

· 论著 ·

Rb 和 P21 基因在婴幼儿皮肤血管瘤中的表达及意义

邹华新¹ 刘 铭²

【摘要】 目的 探讨 Rb 和 P21 蛋白在婴幼儿血管瘤发生、发展及退化过程中的表达及与血管瘤退化有关的可能机制。方法 采用免疫组织化学方法(SP 法)检测 Rb、P21^{WAF1/CIP1} 及增殖细胞核抗原在婴幼儿皮肤血管瘤标本增生期、退化期以及血管畸形标本中的表达情况,并用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸-生物素颈端标记法检测血管内皮细胞凋亡情况,结合 CD₃₄ 相关抗原的免疫组织化学染色,证实 Rb 和 P21 表达的细胞是血管内皮细胞。结果 增生期血管瘤内皮细胞 Rb 和 P21 表达水平低于退化期,差异有统计学意义($P < 0.05$),退化期血管瘤 Rb 和 P21 表达水平与血管畸形组织相比,差异有显著统计学意义($P < 0.001$)。结论 Rb 和 P21 可能通过抑制血管瘤内皮细胞增殖和促进血管内皮细胞凋亡,而在血管瘤的退化过程中起重要作用。

【关键词】 皮肤肿瘤/病理学;血管瘤/病理学;基因,抑制;肿瘤;癌基因蛋白质

P21 (ras)Expression and significance of Rb / P21^{WAF1/CIP1} gene protein in different stage of infantile dermal hemangioma. ZOU Hua-xin¹, LIU Ming². Xuzhou Children's Hospital, Jiangsu 221006; 2. The First Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Sichuan, 646000, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression and significance of Rb / P21 gene protein in different stage of infantile dermal hemangiomas, vascular malformation, to study the role of Rb / P21 in the occurrence, development and regression of hemangiomas. **Methods** The expression of Rb / P21 was examined in proliferating, involuting hemangiomas and vascular malformation by using streptavidin peroxidase immunohistochemistry method (S-P). The apoptotic cells in different stages of infantile dermal hemangiomas and vascular malformations were detected by TUNEL assay. Immunohistochemical technique for CD₃₄ related antigen was used to prove that the cells which expressed Rb / P21 were endothelium. **Results** The expression of Rb / P21 was significantly lower in proliferating hemangiomas than that in involuting hemangiomas ($P < 0.05$), and which was significantly higher than that in vascular malformation ($P < 0.001$). **Conclusions** It is suggested that Rb / P21 might play an important role in the regression of hemangiomas endothelial cells.

【Key word】 Skin neoplasms/PA; Hemangioma/PA; Genes, Suppressor, Tumor; Oncogene Protein p21(ras)

血管瘤是婴幼儿较常见的一种良性血管肿瘤,发病率高达 10%~12%,男女比例为 1:3~5^[1],其病因目前仍不十分清楚。近年来研究表明,血管瘤是一种血管形成性疾病,血管内皮细胞的增殖和凋亡在血管瘤的增生与退化过程中起重要作用。有研究证实,凋亡存在于婴幼儿血管瘤的整个自然过程^[2]。Rb 和 P21 是近年来发现的一种抑癌基因和细胞周期素依赖蛋白激酶 (CDK) 的负性调控因子。能阻断细胞周期从 G₁ 到 S 期转换,从而抑制细胞增殖,且在某些肿瘤中存在基因异常和蛋白表达的异常,能促进肿瘤细胞凋亡。本研究应用免疫组织化学方法

检测不同时期婴幼儿皮肤血管瘤组织以及血管畸形组织中 Rb 和 P21 基因蛋白的表达,探讨 Rb 和 P21 在血管瘤发生、发展以及退化过程中作用机制。

材料与方 法

一、实验材料与分组

本组 76 例,血管瘤 54 例,男 34 例,女 42 例,平均年龄 2.6 岁(40 d 至 5 岁);血管畸形 22 例,男 12 例,女 10 例,年龄 1~16 岁。按 Mulliken^[3]分类标准进行分组,增生期血管瘤组(A 组)28 例,退化期血管瘤组(B 组)26 例,血管畸形组(C 组)22 例。所有病例术前未行辅助性治疗,均于术中留取病变区

