

Rb 基因、Rb2/p130 基因在骨肉瘤中的表达与相关性

李世德¹, 张向敏², 卓祥龙¹

Expression and Relativity of Rb, Rb2/p130 Gene in Osteosarcoma

LI Shi-de¹, ZHANG Xiang-min², ZHUO Xiang-long¹

1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Orthopedics, Luzhou No. 3 Hospital

Corresponding Authors: ZHANG Xiang-min, E-mail: jedzm2003@yahoo.com.cn

Abstract Objective To evaluate the relationship between the expression of Rb and Rb2/p130 gene in osteosarcoma, and examine their possible effects on carcinogenesis and progression of osteosarcomas.

Methods Sixty-two cases of osteosarcoma and 39 cases of osteochondroma and 51 cases of normal bone tissues were examined with the method of SP immunohistochemistry. **Results** The results of the study showed: 1. The expression rate of Rb, Rb2/p130 gene in osteosarcoma was respectively 38.71% and 27.42%, and in osteochondroma was respectively 84.62% and 76.92%, and in normal bone tissue was respectively 94.12% and 82.35%. 2. Both the expression rate of Rb and Rb2/p130 gene in osteosarcoma was lower than that in osteochondroma and normal bone tissue ($P < 0.01$). 3. There was no significant difference between the expression rates of Rb and Rb2/p130 in osteochondroma and normal bone tissue ($P > 0.05$). 4. There was significant positive correlations between the expression of Rb and Rb2/p130 gene in osteosarcoma ($r = 0.5265$, $P < 0.01$). **Conclusion** These results demonstrated low expression of Rb and Rb2/p130 gene may involve in the carcinogenesis and the development of osteosarcoma and can reflect the malignant degree and prognosis of osteosarcoma.

Key words Osteosarcoma; Rb gene; Rb2/p130 gene; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)中 Rb 基因、Rb2/p130 基因表达情况及两者间的相关性。**方法** 用免疫组织化学 SP 法检测 Rb、Rb2/p130 基因在 62 例 OS、39 例骨软骨瘤及 51 例非肿瘤患者患旁正常骨组织中的蛋白表达情况。**结果** 1. OS 组中 pRb、pRb2/p130 阳性率分别为 38.71%、27.42%; 2. 骨软骨瘤组中两者的阳性率分别为 84.62%、76.92%; 3. 正常骨组织组中两者的阳性率分别为 94.12%、82.35%; 4. OS 组与骨软骨瘤组及正常骨组织组中二个基因表达差异均有统计学意义($P < 0.01$); 5. 在骨肉瘤中二个基因表达呈正相关,有统计学意义($r = 0.8743$, $P < 0.01$)。**结论** Rb、Rb2/p130 基因在骨肉瘤中以低表达方式存在,它们与骨肉瘤的发生、发展及预后关系密切,它们在骨肉瘤中的表达呈正相关,并且有可能通过共同低表达来促使骨肉瘤的发生、发展,而它们共同作用的机制有待进一步研究。

关键词:骨肉瘤; Rb 基因; Rb2/p130 基因; 免疫组织化学

中图分类号: R738.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)09-0643-04

0 引言

骨肉瘤是骨恶性肿瘤中最常见的一种,占骨肿瘤总数的 12.3%,好发于 10~25 岁的青少年,是青少年致残、甚至致命的重要原因之一,因此骨肉瘤已经成为当今医学界十分重视的难题。近年来,随着

分子生物学的发展,国内外学者对骨肉瘤的相关癌基因及抑癌基因进行了较为深入的研究,其中 Rb 基因家族的重要成员视网膜母细胞瘤基因(Retino-blastom gene, Rb 基因)及 Rb2/p130 基因等相关的研究较多,它们均属于典型的抑癌基因,所表达的蛋白质结构和功能相似^[1],在 OS 中出现基因突变、缺失或有纯合子缺失等改变是频发现象^[2-3]。本研究应用免疫组织化学技术,检测 Rb、Rb2/p130 基因在 OS 中的表达情况,并分析两者间的相关性,探讨它们在 OS 的发生、发展及预后中的可能作用。

收稿日期: 2007-05-31; 修回日期: 2008-06-03

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(0342010-2)

作者单位: 1. 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院脊柱骨病外科; 2. 广西柳州市第三人民医院骨科

