

MDM2 在去分化脂肪肉瘤中的表达及临床意义

栗杰, 肖何, 李梦侠, 陈川

(陆军军医大学陆军特色医学中心, 重庆 400042)

摘要: [目的] 探讨鼠双微粒体 2 (MDM2) 在去分化脂肪肉瘤 (DDLPS) 中的表达及其临床意义。[方法] 选取 2013 年 4 月至 2021 年 12 月陆军军医大学陆军特色医学中心收治的 27 例 DDLPS 患者的组织标本, 分别利用免疫组化和荧光原位杂交 (FISH) 法检测肿瘤组织中 MDM2 的表达, 并收集患者影像学、治疗方式、随访信息等相关临床病理资料。采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法分析不同 MDM2 表达组间临床特征构成比差异。采用 Kaplan-Meier 和 Log-rank 法分析不同 MDM2 表达组间无复发生存期和总生存期的差异。[结果] 27 例 DDLPS 患者中免疫组化检测 MDM2 的阳性表达率为 55.6%, 而 FISH 检测 MDM2 基因扩增阳性表达率为 100%。MDM2 表达与性别、年龄、吸烟史、饮酒史、肿瘤家族史、肿瘤部位、肿瘤大小、是否手术、临床分期均无显著性相关 (P 均 >0.05)。免疫组化 MDM2 阴性患者中位无复发生存期为 26 个月, 而 MDM2 阳性患者中位无复发生存期为 10 个月, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.013, P=0.045$)。[结论] 免疫组化检测组织 MDM2 的表达可能作为 DDLPS 预后的判断指标。

关键词: 去分化脂肪肉瘤; 鼠双微粒体 2; 免疫组织化学; 预后; 临床意义

中图分类号: R739.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2023)03-0226-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2023.03.B010

Expression and Clinical Significance of MDM2 in Dedifferentiated Liposarcoma

SU Jie, XIAO He, LI Meng-xia, CHEN Chuan

(Army Medical Center of Army Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and clinical significance of murine double minute 2 (MDM2) in dedifferentiated liposarcoma (DDLPS). [Methods] The tumor tissue samples were collected from 27 patients with DDLPS admitted to Army Medical Center of Army Medical University from April 2013 to December 2021. The expression of MDM2 in tumor tissues was detected by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization (FISH), respectively. The association of MDM2 expression with clinicopathological features of DDLPS patients was analyzed, the relapse-free survival and overall survival in patients with different MDM2 expression was compared by Kaplan-Meier method and Log-rank test. [Results] The positive expression rate of MDM2 detected by immunohistochemistry was 55.6% in DDLPS patients, while the positive rate of MDM2 gene amplification detected by FISH was 100%. The expression of MDM2 was not correlated with gender, age, history of smoking and drinking, family history, tumor location and size, surgical treatment and clinical stage (all $P>0.05$). According to immunohistochemistry, the median relapse-free survival of MDM2-negative and MDM2-positive patients was 26 months and 10 months, respectively ($\chi^2=4.013, P=0.045$). [Conclusion] The expression of MDM2 in tumor tissues detected by immunohistochemistry may be of prognostic significance for DDLPS patients.

Subject words: dedifferentiated liposarcoma; murine double minute 2; immunohistochemistry; prognosis; clinical significance

去分化脂肪肉瘤 (dedifferentiated liposarcoma,

DDLPS) 是一种从非典型脂肪瘤/高分化脂肪肉瘤向非脂肪源性肉瘤过渡的侵袭性、高度恶性肿瘤, 预后较差^[1-2]。临床上 DDLPS 的治疗以手术切除为主, 而对于无法手术的局部晚期或转移性患者来说, 化疗和局部放疗是常用的治疗手段。目前相关研究报道

基金项目: 重庆市自然科学基金杰出青年科学基金项目 (cstc2019jcyjqq X0008)

通信作者: 李梦侠, E-mail: Mengxia.li@outlook.com;

