

Rb2/p130、CyclinD1 在脑胶质瘤中的表达及意义

Expressions of Rb2/p130, CyclinD1 in Gliomas and Their Significance

WANG Ji-wei, YUAN Yu, WANG Qiu-xia, et al.

王冀伟¹, 袁宇¹, 王秋霞², 杨坤³, 邸辉¹, 丁亚楠¹

(1. 河北大学附属医院, 河北保定 071000; 2. 保定市第一中心医院, 河北保定 071000;

3. 定州市卫生中等专业学校, 河北定州 073000)

摘要: [目的] 观察 Rb2/p130、CyclinD1 在脑胶质细胞瘤中的表达及其相关性, 并探讨其与脑胶质细胞瘤临床病理分级关系。[方法] 选取 I~IV 级脑胶质细胞瘤 80 例, 并对其蜡块进行免疫组化 SP 法染色, 检测 Rb2/p130、CyclinD1 在脑胶质细胞瘤中的表达。[结果] 本组 80 例脑胶质细胞瘤中 44 例有不同程度的 CyclinD1 表达, 阳性率为 55.0% (44/80)。不同病理分级的脑胶质细胞瘤中 CyclinD1 的表达有统计学差异。随胶质瘤的恶性度增高, 表达率上升。p130 的阳性率为 71.3% (57/80), 在不同病理分级的胶质瘤中, CyclinD1 表达存在统计学差异, 即随胶质瘤病理分级的增高, p130 的表达率降低。CyclinD1 与 p130 表达呈负相关。[结论] CyclinD1 随脑胶质细胞瘤级别的增高, 其阳性表达逐渐增强, 而 Rb2/p130 则相反。CyclinD1 的正调控与 Rb2/p130 的负调控可能是影响脑胶质细胞瘤发生发展的重要因素。

关键词: 脑胶质细胞瘤; 免疫组化; CyclinD1; Rb2/p130

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** B

文章编号: 1671-170X (2014) 08-0688-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.08.B017

脑胶质细胞瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤, 约占颅内肿瘤的 40%~50%^[1]。目前临床上采取以手术为主的综合治疗, 但治疗效果不理想, 尤其是恶性胶质细胞瘤。虽然其预后随肿瘤分型及其恶性度的不同略有差异, 但总体来说预后较差, 明确胶质瘤的发病机制是提高和改善其诊断与治疗的根源所在。细胞周期机制的破坏, 与胶质瘤的发病机制密切相关。

研究表明, 细胞周期最重要的是 G₁ 和 S 期之间的调控点。因此对 G₁-S 交界处调控点的研究就更为重要。在 G₁-S 调控点发挥重要作用的是细胞周期限速步骤的调控因子 CyclinD1、Rb 等。

Rb 基因家族新成员 Rb2/p130 功能上与 pRb 非常接近, 但不完全相同。为深入研究在脑胶质细胞瘤中 Rb2/p130 是否存在异常, 我们对 80 例脑胶质细胞瘤患者的 Rb2/p130、CyclinD1 进行同时检测。

本实验借助免疫组化技术, 对脑胶质细胞瘤中 CyclinD1、Rb2/p130 蛋白表达的关系进行研究, 探讨它们之间的相互关系及与脑胶质细胞瘤生物学行为的相关性, 深入理解 CyclinD1、Rb2/p130 表达的改变在脑胶质细胞瘤中的重要意义, 从而为脑胶质细胞瘤的诊断和治疗方案的设计提供新的

思路 and 依据。

1 资料与方法

1.1 标本和临床资料

选择河北大学附属医院神经外科于 2009 年 1 月至 2013 年 8 月期间 80 例脑胶质瘤患者手术切除的组织标本。其中男性患者 44 例, 女性 36 例; 年龄 7~72 岁, 中位年龄 46 岁。标本用 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, HE 染色常规病理诊断。按照 Kernohan 神经胶质瘤分类及分级标准^[2], 经病理学检查确诊。其中小脑胶质细胞瘤 3 例, 大脑细胞胶质瘤 77 例; 胶质细胞瘤 I 级 12 例, 胶质细胞瘤 II 级 25 例, 胶质细胞瘤 III 级 20 例, 胶质细胞瘤 IV 级 23 例。本研究中将胶质细胞瘤 I 级与 II 级称为低度恶性组, 将 III 级与 IV 级称为高度恶性组。全部患者术前未进行放疗和化疗, 均是第一次开颅手术切除肿瘤后采集标本。

