

# 贲门癌 mdm2 基因扩增及蛋白表达的研究

薛晓英<sup>1</sup>,胡 荣<sup>2</sup>,杨力伟<sup>3</sup>,段惠军<sup>4</sup> \*

Study of the Amplification and Protein Expression of Gene mdm2 in Cardia Gastric Carcinoma

XUE Xiao-ying<sup>1</sup>, HU Rong<sup>2</sup>, YANG Li-wei<sup>3</sup>, DUAN Hui-jun<sup>4</sup> \*

1. Department of Radiation Oncology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Medical Department of Baiqiu International Peace Hospital; 3. Department of Chest Surgery, The Fourth Hospital of Hebei Medical University; 4. Department of Pathology, Hebei Medical University ( \*corresponding author)

**Abstract Objective** To detect the amplification and protein expression of gene mdm2 in cardia gastric carcinoma and investigate their pathological clinical value. **Methods** Gene amplifications were detected by differential Polymerase Chain Reaction (dPCR) and protein expressions were screened by flow cytometry (FCM) and immunohistochemistry (IHC). **Results** Mdm2 amplifications were found in 7 of 38 case (18.42%). The values (FI) of mdm2 expression detected by FCM were  $1.45 \pm 0.34$  and  $1.00 \pm 0.13$  in cardia gastric carcinoma and normal cardia gastric mucosa respectively ( $P < 0.01$ ). The positive rate of immunohistochemical staining for mdm2 protein were 64.86% and 0.00% in cardia gastric carcinoma and normal cardia gastric mucosa respectively ( $P < 0.01$ ). Positive cases of mdm2 gene amplification and expression in higher grade group was higher than that in the lower grade group (33.30% VS 5.00%, 80.00% VS 47.06%,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Mdm2 gene amplification and expression play an active role in cardia gastric oncogenesis. The detection of these alternations may be helpful to assess the prognosis of cardia gastric carcinoma.

**Key words** :Cardia gastric carcinoma; Mdm2 gene; Gene amplification; Protein expression;

**摘要** 目的 检测贲门癌组织中 mdm2 基因扩增及蛋白表达,探讨其在贲门癌发生发展中的作用,分析其临床病理意义。方法 用 dPCR 技术检测贲门癌组织 mdm2 基因扩增;用免疫组织化学技术及流式细胞术检测 mdm2 蛋白表达水平。结果 该组标本中 18.42% 有 mdm2 基因扩增,64.86% 有 mdm2 蛋白过表达,其 mdm2 表达 FI 值 ( $1.45 \pm 0.34$ ) 明显高于正常黏膜组织的 FI 值 ( $1.00 \pm 0.13$ ,  $P < 0.05$ )。高中分化的贲门癌组织,mdm2 基因扩增率及蛋白表达水平均较低分化者高 (33.30% VS 5.00%, 80.00% VS 47.06%,  $P < 0.05$ )。结合该组标本此前已检测的 p53 基因突变和蛋白表达结果发现,两种基因及蛋白表达异常在本组标本中的分布有不重叠趋势。结论 mdm2 基因扩增和过表达是贲门癌较常见的分子改变,并可能通过抑制野生型 p53 基因功能参与贲门癌形成;有 mdm2 扩增及表达的贲门癌组织分化程度较高,提示预后较好。

**关键词** :贲门癌;mdm2 基因;基因扩增;蛋白表达

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)09-0536-03

## 0 引言

本研究采用差异 PCR (dPCR) 技术、免疫组织化学及流式细胞术 (FCM), 对 38 例贲门癌组织的 mdm2 基因扩增及其中 37 例癌组织的蛋白表达进行检测, 并分析了各项检测结果与贲门癌发生发展的关系及其临床病理价值, 以进一步阐明贲门癌的分子机制, 为选择 mdm2-p53 负反馈机制作为贲门

癌基因治疗的靶点提供可靠依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

取河北医科大学第四医院胸外科手术切除的 38 例新鲜贲门癌标本 (1998 年 12 月 ~ 1999 年 4 月), 部分迅速液氮冷冻并移至 -70℃ 冰箱冻存, 备 dPCR 用, 部分常规石蜡包埋或经 70% 酒精固定 4 周, 保存分别用于免疫组织化学染色和 FCM 检测。