陈川, E-mail: sinkriver@126.com

收稿日期: 2022-12-02; **修回日期:** 2023-01-05

原发性DDLPS患者的5年生存率为51.5%,其中手术治疗患者的5年生存率为41.9%,放疗患者的5年生存率为59.0%,而化疗患者的5年生存率仅为37.6%^[3-5]。此外,目前临床上尚无研究证实对DDLPS患者进行预后判断的特异性的分子生物标志物。本文收集分析陆军军医大学陆军特色医学中心收治的27例DDLPS患者的临床病理资料,通过检测DDLPS组织中鼠双微粒体2(murine double minute 2,MDM2)的表达,探讨MDM2表达在DDLPS中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取陆军军医大学陆军特色医学中心2013年4月至2021年12月收治的27例DDLPS患者。患者均行手术或穿刺活检并经病理明确诊断为DDLPS。收集临床病理资料,包括性别、年龄、吸烟史、饮酒史、肿瘤家族史、肿瘤部位、肿瘤大小、分期、首发症状、基础合并症、既往病史等情况。本研究经陆军军医大学陆军特色医学中心伦理委员会审批[医研伦审(2022)第158号]。

1.2 影像学检查

影像学检查结果包括腹部平扫或增强CT、腹部平扫或增强MRI、四肢平扫或增强CT、四肢平扫或增强MRI,以及PET/CT检查。

1.3 免疫组化方法及结果判读

标本均经10%中性甲醛固定液固定,常规石蜡包埋,切成4 μm厚连续切片,二甲苯、无水乙醇脱蜡,PBS冲洗3次,枸橼酸抗原修复液进行抗原热修复,PBS液冲洗3次,加入阻断内源性过氧化物酶,室温下放置10 min,PBS液冲洗3次,滴加MDM2抗体(稀释比例为1:400,购自福州迈新生物技术开发有限公司)或CDK4抗体(稀释比例为1:200,购自广州安必平医药科技股份有限公司),4℃过夜,PBS液冲洗3次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育30 min,然后PBS液冲洗3次,滴加DAB显色液进行显色,清水冲洗后苏木素复染,脱水、透明、封片后进行镜下观察。

免疫组化结果判读^[6-7]:MDM2阳性定位于细胞核。根据细胞核染色程度进行评分:0分为无染

色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色或黑色。根据阳性细胞占肿瘤细胞总数的百分比进行评分:<5%为0分;5%~25%为1分;26%~50%为2分;51%~75%为3分;>75%为4分。两者评分的乘积<3分为阴性;≥3分为阳性。

1.4 FISH 检测方法及结果判读

10%中性甲醛固定液固定后石蜡包埋、切片,然后在柠檬酸缓冲液中进行预处理,蛋白酶消化组织,冲洗切片后固定,加入FISH探针(购自广州安必平医药科技股份有限公司),在75℃条件下变性10 min,37℃杂交16~20 h,柠檬酸钠缓冲液洗脱,然后用含有4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)的荧光固定介质对切片染色,荧光显微镜对结果进行评估。

FISH检测结果判读:随机选择3个视野,观察100个肿瘤细胞核,对其进行MDM2信号(红色信号)与内对照信号(绿色信号)计数。MDM2信号数(红色信号)与内对照信号数(绿色信号)比值≥2或MDM2信号(红色信号)成簇分布为扩增阳性;比值<2为阴性。

1.5 随访

27例患者治疗后均痊愈或症状缓解后出院,住院时间10~37 d,平均18 d。27例患者治疗后均获随访,随访内容包括患者无复发生存时间及总生存时间,随访截止日期2021年12月21日。随访时间为1~42个月,中位随访时间为10个月。

1.6 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法分析不同MDM2表达组间临床特征构成比差异。采用Kaplan-Meier和Log-rank法分析不同MDM2表达组间无复发生存期和总生存期的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料

27例DDLPS患者(Table 1),男性14例,女性13例;发病年龄34~84岁,中位年龄59岁。根据影像学资料统计肿瘤累及部位:腹膜后11例(40.7%),四肢4例(14.8%),腹盆腔4例(14.8%),肾2例(7.4%),肾上腺1例(3.7%),胃1例(3.7%),胰腺1例(3.7%),骶骨1例(3.7%),纵隔1例(3.7%),肺转移1例

