

翼状胬肉的 p53 和 TGF- β 表达及相关联系

李娟^{1,2} 廖若辰^{1,2} 马春侠^{1,2} 谭小波^{1,2*}

1 承德医学院附属医院眼科 2 河北省泛血管疾病重点实验室

DOI:10.12238/bmtr.v7i1.11798

[摘要] 目的: 评估抑癌基因p53蛋白和转化生长因子 β (TGF- β) 在翼状胬肉中的表达,并探讨它们之间的关系。方法: 在20例翼状胬肉、10例正常结膜的研究样本中,进行组织蜡块包埋切片,使用免疫组织化学染色的方法观察p53和TGF- β 的表达。结果: 在我们的研究中,45%翼状胬肉标本的p53表达呈阳性;40%翼状胬肉标本TGF- β 染色呈阳性;所有正常结膜均未显示p53或TGF- β 染色。翼状胬肉组的p53和TGF- β 反应性均大于正常结膜组($P<0.05$)。Fisher精确检验分析证实了TGF- β 与p53表达之间存在高度统计学意义的相关性($P<0.05$)。结论: p53和TGF- β 翼状胬肉中过表达,它们之间存在相关性。

[关键词] 翼状胬肉; TGF- β ; p53

中图分类号: R777.33 文献标识码: A

Expression of p53 and TGF- β in pterygium and related associations

Juan Li^{1,2} Ruochen Liao^{1,2} Chunxia Ma^{1,2} Xiaobo Tan^{1,2*}

1 Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University

2 Hebei Key Laboratory of Panvascular Diseases

[Abstract] Objective: To assess the expression of the oncogenes p53 protein and transforming growth factor β (TGF- β) in pterygium and to explore the relationship between them. Methods: In the study samples of 20 pterygium and 10 normal conjunctiva, tissue wax block embedded sections were performed to observe the expression of p53 and TGF- β using immunohistochemical staining. Results: In our study, 45% of the pterygium specimens were positive for p53 expression; 40% of the pterygium specimens stained positively for TGF- β ; and all normal conjunctivae showed no p53 or TGF- β staining. Both p53 and TGF- β reactivity were greater in the pterygium group than in the normal conjunctiva group ($P<0.05$). analysis by Fisher's exact test confirmed a highly statistically significant correlation between TGF- β and p53 expression ($P<0.05$). Conclusion: p53 and TGF- β were overexpressed in pterygium and there was a correlation between them.

[Key words] pterygium; TGF- β ; p53

引言

翼状胬肉是一种常见的良性纤维血管性眼部疾病。它的特点是结膜组织的肉质三角形侵入角膜。翼状胬肉的发病机制尚不完全清楚。最近的数据提供的证据表明,遗传成分^[1]、病毒感染、免疫机制、细胞因子、生长因子、细胞外基质重塑、抗凋亡机制和几种血管生成因子可能在这种疾病的发病机制中发挥作用^[2]。翼状胬肉长期以来一直被认为是一种慢性退行性疾病。最近,在翼状胬肉中发现了轻度异型增生、局部侵袭性和高复发率等肿瘤样特征。翼状胬肉标本上皮中p53的发现进一步证明翼状胬肉是一种与UV相关的肿瘤生长障碍,而不是退行性过程。p53蛋白是一种由TP53基因编码的肿瘤抑制蛋白,位于17号染色体的短臂上^[3]。p53对于调节细胞分裂和防止肿瘤形成至关重要。在正常细胞中,p53蛋白的寿命很短,并且维持在较低水

平,通常无法检测到;但p53基因的突变导致其蛋白质在细胞中的稳定性增加,这可以通过针对p53的几个表位的抗体来检测。许多研究人员发现原发性和复发性翼状胬肉的上皮中p53蛋白水平异常。免疫组化报道的翼状胬肉p53阳性染色的患病率为7.9%至100%^[4]。此外,许多纤维血管生成生长因子与翼状胬肉发病机制有关,例如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、碱性成纤维细胞生长因子(β -FGF)、血小板源性生长因子(PDGF)和转化生长因子- β (TGF- β)^[5],野生型p53的表达与各种细胞类型中TGF- β 启动子的强烈抑制有关^[6,7]。一些研究人员提出了翼状胬肉发病机制的过敏和免疫学基础^[8]。在光折射角膜切除术后的恢复期间,在角膜中鉴定出几种生长因子、细胞因子和金属蛋白酶。这些由迁移性白细胞产生的生物因子被认为在翼状胬肉的形成中起着重要作用^[9]。此外,已经证明UV可能会激活翼状胬肉上皮细胞