通信作者: 张向敏, E-mail: jedzm2003@yahoo.com.cn

作者简介: 李世德(1953-),男,主任医师、教授,主要从事骨肿瘤相关的研究

1 资料和方法

1.1 病例的分组及处理

疾病组 1:标本收集广西医科大学第一附属医院脊柱骨病科 2001 ~ 2007 年间,手术活检骨肉瘤标本 62 例,平均年龄 21.7 岁,男 41 例,女 21 例,男女之比为 1.95 : 1,所有病例术前均未经过化疗、放疗;疾病组 2:同期 39 例骨软骨瘤的病例均为单发,平均年龄 23.8 岁,男 25 例,女 14 例,男女比例为 1.78 : 1,标本取肿瘤组织软骨帽部分为主;对照组:51 例非肿瘤患者患旁正常骨组织,平均年龄为 21.4 岁,男 32 例,女 19 例,男女比例为 1.68 : 1 (2002 ~ 2007)。以上标本均常规用 10 % 福尔马林固定(骨组织需脱钙 5 ~ 7 天)、石蜡包埋、连续切片,厚约 4 μ m,分别作 HE 染色与免疫组化染色。所有 HE 染色石蜡切片均请两位病理专家重新审阅,并对骨肉瘤进行病理分型。同时根据相关临床资料按 Enneking^[4] 标准进行临床分期、根据 MRI 测定肿瘤直径大小及记录有无转移等。

1.2 主要试剂

鼠抗人 Rb 蛋白单克隆抗体、鼠抗人 Rb2/p130 蛋白单克隆抗体及 SP 试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司,工作浓度均为即用型。

1.3 方法与操作步骤

采用免疫组织化学链霉菌素亲生物素-过氧化物酶法(SP 法)。石蜡切片采用柠檬酸抗原修复缓冲液高温抗原修复法;SP 免疫组化染色严格按照试剂盒上的步骤进行,其中阳性对照为已检出的 Rb、Rb2/p130 蛋白阳性片;PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定

Rb 蛋白染色为标本中细胞核内出现颗粒状、棕褐色染色;Rb2/p130 蛋白染色为标本中细胞浆和(或)细胞核内出现颗粒状、棕褐色染色^[5]。每张骨肉瘤切片,选取连续的 10 个高倍视野($\times 400$),每个视野计数 100 个细胞,算出各个视野中阳性细胞数的平均百分比数作为该切片的阳性细胞百分比进行计分,计算阳性细胞平均百分比;每一张骨软骨瘤及正常骨组织切片选取连续的 10 ~ 20 个高倍视野($\times 400$),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。参照赵炬才^[6]等提出的染色评判标准稍加改良后按阳性细胞百分比将染色结果分为 3 级:阳性细胞百分比小于 10 % 为阴性(-),介于 10 % 和 51 % 之间为阳性(+),大于 51 % 为强阳性(++),阳性和强阳性标本全部统计为阳性组进行统计学处理。

1.5 统计学方法

本实验采用 SPSS 11.0 软件包中的 χ^2 检验对各组间 Rb、Rb2/p130 基因表达情况进行分析和处理,

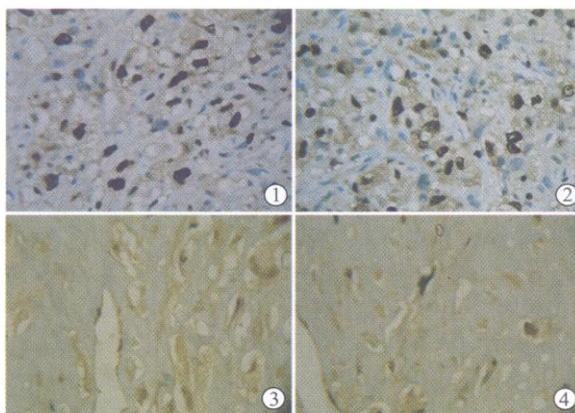


图 1 骨肉瘤中 Rb 蛋白呈阳性表达($\times 400$)

图 2 骨肉瘤中 Rb 蛋白呈弱阳性表达($\times 400$)

图 3 骨肉瘤中 Rb2/p130 蛋白呈弱阳性表达($\times 400$)

图 4 骨肉瘤中 Rb2/p130 蛋白呈弱阳性表达($\times 400$)

以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;用 Spearman 等级相关检验分析 Rb、Rb2/p130 基因在骨肉瘤中表达的相关性。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