Table 1 Basic information of 27 patients of dedifferentiated liposarcoma

Characteristic	N (%)
Gender	
Male	14 (51.9)
Female	13 (48.1)
Age (years old)	
≤50	20 (74.1)
>50	7 (25.9)
History of smoking	
Yes	3 (11.1)
No	24 (88.9)
History of drinking	
Yes	2 (7.4)
No	25 (92.6)
Family history of tumor	
Yes	1 (3.7)
No	26 (96.3)
Tumor site	
Retroperitoneal	11 (40.7)
Limbs	4 (14.8)
Other	12 (44.5)
Tumor size (cm)	
≥20	20 (74.1)
<20	7 (25.9)
Operation	
Yes	23 (85.2)
No	4 (14.8)
Tumor stage	
I ~ II	8 (29.6)
III ~ IV	19 (70.4)

(3.7%)。既往脂肪肉瘤手术史 5 例,结肠腺癌病史 1 例,有肿瘤家族史 1 例(父亲肺癌)。既往合并高血压 8 例、糖尿病 5 例。

2.2 病理结果分析

27 例 DDLPS 患者中手术标本 23 例,穿刺标本 4 例。大体表现:肿瘤一般体积较大,通常在 10 cm 以上,有时可达 30 cm 以上。形态上呈单结节或多结节状,边界清楚,通常具有完整的包膜,切面形态不一,多有黏滑感,呈灰黄灰褐色或灰白色,部分可见出血或坏死区域。肿瘤质地不均,可呈质软、质韧、质硬或鱼肉样等改变,部分与周围组织器官粘连。镜

下可见脂肪肉瘤及去分化成分,两者通常有相对清楚的分界,表现为突然的过渡;但有时界线并不清楚,呈相互镶嵌状或逐渐移行(Figure 1)。

27 例患者均行 MDM2、CDK4 免疫组化(Figure 2),其中 MDM2 阳性 15 例,阴性 12 例,MDM2 阳性表达率为 55.6%。CDK4 阳性 23 例,阴性 4 例,CDK4 阳性表达率为 85.2%。MDM2 基因扩增阳性表达率为 100%(Figure 3)。

2.3 MDM2 对无复发生存期及总生存期的预后作用

MDM2 阳性和阴性表达组患者的性别、年龄、吸烟史、饮酒史、肿瘤家族史、肿瘤部位、肿瘤大小、是否手术、分期构成比例均无显著性差异(Table 2)。MDM2 阳性患者中位无复发生存期为 10 个月(95% CI:7.634~12.366),而 MDM2 阴性患者中位无复发生存期 26 个月,两组间无复发生存期有显著性差异($\chi^2=4.013, P=0.045$)。MDM2 阴性患者总生存率明显高于阳性患者,MDM2 阴性患者在随访期间内无一例死亡(Figure 4),但由于例数较少而未达到统计学意义。

3 讨 论

在临床实践中,即使是同一部位的 DDLPS,不同患者的预后仍存在明显的差异。本研究通过对 DDLPS 患者相关指标的单因素分析发现,MDM2 表达与患者预后明显相关。目前多个研究证实 MDM2 是多种肿瘤患者预后相关的生物标志物。MDM2 高表达与子宫内膜癌、睾丸生殖细胞肿瘤患者的预后相关[8-9]。Ye 等[10]研究发现 MDM2 是食管鳞癌预后不良的生物标志物;腹膜后脂肪肉瘤术后的患者 MDM2 阳性可能提示预后较差[11]。本研究结果表明,

