

黏液样/圆细胞型脂肪肉瘤中 FUS-CHOP mRNA 和 MDM₂、p53 蛋白的表达

魏万里¹, 王 岩¹, 阮永华², 陈 芸¹, 叶 恩¹

Expression of FUS-CHOP mRNA and MDM₂, p53 Protein in Myxoid/round Cell Liposarcoma

WEI Wan-li¹, WANG Yan¹, RUAN Yong-hua², CHEN Yun¹, YE En¹

1. Department of Pathology, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650118, China; 2. Department of Pathology, Kunming Medical College

Abstract: **Objective** To explore the expression of FUS-CHOP mRNA and MDM₂, p53 protein in Myxoid/round cell Liposarcoma and their significance. **Methods** Twenty-five formalin-fixed, paraffin-embedded MRCL samples and 18 control cases retrieved from the archival files were studied. Nested reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was employed to detect the FUS-CHOP mRNA expression, followed by DNA sequencing to confirm the PCR product. β -actin gene was used to assess the quality of the mRNA templates. All of the MRCL cases was available for immunohistochemical analysis of MDM₂ and p53 status. **Results** β -actin mRNA was detected in 18 MRCLs (18/25, 72 %) and 12 negative control case (12/18, 66.7 %). Type FUS-CHOP mRNA was successfully detected in 15 out of 25 (60 %) MRCLs. All of control cases were negative for the FUS-CHOP fusion gene transcripts. The positive rate of MDM₂ and p53 proteins were 56 % (14/25) and 44 % (11/25), respectively. both of them were significantly higher in round cell liposarcoma than them in myxoid and mixed liposarcoma. There was no correlation between FUS-CHOP mRNA and the expression of p53, MDM₂ protein, but there was a tendency of positive correlation between the expression of MDM₂ and p53. **Conclusion** (1) FUS-CHOP is considered as a specific molecular and genetic hallmark for MRCLs and is useful for the diagnosis of MRCLs. (2) The expression of MDM₂ and p53 protein is associated with the progression of MRCLs. (3) There is a no correlation between MDM₂, p53 and FUS-CHOP in MRCLs.

Key words: Myxoid/round cell liposarcoma; TLS/ FUS-CHOP; p53 protein; MDM₂ protein

摘 要: **目的** 探讨 FUS-CHOP mRNA 及 MDM₂、p53 蛋白在黏液样/圆细胞型脂肪肉瘤(MRCLs)组织中的表达。**方法** 收集经甲醛固定、石蜡包埋的 MRCLs 组织标本 25 例。以非 MRCLs 的脂肪肉瘤及其他软组织肉瘤共 18 例作对照组。用嵌套式 RT-PCR 的方法检测 FUS-CHOP 融合基因 mRNA 并做 DNA 测序证实,以 β -actin 基因作为内对照。用免疫组化 SP 法检测 25 例 MRCLs 中 MDM₂、p53 蛋白表达情况。**结果** MRCLs 组和阴性对照组 β -actin 阳性率分别为 72 % (18/25) 和 66.7 % (12/18)。25 例 MRCLs 中 15 例检出 型 FUS-CHOP 融合基因表达,去除 β -actin 阴性病例后阳性率为 83.3 % (14/18)。对照组 18 例标本均未检出 FUS-CHOP 融合基因。MRCLs 中 MDM₂、p53 蛋白阳性表达率分别为 56 % (14/25) 和 44 % (11/25),以圆细胞为主的病例组阳性表达率最高,差异有统计学意义。FUS-CHOP 融合基因与 MDM₂ 及 p53 蛋白表达无相关性;而 MDM₂ 与 p53 蛋白表达呈正相关,有统计学意义。**结论** (1) FUS-CHOP 融合基因是 MRCLs 的特异性分子遗传标志物,可用于该肿瘤的诊断与鉴别诊断。(2) MRCLs 中 MDM₂、p53 蛋白表达与其预后相关。(3) MRCLs 中 FUS-CHOP 融合基因与 MDM₂、p53 蛋白的表达无相关性。