Rb 蛋白染色在骨肉瘤、骨软骨瘤及正常骨组织标本中表现为细胞核内深浅不一、粗细不等的颗粒状、棕褐色染色,细胞浆未见明显着色;Rb2/p130 蛋白染色在骨肉瘤、骨软骨瘤及正常骨组织标本中表现为细胞核内和(或)细胞浆内颗粒状、棕褐色染色,阳性细胞多呈弥漫性或局灶性分布。

2.2 Rb 基因在骨肉瘤、骨软骨瘤及正常骨组织标本中表达情况

骨肉瘤组与骨软骨瘤组 Rb 基因表达差异有统计学意义($P = 0.0001$),骨肉瘤组与正常骨组织组 Rb 基因表达差异有统计学意义($P = 0.0001$),见表 1,与沈为栋^[7]等的报告相近,骨软骨瘤组与正常骨组织组 Rb 基因表达差异没有统计学意义($P = 0.4381$)。

2.3 Rb2/p130 基因在骨肉瘤、骨软骨瘤及正常骨组织标本中表达情况

骨肉瘤组与骨软骨瘤组 Rb2/p130 基因表达差异有统计学意义($P = 0.0001$),骨肉瘤组与正常骨组织组 Rb2/p130 基因表达差异有统计学意义($P = 0.0001$),骨软骨瘤组与正常骨组织组 Rb2/p130 基因表达差异没有统计学意义($P = 0.1287$),见表 1。

2.4 骨肉瘤中 Rb、Rb2/p130 基因表达与部分临床指标的关系

Rb、Rb2/p130 基因在骨肉瘤不同临床 Enneking 分期中、肿瘤大小^[8]、转移及不同病理类型的表达关系,见表 2。

表 1 Rb、Rb2/ p130 基因在骨肉瘤、骨软骨瘤及正常骨组织标本中表达情况

Tab 1 The expression of Rb gene and Rb2/ p130 gene in osteosarcoma tissue ,osteochondroma tissue and normal bone tissue									
Groups	n	Expression of Rb gene			Expression of Rb2/ p130 gene			Positive expressing rates (%)	
		-	+	++	-	+	++	Rb	Rb2/ p130
osteochondroma	39	6	14	19	9	12	18	84. 62	76. 92
normal bone tissues	51	3	15	33	10	13	28	94. 12	82. 35
osteosarcomas	62	38	17	7	44	10	6	38. 71	27. 42

表 2 骨肉瘤 Rb、Rb2/ p130 基因表达与临床、病理关系

Tab 2 The expression of Rb gene and Rb2/ p130 gene in osteosarcoma tissue and its relationship with clinical and pathologic type						
Groups	n	Positive expression cases of Rb gene	Positive expression cases of Rb2/ p130 gene	Positive rates (%)		
				Rb	Rb2/ p130	
Total	62	24	17	38. 71	27. 42	
Diameter	7 cm	34	20	58. 82	38. 24	
	> 7cm	28	4	14. 29	14. 29	
Metastases	Negative	47	22	46. 81	34. 04	
	Positive	15	2	13. 33	6. 67	
Enneking stage	IIA	32	18	54. 55	43. 75	
	IIB	17	3	17. 65	11. 76	
	III	13	2	15. 38	7. 69	
骨肉细胞型	36	12	8	33. 33	22. 22	
软骨母细胞型	10	5	3	50. 00	30. 00	
纤维母细胞型	12	5	4	41. 67	33. 33	
Others	4	2	2	50. 00	50. 00	

* 有无转移比较 Rb 为 $P = 0. 0187$, Rb2/ p130 为 $P = 0. 0342$; ** 肿瘤大小比较 Rb 为 $P = 0. 0192$, Rb2/ p130 为 $P = 0. 0329$; *** Enneking 分期 IIA 期与 IIB、III 期比较 Rb 为 $P = 0. 028$, $P = 0. 013$; Rb2/ p130 为 $P = 0. 022$, $P = 0. 0194$; **** 不同病理类型比较均为 $P > 0. 05$

2. 5 骨肉瘤中 Rb、Rb2/ p130 基因表达强度之间的相互关系

Rb 基因与 Rb2/ p130 基因在骨肉瘤中的表达具有一致性,即 Rb 基因的表达低,多同时合并有 Rb2/ p130 基因表达降低,两者呈正相关,见表 3。

表 3 骨肉瘤中 Rb、Rb2/ p130 基因表达强度之间的相互关系

Tab 3 The relationship of the expression of Rb gene and Rb2/ p130 gene in osteosarcoma				
Rb gene	n	Rb2/ p130 gene		
		-	+	++
-	38	36	3	1
+	17	7	5	2
++	7	2	3	3
Total	62	45	11	6

