

p53 和 MMP-2 在肺癌组织中的表达及意义

张书卿, 张绪良

(黄石市中心医院, 湖北 黄石 435000)

摘要: [目的] 探讨 p53 及 MMP-2 蛋白在人肺癌组织中的表达情况。[方法] 采用量子点免疫荧光组织化学(QDs-IHC)技术分析和研究人肺癌组织芯片中 p53 及 MMP-2 蛋白的表达情况,并检测 p53 及 MMP-2 蛋白在肺癌组织中的共表达。[结果] QDs-IHC 检测分析显示, p53 及 MMP-2 蛋白在肺癌组的表达均高于对照组, 差异显著($P < 0.05$)。p53 及 MMP-2 蛋白表达之间呈显著正相关($r = 0.533, P < 0.01$)。[结论] 新型半导体免疫荧光标记试剂—量子点结合组织芯片技术(QDs-IHC)可以检测到 p53 及 MMP-2 蛋白在肺癌组织中的表达, p53 及 MMP-2 在肺癌组织中的共表达对肺癌的恶性进展起促进作用。

主题词: 量子点技术; 肺肿瘤; p53; MMP-2

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)06-0456-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.06.B004

Expressions of p53 and MMP-2 in Lung Cancer Tissues and Their Significances

ZHANG Shu-qing, ZHANG Xu-liang

(Central Hospital of Huangshi, Huangshi 435000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of p53 and MMP-2 in lung carcinoma tissues. [Methods] Expression of p53 and MMP-2 in lung carcinoma tissues and normal lung tissues was detected by quantum dots combined with IHC technology (QDs-IHC). [Results] Expressions of p53 and MMP-2 in lung carcinoma tissues was higher than those in control group ($P < 0.05$). Expressions of p53 and MMP-2 in lung carcinoma showed a positive correlation ($r = 0.533, P < 0.01$). [Conclusion] QDs-IHC can be used to detect the expression of p53 and MMP-2. Expression of p53 and MMP-2 might play an important role in predicting the progress of lung carcinoma.

Subject words: quantum dots; lung neoplasms; p53; MMP-2

量子点(quantum dots)是根据传统的免疫荧光主要用同位素和有机荧光染料标记细胞和生物分子来达到这一目的^[1,2]。但学者们都明白同位素和有机染料存在一系列的不足,这样就在一定程度了对其在生物活体内的应用进行一定的干扰。量子点的研究和问世解决了这一系列问题,逐渐成为新一代生物荧光标志物。与传统的有机荧光染料或钌系配合物相比,荧光量子点具有以下光学特性^[3]:①量子点的发射波长可通过控制它的粒径大小来“调谐”,因而可获得多种可分辨的颜色;②大小不一的纳米晶体可以在同一波长光的激发下迸发出不同色谱的可见光,所有激发的光谱波长宽同时呈连续阶段分布,而发射光谱一般为对称分布且宽度窄,这样

导致不同的量子点能在同一波长光的激发下还能在同一时间内使用不同的波长光谱的量子点来进行生物分子来特殊标记鉴别。由于量子点具有普通荧光物质无法比拟的光学特性,因而将其作为荧光探针用于生物分子的标记和检测,从而在细胞定位、信号转导、胞内组分的运动和迁移以及临床诊断等研究中发挥巨大作用,是其在生物科学中最有前途的应用之一^[4]。虽量子点最近几年才引起生物学家的极大关注,但其在生物科学中的应用研究已取得了一些突破性的进展,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

肺癌组织芯片由武汉珈源量子点技术开发有限

通讯作者: 张绪良, 主治医师, 硕士; 黄石市中心医院普爱院区肿瘤外科, 湖北省黄石市西塞山区医院街 293 号 (435000); E-mail: 1816500584@qq.com

收稿日期: 2013-08-02; **修回日期:** 2013-10-14

责任公司(简称武汉量子点公司)构建,点阵设计:10×15,各点直径1.1mm,厚4μm。140例肺癌患者的癌组织,10例非癌变肺组织作为对照组,每例组织均有2点。所有组织来源于外科手术诊疗时的病理标本,所有病理切除标本均经病理医生证实,并且术前患者全部未接受放、化疗,经福尔马林溶液固定24h。