1.2 试剂

即用型鼠抗 Rb2/p130 单克隆抗体、即用型鼠抗 CyclinD1 单克隆抗体, 均为美国 LifeSpan Biosciences 公司产品, 购自福州迈新生物技术有限公司 (产品编号分别为: MAB-0366, MAB-0016; 克隆号分别为 1A6, 100/D5)。

1.3 实验方法

免疫组化采用链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶 (streptavidin-peroxidase, SP) 法, 即 SP 法。

1.4 结果观察和判断标准

免疫组化玻片由两位病理科医生在不知病理分级与临床资料的情况下读片。以细胞核内出现棕褐色颗粒为 CyclinD1 阳性。Rb2/p130 蛋白染色为标本中细胞浆和/或细胞核内出现均匀、颗粒状、棕褐色染色^[3]。每一张脑胶质细胞瘤切片选取连续的 10~20 个高倍视野 (均为 ×400 的高倍视野), 每个视野计数 100 个细胞, 分别统计其中的所有阳性或阴性细胞, 并计算它们的阳性率。按肿瘤阳性细胞百分比将肿瘤染色结果分为 5 个等级, -: 阳性细胞数在 10% 以下 (低表达), +: 阳性细胞数占 10%~30% (中度表达), ++: 阳性细胞数占 30%~70% (高表达), +++: 阳性细胞数占 70% 以上 (强表达)。阳性和强阳性标本全部统计为阳性组进行统计学处理。

通讯作者: 袁宇, 主治医师, 硕士; 河北大学附属医院神经外科, 河北省保定市裕华路 212 号 (071000); E-mail: autofan100@sina.com
收稿日期: 2013-11-17; **修回日期:** 2013-12-24

1.5 统计学处理

本实验采用 SPSS11.0 文件包中的 χ^2 检验进行实验数据的分析和处理各组间 *CyclinD1*、*Rb2/p130* 基因表达情况, Spearman 等级相关检验来分析 *CyclinD1*、*Rb2/p130* 在脑胶质细胞瘤中表达的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *CyclinD1* 在脑胶质细胞瘤中的表达

CyclinD1 在胶质细胞瘤标本中呈典型胞核表达,核膜染色明显。44 例脑胶质细胞瘤标本中出现阳性细胞,占总标本的 55.0%。高恶性胶质瘤的阳性率明显高于低恶性肿瘤 ($P<0.05$),在较小瘤细胞和细胞密度增大区域 *CyclinD1* 阳性反应增强。胶质瘤 I~II 级中 *Cyclin D1* 表达明显弱于 III~IV 级 (Table 1, Figure 1~4)。

2.2 *Rb2/p130* 蛋白在脑胶质细胞瘤中的表达

由于胶质细胞瘤恶性程度不同,其 *Rb2/p130* 蛋白染色强度及阳性细胞构成比也不同。一般低度恶性阳性细胞以核内棕色为主。高度恶性阳性细胞以核内弥漫性颗粒为主 (Figure 5~7)。低度恶性细胞瘤中,*Rb2/p130* 蛋白阳性表达率为 83.8%,低恶性度组与高度恶性组相比,有显著差异 ($P<0.05$)(Table 1)。

2.3 脑胶质细胞瘤中 *CyclinD1* 表达与 *Rb2/p130* 表达的相关性

在胶质细胞瘤中 *CyclinD1* 和 *Rb2/p130* 表达呈明显负相关关系($r=-0.5941, P<0.05$)(Table 2)。

3 讨论

CyclinD1 在多种恶性肿瘤中存在着过度表达现象,被证实为 *Bcl-1* 原癌基因,与肿瘤的发生、发展联系紧密。虽然至

Table 1 Expression of *Rb2/p130*, *CyclinD1* in gliomas

Pathological grades	N	CyclinD1					Rb2/p130				
		-	+	++	+++	Positive rate(%)	-	+	++	+++	Positive rate(%)
Low grade group	37	24	8	4	1	35.1	6	4	17	10	83.8
High grade group	43	12	3	15	13	72.1*	17	12	10	4	60.5*
Total	80	36	11	19	14	55.0	23	16	27	14	71.3

*:versus low grade group, $P<0.05$

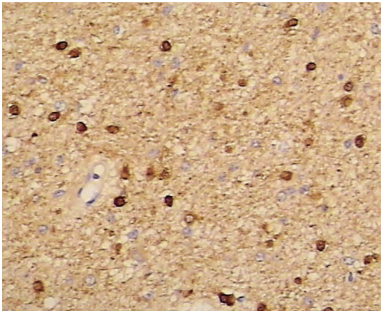


Figure 1 Glioma (WHO I) *CyclinD1* positive expression (SP x200)