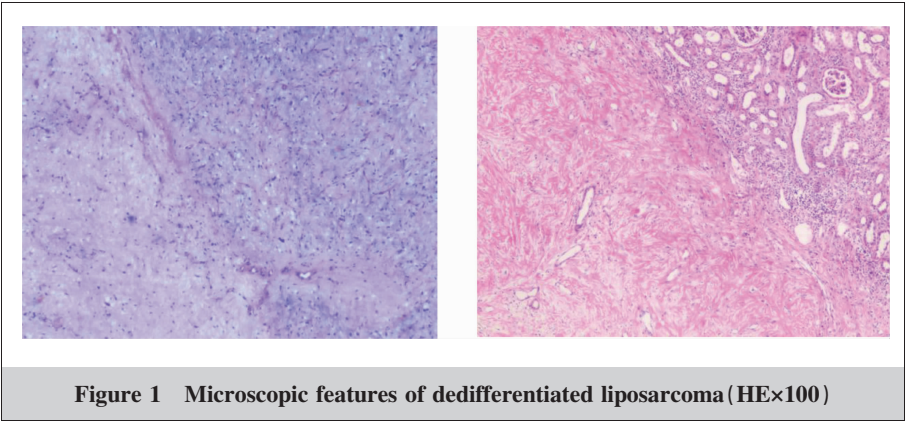


Figure 1 Microscopic features of dedifferentiated liposarcoma (HE×100)