中的信号通路,从而导致细胞因子和生长因子的产生^[10]。然而,TGF- β 在翼状胬肉中的作用以及TGF- β 与p53表达的差异尚不清楚。本研究的目的是进一步研究翼状胬肉中TGF- β 和p53蛋白的表达以及这两种蛋白之间的可能联系。

1 材料和方法

1.1 病人

从20例患者(11例男性和9例女性)中采集翼状胬肉组织,年龄从40岁到76岁不等(平均 57.15 ± 9.816)岁。从10例患者(5例男性和5例女性)中采集正常结膜组织,年龄从43岁到67岁不等(平均 53.0 ± 8.781)岁。所有翼状胬肉患者均在承德医学院附属医院接受了翼状胬肉切除术切除。所有病灶均位于鼻侧,仅以原发性翼状胬肉头部作为翼状胬肉样本。从10例接受视网膜脱离手术时无翼状胬肉和睑裂膜的患者(6例男性和4例女性)的内侧球结膜中收集正常结膜样本作为对照,这些患者年龄为40至62岁(平均 48.5 ± 7.619)岁。表1总结了患者的相关临床特征。患者术前接受3g/L左氧氟沙星滴眼液,每天4次,持续2-3d,术前接受0.4g/100mgBenoxil局部麻醉剂。手术过程中未使用药物或化学制剂。该研究方案得到了当地研究和伦理委员会的批准,并根据赫尔辛基宣言获得了本研究中所有受试者的知情同意。

表1 样本相关性

样本	变量	患者人数	
翼状胬肉(20)	年龄(岁)	>55	11
		≤ 55	9
	性别	男性	11
		女性	9
TGF- β 表达	阳性	8	
	阴性	12	
P53表达	阳性	9	
	阴性	11	
正常结膜(10)	年龄(岁)	>55	2
		≤ 55	8
	性	男性	6
		女性	4

1.2 方法

组织段用40%多聚甲醛固定过夜,并包埋在石蜡中。如前所述,使用过氧化物酶偶联方法切割 $4 \mu\text{m}$ 的切片并处理p53和TGF- β 的免疫组织化学证明^[11]。简而言之,所有玻片均经过脱蜡处理,并用乙醇浓度和磷酸盐缓冲液(PBS)的梯度再水化。在室温下将内源性过氧化物酶活性浸泡在30mL/LH202中10分钟,以阻断内源性过氧化物酶活性。通过在10mmol/L柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)中微波加热15分钟进行抗原修复。用10%正常山羊血清的PBS溶液处理切片10分钟。以1:50稀释的即用型兔抗人TGF- β 多克隆抗体和小鼠抗人p53单克隆抗体用作一抗,并在室温下孵育60分钟。使用生物素化的山羊抗兔和抗小鼠IgG作为二抗,

并在室温下孵育15分钟。将样品在辣根过氧化物酶链霉亲和素中于RT下进一步孵育15分钟。在5分钟内用与3,3'-二氨基联苯胺四氯化物(DAB)和过氧化氢混合物孵育产生的棕色原观察到抗体-抗原反应的位点。用苏木精复染载玻片并封片于中性香脂。显微照片由数码相机Zeisscoolpix4200在显微镜OLYMPUSPM-10AK上拍摄,并由Photoshop软件处理。结果由3名观察者在5个高倍($\times 400$)显微镜视野中独立评估,并对上皮免疫反应细胞的百分比进行评分。测量值被平均。那些细胞染色超过10%的细胞被认为是阳性的。

1.3 统计分析

通过SPSS统计软件包25.0版,通过Fisher精确检验评估TGF- β 和p53表达之间以及翼状胬肉和结膜之间表达差异之间的可能相关性。P值 < 0.05 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 p53表达