关键词: 黏液样/圆细胞型脂肪肉瘤; TLS/ FUS-CHOP; MDM₂ 蛋白; p53 蛋白

中图分类号: R738.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2008)09-0647-04

0 引言

黏液样/圆细胞型脂肪肉瘤(myxoid/round cell liposarcoma, MRCLs)是成人脂肪肉瘤中最常见的类型之一,约占 50 %左右,常发生在下肢深部软组织和腹膜后。细胞和分子遗传学研究表明,95 %以上的

收稿日期:2007-09-27;修回日期:2008-01-24

作者单位:1. 650118 昆明医学院第三附属医院病理科;
2. 昆明医学院病理教研室

作者简介:魏万里(1959-),女,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤的病理诊断与研究

MRCLs 存在特异性的染色体易位 $t(12;16)(q13;p11)$, 即位于 12q13 的 CHOP 基因和 16p11 FUS 基因发生融合, 形成 FUS-CHOP 融合基因^[1]。同时发现人类 12 号染色体上还存在多个与脂肪源性肿瘤发生发展相关的基因, 如: MDM₂ 和 CDK₄ 等^[2], 其中最恒定扩增的是 MDM₂, 它除了本身可以导致肿瘤发生外还可作用于 p53 基因而促使 MRCLs 发生^[3]。Alava 等^[4-5]研究发现在一些发生特异性染色体易位的肉瘤中, p53 与预后呈明显的负相关。本实验的目的在于探讨 FUS-CHOP mRNA 在 MRCLs 中的特异性及其与 MDM₂、p53 蛋白表达的关系, 并探讨它们与 MRCLs 发生、发展的关系。

1 资料与方法

1.1 资料 收集云南省肿瘤医院病理科 1999 ~ 2007 年间存档 MRCLs 病例 25 例, 参照 Fletch CDM 编写的软组织肿瘤组织分类诊断学^[5], 分为以黏液成分为主的 9 例, 黏液圆细胞混合的 9 例, 以圆细胞成分为主的 7 例, 标本均经 10 % 中性福尔马林固定, 石蜡包埋。对照组 18 例, 分别为其他亚型脂肪肉瘤 4 例(包括分化良好型 1 例, 去分化型 1 例和多形型 2 例), 滑膜肉瘤 3 例, 低度恶性纤维肉瘤 5 例, 恶性纤维组织细胞瘤 2 例, 黏液脂肪瘤 1 例, 脂肪母细胞瘤 1 例, 神经鞘瘤伴黏液变 1 例和黏液软骨肉瘤 1 例。全部病例均经复查证实。

1.2 FUS-CHOP 融合基因的检测 RNA 抽提: 抽提方法参照相关文献^[6]。收集 5 μ m 厚石蜡包埋组织切片 21 ~ 25 张, 为防止污染, 用 70 % 乙醇擦洗切片刀及刀架, 二甲苯脱蜡至无水乙醇, 干燥后加入裂解液(20 mmol/L Tris-HCL, pH 8.0, 20 mmol/L edta, 2 % SDS) 200 μ l。加入 20 mg/ml 蛋白酶 K 至终浓度 100 μ g/ml, 55 °C 温浴过夜。组织完全溶解后 95 °C 加热 10 min 灭活蛋白酶 K。以下操作严格按照 Takara 生物工程公司生产的 RNA 提取试剂盒说明书进行抽提 RNA。

嵌套式 PCR: 采用 Takara 生物工程公司生产的 RT-PCR 二步法试剂盒。严格按照说明进行操作。RT 反应条件: 42 °C 30 min, 99 °C 5 min。所用 PCR 引物参考有关文献^[6], 本实验所用引物均由上海生物工程有限公司合成, 见表 1。引物扩增条件: 94 °C 预变性 2 min, 1 个循环, 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环之后, 72 °C 延伸 7 min。从第一轮 PCR 产物中吸取 1 μ l 再加 9 μ l 蒸馏水作为第二轮 PCR 的模板, 第二轮将退火温度改为 65 °C, 其余同第一轮。用蒸馏水作为第一轮的空白对照, 用第一轮空白对照产物作为第二轮空白