1.2 主要试剂

鼠抗人 p53 多抗和鼠抗人 MMP-2 单抗(Zymed),工作浓度分别为1:200、1:100;羊抗兔、鼠生物素化二抗(配置浓度均为1:500);通用型 SP 试剂盒均购自上海生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 QDs-IHC 检测

p53 及 MMP-2 蛋白表达实验方法等步骤在生命科学领域技术熟练参考相关标准操作,用医用的90%甘油定量滴加生物组织制作的芯片后作为封片,最后在相关技术操作员的指导下上荧光显微镜蓝光激发波长 QD1050,当观察后发现该波谱的信号激发后细胞内主要显示红色的荧光颗粒可定为阳性。用 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性片作阳性对照。镜下观察显示 p53 蛋白定位于细胞膜和细胞质内,但是 MMP-2 却定位于细胞核内的基质中。通过高倍镜观察前提必须是每例组织要取视野4个不同点,而且每个点的视野计数要满足100个细胞数目。根据阳性细胞所占百分比作为评估:阳性细胞数≤10%为阴性,>10%为阳性。

1.3.2 QDs 免疫荧光双标法检测

应在无光线照射的实验室中进行检查。入无光实验室后,检查装置电源是否接通和漏电等情况确保电源及整个操作电路的正确运行,对于线路破坏以及用电器破坏及时更换。在恰当的时间启动超高压水银灯的安全运作,水银灯的运作时间维持在10~15min,进行使用水银灯照明,其目的主要是让光源稳定,因为光源的振荡会造成光强度的失衡,有了稳恒的点光源我们就可以精确地观察其点光源的强度从而更好地把握其适用范围,我们可以事先在密闭的无灯光的黑暗环境中训练操作者的眼睛用以完全适应密闭的空间,操作者再通过荧光显微镜仔细观察病例标本从而判断其阴性和阳性情况,具体操作技术国外文献已报道^[5]。量子点荧光强度级别

的评估主要是根据其发光强度来观察大致分级如下:一般为4级,“-”:无或可见微弱自发荧光。“+”:仅能见到适度的荧光(其强度有限);“++”:能见明亮的荧光,其强度适度;“+++”:荧光强度十分明显,主要表现为荧光耀眼。利用某些荧光素,如 FITC、RPE 等通过化学反应与抗体或其他蛋白结合制备成荧光探针,然后与被测抗原或配体发生特异性结合,形成的荧光复合物在一定波长光的激发下可产生荧光,因此利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测未知抗原或相应配体。p53 及 MMP-2 蛋白共表达实验方法如下:4μm 厚组织芯片,常规脱蜡、水化采用微波加热恢复其表面失去的抗原,在室温中逐渐冷却。PBS 冲洗:3×2min,加2%牛血清白蛋白(BSA)封闭缓冲液,37℃密闭容器中孵育30min;抗原包被→封闭→待检标本→生物素化抗体→洗涤→酶标记亲和素→洗涤→加底物显色和检测:滴加 p53 及 MMP-2 一抗(再次37℃密闭容器中孵育1~2h;PBST(PBS+0.05%Tween 聚山梨酸酯20)漂洗(3×5min),加2%BSA 封闭缓冲液,37℃湿盒孵育10min;滴加用2%BSA 稀释的生物素化羊抗鼠 IgG,37℃密闭容器中孵育30min;滴加用2%BSA 稀释的 QDs(545nm)-IgG (稀释比为1:100)37℃密闭容器中孵育20min;PBST 洗(2×3min),PBS 冲洗(2×3min),90%缓冲硝酸甘油封片,上荧光显微镜紫外同时激发 QDs(605nm)和 QDs(545nm),以细胞内出现橙红色和/或绿色的荧光颗粒为阳性。细胞内外和细胞磷脂双分子层中如果出现信号蛋白其颜色就会发生改变,当我们通过荧光显微镜观察到浅绿色出现在细胞内时提示为 p53 蛋白。p53 蛋白可锚连于胞质和细胞膜的磷脂双分子层中量子点技术可以追踪其踪迹和表达的相关情况,在细胞核内的信号蛋白大量的表达会呈现出颜色的改变,比如我们看到红色的信号光谱这可能是大量的 MMP-2 蛋白表达在细胞基质中。通过荧光显微镜下信号光谱颜色的显现而观察 p53 和 MMP-2 蛋白的共表达情况。

