



电子、语音版

·论著·

颅底脊索瘤中突变型p53相关的临床和细胞水平研究

田凯兵¹, 王亮¹, 马骏鹏¹, 杜江², 姚博瀚¹, 李达¹, 张俊廷¹, 吴震¹

1. 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科, 北京 100070

2. 首都医科大学附属北京天坛医院神经病理科, 北京 100070

摘要:目的 探讨突变型p53在颅底脊索瘤中的表达与患者预后及临床特点的关联,并在细胞层面验证突变型p53在颅底脊索瘤中的功能。方法 纳入2005年1月—2014年12月在首都医科大学附属北京天坛医院接受手术治疗的颅底脊索瘤患者49例,应用石蜡切片进行免疫组织化学染色,分析突变型p53表达与颅底脊索瘤患者预后及临床特点的关系。应用siRNA敲降脊索瘤细胞系UCH-1中的p53基因,分析敲降前后细胞功能的变化。结果 在蛋白水平,突变型p53表达水平是肿瘤术后进展的风险因素,随突变型p53表达水平升高,肿瘤进展风险增加($OR:1.040, 95\%CI:1.007\sim1.073, P=0.016$);另外,骨质浸润型肿瘤较非浸润型中突变型p53表达升高($t=3.319, P=0.002$),质地硬的较质地软的肿瘤突变型p53表达升高($t=-3.503, P=0.001$),血供丰富型较不丰富型肿瘤突变型p53表达升高($t=2.081, P=0.043$)。细胞水平,与对照组相比,p53敲降组的细胞活力在不同时间点间有差异($F=305.715, P=0.000$);p53敲降组细胞凋亡率低于对照组($t=-3.961, P=0.017$);与对照组相比,p53敲降组在第6($t=-5.232, P=0.014$)、12($t=4.778, P=0.017$)及24($t=-9.303, P=0.003$)小时穿透至下室的肿瘤细胞均增多。结论 颅底脊索瘤中突变型p53表达升高可导致术后肿瘤进展风险增加,其表达与肿瘤质地、侵袭性和血供情况相关;突变型p53表达受抑制后脊索瘤细胞增殖和侵袭能力提高,凋亡减少。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2022, 49(4): 26–33]

关键词: 颅底;脊索瘤;突变型p53;进展;侵袭

中图分类号:R739.41

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2022.04.005

Mutant p53-related clinical and cellular studies in skull base chordoma

TIAN Kai-Bing¹, WANG Liang¹, MA Jun-Peng¹, DU Jiang², YAO Bo-Han¹, LI Da¹, ZHANG Jun-Ting¹, WU Zhen¹

1. Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China

2. Department of Neuropathology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of mutant p53 in skull base chordoma and its association with patients' prognosis and clinical features, and to verify the function of mutant p53 in skull base chordoma at the cellular level.

Methods A total of 49 patients with skull base chordoma who underwent surgical treatment in Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, from January 2005 to December 2014 were enrolled, and paraffin sections were used for immunohistochemical staining to analyze the association of the expression of mutant p53 with the prognosis and clinical features of the patients with skull base chordoma. The p53 gene in the skull base chordoma cell line UCH-1 was knocked down by siRNA to analyze the change in cell function before and after knockdown. **Results** At the protein level, the expression level of mutant p53 (odds ratio = 1.040, 95% confidence interval: 1.007~1.073, $P = 0.016$) was a risk factor for tumor progression after surgery; in addition, the expression of mutant p53 in bone-infiltrating tumors was significantly higher than that in non-infiltrating tumors ($t = 3.319, P = 0.002$), the expression of mutant p53 in hard tumors was significantly higher than that in

基金项目:国家自然科学基金(81802683,82141113),北京市医院管理中心创新梦工场-田凯兵青年职工创新工作室,北京市优秀人才青年骨干个人项目(2018-田凯兵)。

收稿日期:2022-05-28;**修回日期:**2022-08-09

作者简介:田凯兵(1988—),男,主治医师,博士,主要从事颅脑肿瘤的相关研究,Email: tiankaibing@126.com。

通信作者:吴震(1966—),男,首都医科大学附属北京天坛医院神经外科肿瘤一病区科室主任,主任医师,博士,主要从事颅底与脑干肿瘤的相关研究,Email: wuzhen1966@aliyun.com。

soft tumors ($t = -3.503$, $P = 0.001$), and the expression of mutant p53 in tumors with rich blood supply was significantly higher than that in tumors without rich blood supply ($t = 2.081$, $P = 0.043$). At the cellular level, there was a significant difference in cell viability between the control group and the p53 knockdown group at different time points ($F = 305.715$, $P = 0.000$), and the p53 knockdown group had a significantly lower cell apoptosis rate than the control group ($t = -3.961$, $P = 0.017$). Compared with the control group, the p53 knockdown group had a significant increase in the number of tumor cells penetrating into the lower compartment at 6 hours ($t = -5.232$, $P = 0.014$), 12 hours ($t = 4.778$, $P = 0.017$), and 24 hours ($t = -9.303$, $P = 0.003$). **Conclusions** The increased expression of mutant p53 in skull base chordoma may increase the risk of tumor progression after surgery, and the expression of mutant p53 is associated with tumor texture, invasion, and blood supply. There are increases in the proliferation and invasion abilities of chordoma cells and a reduction in apoptosis after the expression of p53 is inhibited. [Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2022, 49(4): 26–33]