患者男性 28 例, 女性 10 例, 年龄 47 ~ 77 岁, >60 者 20 例, 60 者 18 例。所有病例术前均未进行过放、化疗, 术后均经病理证实为贲门癌, 其中腺癌 33 例, 黏液腺癌 5 例 (包括印戒细胞癌 1 例), 有局部淋

收稿日期:2004-11-29;修回日期:2005-03-28

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(39289)

作者单位:1.050000 石家庄,河北医科大学第二医院放疗科;2.白求恩国际和平医院内科;3.河北医科大学第四医院胸外科;4.河北医科大学病理解剖教研室 (\*通讯作者)。

巴结转移者 16 例。依据分化程度分为两组:分化型管状腺癌为高中分化组,18 例;低分化腺癌、未分化腺癌、黏液腺癌包括印戒细胞癌均属低分化组,共 20 例。

### 1.2 dPCR 技术检测 mdm2 基因扩增

目的基因 mdm2 引物序列为:5'-GTG AAT GAT TCC A GA CAG TC-3' 和 5'-GCT ACT GA G A GT TGA TGGC-3' (107bp), 参照基因 beta-actin 引物序列为:5'-A GC AA G CA G GA G T A T GAC GA G T-3 和 5'-AAT GCA A TC AAA GTC CTC GGC C-3' (284bp)。均由上海生工生物工程公司合成。

用酚-氯仿-异戊醇法抽提基因组 DNA 作为模板, 进行 dPCR 反应。所需 dNTPS、10x、buffer、Taq DNA 聚合酶及 MgCl<sub>2</sub> 为 Sigma 公司产品。38 例癌组织, 非癌区正常贲门黏膜组织的基因组 DNA 均分别进行 dPCR 反应。扩增结果, 取 PCR 产物 15 μL 进行 2% 凝胶电泳, 以凝胶图像分析仪对 PCR 电泳条带进行定量分析, mdm2 指数 = mdm2 值 / actin 值。以正常贲门黏膜组织作为正常对照, 肿瘤组织 mdm2 指数高于正常贲门黏膜组织 mdm2 指数 2 倍确认为 mdm2 基因扩增。

### 1.3 免疫组织化学技术

所用主要试剂均为美国 Santa Crus 公司产品。SP 染色法, DAB 显色, 苏木精复染。用 TBS 缓冲液替代一抗作阴性对照。阳性者为细胞核或胞浆着色, 呈棕黄色颗粒。

### 1.4 流式细胞术

表 1 贲门癌 mdm2 基因扩增和蛋白表达及其与各项临床病理特征

临床病理特征	mdm2 基因扩增			mdm2 蛋白表达			mdm2 蛋白 (FI 值)	P
	阳性例数 / 总例数	阳性率 (%)	P	阳性例数 / 总例数	阳性率 (%)	P		
年龄	60	3/18	16.7	11/18	61.1	>0.05	18	>0.05
	>60	4/20	20				19	
性别	男	5/28	17.9	18/28	64.3	>0.05	28	>0.05
	女	2/10	20.0				9	
分化程度	高中分化	6/18	33.3	16/20	80.0	<0.05	20	<0.05
	低分化	1/20	5.0				17	
组织类型	腺癌	6/33	18.2	21/32	65.6	>0.05	32	>0.05
	黏液腺癌	1/5	20.0				5	
淋巴结转移	阳性	4/17	23.5	10/16	62.5	>0.05	16	>0.05
	阴性	3/21	14.3				21	

### 2.2 免疫组织化学检测 mdm2 蛋白表达

37 例贲门癌组织中有 24 例 mdm2 蛋白表达阳性, 阳性率为 64.86%, 见图 2、3, 而 30 例对照组中无 1 例阳性, 二者的差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。

分析 mdm2 蛋白表达与贲门癌临床病理特征的关系, 发现高、中分化者阳性率为 80.00%, 低分化者阳性率为 47.06%, 二者相比有显著性差异 ( $P <$