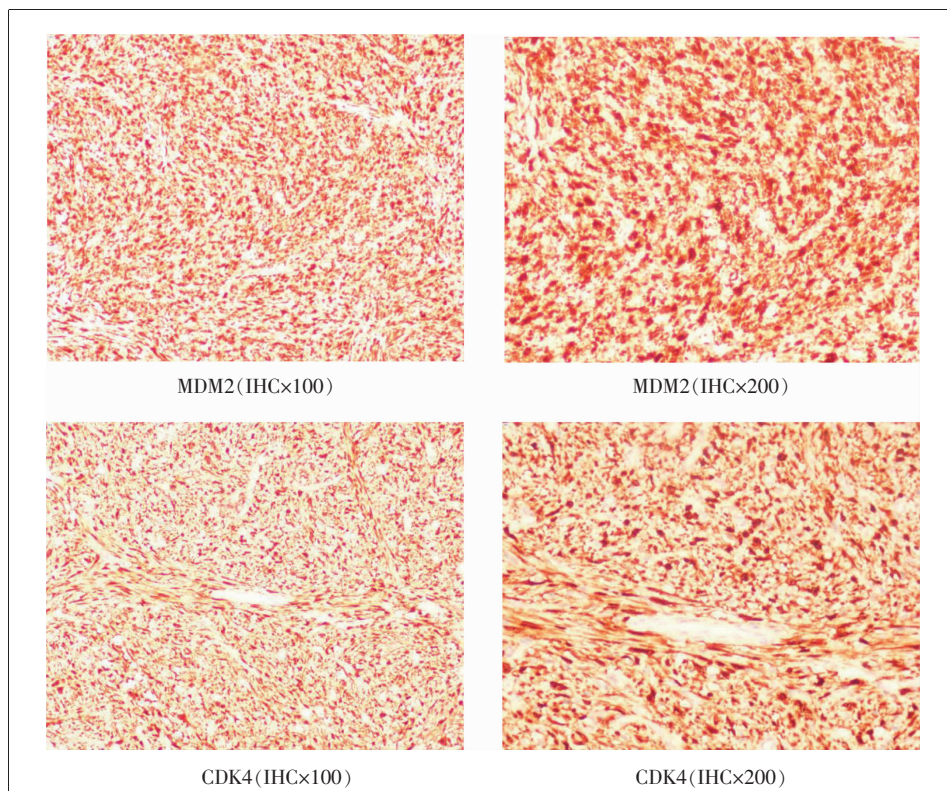


Figure 2 Expression of MDM2 and CDK4 in dedifferentiated liposarcoma

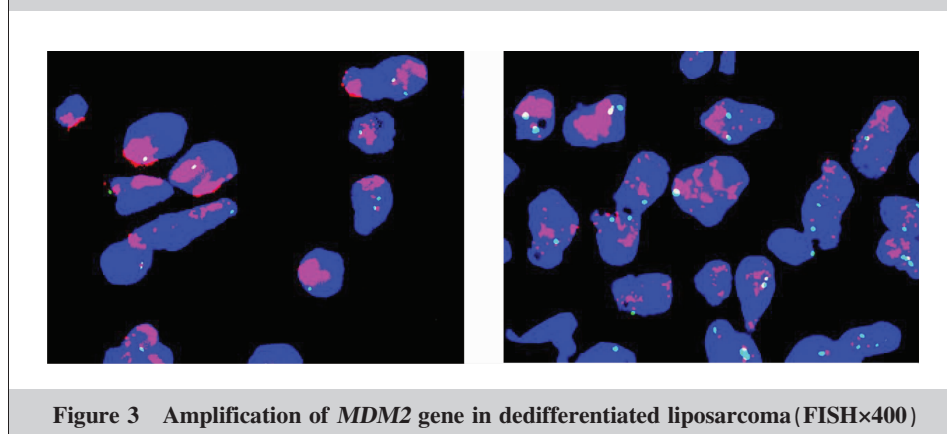


Figure 3 Amplification of MDM2 gene in dedifferentiated liposarcoma(FISH×400)

MDM2 与 DDLPS 患者预后密切相关,MDM2 阳性患者无复发生存期明显低于阴性患者 (中位无复发生存期:10 个月 vs 26 个月, $P=0.045$)。

MDM2 最初是在自发转化的小鼠细胞系中被发现的^[12],在人体正常组织器官中也能观察到其表达。MDM2 位于染色体 12q13~15 区域,通过诱导细胞周期停滞在 G₁ 期等方式调控细胞周期进程,进而参与正常细胞的增殖与分化^[13-14]。此外,MDM2 也是 p53 信号通路中关键的负性调节因子^[15],在调控 p53 转录活性、蛋白质稳定性等方面发挥着重要作用^[16-17]。

本研究发现 MDM2 阳性患者的无复发生存期明显低于阴性患者,其可能的原因在于 MDM2 通过负向调控 p53 表达,使其对肿瘤的抑制功能失活,从而导致肿瘤在短期内生长和复发。因此选择针对 MDM2 靶点的抑制剂可能使 MDM2 阳性患者从中获益。目前针对 MDM2 抑制剂的临床试验出现了一些令人欣喜的临床结果,部分患者在使用 MDM2 抑制剂后肿瘤处于相对稳定的状态,一些患者甚至出现了肿瘤的部分缓解^[18-19]。因此,从目前研究结果来看,以 MDM2 为靶点的治疗策略具有广阔的前景。

此外,本研究还发现,DDLPS 患者组织行 FISH 检测 MDM2 基因扩增阳性率为 100%,而免疫组化 MDM2 阳性表达率仅为 55.6%,两者之间存在一定的差异。众所周知,基因的表达到蛋白形成涉及转录和翻译等诸多过程,其中 DNA 经过转录后的 RNA 需要经过戴帽、加尾和剪

接等过程才能成为成熟的 mRNA,而从 mRNA 到蛋白质的过程还涉及到翻译和翻译后修饰等。这些过程中有多种不确定因素会对基因的表达产生影响。因此,FISH 检测和免疫组化检测可能存在一定的差异,当然这种情况也同样存在于 ALK、PD-L1 等基因表达的鉴定中^[20-21]。

本研究也存在一定的局限性。首先,本研究为回顾性研究,且因样本数量较少,而未能对其进行独立预后分析;其次,虽然 MDM2 表达与 DDLPS 预后密切相关,但是最终将 MDM2 作为 DDLPS 患者疗效

Table 2 Relationship of MDM2 expression with clinical indicators in dedifferentiated liposarcoma

Characteristic	MDM2		χ^2	P
	Negative (n=12)	Positive (n=15)		
Gender				
Male	8(66.7)	6(40.0)	1.899	0.168
Female	4(33.3)	9(60.0)		
Age(years old)				
≥50	8(66.7)	12(80.0)	0.118	0.731
<50	4(33.3)	3(20.0)		
History of smoking				
Yes	3(25.0)	0	2.067	0.150
No	9(75.0)	15(100.0)		
History of drinking				
Yes	2(16.7)	0	-	0.188
No	10(83.3)	15(100.0)		
Family history of tumor				
Yes	0	1(6.7)	-	1.000
No	12(100)	14(93.3)		
Tumor site				
Retroperitoneal	5(41.7)	6(40.0)	0.287	1.000
Timbs	2(16.6)	2(13.3)		
Other	5(41.7)	7(46.7)		
Tumor size(cm)				
<20	2(16.7)	5(33.3)	0.292	0.589
≥20	10(83.3)	10(66.7)		
Operation				
Yes	9(75.0)	14(93.3)	0.620	0.431
No	3(25.0)	1(6.7)		
Tumor stage				
I ~ II	3(25.0)	5(33.3)	0.002	0.962
III ~ IV	9(75.0)	10(66.7)		