Keywords: skull base; chordoma; mutant p53; progression; invasion

脊索瘤是一种起源于人胚胎残余组织的恶性肿瘤,年发病率为0.080~0.089/10万人,占骨肿瘤的1.8%~4.3%,占骨恶性肿瘤的3.9%~6.1%^[1-2],脊索瘤主要发生于人中轴骨两端的颅底和骶尾部,向周围组织侵袭性生长,对周围骨质有明显破坏作用,且常包绕周围重要血管、神经和其他重要结构,这些特性给手术全切带来很大困难,手术全切率非常低,部分患者出现严重术后并发症^[3]。尽管近年来应用于脊索瘤的手术和放疗技术有明显提高,但肿瘤的药物研究工作却相对落后,而较低的手术切除率,较高的术后并发症发生率和肿瘤复发率仍然困扰着患者和医生^[1,3]。针对脊索瘤分子层面深入研究,有助于改进治疗方法,制定有效的药物治疗方案,对改善患者预后,延缓肿瘤复发有重要意义。

脊索瘤常见的肿瘤标志物有brachyury、S-100、CD-40、EMA等,近期有研究报道突变型p53在脊索瘤中发挥促肿瘤作用^[4-5],为进一步明确突变型p53在颅底脊索瘤中发挥的临床作用及初步机制,本课题组开展了此研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2005年1月—2014年12月在首都医科大学附属北京天坛医院神经外科接受手术治疗的原发颅底脊索瘤患者样本进行研究,一般临床资料由住院期间病历获取,随访资料由门诊随访期间获取。本研究经首都医科大学附属北京天坛医院医学伦理委员会批准。

纳入标准:①经病理证实为脊索瘤;②患者或家属具备正常沟通、交流能力,配合术后随访;③患者及家属均签署了知情同意书。排除标准:①合并颅内外其他严重疾病,如脑血管病、心肌梗死;②合并其他部位、类型肿瘤者;③存在认知、心理及精神障碍者。所有患者肿瘤样本在术中肿瘤取出后30 min内用10%甲醛固定,24 h后将样本进行石蜡包埋。样本存放于首都医科大学附属北京天坛医院临床医学研究中心。

患者年龄、性别等人口学信息从患者的住院病历中

获得。根据手术记录,获得患者肿瘤血供、质地等信息。其中,血供分为丰富和不丰富,质地分为软和包含硬成分。通过门诊或者电话进行随访,获得患者后续治疗情况、生存信息、肿瘤进展信息。

根据2013年WHO标准,脊索瘤分为经典型、脊索样型、未分化型^[6],本组病例中只有经典型和脊索样型

肿瘤影像学资料分析在影像归档和通信系统(PACS)进行,对患者磁共振资料和CT资料进行分析。根据对骨质的侵蚀程度,我们将肿瘤分为浸润型和非浸润型,浸润型定义为磁共振可见无论肿瘤向骨质外部分生长与否,肿瘤向斜坡骨质方向生长明显,CT可见肿瘤临近骨质破坏;非浸润型定义为肿瘤不破坏临近骨质而向周围脑组织或其他结构生长,CT上骨质破坏不明显。通过对比术前术后磁共振资料,将切除程度分为I级切除(切除率 $\geq 90\%$)和II级切除(切除程度 $< 90\%$)。根据术前磁共振上肿瘤与硬膜的关系定义肿瘤分期,硬膜外型定义为肿瘤完全位于硬膜外,硬膜下型定义为无论硬膜外部分体积大小,肿瘤侵蚀硬膜并有部分位于硬膜下。另外还通过划定肿瘤范围计算了肿瘤体积。

1.2 方法

1.2.1 突变型p53蛋白检测 石蜡样本制作5 μm 切片,试验开始前60℃烤片2 h,经过脱蜡、水合,应用柠檬酸钠进行抗原修复,3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,山羊血清(北京中杉金桥生物技术有限公司,中国北京)进行抗原封闭,p53抗体(Abcam,英国剑桥)(1:400倍稀释)4℃孵育12 h,二抗 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Conjugate(北京全式金生物技术有限公司,中国北京)(1:250倍稀释)室温孵育1 h,DAB染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,中国北京)显色,复染后脱水、透明、封片。

每例样本由2位病理科医师分别于400倍镜下随机挑选3个视野进行阳性率评估,评估结果取均值作为最终阳性率。

1.2.2 细胞培养及p53敲降 脊索瘤细胞系UCH-1从

脊索瘤基金会 (Chordoma Foundation: <https://www.chordomafoundation.org>) 获得, 培养瓶/皿用明胶 (Thermo Fisher Scientific, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆) 预处理, 应用 IMDM (Thermo Fisher Scientific, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆) 和 RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆) 作为基础培养基 (4:1), 培养基中加入 $1 \times$ NEAA ($100 \times$, Thermo Fisher Scientific, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆)、 $1 \times$ 青链霉素 (Thermo Fisher Scientific, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆) 和 10% 胎牛血清 (Hyclone, 美国犹他州洛根市)。