作者单位:1. 徐州市儿童医院(江苏省,221006);2. 泸州医学院附属医院小儿外科(四川省,646000),E-mail: zouhuaxin607@163.com

域标本,另取瘤体周围正常皮肤 10 例作为对照组。

二、实验方法

1.常规 HE 染色

采用免疫组织化学法 (SP 法) 检测 Rb、P21、PCNA 和 CD34 相关抗原。主要步骤:取 4 μ m 组织切片,常规脱蜡。Rb、P21 和 PCNA 采用高压抗原修复,CD34 相关抗原采用胃酶消化修复抗原,3% 过氧化氢处理 10 min,正常二抗动物血清处理 15 min,一抗 4℃ 孵育过夜,生物素标记的二抗处理 10 min,链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物处理 15 min,DAB 显色液显色,自来水冲洗,苏木精复染。脱水,透明,封片,用小细胞肺癌组织切片作为染色阳性对照标准,用 PBS 代替一抗作为阴性对照标准,人正常皮肤表皮作为 PCNA 的阳性对照组。

2.结果判断

以血管瘤的血管内皮细胞膜、胞浆或胞核染色呈黄色至棕黄色,为 Rb、P21^{WAF1/CIP1} 的阳性反应,以细胞核出现棕黄色颗粒为 PCNA 阳性反应,以胞膜和胞浆出现棕黄色颗粒为 CD34 相关抗原阳性反应。参照卢晓晔等^[9]的方法,根据国际免疫组织化学技术与诊断标准^[9],凋亡细胞的原位检测以细胞核着色呈黄色为凋亡阳性细胞。凋亡指数 (AI) = [染色阳性细胞数 (10 个高倍视野中) / 计数细胞总数 (100 \times 10)] \times 100%。

3.统计学处理

应用 SPSS (12.0 版) 软件,凋亡指数均值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用 t 检验, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。其他数据进行 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、HE 染色结果

A 组见大量增生活跃的内皮细胞,形成细胞团状或细胞索状,肥大细胞数目明显增多,管腔少或形成裂隙,基底膜多层;B 组见血管内皮细胞明显减少,形成大量的毛细血管管腔,血管外已无内皮细胞团或细胞索,血管间结缔组织明显增多,血管间距增大;C 组见瘤体由密集排列、异常扩张的血管组成,血管内皮细胞呈单层扁平状排列,管腔大小不等,血管周围有结缔组织包绕。

二、PCNA 的表达情况

A 组 PCNA 强阳性表达的内皮细胞围成血管腔,呈团块状,核椭圆,体积较大 (图 1)。B 组 PCNA

呈弱阳性表达,血管内皮细胞明显减少,形成大量毛细血管腔 (图 2)。C 组 PCNA 呈阴性表达,毛细血管腔被大量脂肪组织和纤维组织压缩变窄 (图 3)。A 组与 B 组和 C 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组 PCNA 的表达情况

组 别	n	PCNA 的表达				
		(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性率(%)
血管瘤组						
A 组	28	8	4	9	7	78.57
B 组	26	18	5	3	0	30.77
血管畸形组						
	22	18	2	2	0	18.18

注:A 组与 B 组和 C 组比较, $P < 0.05$, χ^2 值分别为 8.927 和 13.994;B 组与血管畸形组比较, $P > 0.05$, χ^2 值为 0.647