对照。阳性对照为本科室 1 例经过 DNA 测序证实含有 FUS-CHOP 融合基因的病例。内对照选用 β -actin 检测 RNA 的质量, 反应体系及扩增条件同上, 但仅需作第一轮 PCR 反应。取第二轮 PCR 产物行 2 % 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统观察电泳结果。PCR 产物进行克隆测序证实(由大连 Takara 生物工程有限公司协助完成)。

表 1 PCR 引物

Tab 1 The primers of PCR

PCR 寡核苷酸引物序列	
FUS-CHOP 第一轮反应:	
Lr ef: 5' AGCAAA GCTA TAA TCCCCCTCA G 3'	
Lr er: 5' GAAGGA GAAA GGCAA TGACTCA-3'	
第二轮反应:	
Lr if: 5' GACA GCA GAACCA GTACAACA GCAG 3'	
Lr ir: 5' GCTTTCA GGTGTGGTGA TGATGAAG 3'	
β -actin act-f: 5' A GGCCAACCGCGA GAAGATGACC-3'	
act-r: 5' GAA GTCCAGGGCGACGTA GCAC-3'	

1.3 免疫组化 免疫组化采用 SP 法, 试剂均购于福州迈新试剂公司。以 PBS 代替一抗作阴性对照, 已知阳性片作阳性对照, 操作步骤按说明书进行。

免疫组化结果判定参照有关文献^[7], 阳性肿瘤细胞核 > 10 %, 肿瘤细胞总数判定为阳性。

1.4 统计学方法 数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 临床病理特征 25 例 MRCLs 中, 男 15 例, 女 10 例(男 女 = 3 2), 最小年龄 5 岁, 最大年龄 80 岁, 平均年龄 50.2 岁, 发病年龄高峰在 45 ~ 50 岁(占 58 %)。发生部位主要在下肢, 共 10 例(占 40 %), 其次为盆腔和腹膜后。25 例 MRCLs 镜下显示不同分化阶段的脂肪母细胞, 明显交织的毛细血管网和黏液样基质。圆形细胞为主的 MRCLs 可以见到较多的核分裂相, 黏液样基质及血管网较少, 见图 1、2。

2.2 FUS-CHOP 检测的结果 25 例 MRCLs 中, 18 例 β -actin 阳性, 阳性率 72 %。对照组 β -actin 阳性 12 例, 有 6 例未表达 β -actin, 包括 3 例低度纤维肉瘤, 1 例脂肪肉瘤, 1 例滑膜肉瘤, 1 例神经鞘瘤伴黏液变性。 β -actin 片段大小为 343 bp, 见图 3。

18 例 β -actin 阳性的 MRCLs 中, 15 例可检出型 FUS-CHOP mRNA, 阳性率为 83.3 %, 片段大小为 103 bp, 见图 4, 未能检测到型 FUS-CHOP 融合基因的表达。各组阳性率用 χ^2 检验确切概率法分析差异无统计学意义($\chi^2 = 2.107$, $P = 0.460 > 0.05$)。对照组肿瘤均未检测出 FUS-CHOP 融合基因, 见表 2。