细胞转染应用 siRNA (吉玛基因, 中国苏州) 进行, p53 敲降组细胞应用 p53 siRNA (序列: 5'-GCAUGAACC-GGAGGCCCAU-3') 进行转染, 对照组细胞应用阴性对照 siRNA (序列: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3') 进行转染^[7], 转染试剂应用 siRNA MATE™ (吉玛基因, 中国苏州), 转染前 24 h 细胞种植于 6 孔板, 约 6×10^4 /孔, 无抗生素培养基 2 mL/孔, 转染前更换培养基。转染前将 6 pmol siRNA 加入 200 μ L Opti-MEM 培养基, 混匀后室温放置 5 min。取 15 μ L siRNA MATE™ 加入上述培养基, 加入后充分混匀, 室温放置 10 min。将 siRNA 血清加入 6 孔板并做好标记, 原条件进行培养。转染后 6 h 观察如细胞死亡较多更换培养基 1 次, 培养 48 h 后测试转染效率。

应用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测转染效率, 转染好的细胞加入 1 mL TRIZol 进行 RNA 提取、应用反转录试剂盒 (Thermo Fisher, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆) 进行反转录、应用 RT-PCR 试剂盒 (Thermo Fisher, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆) 探针法进行 qRT-PCR, p53 探针 (Thermo Fisher, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆), 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算转染效率, 转染小于不低于 50% 为转染合格。

1.2.3 CCK8 实验 增殖实验应用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Molecular Technologies, 日本) 试剂盒进行, 每组重复 3 次, 将细胞接种于 96 孔板培养, 转染完成后更换含有 10% CCK-8 的培养基, 培养箱继续培养 12、24 和 48 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度值 (OD 值), 计算细胞活性, 细胞活性高表示增殖能力强。细胞活性计算公式: 细胞活性 = (细胞 OD 值 - 培养基 OD 值) / (0 h 细胞 OD 值 - 0 h 培养基 OD 值)

1.2.4 凋亡实验 凋亡实验应用 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, 美国富兰克林湖) 试剂盒完成, 每组重复 3 次。转染 24 h 后细胞胰酶消化离心, DPBS 洗 3 次进行细胞计数并离心, 加入 $1 \times$ Binding Buffer 将细胞稀释为 1×10^6 个细胞/mL, 取 100 μ L 于流式管, 分别加入 5 μ L PE Annexin V 和 5 μ L 7-AAD, 轻轻混匀后避光室温反应 15 min, 加入 400 μ L $1 \times$ Binding Buffer 后 1 h 内流式细胞仪检测。

1.2.5 侵袭实验 应用 24 孔 transwell 小室 (Coring, 美国康宁) 进行细胞侵袭实验, 每组设置 3 次重复。小室应用基质胶 Matrigel (Coring, 美国康宁) 预处理, 上室加入无血清细胞混悬液, 下室加入 20% 血清培养基, 分别于培养第 6、12 及 24 小时染色观察并计数。

1.3 统计学方法

应用 IBM SPSS Statistics 20.0 进行统计分析, 首先对纳入研究的患者进行统计学描述, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 t 检验或重复测量数据的方差分析; 计数资料采用例表示, 比较采用 χ^2 检验; 应用 cox 回归分析对患者术后肿瘤进展的影响因素进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

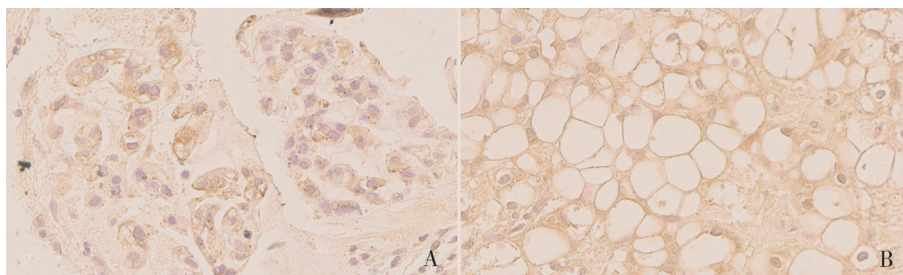
2 结果

2.1 一般资料

本研究纳入颅底脊索瘤患者 49 例。其中, 男性 22 例, 女性 27 例; 年龄 11~63 岁, 平均 (50.0 ± 16.4) 岁; 肿瘤体积 $2 \sim 104 \text{ cm}^3$, 平均 $(23 \pm 25.4) \text{ cm}^3$; 术前卡诺夫斯凯计分 (KPS) 50~100 分, 平均 (80 ± 11.8) 分; 36 例患者切除率 $\geq 90\%$, 13 例患者切除率 $< 90\%$; 术后病理 34 例为经典型, 15 例为软骨样型; 9 例患者接受术后放疗, 其中普通光子放疗 2 例, 单纯伽马刀 4 例, 单纯质子放疗 1 例, 伽马刀 + 质子放疗 2 例; 随访期 4~62 个月, 平均 22 个月, 其中 25 例出现肿瘤进展, 平均无进展生存时间 35.5 个月; 5 例患者死亡, 其中 4 例死于肿瘤进展, 1 例死于原发脑干出血。