三、血管瘤内皮细胞凋亡情况

A 组血管瘤内皮细胞增生活跃,形成内皮细胞团,血管呈丛状或小叶状分布,TUNEL 法染色后见少量散在分布的凋亡细胞 (图 4)。B 组瘤组织内细胞成分减少,见散在呈岛状分布的脂肪和纤维组织,可见大量细胞凋亡 (图 5)。C 组管腔部位被大量脂肪和纤维组织取代,管腔被压缩变窄,此期几乎无细胞凋亡 (图 6)。A 组凋亡指数均值为 2.268 ± 0.714 ,B 组凋亡指数均值为 23.697 ± 11.765 ,C 组凋亡指数均值为 1.346 ± 0.583 。B 组与 A 组及 C 组比较,差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), t 值分别为 5.638 和 5.825。

四、CD34 相关抗原的表达情况

B 组内皮细胞胞浆内弥漫分布棕黄色颗粒,CD34 相关抗原表达阳性。

五、Rb 的表达

B 组血管内皮细胞膜中可见有许多 Rb 抗原表达 (图 7),A 组和 C 组表达少 (图 8、图 9),见表 2。

表 2 各组 Rb 的表达情况

组 别	n	Rb 的表达				
		(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性 率(%)
血管瘤组						
A 组	28	20	2	4	2	28.57
B 组	26	6	4	9	7	76.92
血管畸形组						
	22	18	4	0	0	18.18
对照组						
	10	9	1	0	0	10.00

注:B 组与 A 组比较, $P < 0.05$, $\chi^2 = 12.625$;B 组与 C 组比较, $P < 0.05$, $\chi^2 = 16.448$;A 组与 C 组比较, $P > 0.05$, $\chi^2 = 0.7000$;C 组与对照组比较, $P > 0.05$, $\chi^2 = 0.349$

六、P21^{WAF1/CIP1} 表达

B 组 P21^{WAF1/CIP1} 表达明显 (图 10),A 组、C 组均

较弱(图 11、图 12),见表 3。

表 3 各组 P21^{WAF1/CIP1} 的表达

组 别	n	P21 ^{WAF1/CIP1} 的表达				
		(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性率(%)
血管瘤组						
A 组	28	22	4	2	0	21.43
B 组	26	9	4	8	5	65.38
血管畸形组	22	17	4	1	0	22.73
对照组	10	8	2	0	0	20.00

注:B 组与 A 组、C 组比较, $P < 0.05$, χ^2 值分别为 10.653 和 8.102; A 组与 C 组比较, $P > 0.05$, $\chi^2 = 0.003$; C 组与对照组比较, $P > 0.05$, $\chi^2 = 0.0299$

讨 论

Rb 基因定位于人类第 13 号染色体的长臂 1 区 4 带(13q14)上,主要存在于核内,为核磷蛋白。从已知氨基酸序列推测,Rb 蛋白含有一个类似其它核酸蛋白的亮氨酸拉链样结构。Ruiz^[6]等对 Rb 蛋白的结构研究发现:pRb 阻断细胞增殖的关键功能区在 C 端,含“Pocket”区域,也叫“Rb 口袋”,它们是 Rb 与细胞蛋白结合域,如 E2F 家族、细胞周期调控蛋白如 CyclinD 以及某些病毒、癌基因等,通过网络式调节发挥多种功能。Rb 蛋白功能的发挥依赖激酶、磷酸酶的磷酸化和去磷酸化调节实现,其磷酸化状况