$r = 0. 5265$, $^2 = 14. 81$, $P < 0. 01$

3 讨论

目前众多研究表明,Rb 基因是一个重要的肿瘤抑制基因,其表达的蛋白质通过对细胞周期中的一个重要调控点 G₁/ S 交界处的 R 点的负性调控来促进细胞的分化与成熟,从而起到抑制细胞恶变的作用^[9],其发生功能异常或缺失时,可导致细胞恶变。而骨肉瘤组织或细胞株中 Rb 基因缺失或突变,不能

产生 Rb 蛋白,被认为是骨肉瘤形成的重要原因之一,Rb 基因低表达与骨肉瘤分化差、易于发生肿瘤转移及复发有关,且 pRb 指数越低,骨肉瘤患者预后越差^[10-11]。本研究显示,Rb 基因在骨肉瘤中的表达率明显低于骨软骨瘤与正常骨组织中的表达,这说明了 Rb 基因作为抑癌基因在骨肉瘤中表达下降,并因此失去其对细胞周期的负性调控作用,从而使细胞失去分化能力,造成细胞异常增殖,导致肿瘤发生。Patinor Garcia 等^[12]研究发现,Rb 基因的改变不但与骨肉瘤的发生有关,而且与其预后密切相关。本实验中,Enneking 临床分期为 A 期的骨肉瘤中 Rb 基因阳性表达明显高于分期为 B 及 C 期的骨肉瘤,还有肿瘤直径 > 7 cm 的患者标本中 Rb 基因表达阳性率明显低于肿瘤直径 ≤ 7 cm 的骨肉瘤,而且有转移的骨肉瘤标本中 Rb 基因阳性表达亦明显低于肿瘤无转移的骨肉瘤标本,这些均表明了 Rb 基因表达下降促进细胞分化功能下降,使分化低的骨肉瘤细胞增多,是骨肉瘤发生发展的重要原因之一,可作为骨肉瘤预后评价的参考指标之一,并再次认证了 Rb 基因在骨肉瘤中作为抑癌基因的重要角色。

Rb2/ p130 基因是在 1993 年被发现并克隆成功的一个抑癌基因,属 Rb 基因家族,它所表达的蛋白质 pRb2/ p130 通过对细胞周期中维持 G₀ 期细胞的

转录静止负性调控来促进细胞的分化与成熟,从而抑制细胞的恶变,是其发挥抑癌功能的重要方式,它在人体内的各种正常组织中具有广泛的表达^[2]。Rb2/p130 基因发生异常或缺失与多种肿瘤的发生、发展密切相关,国外有关研究表明,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^[13]。而本实验骨肉瘤标本中 Rb2/p130 基因有一定程度的表达,但明显低于骨软骨瘤与正常骨组织。从本实验中还可以看到肿瘤 > 7 cm 的标本中 Rb2/p130 基因表达明显低于肿瘤 < 7 cm 组,有转移的骨肉瘤标本中 Rb2/p130 基因表达明显低于无转移组,并且 Enneking 临床分期越低的骨肉瘤标本中 Rb2/p130 基因表达越低,这些都说明了 Rb2/p130 基因作为抑癌基因在骨肉瘤中表达下降,从而失去维持 G₀期细胞的转录静止及其对细胞周期的负性调控的作用,使 DNA 合成增加,大量细胞进入 S 期,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,使分化低的骨肉瘤细胞增多,是骨肉瘤发生发展、侵袭性强、预后不佳的重要原因之一,亦可作为骨肉瘤预后评价的参考指标之一,同时也说明了 Rb2/p130 基因在骨肉瘤中表现为一个重要抑癌基因。