1.4 统计学处理

数据用 SPSS 16.0 软件进行分析和计算,率的比较通过 χ^2 检验或精确概率法。采用 Spearman 相关分析对 p53 及 MMP-2 蛋白进行其相关度的检验和证实。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 QDs-IHC 检测 p53 及 MMP-2 蛋白表达

p53 蛋白主要表达在癌细胞的磷脂双分子胞膜以及细胞的胞质中,在癌旁正常组织 p53 的表达极少(Figure 1)。140 例肺癌组织中 p53 蛋白的阳性率为 72.86%,与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$)。MMP-2 蛋白高表达于细胞核,癌旁正常组织中几乎不表达(Figure 2);140 例肺癌组织中 MMP-2 蛋白的阳性率为 87.14%,与对照组相比差异亦有统计学意义($P<0.01$)(Table 1)。

2.2 QDs 免疫荧光双标法检测

p53 和 MMP-2 蛋白共表达 140 例肺癌组织中, p53 和 MMP-2 蛋白阳性共表达 100 例(Figure 3),共同阴性表达 16 例,两者呈显著正相关($r=0.533, P<0.01$)。

Table 1 Expression of p53 and MMP-2 in lung carcinoma tissues and normal lung tissues

Groups	N	p53			MMP-2		
		-	+	P	-	+	P
Control group	10	10	0	<0.01	8	2	<0.01
Lung carcinoma group	140	38	102		18	122	

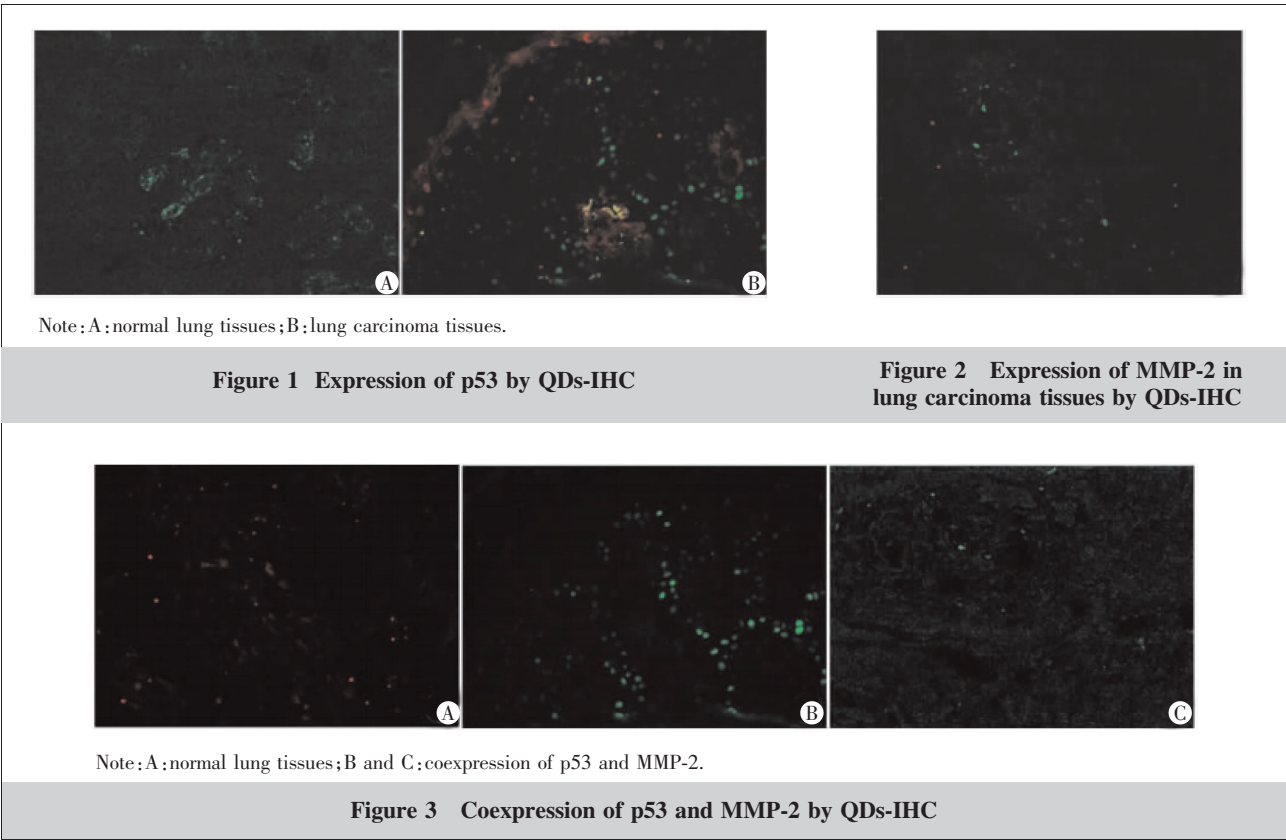
3 讨 论

迄今为止,科学家最普遍用于观察蛋白质或细胞体动态分布的方法还是以化学荧光染料做专一染色,但这样的方法存在着一些限制。首当其冲的便是荧光消失的速度极快,不但局限了目标物质和作用过程的范畴,在观察时也造成许多不方便。另一大困扰即每种有机染料须以不同波长的光激发,不同颜色的染料难以同时使用^[6]。