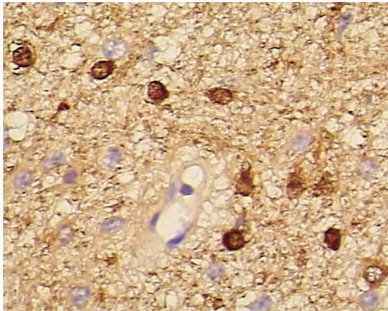


Figure 2 Glioma (WHO I) *CyclinD1* positive expression (SP x400)

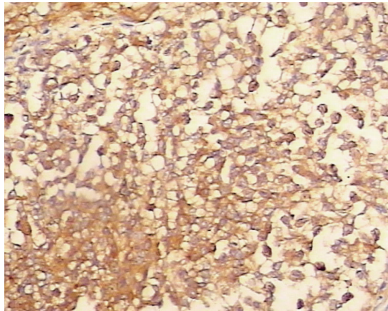


Figure 3 Glioma (WHO III) *CyclinD1* positive expression (SP x200)

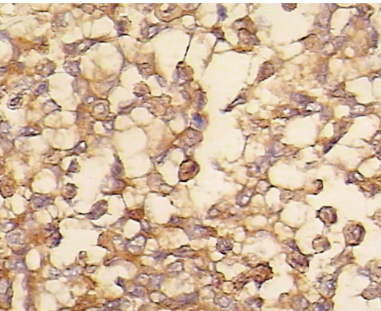


Figure 4 Glioma (WHO III) *CyclinD1* positive expression (SP x400)

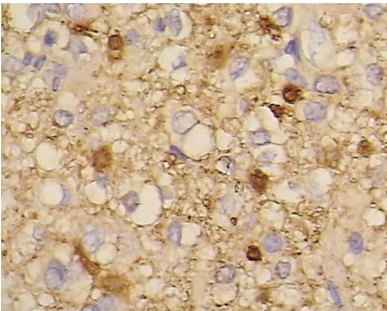


Figure 5 Glioma (WHO I) *Rb2/p130* positive expression (SP x400)

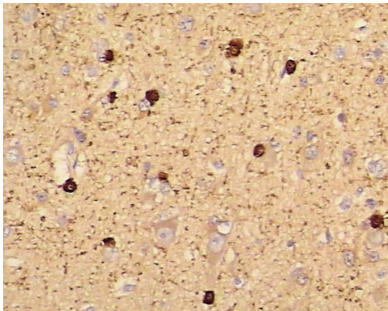


Figure 6 Glioma (WHO IV) *Rb2/p130* positive expression (SP x200)

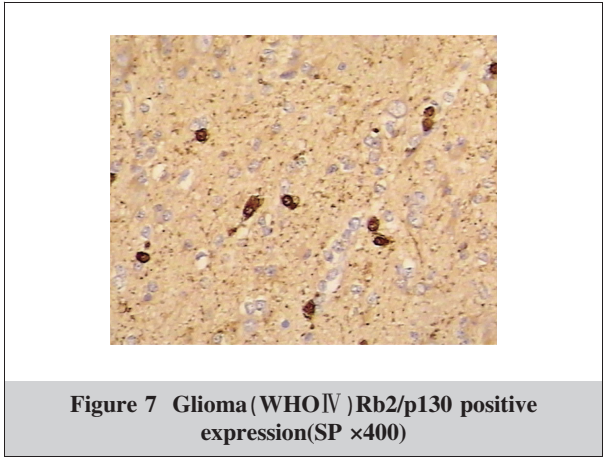


Table 2 The relationship between Rb2/p130 and CyclinD1 expression in gliomas

		Total	CyclinD1		P
			Positive	Negative	
Rb2/p130	Positive	42	35	7	<0.05
	Negative	38	16	22	
Total		80	51	29	

