

胶质瘤 *egr-1* 基因表达水平与其细胞增殖和凋亡关系的研究 *

赵文娟 于士柱 浦佩玉 安同岭 管欣琴

天津医科大学总医院 天津市神经病学研究所

天津市神经损伤变异与再生重点实验室 (天津市 300052)

摘要 目的 探讨胶质瘤细胞 *egr-1* 基因表达水平与肿瘤恶性程度、细胞增殖活性及凋亡程度的关系。方法 用原位杂交、原位细胞凋亡检测和免疫组化染色方法观察了 73 例不同级别的胶质瘤。结果 73 例胶质瘤 *egr-1* mRNA 和 EGR-1 蛋白阳性表达率均为 100%。这两种阳性肿瘤细胞密度均随肿瘤恶性程度升高而相应增加,不同级别组间比较差异均有显著性 ($P<0.01$)。73 例胶质瘤增殖细胞核抗原 (PCNA) 阳性肿瘤细胞和凋亡肿瘤细胞检出率均为 100%。随肿瘤恶性程度升高,PCNA 阳性肿瘤细胞密度增加而凋亡肿瘤细胞密度减少,不同级别组间比较差异均有显著性 ($P<0.05\sim 0.01$)。经直线相关分析证实 *egr-1* mRNA、EGR-1 蛋白和 PCNA 阳性肿瘤细胞密度彼此间均呈显著性正相关 ($r=0.685\sim 0.999$, $P<0.01$)。前三种阳性肿瘤细胞密度均与凋亡肿瘤细胞密度呈显著性负相关 ($r=-0.758\sim -0.775$, $P<0.01$)。结论 *egr-1* 基因表达水平对评价胶质瘤生物学行为有重要参考价值。胶质瘤细胞 *egr-1* 基因表达异常增加可能是促进肿瘤细胞增殖和抑制其凋亡的重要因素,并在胶质瘤发生及恶性进展过程中均起重要作用。

关键词 胶质瘤 早期生长应答基因-1 *egr-1* 细胞增殖 凋亡

The Relationship between *egr-1* Expression, Cell Proliferation and Apoptosis in Human Gliomas

Zhao Wenjuan Yu Shizhu Pu Peiyu et al

Department of Neuropathology, Neurology Institute, Tianjin Medical University
General Hospital, Tianjin

Abstract Objective: To investigate the relationship between the expression level of early growth response gene-1 (*egr-1*) in human glioma, and the tumor grade, cell proliferation and apoptosis of the tumors. Methods: Seventy-three human glioma specimens with different grades of malignancy were studied using in situ hybridization, in situ cell death detection (TUNEL method) and immunohistochemistry. Results: All of the 73 gliomas expressed *egr-1* mRNA and EGR-1 protein (100%). Not only was the positive cell density of *egr-1* mRNA and EGR-1 protein increased with the degree of tumor malignancy but also their expression differences were significant among groups of grade- to , and ($P<0.01$). Both the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and tumor-cell apoptosis were detected in all of the 73 glioma cases (100%). The PCNA-positive tumor cells were increased but apoptotic tumor cells decreased with an enhancement of the tumor malignancy. There were significant differences among the glioma cases of various malignant grades ($P<0.05\sim 0.01$). The positive cell density of *egr-1* mRNA expression, EGR-1 protein and PCNA protein were positively correlated with one another ($r=0.685\sim 0.999$, $P<0.01$). However, each one of them was negatively correlated with the number of apoptotic tumor cells ($r=-0.758\sim -0.775$, $P<0.01$). Conclusion: These results suggest

* 本文课题受天津市高等学校科研基金 (编号: 98409c)。

天津市科技攻关计划重点科技攻关专项基金资助 (编号: 06YFSZSF01100)

通讯作者: 于士柱 tjyushizhu@yahoo.com

that the expression level of *egr-1* mRNA has potential value in the evaluation of biological behavior of gliomas. Overexpression of the *egr-1* gene in glioma cells could possibly promote cell proliferation, inhibit apoptosis and play an important role in the development and malignant progression of glioma.

