Expression of PIRH2 and P53 protein in tissues of esophageal squamous cell carcinoma, atypical hyperplasia and normal esophageal mucosa (SP ×400)

突变为mtP53时,就失去了对细胞生长的抑制作用,反而促进细胞转化和过度增殖,最终可使细胞全部表型出现恶性化^[4,8-10]。大量研究提示^[2-5],P53突变与消化系统恶性肿瘤的发生关系密切。本研究结果表明,在食管癌患者的食管正常组织、癌旁交界组织、癌组织中,P53蛋白的表达率逐渐升高,差异有统计学意义。且其表达与食管癌的分化程度显著相关,但与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、患者年龄及性别并未见明显相关性。

PIRH2能利用RING-H2结构域通过泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)与P53蛋白相互作用并促进P53蛋白的泛素化降解^[11-12]。PIRH2是继鼠双微体-2基因(murine doubleminute-2, Mdm2)^[11-15]之后,最新发现的受P53蛋白诱导激活并负性调控P53蛋白的基因,PIRH2蛋白可以通过非Mdm2途径调控P53蛋白的泛素化,抑制P53活性。本研究发现PIRH2蛋白在食管正常组织、癌旁交界组织、癌组织中的表达也逐渐升高,且差异有统计学意义,但PIRH2蛋白的表达与食管癌的分化程度、淋巴结转移、肿瘤浸润深度、患者年龄、性别等临床病理特征间并无明显相关性。因此可将PIRH2及P53作为食管鳞癌诊断及防治新的切入点。

但本研究的结果显示PIRH2蛋白与P53蛋白在食管癌组织的表达并无显著相关性,而有研究^[4]表明正常细胞中wtP53蛋白半衰期短(6~20 min),含量极微,难以检测出来,而mtP53蛋白具有较长的半衰期(2~12 h),从而产生积聚并表达出来。因此,在临床试验中用免疫组织化学所测的P53蛋白通常认为是mtP53蛋白,可见本研究测得的食管鳞癌组织中的P53主要是mtP53蛋白。因此可以推断在食管鳞癌发生过程中,PIRH2主要促进wtP53蛋白的降解从而降低wtP53蛋白的抑癌活性,而大量wtP53基因突变为促癌基因mtP53,共同促进食管鳞癌的发生,见图2。

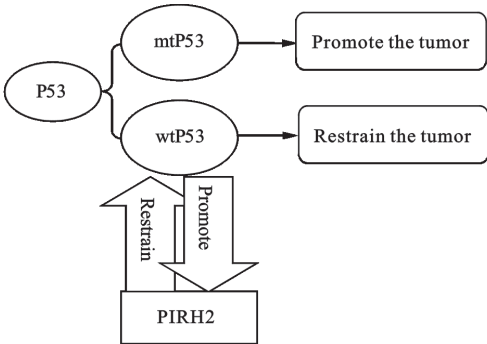


图 2 PIRH2与wtP53在肿瘤生成中的关系

Figure 2 Relationship between PIRH2 and wtP53 in tumor generation process

参考文献:

[1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108.

[2] Bennett WP, Hollstein MC, Metcalf RA, *et al.* p53 mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis[J]. Cancer Res,1992,52(21):6092-7.

[3] Wang LD, Zhou Q, Hong JY, *et al.* p53 protein accumulation and gene mutations in multifocal esophageal precancerous lesions from symptom free subjects in a high incidence area for esophageal carcinoma in Henan, China[J]. Cancer,1996,77(7):124 4-9.

[4] Yuan JM,Ling ZQ,Mao WM.The research progress of p53 in esophageal cancer[J]. Guo Ji Xiao Hua Bing Za Zhi, 2012,32(2):90-2. [袁嘉敏, 凌志强, 毛伟敏. p53在食管癌中的研究进展[J]. 国际消化病杂志,2012,32(2):90-2.]

[5] Chen ZY.Relationship between p53 expression and proliferation and apoptosis in esophageal carci-noma development[J].Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2011, 38(8): 918-20. [陈正言.食管黏膜癌变过程中组织细胞增殖、凋亡和p53表达的变化[J]. 肿瘤防治研究, 2011,38(8): 918-20.]

[6] Leng RP, Lin Y, Ma W, *et al.* Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation[J]. Cell,2003,112(6):779-91.

[7] Qiu YY,Dong LL,Zhu GG,*et al.* Research progress in association between the ubiquitin ligase Pirh2 and tumors[J].Zhong Liu, 2011,31(4):369-73. [邱艳艳, 董兰兰, 朱果果, 等. 泛素连接酶Pirh2与恶性肿瘤相关性的研究进展[J].肿瘤,2011,31(4):369-73.]

[8] Chava S, Mohan V, Shetty PJ, *et al.* Immunohistochemical evaluation of p53, FHIT, and IGF2 gene expression in esophageal cancer[J]. Dis Esophagus,2012,25(1):81-7.

[9] Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops[J]. Oncogene,2005,24(17):2899-908.

[10] Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, *et al.* Loss of 17p, mutation of the p53 gene, and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas[J]. Cancer Res,1993,53(4):846-50.

[11] Shloush J, Vlassov JE, Engson I, *et al.* Structural and functional comparison of the RING domains of two p53 E3 ligases, Mdm2 and Pirh2[J]. J Biol Chem,2011,286(6):4796-808.

[12] Tai E, Benchimol S. TRIMming p53 for ubiquitination[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2009,106(28):11431-2.

[13] Hakem A, Bohgaki M, Lemmers B, *et al.* Role of Pirh2 in mediating the regulation of p53 and c-Myc[J]. PLoS Genet,2011,7(11):e1002360.

[14] Jung YS, Qian Y, Chen X.Pirh2 RING-finger E3 ubiquitin ligase:its role in tumorigenesis and cancer therapy[J].FEBS Lett, 2012, 586(10):1397-402.

[15] Wang Z, Yang B, Dong L, *et al.* A novel oncoprotein Pirh2: rising from the shadow of MDM2[J]. Cancer Sci,2011,102(5):909-17.