量子点是人工镉射切割出来的半导体纳米晶体,约 2~10nm,现已可取代传统染色法,成为细胞内的荧光标记^[7]。量子点的物理特性正好克服了荧光染色法的障碍,只需要用单一镉射光即可激发,且其半衰期为 960s,近似有机染剂的 100 倍。另外量子点在照射次数达 100 次时其荧光效率还可达 70%,

不似一般有机染料很快就会被分解。量子点在追踪多种蛋白质或细胞时,只需要一台荧光显微镜,即可记录被色彩编码的目标每一分钟间隔的动态并延续数天之久^[8,9]。

量子点技术对于追踪细胞信号蛋



白的表达以及相关肿瘤蛋白在癌症患者组织中表达情况的相关性能提供可靠性的观察和分析。量子点技术不仅在追踪信号蛋白和在疾病的诊断方面提供一定的帮助,而且,对于生命个体每一个生命过程中蛋白信号的传递提供清晰的线路图。量子点技术在一些疾病的诊断领域具有举足轻重的作用,如神经系统疾病的诊疗给予某些蛋白质的异常表达,我们通过量子点技术就可以分析何种蛋白表达异常。相信随着专一性分类库的陆续建立,量子点的大量生产将为细胞内与细胞间的追踪研究带来一波新的革命^[10]。

本研究发现 p53 与 MMP-2 在肺癌中的表达呈正相关关系,可以推测它们在肺癌的发生、转移和浸润的过程中具有协同作用,可能的原因是 p53 的异常表达,导致细胞外基质的异常,从而引起 MMP-2 的表达异常。但是具体的机制目前还不清楚,因此对它们之间的关系进一步的研究成为必要,在临床上我们可以充分利用 p53 与 MMP-2 的关系来治疗肺癌,因此为临床上进一步治疗肺癌提供一定的分子生物学基础。临床上,对这两个指标的检测可以更强烈地预测肺癌患者的预后,总之,量子点技术关系到在基因表达学、免疫组化学、蛋白信号传递、分子生物学、病理组织学等学科的方方面面,通过开展和深入研究量子点技术对于肿瘤学的发生发展机制有更深层的认识,从而为肿瘤的防治和治疗开辟新天地。

参考文献:

- [1] Zhang H,Su L,Müller S,et al. Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer,2008,99(10):1684-1694.
- [2] Ando T,Ishiguro H,Kimura M,et al. The overexpression of p53 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep,2007,18(3):601-609.
- [3] Karam JA,Lotan Y,Roehrborn CG,et al. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence[J]. Prostate,2007,67(6):614-622.
- [4] Ito Y,Yoshida H,Tomoda C,et al. Caveolin-1 and MMP-2 expression in follicular variant of thyroid papillary carcinoma[J]. Pathol Res Pract,2009,20(1):545-549.
- [5] Tanase CP,Dima S,Mihai M,et al. Caveolin-1 overexpression correlates with tumour progression markers in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. J Mol Histol,2009,40(1):23-29.
- [6] Hung KF,Lin SC,Liu CJ,et al. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein,caveolin-1,in oral carcinogenesis[J]. J Oral Pathol Med,2003,32(8):461-467.
- [7] Nakatani K,Wada T,Nakamura M,et al. Expression of caveolin-1 and its correlation with cisplatin sensitivity in oral squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2005,131(7):445-452.
- [8] Han SE,Park KH,Lee G,et al. Mutation and aberrant expression of MMP-2 in human oral squamous cell carcinomas and oral cancer cell lines[J]. Int J Oncol,2004,24(2):435-440.
- [9] Liu Z,Cai WB,He L,et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice[J]. Nat Nanotechol,2007,2(1):47-52.
- [10] Chen H,Xue J,Zhang Y,et al. Comparison of quantum dots immunofluorescence histochemistry and conventional immunohistochemistry for the detection of p53 and MMP-2 in the lung cancer tissue microarray[J]. J Mol Histol,2009,40(4):261-268.