45%(20个中的9个)(图1A)翼状胬肉标本p53表达呈阳性。染色仅限于上皮细胞中的细胞核;在上皮下纤维血管层中未观察到免疫染色。在正常结膜组中,所有标本染色均呈阴性(图1B)。翼状胬肉组($P=0.012$)的p53免疫反应性大于正常结膜组。

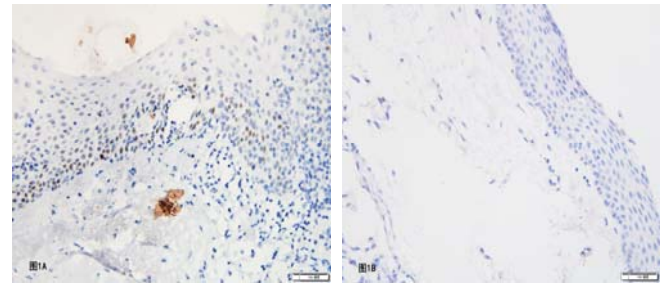


图1 翼状胬肉和正常结膜P53免疫组化表达

2.2 TGF- β 表达

在我们的研究中,40%(图2A)翼状胬肉标本TGF- β 染色呈阳性。染色仅限于上皮细胞中的细胞质;在上皮下纤维血管层中未观察到免疫染色。在正常结膜组中,所有标本染色均呈阴性(图2B)。翼状胬肉组($P=0.043$)的TGF- β 免疫反应性大于正常结膜组。

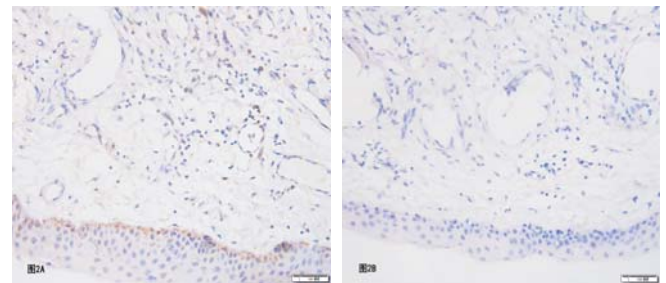


图2 翼状胬肉和正常结膜TGF- β 免疫组化表达

2.3 p53与TGF- β 的关系

与p53阴性病例相比,TGF- β 的表达与p53阳性翼状胬肉明显分离,如表2所示。Fisher精确检验分析证实了TGF- β 与p53表达之间存在高度统计学意义的相关性($P=0.035$)。

表2 TGF-β 与p53表达之间的关系

P53	TGF-β		总
	阳性	阴性	
阳性	8	6	14
阴性	3	13	16
总	11	19	30

3 讨论

在我们的研究中, 45%的原发性翼状胬肉标本的p53表达呈阳性, 而这些蛋白质在正常人结膜中的表达为阴性。p53是一种已知的肿瘤抑制蛋白, 在细胞增殖和细胞凋亡的调节中发挥作用。翼状胬肉的流行病学显示与紫外线暴露有关, 假设是通过自由基氧(ROS)的形成。Perra等人^[12]观察到8-OHdG免疫反应细胞中同时存在改变的p53, 进一步证明了导致明显p53遗传不稳定性的氧化应激在翼状胬肉的发展中起着重要作用。TGF-β在肿瘤发生中的作用, 如早期抑制肿瘤细胞增殖^[13]、诱导细胞凋亡^[14]、促进细胞外基质沉积与抑制免疫监视、功能失衡与肿瘤进展等, 在肿瘤发生发展过程中, TGF-β和p53的关系较为复杂。正常情况下, TGF-β和p53作为肿瘤抑制因子发挥作用, 但在肿瘤进展过程中, 癌细胞可能通过多种机制破坏TGF-β和p53的正常功能, 使其失去对肿瘤生长的抑制作用。一些肿瘤细胞中存在TGF-β信号通路的异常激活或p53基因突变, 导致二者之间的协同抑制肿瘤生长的作用失衡, 从而促进肿瘤的发展^[15]。在我们的研究中, 35%的40%翼状胬肉标本TGF-β染色呈阳性, 而这些蛋白质在正常人结膜中的表达为阴性。几篇报道显示, 野生型p53的表达与各种细胞类型中TGF-β启动子的强烈抑制有关^[16, 17]。