2.2 免疫组织化学 (免疫组化)

颅底脊索瘤中突变型 p53 主要表达于细胞核和细胞质 (图 1), 本组肿瘤样本突变型 p53 染色阳性率 10%~70%, 平均 $(50 \pm 16.4)\%$ 。



A: 阳性率低的样本; B: 阳性率高的样本

图 1 颅底脊索瘤突变型 p53 (免疫组化, 400 \times)

2.3 术后肿瘤进展相关因素分析

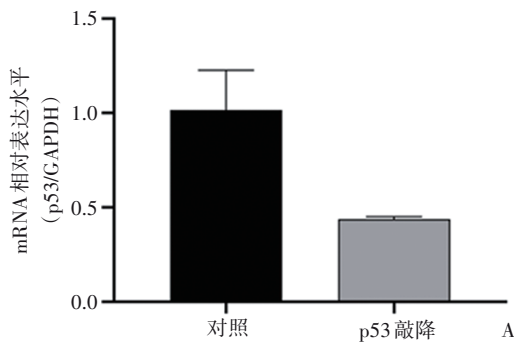
单因素分析结果表明,肿瘤切除程度和突变型p53表达情况是术后肿瘤进展的影响因素,将其纳入多因素分析,表明突变型p53表达是肿瘤进展的风险因素。见表1、2。

表1 颅底脊索瘤患者术后肿瘤进展的单因素分析

因素	无进展患者	进展患者	t/χ^2 值	P值
年龄/ $(\bar{x} \pm s, \text{岁})$	32.3±15.2	35.6±14.4	0.497	0.481
体积/ $(\bar{x} \pm s, \text{cm}^3)$	32.3±27.0	29.4±24.2	0.351	0.553
术前KPS/ $(\bar{x} \pm s, \text{分})$	82.9±10.4	75.2±11.9	1.348	0.246
突变型p53水平/ $(\bar{x} \pm s, \%)$	37.5±11.9	58.2±13.6	8.209	0.004
性别/例	男	11	0.053	0.818
	女	13		
病理性质/例	经典型	15	2.224	0.136
	软骨样型	9		
放疗情况/例	是	2	0.297	0.586
	否	22		
切除程度/例	≥90%	21	4.835	0.028
	<90%	3		
分型/例	浸润	21	1.001	0.317
	非浸润	3		
分期/例	硬膜下	11	0.455	0.500
	硬膜外	13		
质地/例	软	15	3.816	0.051
	含硬成分	9		
血供/例	丰富	11	0.325	0.568
	不丰富	13		

表2 颅底脊索瘤患者术后肿瘤进展的多因素分析

因素	b	S_b	Wald χ^2	P值	OR	95%CI
突变型p53水平	0.039	0.016	5.792	0.016	1.040	1.007~1.073
切除程度	0.486	0.449	1.174	0.279	1.626	0.675~3.920



A: 敲降效率; B: p53 siRNA 转染(100×), 左侧为显微镜下直接观察, 右侧为 GFAP 荧光染色后荧光显微镜观察, 两组细胞形态均正常, 细胞感染效率达到 80% 以上

图2 UCH-1 细胞 p53 siRNA 转染

对 p53 敲降组和对照组细胞在不同时间点间的细胞活力进行比较, 采用重复测量数据的方差分析, 结果显示: ①不同时间点间的细胞活力有差异 ($F=305.715, P=$

2.4 不同类型颅底脊索瘤间突变型p53表达水平分析

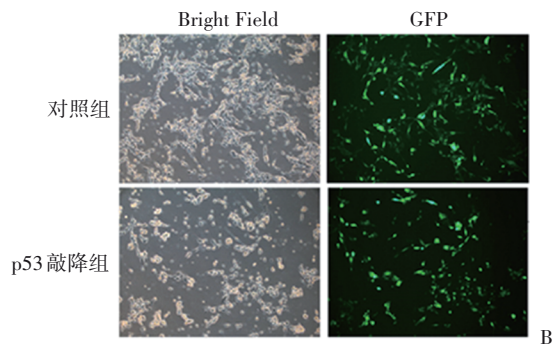
进一步对不同类型颅底脊索瘤间突变型p53相对表达水平进行差异分析, 结果表明不同性别、不同病理类型、不同分期的肿瘤间突变型p53表达未见统计学差异。但不同分型、不同质地、不同血供的肿瘤间突变型p53表达水平存在差异: 其中, 骨质浸润型肿瘤较非浸润型中突变型p53表达升高 ($t=3.319, P=0.002$), 质地硬的较质地软的肿瘤突变型p53表达升高 ($t=-3.503, P=0.001$), 血供丰富的较不丰富的肿瘤突变型p53表达升高 ($t=2.081, P=0.043$)。见表3。

表3 不同临床特征间颅底脊索瘤间突变型p53相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

因素	分类	突变型p53蛋白相对表达水平	t值	P值
性别	男	45.0±18.5	-1.183	0.243
	女	51.6±14.3		
病理性质	经典型	46.3±16.8	-1.118	0.269
	软骨样型	52±15.2		
分型	浸润	51.0±14.5	3.319	0.002
	非浸润	30.7±17.9		
分期	硬膜下	47.4±15.1	-0.266	0.791
	硬膜外	48.7±17.8		
质地	软	39.5±16.9	-3.503	0.001
	含硬成分	54.5±13.0		
血供	丰富	52.0±14.6	0.043	2.081
	不丰富	43.0±17.2		