预测的生物标志物还需要大样本、前瞻性、多中心研究加以验证。

总之，本研究结果证实免疫组化检测组织MDM2的表达可能作为DDLPS预后的判断指标。

参考文献：

[1] Kilpatrick SE. Dedifferentiated liposarcoma: a comprehensive historical review with proposed evidence-based guidelines regarding a diagnosis in need of further clarification[J]. Adv Anat Pathol,2021,28(6):426-438.

[2] Lu J,Wood D,Ingley E,et al. Update on genomic and molecular landscapes of well-differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma[J]. Mol Biol Rep,2021,48(4):3637-3647.

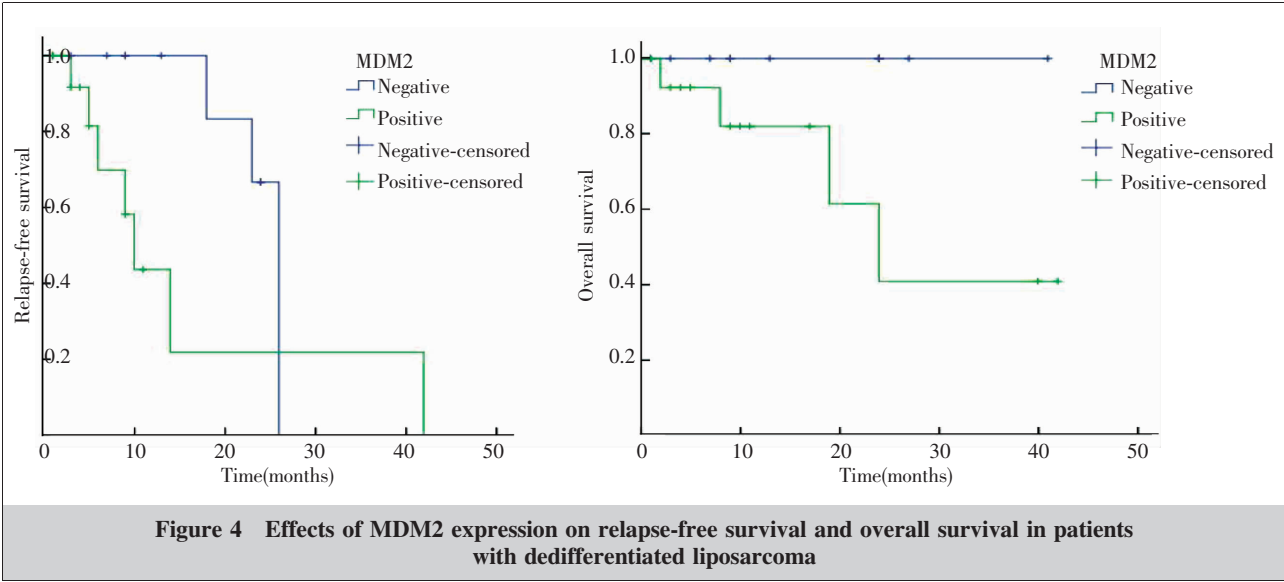
[3] Nishio J,Nakayama S,Nabeshima K,et al. Biology and management of dedifferentiated liposarcoma: state of the Art and perspectives[J]. J Clin Med,2021,10(15):3230.

[4] Gahvari Z,Parkes A. Dedifferentiated liposarcoma: systemic therapy options[J]. Curr Treat Options Oncol,2020,21(2):15.

[5] Gootee J,Aurit S,Curtin C,et al. Primary anatomical site,adjuvant therapy,and other prognostic variables for dedifferentiated liposarcoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2019,145(1):181-192.