Key words Glioma Early growth response gene-1 *egr-1*
Cell proliferation Apoptosis

早期生长应答基因-1 (early growth response gene-1, *egr-1*) 属快反应即刻早期应答基因 (immediate early response gene, IEG), 其编码的 EGR-1 蛋白可诱导下游报道基因 mRNA 转录和蛋白表达, 参与细胞增殖和凋亡调控^[1-3]。其表达异常增加可干扰细胞增殖和凋亡的动态平衡, 诱导细胞转化和肿瘤形成^[2], 但胶质瘤细胞 *egr-1* 基因表达状况如何, 与肿瘤恶性程度、肿瘤细胞增殖活性及凋亡程度的关系怎样, 尚不清楚。为探讨上述问题, 我们观察了 73 例人胶质瘤, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集我院神经外科 2004~2005 年手术切除的新鲜胶质瘤标本 73 例, 男 42 例, 女 31 例, 年龄 3~73 岁。每例标本的一半立即用 OCT 包埋-70℃ 冰箱保存。另一半用 10% 中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 5 μm 厚连续切片备用, 并做 HE 染色确定诊断。按 2000 年 WHO 标准进行分类和分级, 其中 ~

级组 25 例 (毛细胞型星形细胞瘤 1 例、纤维型星形细胞瘤 14 例、原浆型星形细胞瘤 8 例、少突胶质细胞瘤 2 例), 级组 22 例 (间变性星形细胞瘤 21 例、间变性少突胶质细胞瘤 1 例), 级组 26 例 (胶质母细胞瘤 21 例、髓母细胞瘤 5 例)。从冰箱取出冷藏标本复温至 -23℃, 用恒冷冰冻切片机做 6 μm 厚连续冰冻切片, 室温干燥 10 分钟, -70℃ 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 原位杂交 取每例冰冻切片, 经 4% 多聚甲醛-0.1M PBS (pH 7.4) 固定 10 分钟, 0.1M PBS (pH 7.4) 漂洗 5 分钟 ×3 次后, 用经地高辛-ddUTP 3' 末端标记的 *egr-1* 寡核苷酸探针做 mRNA 原位杂交。*egr-1* 探针由美国赛百盛公司合成, 长 45mer, 序列为 5'-CCGTTGCTCAGCAGCATCATC TOCTCCA GTTTGGGGTAGTTGTCC-3', 与 *egr-1* 基因第一外显子转录的 mRNA 翻译区序列第 345~389 位碱基互补。探针标记与检测试剂盒购自美国 Roche 公司, 探针标记、杂交及杂交后检测程序均按该试剂盒说明进行。杂交时设不加探针和不加抗地高辛抗体的对照片, 作为阴性对照。

1.2.2 用冰冻切片 TUNEL 法做原位细胞凋亡检测 切片固定方法与原位杂交相同。TUNEL 试剂盒购自美国 Roche 公司, 检测程序按该试剂盒说明进行。检测时设不加 TUNEL 反应液的对照片, 作为阴性对照。

1.2.3 免疫组化染色 石蜡切片常规脱蜡入水后, 浸泡于 0.01mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中, 经微波加热 (92~98℃) 10 分钟, 冷却到室温后用单克隆抗体 ABC 法标记 EGR-1 蛋白 (1:100) 和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA; PC10, 1:30)。EGR-1 单克隆抗体购自美国 SantaCruz 公司, PCNA 单克隆抗体购自丹麦 Dako 公司, ABC 试剂盒购自美国 Vector 公司。两种免疫组化染色均设阳性和阴性对照。

1.2.4 统计学处理 用装有目镜网格测微尺的 400 倍视野计数 *egr-1* mRNA、EGR-1 蛋白、PCNA 阳性肿瘤细胞密度及凋亡肿瘤细胞密度 (个/0.05mm²)。用 F 和 q 检验及直线相关分析对相应数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 73 例胶质瘤均有 *egr-1* mRNA 和 EGR-1 蛋白 (100%) 不同程度的表达。这两种阳性肿瘤细胞的密度均随肿瘤级别升高而相应增加, 三组间比较均有显著性差异 (表 1)。*egr-1* mRNA 阳性肿瘤细胞为胞浆呈紫蓝色着色, 不均匀散在分布 (图 1), EGR-1 蛋白阳性肿瘤细胞为胞浆呈棕黄色着色, 不均匀散在分布 (图 2)。