2.5 细胞水平试验结果

应用 siRNA 敲降 p53, 感染效率 80% 以上, 细胞形态正常, 提取转染前后细胞应用 qRT-PCR 检测 p53 敲低效率, 敲低效率为 57% (图2)。



0.000, 随着时间延长, 细胞活力逐渐增加; ②组间细胞活力有差异 ($F=254.977, P=0.000$), p53 敲降组细胞活力高于对照组; ③p53 敲降组与对照组细胞活力变化趋势有差

异($F=30.981, P=0.000$)。见表4, 图3。

表4 p53敲降组和对照组各时间段细胞活力比较情况 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	第24小时	第48小时	第72小时
p53敲降组	3	1.600±0.015	2.437±0.073	3.844±0.223
对照组	3	1.160±0.115	1.773±0.055	2.359±0.115

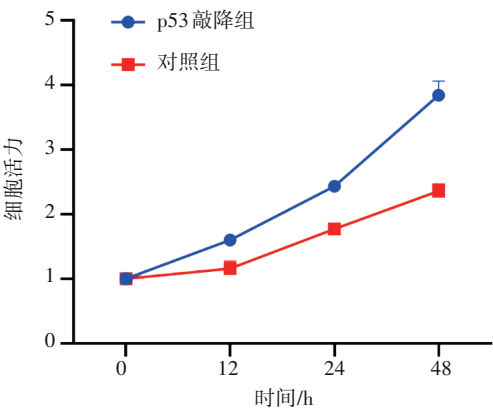


图3 UCH-1细胞增殖活力折线图

p53敲降组细胞凋亡率(4.2%, 4.3%, 3.2%)低于对照

组(7.8%, 6.3%, 5.8%)($t=-3.961, P=0.017$)。见图4。

与对照组相比, p53敲降组在第6($t=-5.232, P=0.014$)、12($t=4.778, P=0.017$)及24($t=-9.303, P=0.003$)小时穿透至下室的肿瘤细胞均增多。见图5。

3 讨论

脊索瘤是一种罕见的低度恶性肿瘤, 多发生于人体中轴骨, 其中颅底脊索瘤约占三分之一, 部分脊索瘤呈浸润性生长, 对周围骨质破坏严重, 术后易复发, 患者远期预后差^[8-9]。目前尚无针对脊索瘤的有效药物治疗方案, 为明确相关作用因子和机制, 包含较多样本的基础研究亟需开展, 本研究着重探讨突变型p53在颅底脊索瘤的表达水平及其作用。

p53基因位于17号染色体, 全长约20 kb, 野生型p53基因是抑癌基因, 野生型p53蛋白由393个氨基酸构成, 主要包含转录激活、DNA结合、四聚体化和负性调节4个结构域, 由5个保守区域和一个环状螺旋结构构成该蛋白的三维立体结构的一部分, 野生型p53蛋白突变主要发生于该三维立体结构^[10]。一般情况下野生型p53不发挥作用, 但当细胞出现非受控的分裂和增殖时被激活^[11], 可诱导p21表达导致的细胞周期暂停^[12]。当细胞受损无法修

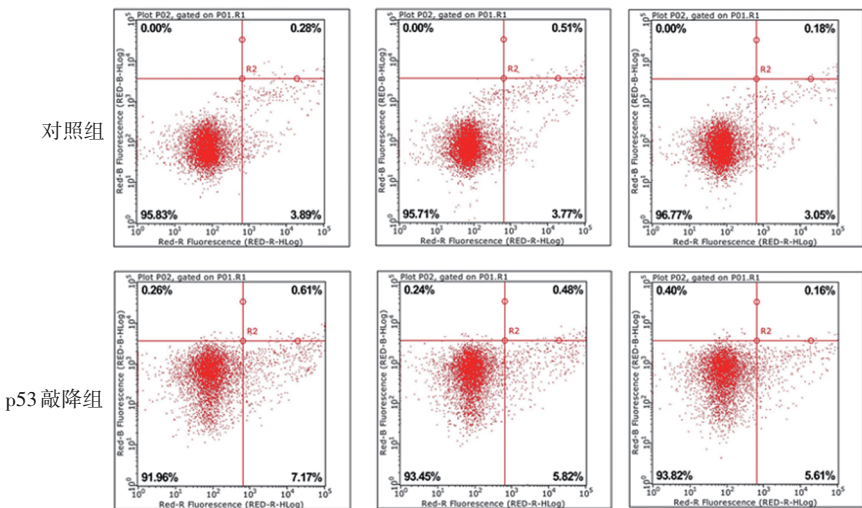
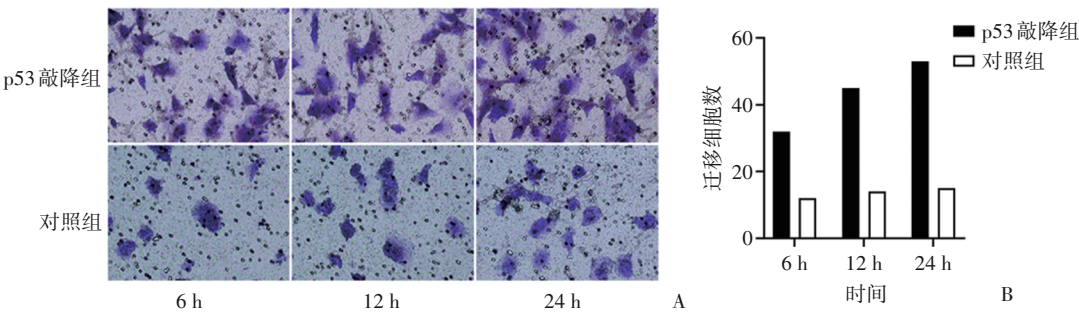