与细胞周期有关,非磷酸化或低磷酸化 pRb 是其活性形式,存在于 G₀ 期或 G₁ 期细胞中,磷酸化 pRb 则存在于 S 期、G₂ 期和 M 期细胞中。

pRb 是遗传性视网膜母细胞瘤中发现的抑癌基因,是 G₁ 期的 Cyclin-CDK 复合物介导的磷酸化作用共同限速底物,因此是 G₁ 期至 S 期调控点中心成分。对 Rb 调控包括一系列 Cyclin-CDK 复合物及对这些复合物的功能进行调控的 CDK 活化激酶(CAK)和 CDK 抑制物(CKI)。这些调节成分以 Rb 为中心构成多条调节途径,其共同模式是:生长因子结合相应的受体,通过信号传递促进 Cyclin 基因表达,Cyclin 与相应 CDK 结合为激酶复合物,在 CAK 协同下对 Rb 蛋白磷酸化,磷酸化 Rb 释放其结合的核转录因子 E2F 以及具有激酶活性的 c-Abl 蛋白,游离的 E2F 进入核内,结合具有特殊序列的基因启动子区(如 c-myc、c-myb、cdc2、二氢叶酸还原酶基因、TK 基因及 E2F-1 基因的启动子区),促进这些基因的表达,上述基因表达产物促进细胞通过 G₁/S 调控点,进入自主分裂程序^[7]。CKI 通过抑制 CDK 或 Cyclin-CDK 的活性,使 pRb 保持去磷酸化且结合 E2F 及其它蛋白的状态,从而抑制细胞增殖。

通常 P21 也称为野生型 P53 激活片段 1,即 WAF1/CIP1,于 1993 年被首次克隆出,它定位于人类 6 号染色体短臂的 2 带 1 区(6p21.2),由 164 个