今肿瘤中 CyclinD1 过度表达的意义尚未完全被肯定,但大多数学者认为它是一种重要的促癌因子。目前关于中枢神经系统肿瘤中是否存在 CyclinD1 的过度表达尚有争论。在脑胶质细胞瘤的研究中,大多认为脑胶质细胞瘤中存在 CyclinD1 的过度表达和基因扩增,如 Cavalla 等^[5]对 50 例胶质细胞瘤免疫组化研究显示,胶质瘤中存在 CyclinD1 过表达,其表达程度与肿瘤病理级别成正比。Chakrabarty 等^[6]用免疫组化的方法对 48 例星形细胞瘤进行研究,除认为其表达程度与肿瘤病理级别成正比外,发现在毛细胞型、弥漫性星形细胞瘤与间变性星形细胞瘤和胶质母细胞瘤之间,CyclinD1 的表达存在显著性差异。陈保东等^[7]报道 45 例胶质瘤中 CyclinD1 的阳性表达率为 42.2%,正常脑组织未见 CyclinD1 阳性染色。在高、低度恶性胶质瘤组织中 CyclinD1 的表达差异显著。但尚有不同意见,Numa 等^[8]就在对三株胶质瘤细胞系 CyclinD1 蛋白表达情况进行的研究中未发现表达增多的迹象。国外还有人报道胶质瘤中未发现 CyclinD1 蛋白过度表达^[9]。我们的实验发现,脑胶质细胞瘤中 CyclinD1 的阳性率为 55.0%。随着胶质细胞瘤恶性程度的增高,CyclinD1 的表达水平亦升高。低恶性度组(WHO I~II 级)的阳性率为 35.1%,而高恶性度组(WHO III~IV 级)阳性率为 72.1%,两组有显著性差异($P<0.05$)。这证实 CyclinD1 在胶质瘤的发生、发展中发挥了重要的促进作用,但其机制还不十分清楚。我们推测,CyclinD1 的过度表达系通过高磷酸化 pRb 而启动各种细胞分裂所需基因,推动细胞进入 S 期加快细胞增殖周期,进而实现正常胶质细胞向肿瘤细胞的转化。Buschges 等^[10]进一步证明,在恶性胶质瘤(胶质母细胞瘤)中存在 CyclinD1 基因扩增,进而从

基因方面证明 CyclinD1 对于肿瘤发生的重要作用。

视网膜母细胞瘤(Rb)基因是第一个被证实的抑癌基因,位于人类染色体 13q14 上,长约 200kb。Rb 蛋白的主要功能是与转录因子 E2F 结合,后者能与某些基因(如 *myc*、*myb*、DNA 多聚酶等)的启动子区结合,从而调节细胞周期。当 cyclin D 和/或 CDK4 磷酸化 pRb 后,这些启动子促进了细胞从 G₁ 向 S 期的演化,因此 Rb 通路是控制细胞通过 G₁“检查点”的关键细胞周期调节因子,由于肿瘤细胞 Rb 蛋白表达缺失或减弱将加快肿瘤细胞增殖周期。Rb2/p130 基因属 Rb 基因家族,是一个典型的抑癌基因,Rb2/p130 蛋白的主要功能是与 E2F 结合从而调控细胞周期^[11],Rb2/p130 在人体内的各种正常组织中具有广泛的表达,而其发生异常或缺失与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[12-14]。研究表明,pRb2/p130 参与维持 G₀ 期细胞的转录静止,此外还参与调控 G₀/G₁ 期的过渡,pRb2/p130 也参与细胞分化和 G₁/G₀ 期的过渡。Rb2/p130 基因低表达或阴性表达在很多恶性肿瘤中是一个频发事件。国内外已有一些学者利用免疫组化技术对人脑胶质细胞瘤中 Rb2/p130 基因表达进行较为深入的研究,发现它随着胶质细胞瘤恶性程度的升高表达率下降,呈现负相关^[4]。Tsuzuki 等^[15]研究发现,13%星形细胞瘤出现 Rb 基因突变,且均为 IV 型胶质瘤,但 21.7%星形细胞瘤 Rb 蛋白表达为缺失。Puduvalli 等^[16]通过免疫组化的方法研究发现,67.5%间变型星形细胞瘤和 47.5%多形性胶质母细胞瘤出现 Rb 表达缺失或降低。

通过对 Rb2/p130 基因表达进行较为深入的研究说明了 Rb2/p130 基因作为抑癌基因在人脑胶质细胞瘤中表达下降,造成细胞异常增殖,导致肿瘤发生发展。Rb2/p130 表达下降也使其促进细胞分化功能下降,使低分化的胶质细胞瘤细胞增多,是胶质细胞瘤发生发展、侵袭性强、预后不佳的重要原因之一,可作为胶质细胞瘤预后评价的参考指标之一。