图4 UCH-1细胞p53敲降前后凋亡结果(流式细胞检测, Q2+Q3为总凋亡率)



A: 染色镜下观察(100×); B: 迁移细胞数柱状图

图5 Transwell检测UCH-1细胞迁移水平

复时,野生型p53蛋白还可触发细胞程序性凋亡^[13]。突变型p53蛋白失去和DNA结合的能力,并且可与野生型p53蛋白结合形成稳定的四聚体而使野生型p53丧失正常功能,通常情况下,因突变型p53蛋白构象改变,半衰期长,一般免疫组化检测的是突变型p53蛋白^[14]。多项研究表明,突变型p53表达与前列腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌等多种肿瘤的发生、发展、侵袭和转移相关^[15-19],近年来,有研究发现脊索瘤中突变型p53表达与术后肿瘤进展相关^[4-5],但之前研究将颅底脊索瘤和骶尾部脊索瘤进行整体分析,本研究纳入更多病例将颅底脊索瘤进行单独分析,并且除蛋白层面外,本研究进一步在细胞层面深入探讨其功能,最终从蛋白水平证实突变型p53高表达与脊索瘤的侵袭性、质地、血供和肿瘤进展相关,并从细胞层面证实与对照组相比,p53敲降组细胞增殖和侵袭能力提高,凋亡减少。

突变型p53与脊索瘤增殖相关,Pallini和Matsuno等^[20-21]研究发现p53基因突变与脊索瘤患者术后短期内进展相关,Yakkioui等^[4]在一项研究中纳入了25例脊索瘤样本,发现突变型p53高表达与脊索瘤中肿瘤细胞高有丝分裂指数和较差的预后相关,同时该研究中发现鼠双微基因(MDM2)在脊索瘤中高表达且与其高有丝分裂指数相关,他指出MDM2高表达可诱导p53基因转录为p53 47k蛋白,该蛋白不能发挥p53蛋白正常功能从而促进肿瘤细胞的增殖。Naka等^[22]的研究中纳入了17例脊索瘤样本,其研究结果证实突变型p53高表达与肿瘤高增殖率相关。在Yadav等^[5]的一项研究中,纳入了9例儿童和13例成人脊索瘤样本,结果表明,与成人肿瘤相比,儿童肿瘤异型性更加明显,有丝分裂指数和突变型p53高表达率更高,限于样本例数无法进行有效统计学分析,但作者指出突变型p53高表达可通过某种机制促进儿童肿瘤细胞增殖。另有多项研究中也证实突变型p53阳性率与ki67阳性率(代表肿瘤细胞增殖水平)相关,且突变型p53高表达是肿瘤进展的风险因素^[20,23-25]。本研究与上述研究结果一致,脊索瘤中突变型p53高表达是术后肿瘤进展的影响因素,细胞水平p53表达受抑制,肿瘤细胞增殖能力提高,推断是因脊索瘤细胞内野生型和突变型p53表达均受到抑制,突变型p53无直接刺激或抑制增殖作用,而野生型p53表达降低后其抗肿瘤作用也随之减弱,导致细胞增殖能力提高。

突变型p53高表达与脊索瘤的侵袭性.Ma等^[26]的研究结果表明,iASPP可与野生型p53特异性结合而抑制其发挥作用,可导致肿瘤细胞增殖和侵袭能力提高。另外多项研究表明脊索瘤侵袭性与STAT3、HOXC8、FUBP1表达水平相关^[27-29],而野生型p53与多种肿瘤内STAT3、HOXC8、FUBP1表达水平相互影响^[30-34],由此可推断脊索瘤内野生型p53表达降低或发生突变不能发挥作用,进而

可通过影响STAT3、HOXC8、FUBP1的表达,进一步导致肿瘤侵袭性增强。

肿瘤血供情况是评估肿瘤患者预后的重要指标,虽然本组病例中肿瘤血供不是肿瘤进展的风险因素,但本课题组一项纳入153例脊索瘤患者的病例分析结果表明血供丰富者更容易复发^[35],本研究结果证实血供丰富的脊索瘤中突变型p53表达水平较血供不丰富者高。目前尚未有研究突变型p53与脊索瘤血供程度的相关性,但野生型p53被证实可抑制局部血管形成,而突变型p53的出现可促进肿瘤血管生成^[36-37],研究者认为脊索瘤内野生型p53可抑制血管生成,而突变型p53的出现导致野生型p53失去其生物学功能,从而导致突变型p53表达高的肿瘤内血管生成增多,而血供更加丰富。