[6] 任鲁宁,王欢,朱占胜,等. MDM2 及 p53 在甲状腺滤泡癌中的表达及与甲状腺滤泡癌发生、发展的相关性[J]. 中国老年学杂志,2022,42(8):1833-1835.

Ren LN,Wang H,Zhu ZS,et al. Expression and correlation of MDM2 and p53 in thyroid follicular carcinoma[J].



- Chinese Journal of Gerontology, 2022, 42(8): 1833–1835.
- [7] 刘宁利, 桑洁. 甲状腺乳头状癌组织中 FOXQ1 和 CDK4 的表达与临床病理特征及预后的相关性研究[J]. 局解手术学杂志, 2022, 31(9): 825–829.
- Liu NL, Sang J. Correlation of FOXQ1 and CDK4 expressions with clinicopathological features and prognosis in papillary thyroid carcinoma[J]. Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery, 2022, 31(9): 825–829.
- [8] Weijiao Y, Fuchun L, Mengjie C, et al. Immune infiltration and a ferroptosis-associated gene signature for predicting the prognosis of patients with endometrial cancer[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(12): 16713–16732.
- [9] Lobo J, Alzamora MA, Guimarães R, et al. p53 and MDM2 expression in primary and metastatic testicular germ cell tumors: association with clinical outcome[J]. Andrology, 2020, 8(5): 1233–1242.
- [10] Ye J, Zhang L, Li Z, et al. High expression of MDM2 and the p53 protein is predictive biomarkers for poor prognosis of oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Manag Res, 2021, 13: 2733–2744.
- [11] 黄晓东, 李沛雨, 卢灿荣, 等. 腹膜后脂肪肉瘤切除术后免疫组化标记物 MDM2、CDK4、Ki-67 与其预后的关系[J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(1): 34–38.
- Huang XD, Li PY, Lu CR, et al. Prognostic factors of immunohistochemical markers MDM2, CDK4, Ki-67 in retroperitoneal liposarcoma [J]. Academic Journal of Chinese PLA Medical School, 2016, 37(1): 34–38.
- [12] Zhang J, Kong X, Zhang Y, et al. MDM2 is a target and mediator of IRP2 in cell growth control [J]. FASEB J, 2020, 34(2): 2301–2311.
- [13] Traweck RS, Cope BM, Roland CL, et al. Targeting the MDM2-p53 pathway in dedifferentiated liposarcoma [J]. Front Oncol, 2022, 12: 1006959.
- [14] Hernandez-Monge J, Martínez-Sánchez M, Rousset-Roman A, et al. MDM2 regulates RB levels during genotoxic stress[J]. EMBO Rep, 2021, 22(1): e50615.
- [15] Munisamy M, Mukherjee N, Thomas L, et al. Therapeutic opportunities in cancer therapy: targeting the p53-MDM2/MDMX interactions[J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(12): 5762–5781.
- [16] Wang W, Qin JJ, Rajaei M, et al. Targeting MDM2 for novel molecular therapy: beyond oncology[J]. Med Res Rev, 2020, 40(3): 856–880.
- [17] Allahbakhshian Farsani M, Rafiee M, Aghaee Nezhad H, et al. The expression of p53, MDM2, c-myc, and p14^{ARF} genes in newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia patients[J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2020, 36(2): 277–283.
- [18] Haddox CL, Riedel RF. Recent advances in the understanding and management of liposarcoma[J]. Fac Rev, 2021, 10: 1.
- [19] Gluck WL, Gounder MM, Frank R, et al. Phase 1 study of the MDM2 inhibitor AMG 232 in patients with advanced p53 wild-type solid tumors or multiple myeloma[J]. Invest New Drugs, 2020, 38(3): 831–843.
- [20] Canterbury CR, Fernandes H, Crapanzano JP, et al. ALK gene rearrangements in lung adenocarcinomas: concordance of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, RNA in situ hybridization, and RNA next-generation sequencing testing[J]. JTO Clin Res Rep, 2021, 2(10): 100223.
- [21] Zerdas I, Karafousia V, Mezheyski A, et al. Discordance of PD-L1 expression at the protein and RNA levels in early breast cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(18): 4655.