表 1 不同级别胶质瘤组间 *egr-1* mRNA 和 EGR-1 蛋白阳性肿瘤细胞密度的比较 (细胞数/0.05mm²)

分组	例数	<i>egr-1</i> mRNA 阳性细胞 ($\bar{x} \pm s$)	EGR-1 蛋白阳性细胞 ($\bar{x} \pm s$)
~ 级组	25	35.24 ± 1.62	33.20 ± 0.93
级组	22	77.64 ± 4.97	74.18 ± 2.22
级组	26	119.54 ± 29.02	121.00 ± 33.23
F 值		109.33*	102.53*
P 值		<0.001	<0.001

q 检验: * 三组间均有显著性差异, P<0.01

2.2 73 例胶质瘤的 PCNA 阳性表达率及凋亡细胞阳性检出率均为 100%。随肿瘤级别升高, PCNA 阳

性肿瘤细胞密度相应增加,三组间比较均有显著性差异,而凋亡肿瘤细胞密度则相应下降,三组间比较均有显著性差异(表2)。PCNA 阳性肿瘤细胞为胞核呈棕黄色着色,不均匀散在分布(图3),凋亡肿瘤细胞为胞核呈紫蓝色着色,不均匀散在分布(图4)。

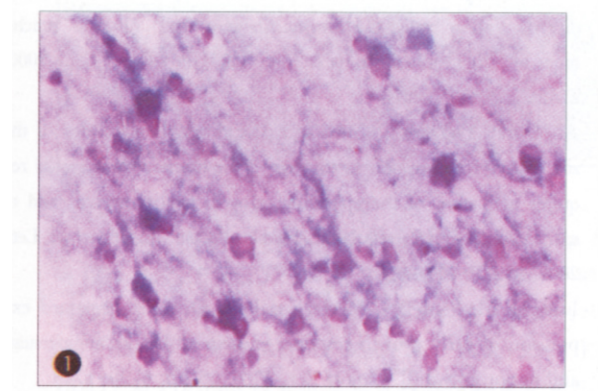


图1 纤维型星形细胞瘤中表达 *egr-1* mRNA 的阳性肿瘤细胞,胞浆呈紫蓝色着色,阳性肿瘤细胞呈不均匀散在分布,原位杂交×400

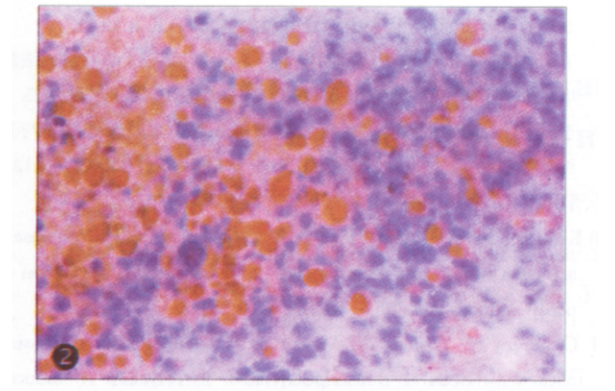


图2 胶质母细胞瘤中表达 EGR-1 蛋白的阳性肿瘤细胞,胞浆呈棕黄色着色,阳性肿瘤细胞呈不均匀散在分布,免疫组织化学染色 ABC 法×200

表2 不同级别胶质瘤组间 PCNA 阳性肿瘤细胞及凋亡肿瘤细胞密度的比较 (细胞数/0.05mm²)

分组	例数	<i>egr-1</i> mRNA 阳性细胞 ($\bar{x} \pm s$)	EGR-1 蛋白阳性细胞 ($\bar{x} \pm s$)
Ⅰ级组	25	73.56 ± 11.84	77.00 ± 11.56
Ⅱ级组	22	159.32 ± 7.03	46.36 ± 12.02
Ⅲ级组	26	237.46 ± 7.11	26.58 ± 7.71
F 值		41.37*	198.22**
P 值		<0.001	<0.001