虽然p53表达与肿瘤组织质地的相关性研究较少,但本研究结果显示质地硬的肿瘤突变型p53表达高于质地软的肿瘤。而本课题组前期研究证实肿瘤质地是影响术后肿瘤进展的潜在风险因素,质地硬的肿瘤较质地软的肿瘤进展快^[35],这可能由于质地硬的肿瘤中突变型p53蛋白高表达,抑制野生型p53发挥抗肿瘤作用而导致质地硬的肿瘤增殖快。关于不同质地肿瘤中突变型p53蛋白表达差异的原因,研究者认为质地硬的肿瘤中突变型p53蛋白表达高,野生型p53肿瘤抑制作用受抑,对周围骨质侵袭性高,肿瘤内骨性成分多而肿瘤质硬;而质地软的肿瘤中突变型p53蛋白表达水平低,野生型p53可发挥抑肿瘤作用,对周围骨质的侵袭性弱,骨质破坏不明显而导致肿瘤质地较软。

本研究结果证实敲降脊索瘤细胞中突变型p53表达可抑制脊索瘤细胞凋亡,Hai等^[38]研究中证实lncRNA XIST在脊索瘤中可促进肿瘤细胞增殖并抑制其凋亡,而lncRNA XIST表达可导致miR-124-3p的靶基因p53凋亡刺激蛋白抑制剂(iASPP)上调,而iASPP可特异性的和野生型p53蛋白结合抑制肿瘤细胞凋亡,这一研究表明野生型p53蛋白功能受阻可导致脊索瘤细胞凋亡受抑制,本研究中在细胞水平野生型和突变型p53表达均受到抑制,而既往研究表明突变型p53无肿瘤抑制作用^[14],推断是因野生型p53水平降低,导致抑肿瘤作用减弱,而引起肿瘤细胞凋亡减弱。

本研究尚存在一些不足,首先,本研究纳入的样本量相对较小,需进一步在更多的样本中进行验证;其次,本研究仅仅在蛋白水平和细胞水平对突变型p53在颅底脊索瘤中发挥的作用进行了初步研究,其具体作用机制尚需进一步深入研究。

综上,颅底脊索瘤中突变型p53表达升高是术后肿瘤进展的风险因素,突变型p53表达与肿瘤质地、侵袭性和血供情况相关;突变型p53表达受抑制后脊索瘤细胞增殖和侵袭能力提高,凋亡减少。