在本实验的 80 例胶质细胞瘤中 Rb2/p130 的失表达率为 28.7%,CyclinD1 的过表达率为 55.0%。致癌基因 CyclinD1 的过表达和抑癌基因 Rb 的失表达均主要见于具有恶性生物学行为的 III、IV 级,Rb2/p130 的失表达率及 CyclinD1 的过表达率与组织学分级成正相关($P<0.05$)。Rb2/p130、CyclinD1 的异常表达均有检出,其中 Rb2/p130、CyclinD1 蛋白在恶性胶质细胞瘤表达两者之间存在负相关($r=-0.5941$)。这其中可能的机制是:CyclinD1 过表达可促进 Rb2/p130 磷酸化,或通过 Cdk4/Cdk6 形成复合物使 Rb2/p130 磷酸化,磷酸化可使 Rb2/p130 与细胞内蛋白形成复合物的能力丧失,影响 Rb2/p130 的功能导致失活;当 Rb2/p130 磷酸化不足时又可以促进 CyclinD1 的表达,CyclinD1 蛋白的合成与活化又导致 Rb2/p130 蛋白磷酸化^[17,18],由此 CyclinD1 的表达与 Rb2/p130 的磷酸化构成一个反馈环。当 CyclinD1 蛋白过度表达或功能性 Rb2/p130 蛋白减少时,既不能与 E2F 形成复合体,也不能提供 Rb2/p130 蛋白本身磷酸化抑制 CyclinD1 基因的转录,可使细胞持续性增殖^[19,20]。可见,两种基因异常表达与胶质瘤生

物学行为密切相关,可作为检测该瘤恶性程度的指标之一。

参考文献:

- [1] Eck SL, Alavi JB, Alavi A, et al. Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010 RSVTK: a phase I trial [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(12): 1465–1482.
- [2] Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system [J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61(3): 215–225.
- [3] Claudio PP, De Luca A, Howard CM, et al. Function analysis of pRb2/p130 interaction with cyclins [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(9): 2003–2008.
- [4] Li Q, Sakurai Y, Ryu T, et al. Expression of Rb2/p130 protein correlates with the degree of malignancy in gliomas [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2004, 21(3): 121–125.
- [5] Cavalla P, Dutto A, Piva R, et al. CyclinD1 expression in glioma [J]. *Acta Neuropathol*, 1998, 95(2): 131–135.
- [6] Chakrabarty A, Bridges LR, Gray S, et al. CyclinD1 in astrocytoma tumors: an immunohistochemistry study [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1996, 22(4): 311–316.
- [7] Chen BD, Zhong X, Li W, et al. Significance of NF- κ B and CyclinD1 expression in the gliomas [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2003, 9(1): 16–18. [陈保东, 钟霞, 黎文, 等. 胶质瘤中 NF- κ B、CyclinD1 的表达及意义 [J]. *肿瘤学杂志*, 2003, 9(1): 16–18.]
- [8] Numa Y, Tsukazaki Y, Yamamoto M, et al. Cyclin protein expression on malignant glioma cells [J]. *Hum Cell*, 1998, 11(1): 21–26.
- [9] Gillett C, Smith P, Gregory W, et al. CyclinD1 and prognosis in human breast cancer [J]. *Cancer*, 1996, 69(4): 92–99.
- [10] Buschges R, Weber RC, Actor B, et al. Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas [J]. *Brain Pathol*, 1999, 9(3): 435–442.
- [11] Schwarze F, Meraner J, Lechner M, et al. Cell cycle-dependent acetylation of Rb2/p130 in NIH3T3 cells [J]. *Oncogene*, 2010, 29(42): 5755–5760.
- [12] Claudio PP, Howard CM, Pacilio C, et al. Mutations in the retinoblastoma-related gene Rb2/p130 in lung tumors and suppression of tumor growth in vivo by retrovirus-mediated gene transfer [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(2): 372–382.
- [13] Howard CM, Claudio PP, Gallia GL, et al. Retinoblastoma-related protein pRb2/p130 and suppression of tumor growth in vivo [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(19): 1451–1460.
- [14] Pupa SM, Howard CM, Invernizzi AM, et al. Ectopic expression of pRb2/p130 suppresses the tumorigenicity of the c-erbB-2-overexpressing SKOV3 tumor cell line [J]. *Oncogene*, 1999, 18(3): 651–656.
- [15] Tsuzuki T, Tsunoda S, Sakaki T, et al. Alterations of retinoblastoma, p53, p16 (CDKN2), and p15 genes in human astrocytomas [J]. *Cancer*, 1996, 78(2): 287–293.
- [16] Puduvali VK, Kyriakis AP, Hess KR, et al. Patterns of expression of Rb and p16 in astrocytic gliomas, and correlation with survival [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(5): 963–969.
- [17] Rao SS, Chu C, Khotz DS. Ectopic expression of CyclinD1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic-helix-loop-helix regulators [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(8): 5259–5267.
- [18] Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation [J]. *TIBS*, 1990, 15(10): 378–383.
- [19] Muller H, Lukas J, Schneider A. CyclinD1 expression is regulated by the retinoblastoma protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(8): 2945–2949.
- [20] Fan J, Bertino JR. Function roles of E2F in cell cycle regulation [J]. *Oncogene*, 1997, 14(10): 1191–1195.