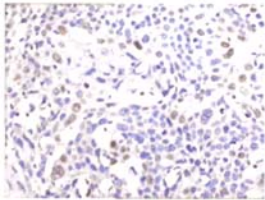


图 1 PCNA 在增生期表达 (SP×200),血管内皮细胞胞核见棕黄色颗粒

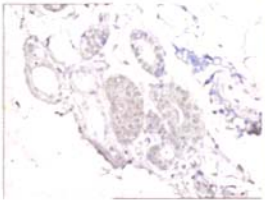


图 2 PCNA 在退化期表达 (SP×200),血管内皮细胞胞核见少许棕黄色颗粒

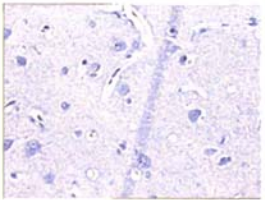


图 3 PCNA 在血管畸形表达 (SP×200),血管内皮细胞胞核无棕黄色颗粒

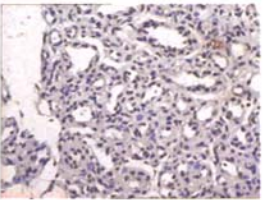


图 4 增生期血管瘤细胞凋亡 (TUNEL×200),血管内皮细胞胞见少许棕黄色颗粒

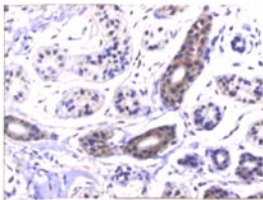


图 5 退化期血管瘤细胞凋亡 (TUNEL×200),血管内皮细胞胞可见大量棕黄色颗粒

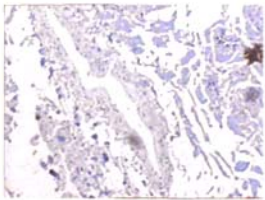


图 6 血管畸形细胞凋亡 (TUNEL×200),血管内皮细胞胞无棕黄色颗粒

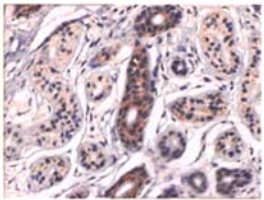


图 7 Rb 在退化期表达 (SP×200),血管内皮细胞胞浆可见大量棕黄色颗粒

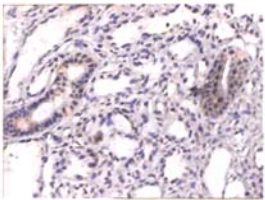


图 8 Rb 在增生期表达 (SP×200),血管内皮细胞胞浆仅见少许棕黄色颗粒

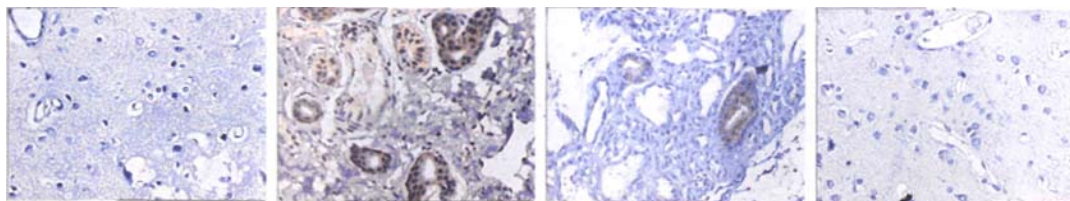


图 9 Rb 在血管畸形中表达 (SP×200), 血管内皮细胞胞浆无棕黄色颗粒 图 10 P21 在退化期表达 (SP×200), 血管内皮细胞胞浆可见大量棕黄色颗粒 图 11 P21 在增生期表达 (SP×200), 血管内皮细胞胞浆可见少许棕黄色颗粒 图 12 P21 在血管畸形中表达 (SP×200), 血管内皮细胞胞浆几乎无棕黄色颗粒

氨基酸构成, 富含精氨酸, N 末端第 21~26 氨基酸与 cyclinD、cyclinE 结合, C 末端第 124~164 氨基酸与 PCNA 结合, 中间第 49~72 氨基酸与 CDK2 结合。免疫荧光检测和亚细胞结构显示, 在正常细胞和肿瘤细胞中, P21 蛋白定位于细胞质和细胞核中, 细胞核中的 P21 蛋白与 CDK 和抑制激酶活性有关, 而细胞质中的 P21 蛋白与非活性 P21 的积聚有关。在正常细胞中, P21 是活性 Cyclin/CDK 复合物的一个成分, 活性 Cyclin/CDK/P21 复合物向非活性复合物的转变可能与 P21 亚单位的化学计量改变有关^[6], 在包含 P53 突变型的细胞中, P21 不再与 Cyclin/CDK 复合物相关, 可能是 P21 不能抑制突变型 P53 细胞的原因。

生长抑制蛋白 P21 是各种细胞周期依赖激酶的有效抑制物, 它的表达通过 P53 依赖和非依赖机制在翻译水平上调节^[7]。①由 P53 介导的途径: P53 作为转录因子启动 P21 表达, P21 与 cyclinE/cdk 2 复合物结合, 抑制 Rb 磷酸化, Rb 不能释放 E2F, 使 DNA 合成受抑制, 阻止由 G₁ 期进入 S 期, 另一方面, P21 与 PCNA 结合, 虽不破坏 PCNA 的空间构象, 但覆盖其某些功能区, 使 PCNA 不能与 DNA 聚合酶 δ 形成复合物, 或 DNA 全酶复合物不能在 DNA 单链上滑动, 影响 DNA 复制, 两方面作用使细胞生长停滞于 G₁ 期, 引起细胞周期阻滞, 导致细胞凋亡。②非依赖 P53 途径: 在 P53 基因和蛋白缺失的细胞中, 生长因子、 γ -干扰素等均可诱导 P21 的表达。

本实验中, Rb 和 P21 抗原在小儿血管瘤增生期少量表达, 在退化早期的血管瘤组织中阳性表达最强, 阳性细胞率也最高, 在血管畸形组织中仅有少量表达。Rb 的表达在血管瘤各期中基本一致。在增生期血管瘤组织中 PCNA 抗原呈强阳性表达, 而 Rb 及 P21 不表达或呈弱阳性表达, 肿瘤组织内仅见少量凋亡细胞, 退化期 PCNA 阳性表达率明显降低, Rb 及 P21 的阳性表达率呈明显增高, 血管瘤组织内