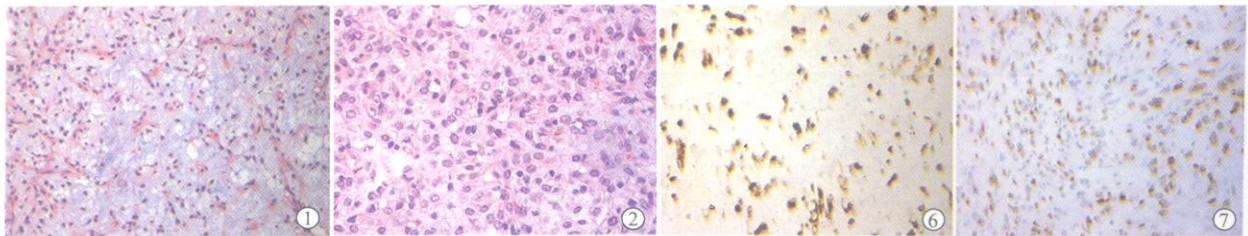
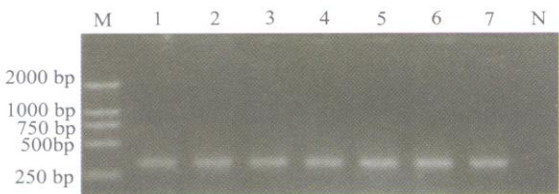


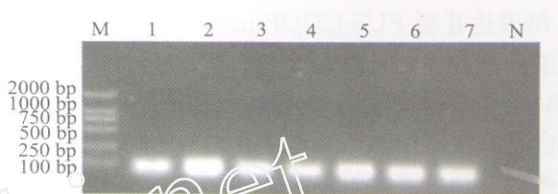
图 1 MRCL:“枝丫”状血管和黏液样基质(HE × 200) 图 2 以圆细胞为主的 MRCL:见脂肪母细胞 (HE× 400)
图 6 MRCLs 肿瘤细胞核 MDM₂(+) 图 7 MRCLs 肿瘤细胞核 p53(+)

Fig 1 MRCL: plexiform capillary network and mucoid matrix (HE × 200) Fig 2 Round cell type MRCL: round cell and lipoblast (HE × 200) Fig 6 Nuclear immunoreactivity for MDM₂ Fig 7 Nuclear immunoreactivity for p53



M: DNA marker (DL2000); Lane 1~7: MRCLs; N: Negative control

图 3 β -actin 基因 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳
Fig 3 Result of RT-PCR Assay of samples for β -actin mRNA



M: DNA marker (DL2000); Lane 1~7: MRCLs; N: Negative control

图 4 FUS-CHOP 基因 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳
Fig 4 Result of RT-PCR Assay of MRCLs for FUS-CHOP mRNA

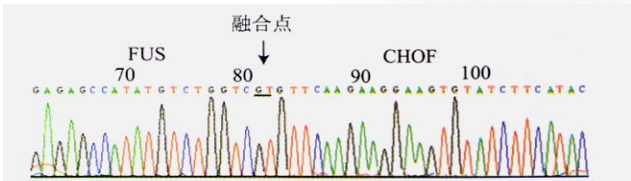
表 2 MRCLs 及对照组 FUS-CHOP 融合基因 mRNA 表达
Tab 2 The expressions of FUS-CHOP mRNA in MRCLs and control cases

type	n	Positive rate	Expression of FUS-CHOP mRNA	
			+	-
MRCLs	25	83.3 %	15	10
Myxoid type	9	44.4 %	4	5
Mixed type	9	77.8 %	7	2
Round cell type	7	57.1 %	4	3
WDL	1	0	0	1
DL	1	0	0	1
PL	2	0	0	2
SS	3	0	0	3
L GFMS	5	0	0	5
MFH	2	0	0	2
myxolipoma	1	0	0	1
lipoblastoma	1	0	0	1
neurilemoma	1	0	0	1
EMC	1	0	0	1

WDL : well differentiated liposarcoma ; DL : dedifferentiate liposarcoma ; PL : ploemorphic liposarcoma ; SS : synovial sacoma ; L GFMS : low-grade fibromyxoid sacoma ; MFH : malignant fibrous histiocytoma ; EMC : extraskeletal mesenchymal chondrosacoma

PCR 产物经 Takara5816 (T)-1 载体克隆测序证实,见图 5。

2.3 免疫组化结果 见图 6、7,表 3。以黏液为主型病例组 MDM₂、p53 蛋白阳性率均低于混合型和以圆细胞为主型的病例组,差异有统计学意义($\chi^2 = 8.090, P = 0.015 < 0.05; \chi^2 = 8.666, P = 0.01 < 0.05$)。