采用美国 B. D 公司生产的 FACS 420 型流式细胞仪进行测定, 测量的数据输入 HP2300 Consort 30 计算机。用相应的软件进行数据处理。

$$FI = \frac{\text{肿瘤细胞基因蛋白的平均荧光强度} - \text{对照样品平均荧光强度}}{\text{正常贲门黏膜细胞基因蛋白表达的平均荧光强度}}$$

### 1.5 统计方法

用确切概率法、<sup>2</sup>检验、t 检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 mdm2 基因扩增

将 38 例非癌区正常贲门黏膜组织作为对照组, 经 dPCR 检测, 38 例贲门癌组织中有 7 例扩增阳性, 阳性率 18.42%, 见图 1。分析其与各项临床病理特征的关系, 发现 mdm2 基因扩增与贲门癌的组织分化程度有关 ( $P < 0.05$ ), 即高中分化的肿瘤呈现出较高的扩增率 (33.30%), 低分化肿瘤的扩增率则较低 (5.00%)。mdm2 基因扩增与患者的年龄、性别、组织类型及淋巴结转移等无明显关系 ( $P$  均  $> 0.05$ ), 见表 1。

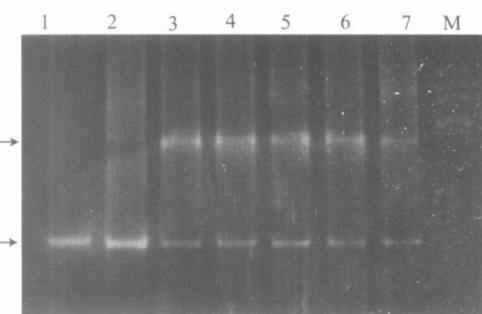


图 1 dPCR 检测 mdm2 基因扩增

1、2:示扩增肿瘤组织;3、4、5、6、7:示未扩增肿瘤组织;M:Marker

0.05)。mdm2 蛋白表达与患者的性别、年龄、组织类型及淋巴结转移等均未见相关关系, 见表 1。

### 2.3 FCM 检测 mdm2 蛋白表达

FCM 检测显示, 37 例癌组织 mdm2 蛋白表达 FI 值为 1.45 ± 0.34, 30 例正常贲门黏膜组织 mdm2 蛋白表达 FI 值为 1.00 ± 0.13, 二者有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

分析贲门癌各项临床病理特征与 mdm2 蛋白表达的关系,发现高、中分化腺癌 mdm2 蛋白表达 *FI* 值 (1.51 ± 0.38) 明显高于低分化腺癌 (1.30 ± 0.24),二者有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),该检测结果与患者的性别、年龄及淋巴结转移情况无关,见表 1。

### 3 讨论

mdm2 基因扩增及过表达在多种人类肿瘤中已有报导,最初认为仅软组织肉瘤有 mdm2 基因扩增<sup>[1]</sup>,但随后发现许多上皮来源肿瘤如非小细胞性肺癌、头颈部鳞癌等都出现同样的分子改变<sup>[2,3]</sup>,提示 mdm2 基因扩增和/或过表达是肿瘤发生中较为常见的分子事件。然而迄今为止国内外有关 mdm2 基因异常与贲门癌关系的研究甚少,本组病例经 dPCR 法检测,38 例贲门癌组织中有 7 例出现 mdm2 基因扩增 (18.42%),与上述报道极为相似。免疫组织化学检测显示,64.86% 有 mdm2 蛋白表达阳性,而正常贲门黏膜组织则无一例阳性 ( $P < 0.01$ )。FCM 检测结果也显示癌组织与正常贲门黏膜的 mdm2 蛋白 *FI* 值有显著差异 ( $P < 0.01$ ),提示 mdm2 基因扩增及表达异常在贲门癌的发生发展过程中有着不容忽视的作用。