q 检验 * 三组间均有显著性差异 $P < 0.05 \sim 0.01$, ** 三组间均有显著性差异 $P < 0.01$

2.3 73 例胶质瘤,总 *egr-1* mRNA 阳性肿瘤细胞密度为 78.04 ± 40.75 ,总 EGR-1 蛋白阳性肿瘤细胞密

度为 76.82 ± 42.83 ,总 PCNA 阳性肿瘤细胞密度为 157.78 ± 6.03 ,总凋亡肿瘤细胞密度为 49.81 ± 23.72 ($\bar{x} \pm s/0.05\text{mm}^2$)。经直线相关分析证实,*egr-1* mRNA、EGR-1 蛋白和 PCNA 阳性肿瘤细胞密度彼此间均呈显著性正相关($r=0.685 \sim 0.999, P < 0.001$),前三种阳性肿瘤细胞密度均与凋亡肿瘤细胞密度呈显著性负相关($r=-0.758 \sim -0.775, P < 0.001$)。

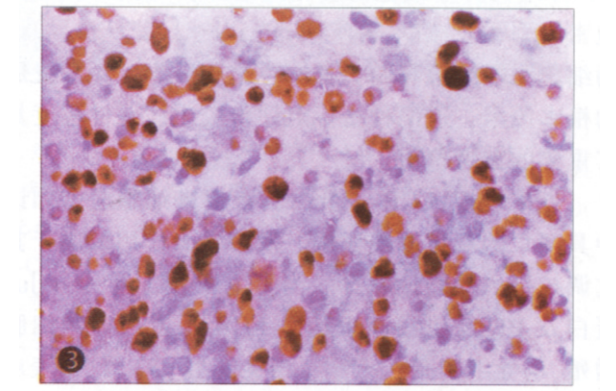


图3 间变性星形细胞瘤中表达 PCNA 的阳性肿瘤细胞,胞核呈棕黄色着色,阳性肿瘤细胞呈不均匀散在分布,免疫组织化学染色 ABC 法×400

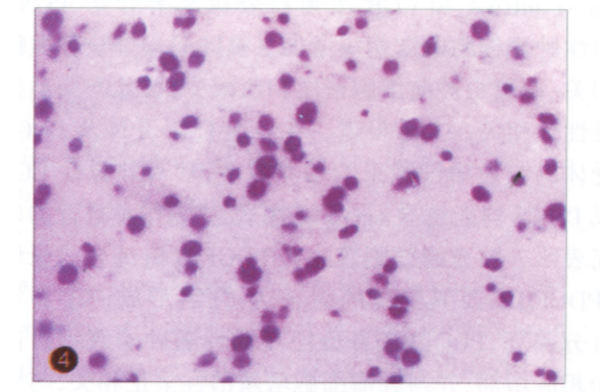


图4 间变性星形细胞瘤中的凋亡肿瘤细胞,胞核呈紫蓝色着色,凋亡肿瘤细胞呈不均匀散在分布 TUNEL 法×400

3 讨论

egr-1 基因编码的 EGR-1 蛋白是真核细胞内的重要转录因子。生理情况下,EGR-1 蛋白参予细胞增殖与凋亡动态平衡的调控^[4,5]。本组 73 例胶质瘤中,*egr-1* mRNA 和 EGR-1 蛋白的阳性表达率均为 100%,两种阳性肿瘤细胞均随肿瘤恶性程度升高而相应增加,不同级别胶质瘤组间差异均有显著性。提示胶质瘤普遍有 *egr-1* 基因过表达,*egr-1* 基因表达异常增加与胶质瘤的发生、发展密切相关,其表达水平是评价胶质瘤生物学行为的重要参考指标^[6]。

细胞增殖和凋亡在协调细胞群体相对稳定方面

起着同等重要的作用,这两个过程处于动态平衡将维持细胞群体中细胞数的相对恒定^[7,8]。无限增殖和凋亡抑制是转化细胞共有的特征,由此引起的细胞异常蓄积是肿瘤发生、发展的中心环节^[9]。本组73例胶质瘤增殖期细胞标记物PCNA的阳性表达率及凋亡肿瘤细胞的检出率均为100%,两种阳性肿瘤细胞密度间呈显著性负相关。随肿瘤级别升高PCNA阳性肿瘤细胞密度相应增加,而凋亡肿瘤细胞密度则相应减少,各组间比较均有显著性差异。说明细胞无限增殖和凋亡抑制也是胶质瘤发生、发展的根本原因,这两种指标对评价胶质瘤恶性程度具有重要的参考价值^[7-9]。