箭头处为融合点,融合点上游为 FUS 基因,下游为 CHOP 基因
↓ show the location of FUS-CHOP fusion

图 5 FUS-CHOP 基因经克隆测序结果
Fig 5 Result of colonies sequencing for PCR products of FUS-CHOP mRNA

2.4 FUS-CHOP 融合基因及 MDM₂、p53 蛋白在 MRCLs 中的表达及相关性分析

对 MRCLs 中 FUS-CHOP 融合基因及 MDM₂、p53 蛋白表达情况进行 Spearman 相关性分析显示: FUS-CHOP mRNA 与 MDM₂、p53 蛋白表达均无相关性($\chi^2 = 0.5000, P = 0.667$)。MDM₂、p53 蛋白表达呈显著正相关($r_s = 0.995, P = 0.0000$)。

3 讨论

3.1 FUS-CHOP

本实验采用 Hisaoka 等^[6]报道的方法,成功地从 15 例 MRCLs 组织中检测到 FUS-CHOP mRNA 表达(均为 型融合),结果与 Hisaoka 等^[6]报道相符,进一步证实 FUS-CHOP 融合基因在 MRCLs 中呈特异性表达,FUS-CHOP 融合基因的形成可以作为 MRCLs 特异性的分子标记物用于 MRCLs 诊断

表 3 MRCLs 中 MDM₂、p53 蛋白表达
Tab 3 The expressions of MDM₂、p53 proteins in MRCLs

MRCLs type	n	MDM ₂			P	Expression of p53			P
		+	-	Positive rate(%)		+	-	Positive rate(%)	
Total	25	14	11	56.0	< 0.05	11	14	44.0	< 0.05
Myxoid	9	3	6	33.3		1	8	11.1	
Mixed type	9	4	5	44.4		4	5	44.4	
Round cell	7	7	0	100		6	1	85.7	

及鉴别诊断。MRCLs 中圆形细胞是差分化的表现形式,圆形细胞数量越多预示其侵袭性越高。本组病例中 16 例混合型和圆细胞为主型的 MRCLs 有 11 例表达 型 FUS-CHOP mRNA,而 9 例以黏液为主的病例只有 3 例表达 型 FUS-CHOP mRNA,结果与以往研究相符,即圆细胞型脂肪肉瘤的融合基因主要为 型,支持 FUS-CHOP mRNA 型可能与预后差有关^[8]。也有 MRCLs 中融合基因亚型和临床病理指标之间无明显相关性的研究报道^[9]。因此,关于 FUS-CHOP 融合基因亚型与 MRCLs 的生物学行为的关系有待进一步研究。

3.2 MDM₂与 p53

研究显示脂肪肉瘤特征性的环状和巨大标记染色体由 12q13-15 扩增而来,这一区域最恒定的扩增就是 MDM₂ 基因^[2]。MDM₂ 蛋白主要功能是与 p53 蛋白酸性活化域直接结合形成 p53 - MDM₂ 复合物,从而抑制野生型 p53 介导的转录激活功能。此外,MDM₂ 基因的酸性活化域具有反式激活作用,此与转录调控有关^[10]。关于 MDM₂、p53 在 MRCLs 中表达,文献报道不一。Smith 和 Goldblum 等^[11] 用免疫组化方法检测 MRCLs 中 MDM₂ 和 p53 蛋白几乎是不表达的。与此相反,Dei Tos 等^[12] 在所有的 MRCLs 实验样本中检测到 p53 的表达,MDM₂ 的阳性率为 56 %。本实验观察到,MRCLs 中 MDM₂ 和 p53 阳性率分别为 56 %和 44 %,p53 与 MDM₂ 的表达高度相关 ($\chi^2 = 0.995, P = 0.0000$),与 Taubert 等^[13]、王亚兰等^[14] 报道的相近,提示 MRCLs 中存在 MDM₂ 和 p53 蛋白异常表达,MDM₂ 可能是 p53 的异常表达的影响因素之一。结果还显示,圆细胞型为主的差分化 MRCLs 中 MDM₂ 和 p53 蛋白阳性表达率明显高于分化较好的黏液为主型和混合型 MRCLs,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.090, P = 0.015 < 0.05; \chi^2 = 8.666, P = 0.01 < 0.05$),提示 MDM₂ 和 p53 过表达可能与 MRCLs 预后不良有关。