研究业已表明 Rb 基因和 Rb2/p130 基因均为典型的抑癌基因,它们在正常组织中广泛表达,Rb 基因和 Rb2/p130 基因具有共同的生物学功能,即负向调控细胞周期^[14]。有学者在 Rb 基因缺失的骨肉瘤细胞中导入 Rb2/p130 基因也能抑制肿瘤细胞的生长,这提示在骨肉瘤细胞中 Rb2/p130 蛋白与 pRb 的功能相似,在功能上可能存在一定程度的重叠^[15];研究表明,虽然 Rb 蛋白与 Rb2/p130 蛋白生物学功能非常相近而互相重叠,但是在肿瘤的发生发展中的作用有一定差别,即 Rb 蛋白在抑制肿瘤的发生中所起的作用较为明显,而 Rb2/p130 蛋白的重要性,则体现在对肿瘤进展的抑制作用^[16]。本研究中我们结合 Rb 基因的表达情况进行研究,发现 Rb 基因与 Rb2/p130 基因在骨肉瘤中的表达具有明显的一致性,即 Rb 基因的表达低,多同时合并有 Rb2/p130 基因表达降低,两者呈正相关,根据实验结果我们可以推断:骨肉瘤的发生发展可能是因为 Rb 基因突变或缺失,而该基因表达缺失或降低,对细胞周期的负性调控作用减弱或丧失,使细胞异常增殖,导致肿瘤发生,同时,由于 Rb 基因与 Rb2/p130 基因生物学功能相似,在细胞周期的调控功能上有部分重叠,即 Rb2/p130 基因的存在可部分补充因 Rb 基因突变或缺失的情况下对细胞周期的负性调控作用,肿瘤可处于相对稳定状态,如同时伴有 Rb2/p130 基因的突变或缺失,则进一步

失去对细胞周期的负性调控作用,使大量细胞进入 S 期,造成细胞异常增殖,加快细胞的恶变,从而促进已经形成的肿瘤的发展。因此我们可以认为:Rb 基因与 Rb2/p130 基因在骨肉瘤中的表达情况是骨肉瘤预后的重要标志,而对骨肉瘤预后因素的研究可以较好地指导临床治疗及预后判断;本实验研究了 Rb 基因与 Rb2/p130 基因在骨肉瘤中表达水平及其相关性,而它们在骨肉瘤的发生、发展中相互作用的确切机制如何,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Sanseverino F, Tomcelli M, Petraglia F, et al. Role of the retinoblastoma family in gynecological cancer[J]. *Cancer Bio Ther*, 2003, 2(6): 636-641.
- [2] Miller CW, Aslo A, Won A, et al. Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma[J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122(9): 559-565.
- [3] Leezer JL, Hackmiller RC, Greene RM, et al. Expression of the retinoblastoma family of tumor suppressors during murine embryonic orofacial development[J]. *Orthod Craniofac Res*, 2003, 6(1): 32-47.
- [4] Enneking WF, Dunham W, Gebhardt MC, et al. A system for the functional evaluation of reconstructive procedures after surgical treatment of tumors of musculoskeletal system[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1993(286): 241-246.
- [5] 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.
- [6] 赵炬才,王丹,刘政国,等. 人骨肉瘤中 Rb 基因表达的初步研究[J]. *中华骨科杂志*, 1996, 16(11): 692-695.
- [7] 沈为栋,廖金辉,李康华,等. Rb 与 cyclinD₁ 在骨肉瘤中的表达及其意义[J]. *癌症*, 2000, 19(6): 541-543.
- [8] 胡丹,黄健文,胡世平,等. p53, p63, p73 蛋白在骨肉瘤的表达及相关性研究[J]. *中国骨肿瘤骨病*, 2004, 3(1): 47-50.
- [9] Iida K, Nobori T, Matsumine A, et al. Effect of retinoblastoma tumor suppressor gene expression on chemosensitivity of human osteosarcoma cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2003, 14(4): 1961-1965.
- [10] Heinsohn S, Evermann U, Zur Stadt U, et al. Determination of the prognostic value of loss of heterozygosity at the retinoblastoma gene in osteosarcoma[J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(5): 1205-1214.
- [11] 范祖森,敖世洲. 肿瘤抑制基因 Rb 与细胞周期调控研究新进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1999, 26(5): 4291-4331.
- [12] Patino-Garcia A, Pineiro ES, Diez MZ, et al. Genetic and epigenetic alterations of the cell cycle regulators and tumor suppressor genes in pediatric osteosarcomas[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2003, 25(5): 362-367.
- [13] 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): 372-6221.
- [14] Paggi MG, Giordano A. Who Is the Boss in the Retinoblastoma Family? The point of View of Rb2/p130, the Little Brother[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5950-5953.
- [15] Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, et al. Role RB and RB2/p130 gene in marrow stromal stem cells plasticity[J]. *J Cell Physiol*, 2004, 200(2): 201-212.
- [16] Genovese C, Trani D, Caputi M, et al. Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family[J]. *Oncogene*, 2006, 25(38): 5201-5209.

[编辑:贺文;校对:刘红武]