近来发现,EGR-1蛋白具有促进细胞增殖和诱导其凋亡的双重调控作用,发挥什么作用取决于其它调控蛋白的表达状况。当野生型p53蛋白、c-Jun蛋白及PTEN蛋白高表达时EGR-1蛋白抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡^[2,10,11]。当突变型p53蛋白、表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)及其受体、血小板源生长因子(platelet derived growth factor,PDGF)及其受体高表达时,则促进细胞增殖,抑制细胞凋亡^[14,12,13]。本组73例胶质瘤中,随肿瘤细胞egr-1 mRNA和EGR-1蛋白表达水平升高,PCNA阳性肿瘤细胞密度相应增加,彼此间均呈显著性正相关。而凋亡肿瘤细胞密度相应减少,彼此间均呈显著性负相关。文献报道,在表达EGF受体及PDGF受体的胶质瘤细胞系的培养液中,加入外源性EGF或PDGF均能诱导egr-1基因表达^[6]。作者最近的研究表明,胶质瘤细胞普遍有PDGF B链纯合二聚体(PDGFBB)及其受体的高表达,两者形成一个异常自分泌环,PDGFBB自分泌环活性随肿瘤级别升高而相应增加,并与肿瘤细胞增殖活性呈正相关,与肿瘤细胞凋亡程度呈负相关,和本次研究的结果完全一致^[13]。结合他人及我们以往研究的结果,提示在已有上述其它基因结构及表达异常存在的前提下,egr-1基因表达异常增加也可促进胶质瘤细胞增殖和抑制其凋亡,由此引起的细胞无限蓄积可能在胶质瘤发生及恶性进展过程中均起重要作用^[9,6,13]。

参考文献

- 1 Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1[J]. J Cell Physiol, 2002, 193(3): 287~292
- 2 Baron V, Duss S, Rhim J, et al. Antisense to the early growth response-1 gene (Egr-1) inhibits prostate tumor development in TRAMP mice[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1002: 197~216
- 3 Liu C, Yao J, Mercola D, et al. The transcription factor EGR-1 directly transactivates the fibronectin gene and enhances attachment of human glioblastoma cell line U251[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20315~20323
- 4 Al-Sarraj A, Thiel G. Substance P induced biosynthesis of the zinc finger transcription factor Egr-1 in human glioma cells requires activation of the epidermal growth factor receptor and of extracellular signal-regulated protein kinase [J]. Neurosci Lett, 2002, 332(2): 111~114
- 5 Lucerna M, Pomyje J, Mechtcheriakova D, et al. Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth[J]. Cancer Res, 2006, 66(13): 6708~6713
- 6 Kaufmann K, Thiel G. Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor induce expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor, in human malignant glioma cells [J]. J Neurol Sci, 2001, 189(1~2): 83~91
- 7 于士柱,黄悦,李莉,等.胶质瘤细胞端粒酶基因表达对其增殖及凋亡影响的研究[J].中国神经肿瘤杂志,2005,3(2):82~87
- 8 于士柱,浦佩玉,江德华,等.胶质瘤c-myc基因表达水平与其细胞增殖和凋亡关系的研究[J].现代神经疾病杂志,2003,3(1):22~25
- 9 于士柱,浦佩玉,江德华,等.胶质瘤细胞bd-2基因表达水平与其细胞增殖及凋亡关系的研究[J].中华病理学杂志,2000,29(1):12~15
- 10 Krones-Herzig A, Mittal S, Yule K, et al. Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53[J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5133~5143
- 11 Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, et al. PTEN expression elicited by EGR-1 transcription factor in calyculin A-induced apoptotic cells[J]. J Cell Biochem, 2005, 94(1): 117~125
- 12 Weisz L, Zalcenstein A, Sambolsky P, et al. Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function [J]. Cancer Res, 2004, 64(22): 8318~8327
- 13 于士柱,浦佩玉,江德华,等.胶质瘤细胞PDGFBB自分泌环活性与肿瘤细胞egr-1基因表达关系的研究[J].中华神经外科杂志,2000,16(4):235~238

(2006-12-05 收稿)

(2007-01-26 修回)

(孙慧校对)