3.3 FUS-CHOP 与 MDM₂、p53 的关系

虽然 MDM₂ 基因与 CHOP 基因都位于 12q13-15 染色体区域,但本实验结果未提示 FUS-CHOP 融合基因与 MDM₂、p53 蛋白的表达存在相关性 (χ^2

$= 0.5000, P = 0.667$)。12q13-15 染色体区域的基因发生突变是否影响 FUS - CHOP 融合基因的形成,还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Knight JC, Renwick PJ, Cin PD, et al. Translocation t(12; 16)(q13;p11) in myxoid liposarcoma and round cell liposarcoma: molecular and cytogenetic analysis[J]. Cancer Res,1995, 55(1):24-27.

[2] Pilotti S, Della Torre G, Mezzelani A, et al. The expression of MDM₂/CDK4 gene product in the differential diagnosis of well-differentiated liposarcoma and large deep-seated lipoma[J]. Br J Cancer,2000,82(7):1271-1275.

[3] Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, et al. Amplification of gene encoding a p53 associated protein in human sarcomas[J]. Nature,1992,358(6381):80-83.

[4] De Alava E, Antonescu CR, Panizo A, et al. Prognostic impact of p53 status in Ewing sarcoma[J]. Cancer,2000,89(4):783-792.

[5] Fletcher CDM. Diagnostic Histocateology of Tumors[M]// Fletcher CDM. Soft tissue tumors. Edinburg: Churchill Livingstone, 1995.1043-1096.

[6] Hisaoka M, Tsuji S, Morimitsu Y, et al. Detection of TLS/ FUS-CHOP fusion transcripts in myxoid and round cell liposarcomas by nested reverse transcripts-polymerase chain reaction using archival paraffin-embedded tissues[J]. Diagn Mol Pathol,1998,7:96-101.

[7] Hirofumi N, Nobuhito A, Susumu J, et al. Myxoid Liposarcoma with adipocytic maturation: Detection of TLS/ CHOP fusion gene transcript[J]. Diagn Mol Pathol,2004,13(2):92-96.

[8] Kuroda M, Ishida T, Takanashi M, et al. Oncogenic transformation and inhibitor of adipocytic conversion of preadipocytes by TLS/ FUS-CHOP Type chimeric protein [J]. Am J Pathol,1997,151(3):735-744.

[9] Antonescu CR, Tschernyavsky SJ, Decuseara R, et al. Prognostic impact of p53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: A molecular and clinicopathologic study of 82 cases[J]. Clinical Cancer Res,2001,7(12):3977-3987.

[10] 金晶,刘耕陶. MDM₂与 p53 [J]. 癌症,2001,20(6):663-666.

[11] Smith TA, Goldblum JR. Immunohistochemical analysis of p53 protein in myxoid/ round cell liposarcoma of the extremities[J]. Appl Immunohistochem,1996,228-234.

[12] Dei Tos AP, Piccinin S, Doglioni C, et al. Molecular abnormalities of the G1-S checkpoint in myxoid and round liposarcoma[J]. Am J Pthol,1997,151(6):1531-1539.

[13] Taubert H, Wurl P, Meyer A, et al. Molecular and immunohistochemical P53 status in liposarcoma and malignant fibrous histocytoma: identification of seven new mutation for soft tissue[J]. Cancer,1995,76(7):1187-1196.

[14] 王亚兰,李圆圆. 脂肪肉瘤中 HSP70 和 MDM₂与 p53 及 Rb 表达的关系[J]. 中国肿瘤临床,2004,15(31):888-890.

[编辑:安 凤;校对:杨 卉]