本课题组<sup>[4]</sup>还曾用多聚酶链反应-单链构像多态性分析 (PCR-SSCP) 及免疫组织化学、流式细胞术对同一组标本进行了 p53 基因第 5、6、7、8 外显子突变检测及 p53 蛋白表达检测,综合分析两基因及其蛋白表达的检测结果,发现有 p53 突变及过表达的组织其 mdm2 基因扩增及过表达者较少,而无 p53 突变及过表达者其 mdm2 基因扩增及表达异常者较多,即两种基因改变在本组病人贲门癌组织中的分布呈不重叠趋势,该现象在其他肿瘤也曾见到<sup>[5]</sup>。众所周知,大多数肿瘤的形成与 p53 蛋白失活有关,而 p53 蛋白失活的原因则很多。已知一半以上人类肿瘤存在 p53 基因突变,这是造成 p53 蛋白失活的主要原因,而野生型 p53 (wt p53) 功能失活并参与肿瘤形成的机制尚无定论,目前认为 mdm2 基因扩增和过表达从中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。mdm2 基因是 p53 的转录靶基因,该基因可因 wt p53 诱导而转录增强,其表达产物又转而可与 wt p53 结合形成复合物,封闭其转录活性,此即所谓 p53/mdm2 负反馈调节环<sup>[7]</sup>,而 mdm2 在 p53 功能调节中处于核心地位。mdm2 基因扩增和过表达既可使 p53 蛋白聚集减少又能激活泛素促进 p53 蛋白降解,同时还干扰 p53 蛋白对其下游基因的转录激活特性,通过抑制 p53 蛋白的活性参与肿瘤形成<sup>[7]</sup>。本组病例中,mdm2 基因扩增的阳性率 (18.42%) 与其表达的阳性率 (64.86%) 差异较大,这在其他肿瘤也有类似

报道<sup>[8]</sup>,提示 mdm2 蛋白过表达受基因及转录水平的双重调控,其详细机制尚待探讨。

分析 mdm2 基因扩增及其蛋白表达与贲门癌各项临床病理特征的关系发现,mdm2 基因扩增与肿瘤的组织分化程度有关,即高中分化的肿瘤呈现出较高的扩增率 (33.30%),而低分化癌 mdm2 的扩增率则较低 (5.00%),其差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。免疫组织化学及 FCM 检测结果也显示 mdm2 蛋白表达与组织分化程度呈负相关 ( $P < 0.05$ ),这在其他肿瘤也有类似报导<sup>[8]</sup>。所有检测结果与患者的性别、年龄、组织类型及淋巴结转移等无关。或许贲门癌组织分化程度不同,其发生发展的分子机制也不尽相同。即较高分化肿瘤的分子发生机制常与 mdm2 基因扩增及过表达有关,而低分化肿瘤则另有其他的分子途径,如 p53 基因突变等,但这一观点还有待进一步证实。本研究结果对判断病人的预后有一定的价值,提示有 mdm2 基因及蛋白表达异常的肿瘤多分化较高、恶性度低、预后较好。同时为选择以 p53-mdm2 机制为靶点的分子生物学手段治疗贲门癌提供了理论依据。

综上所述,和其他肿瘤一样,mdm2 基因扩增和过表达在贲门癌的发生发展中有重要作用,可能是通过抑制 wt p53 蛋白活性实现的,而与突变型 p53 蛋白无明显关系。在高中分化的贲门癌组织中 mdm2 基因扩增和过表达更为常见。

(本文图 2、3 见封 3)

### 参考文献:

- [1] Nasir L, Rutteman GR, Reid SW, et al. Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas [J]. Cancer Lett, 2001, 174(1): 83-89.
- [2] Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, et al. MDM2 gene amplification: a new independent factor of adverse prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Lung Cancer, 2004, 43(3): 285-295.
- [3] Ho GH, Calvano JE, Bisogna M, et al. Genetic alterations of the p14ARF-hdm2-p53 regulatory pathway in breast carcinoma [J]. Breast Cancer Res Treat, 2001, 65(2): 225-232.
- [4] 薛晓英,段惠军,李英敏,等. p53 基因突变与贲门癌的关系及其临床病理意义 [J]. 河北医科大学学报, 2001, 22(1): 193-195.
- [5] Knights CD, Liu Y, Appella E, et al. Defective p53 post-translational modification required for wild type p53 inactivation in malignant epithelial cells with mdm2 gene amplification [J]. J Biol Chem, 2003, 278(52): 52890-52900.
- [6] Liu Z, Olejniczak ET, Fesik SW, et al. Over-expression of the human MDM2 p53 binding domain by fusion to a p53 transactivation peptide [J]. Protein Expr Purif, 2004, 37(2): 493-498.
- [7] Latonen L, Kurki S, Pitkanen K, et al. P53 and MDM2 are regulated by PF-3-kinases on multiple levels under stress induced by UV radiation and proteasome dysfunction [J]. Cell Signal, 2003, 15(1): 95-102.
- [8] Taniere P, Martel-Planche G, Puttawibul P, et al. TP53 mutations and MDM2 gene amplification in squamous-cell carcinomas of the esophagus in south Thailand [J]. Int J Cancer, 2000, 88(2): 223-227.