参 考 文 献

- [1] ULICI V, HART J. Chordoma[J]. Arch Pathol Lab Med, 2022, 146(3): 386-395.
- [2] ZOU MX, LV GH, ZHANG QS, et al. Prognostic factors in skull base chordoma: a systematic literature review and meta-analysis[J]. World Neurosurg, 2018, 109: 307-327.
- [3] STACCHIOTTI S, SOMMER J. Chordoma Global Consensus Group. Building a global consensus approach to chordoma: a position paper from the medical and patient community[J]. Lancet Oncol, 2015, 16(2): e71-e83.
- [4] YAKKIOUI Y, TEMEL Y, CREYTENS D, et al. A comparison of cell-cycle markers in skull base and sacral chordomas[J]. World Neurosurg, 2014, 82(1-2): e311-e318.
- [5] YADAV R, SHARMA MC, MALGULWAR PB, et al. Prognostic value of MIB-1, p53, epidermal growth factor receptor, and INI1 in childhood chordomas[J]. Neuro Oncol, 2014, 16(3): 372-381.
- [6] WHO Classification of Tumours Editorial Board. WHO classification of tumours of soft tissue and bone[M]. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 2013: 328-329.
- [7] WAN JK, ZHANG J, ZHANG JQ. Expression of p53 and its mechanism in prostate cancer[J]. Oncol Lett, 2018, 16(1): 378-382.
- [8] FREZZA AM, BOTTA L, TRAMA A, et al. Chordoma: update on disease, epidemiology, biology and medical therapies[J]. Curr Opin Oncol, 2019, 31(2): 114-120.
- [9] 梁松林, 荔志云, 孙建军, 等. 颅底脊索瘤的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2020, 47(6): 656-660.
- [10] MAY P, MAY E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein[J]. Oncogene, 1999, 18(53): 7621-7636.
- [11] HARRIS SL, LEVINE AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops[J]. Oncogene, 2005, 24(17): 2899-2908.
- [12] GEORGAKILAS AG, MARTIN OA, BONNER WM. p21: a two-faced genome guardian[J]. Trends Mol Med, 2017, 23(4): 310-319.
- [13] GOTTLIEB TM, OREN M. p53 and apoptosis[J]. Semin Cancer Biol, 1998, 8(5): 359-368.
- [14] RANGEL LP, COSTA DCF, TCRGVIEIRA, et al. The aggregation of mutant p53 produces prion-like properties in cancer[J]. Prion, 2014, 8(1): 75-84.
- [15] CALVOCORESSI L, UCHIO E, KO J, et al. Prostate cancer aggressiveness and age: impact of p53, BCL-2 and microvessel density[J]. J Invest Med, 2018, 66(8): 1142-1146.
- [16] NAKAYAMA M, OSHIMA M. Mutant p53 in colon cancer[J]. J Mol Cell Biol, 2019, 11(4): 267-276.
- [17] CARVALHO J, OLIVEIRA P, SENZ J, et al. Redefinition of familial intestinal gastric cancer: clinical and genetic perspectives[J]. J Med Genet, 2021, 58(1): 1-11.
- [18] WADOWSKA K, BIL-LULA I, TREMBECKI Ł, et al. Genetic markers in lung cancer diagnosis: a review[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4569.
- [19] 郭彦杰, 冯妮, 李璇, 等. 沉默信息调节因子 1/p53 信号通路参与 MPTP 诱导的帕金森病小鼠多巴胺能神经元丢失[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2020, 47(1): 38-43.
- [20] PALLINI R, MAIRA G, PIERCONTI F, et al. Chordoma of the skull base: predictors of tumor recurrence[J]. J Neurosurg, 2003, 98(4): 812-822.
- [21] MATSUNO A, SASAKI T, NAGASHIMA T, et al. Immunohistochemical examination of proliferative potentials and the expression of cell cycle-related proteins of intracranial chordomas[J]. Hum Pathol, 1997, 28(6): 714-719.
- [22] NAKA T, FUKUDA T, CHUMAN H, et al. Proliferative activities in conventional chordoma: a clinicopathologic, DNA flow cytometric, and immunohistochemical analysis of 17 specimens with special reference to anaplastic chordoma showing a diffuse proliferation and nuclear atypia[J]. Hum Pathol, 1996, 27(4): 381-388.
- [23] TAUZIÉDE-ESPARIAT A, BRESSON D, POLIVKA M, et al. Prognostic and therapeutic markers in chordomas: a study of 287 tumors[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2016, 75(2): 111-120.
- [24] SAKAI K, HONGO K, TANAKA Y, et al. Analysis of immunohistochemical expression of p53 and the proliferation marker Ki-67 antigen in skull base chordomas: relationships between their expression and prognosis[J]. Brain Tumor Pathol, 2007, 24(2): 57-62.
- [25] NAKA T, BOLTZE C, KUESTER D, et al. Alterations of G1-S checkpoint in chordoma: the prognostic impact of p53 overexpression[J]. Cancer, 2005, 104(6): 1255-1263.
- [26] MA YL, ZHU B, LIU XG, et al. iASPP overexpression is associated with clinical outcome in spinal chordoma and influences cellular proliferation, invasion, and sensitivity to cisplatin *in vitro*[J]. Oncotarget, 2017, 8(40): 68365-68380.
- [27] WANG AC, OWEN JH, ABUZEID WM, et al. STAT3 inhibition as a therapeutic strategy for chordoma[J]. J Neurol Surg B Skull Base, 2016, 77(6): 510-520.
- [28] FANG XY, YAN RC. miR-152 inhibits the proliferation and invasion of chordoma cells by targeting *HOXC8*[J]. J Int Med Res, 2019, 47(10): 5185-5193.
- [29] WEN H, FU Y, ZHU YP, et al. Long non-coding RNA KRT8P41/miR-193a-3p/FUBP1 axis modulates the proliferation and invasion of chordoma cells[J]. J Bone Oncol, 2021, 31: 100392.
- [30] PHAM TH, PARK HM, KIM J, et al. STAT3 and p53: dual target for cancer therapy[J]. Biomedicines, 2020, 8(12): 637.
- [31] 王佳琦. FTY720抑制脊索瘤细胞增殖、侵袭和迁移及相关机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [32] JIANG Y, WANG ZL, YING CT, et al. FMR1/circCHAF1A/miR-211-5p/*HOXC8* feedback loop regulates proliferation and tumorigenesis via MDM2-dependent p53 signaling in GSCs[J]. Oncogene, 2021, 40(24): 4094-4110.
- [33] DEBAIZE L, TROADEC MB. The master regulator FUBP1: its emerging role in normal cell function and malignant development

- [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(2): 259-281.
- [34] POOLE MI, SORRIBES I, JAIN HV. Modeling hepatitis C virus protein and p53 interactions in hepatocytes: implications for carcinogenesis[J]. Math Biosci, 2018, 306: 186-196.
- [35] TIAN K, WANG L, MA J, et al. MR imaging grading system for skull base chordoma[J]. Am J Neuroradiol, 2017, 38(6): 1206-1211.
- [36] PFAFF MJ, MUKHOPADHYAY S, HOOFNAGLE M, et al. Tumor suppressor protein p53 negatively regulates ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis[J]. J Vasc Surg, 2018, 68(6S): 222S-233S.e1.
- [37] BABAEI G, ALIARAB A, ASGHARI VOSTAKOLAEI M, et al. Crosslink between p53 and metastasis: focus on epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cell, angiogenesis, autophagy, and anoikis[J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(11): 7545-7557.
- [38] HAI B, PAN XY, DU CC, et al. LncRNA XIST promotes growth of human chordoma cells by regulating miR-124-3p/iASPP pathway[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 4755-4765.

责任编辑:王荣兵