可见大量的凋亡细胞。Rb 和 P21 表达和激活与血管瘤的退化有密切关系, 其机制可能与 Rb/P21 参与血管瘤内皮细胞凋亡和增殖的调控与介导有关。

参考文献

- 1 Metry D. Update on hemangiomas of infancy. Curr Opin[J]. Pediatr, 2004, 16:373-377.
- 2 Hasan Q, Tan ST, Gush J, et al. Altered mitochondrial cytochrome b gene expression during the regression of hemangioma[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 108:1471-1478.
- 3 Mulliken JB, Glowack J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics [J]. Plast Reconstr Surg, 1982, 69(3):412-422.
- 4 卢晓晔, 覃莉, 黄中新, 等. Caspase 活化细胞凋亡在非小细胞肺癌组织中的表达[J]. 实用癌症杂志, 2002, 17(2): 122-124.
- 5 Al-Adnani M, Williams S, Rampling D, et al. Histopathological reporting of paediatric cutaneous vascular anomalies in relation to proposed multidisciplinary classification system[J]. J Clin Pathol., 2006, 59(12):1278-1282.
- 6 Ruiz S, Santos M, Lara MF, et al. Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis [J]. Cancer Res, 2005, 165(21):9678-9686.
- 7 Zhao Y, Tan J, Zhuang L, et al. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(44):16090-6095.
- 8 Srivastava RK, Chen Q, Siddiqui I, et al. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1/CIP1)[J]. Cell Cycle., 2007, 6(23):2953-2961.
- 9 Tornillo L, Lugli A, Zlobec I, et al. Prognostic value of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in mismatch repair-proficient colorectal cancer: a tissue microarray-based approach[J]. Am J Clin Pathol., 2007, 127(1):114-123.

Rb和P21基因在婴幼儿皮肤血管瘤中的表达及意义

作者: 邹华新, 刘铭, ZOU Hua-xin, LIU Ming
作者单位: 邹华新, ZOU Hua-xin(徐州市儿童医院, 江苏省, 221006), 刘铭, LIU Ming(泸州医学院附属医院小儿外科, 四川省, 646000)
刊名: 临床小儿外科杂志 
英文刊名: JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY
年, 卷(期): 2008, 7(4)
被引用次数: 1次

参考文献(9条)

1. Srivastava RK;Chen Q;Siddiqui I Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(/WAF1/CIP1) 2007(23)
2. Zhao Y;Tan J;Zhuang L Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim 2005(44)
3. Ruiz S;Santos M;Lara MF Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis 2005(21)
4. Al-Adnani M;Williams S;Rampling D Histopathological reporting of paediatric cutaneous vascular anomalies in relation to proposed multidisciplinary classification system 2006(12)
5. 卢晓晔;覃莉;黄中新 Caspase活化细胞凋亡在非小细胞肺癌组织中的表达[期刊论文]-实用癌症杂志 2002(02)
6. Mulliken JB;Glowack J Hemangiomas and vascular malformations in infants and children:a classification based on endothelial characteristics 1982(03)
7. Tornillo L;Lugli A;Zlobee I Prognostic value of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in mismatch repair-proficient colorectal cancer.a tissue microarray-based approach 2007(01)
8. Hasan Q;Tan ST;Gush J Altered mitochondrial cytochrome b gene expression during the regression of hemangioma 2001
9. Metry D Update on hemangioma of infancy 2004(4)

引证文献(2条)

1. 刘国林 婴幼儿血管瘤增殖、退化机制的研究进展[期刊论文]-当代医学 2010(1)
2. 彭强, 周昉, 刘文英, 王元祥, 魏艇, 位永娟 血管内皮祖细胞在血管瘤中的表达和作用[期刊论文]-临床小儿外科杂志 2009(5)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200804011.aspx

授权使用: 黔南民族师范学院(gnnzsfxy), 授权号: 9607d518-844c-4cc4-b523-9ed401050b44

下载时间: 2011年4月29日