在我们的研究中, 与p53阴性病例相比, TGF-β的表达与p53阳性翼状胬肉明显分离, 证实了TGF-β和p53表达之间存在高度统计学意义的相关性。TGF-β的过表达可能与紫外线诱导的p53遗传不稳定性有关。这些发现表明, 抗凋亡机制可能不是翼状胬肉复发的原因。总之, 我们的研究表明, p53对TGF-β的调节在翼状胬肉的抗凋亡机制中发挥作用。

[参考文献]

[1] DETORAKIS E T, SPANDIDOS D A. Pathogenetic mechanisms and treatment options for ophthalmic pterygium: trends and perspectives (Review)[J]. Int J Mol Med, 2009, 23(4): 439-47.

[2] BRADLEY J C, YANG W, BRADLEY R H, et al. The science of pterygia[J]. Br J Ophthalmol, 2010, 94(7): 815-20.

[3] MULLER P A, VOUSDEN K H, NORMAN J C. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion [J]. J Cell Bio, 2011, 192(2): 209-18.

[4] TSAI Y Y, CHANG K C, LIN C L, et al. p53 Expression in pterygium by immunohistochemical analysis: a series report of 127 cases and review of the literature[J]. Cornea, 2005, 24(5): 583-6.

[5] KHALFAOUI T, MKANNEZ G, COLIN D, et al. Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and

p53 expression in pterygium from Tunisian patients[J]. Pathol Biol (Paris), 2011, 59(3): 137-41.

[6] TSAI Y Y, CHENG Y W, LEE H, et al. P53 gene mutation spectrum and the relationship between gene mutation and protein levels in pterygium[J]. Mol Vis, 2005, 11: 50-5.

[7] CHOWERS I, PE'ER J, ZAMIR E, et al. Proliferative activity and p53 expression in primary and recurrent pterygia [J]. Ophthalmology, 2001, 108(5): 985-8.

[8] ISAJI M, KIKUCHI S, MIYATA H, et al. Inhibitory effects of tranilast on the proliferation and functions of human pterygium-derived fibroblasts[J]. Cornea, 2000, 19(3): 364-8.

[9] PANG Y, ROSE T. Rapid growth of pterygium after photo refractive keratectomy[J]. Optometry, 2006, 77(10): 499-502.

[10] DI GIROLAMO N, WAKEFIELD D, CORONEO M T. UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(6): 2430-7.

[11] EROĞUL Ö, ŞEN S. Comparison of Biomarkers Playing a Role in Pterygium Development in Pterygium and Recurrent Pterygium Tissues[J]. Diagnostics (Basel), 2024, 14(23).

[12] PERRA M T, MAXIA C, CORBU A, et al. Oxidative stress in pterygium: relationship between p53 and 8-hydroxydeoxyguanosine[J]. Mol Vis, 2006, 12: 1136-42.

[13] NIU X, XU C, CHEUK Y C, et al. Characterizing hub biomarkers for post-transplant renal fibrosis and unveiling their immunological functions through RNA sequencing and advanced machine learning techniques[J]. Journal of Translational Medicine, 2024, 22(1).

[14] BRADLEY P, THOMAS P G. Using T Cell Receptor Repertoires to Understand the Principles of Adaptive Immune Recognition[J]. Annual Review of Immunology, 2019, 37(1): 547-70.

[15] FANG Y, SHEN B, DAI Q, et al. Composition and diversity analysis of the TCR CDR3 repertoire in patients with idiopathic orbital inflammation using high-throughput sequencing [J]. BMC Ophthalmology, 2023, 23(1).

[16] KRIFA L, OHIRA A, AMEMIYA T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium[J]. Acta Histochem, 1996, 98(2): 195-201.

[17] DETORAKIS E T, ZARAVINOS A, SPANDIDOS D A. Growth factor expression in ophthalmic pterygia and normal conjunctiva [J]. Int J Mol Med, 2010, 25(4): 513-6.

作者简介:

李娟(1998—),女,汉族,海南人,在读硕士研究生,研究方向: 白内障、眼表疾病。