[编辑:周永红]

## Neuropilin-1 在胰腺癌组织及细胞系中的表达

(正文见 549 页)

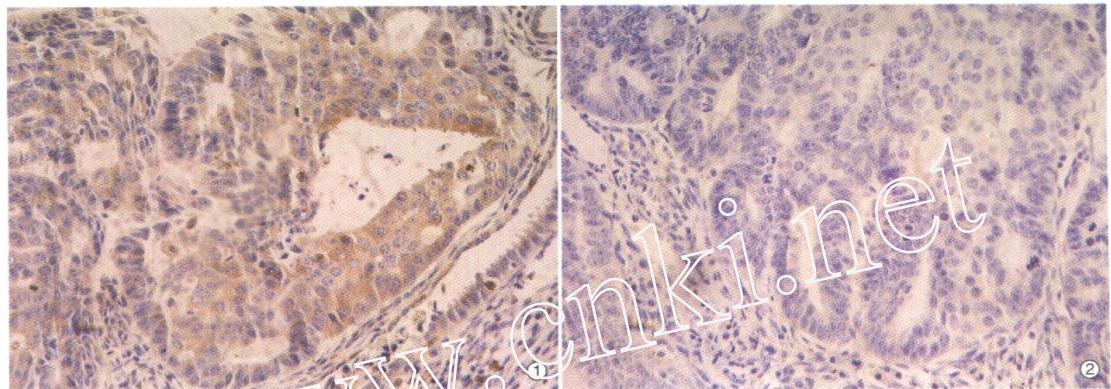


图1 免疫组化检测胰腺肿瘤组织中 NRP-1 的表达: 肿瘤组织及血管内皮细胞中有表达( $\times 200$ )

图2 免疫组化阴性对照图( $\times 200$ )

## 贲门癌 mdm2 基因扩增及蛋白表达的研究

(正文见 536 页)

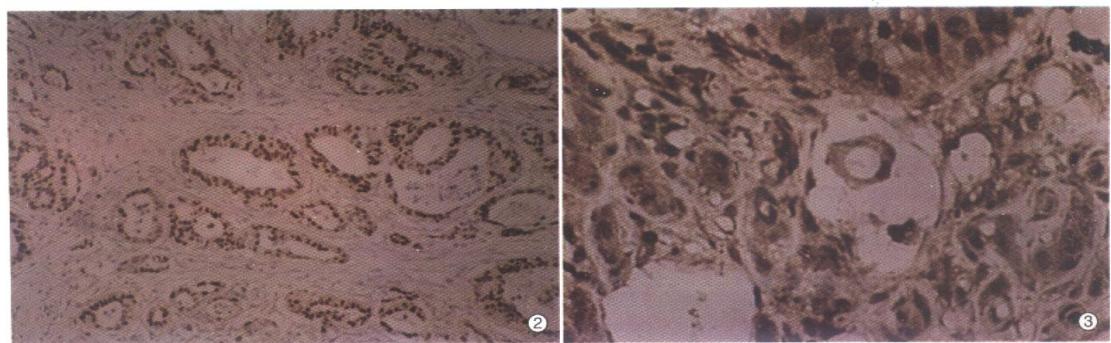


图2 mdm2 蛋白在贲门癌组织中的表达(SP  $\times 100$ )

图3 mdm2 蛋白在贲门癌组织中的表达(SP  $\times 400$ )