

头颈鳞状细胞癌手术切缘 P53 表达及意义

李 超¹, 张 兵¹, 陈 锦¹, 王朝晖¹, 李 伦², 姜庆华¹, 宋宇峰³

Expression and Significance of P53 Protein in Surgical Margins of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

LI Chao¹, ZHANG Bing¹, CHEN Jing¹, WANG Zhao-hui¹, LI Lun², JIANG Qing-hua¹, SONG Yu-feng³

1. Department of Head and Neck Surgery; Sichuan Cancer Hospital, Chengdu 610041, China, 2. Department of Pathology; 3. Department of Oral and Maxillary Surgery, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College

Corresponding Author: LI Lun, E-mail: sclichao@qq.com

Abstract: Objective To explore the expression of P53 protein in the surgical margins of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), and its relationship between clinicopathological parameters and tumor local recurrence. **Methods** The expression of P53 protein in 82 cases of human HNSCCs and 10 cases of normal oral mucosa was detected by using immunohistochemistry. The correlations among P53 protein to clinicopathological parameters and tumor local recurrence in these cases was investigated. **Results** Of the 82 cases of HNSCC, 59.76% (49/82) in surgical margins were positive for P53 protein. P53 protein was mainly detected in nucleus of basal cell in surgical margins. The expression of P53 protein was significantly higher in surgical margins of patients with HNSCC than that in normal oral mucosa ($P<0.05$). P53 protein positive expression was significantly correlated with tumor differentiation and tumor local recurrence in 82 cases of HNSCC ($P<0.05$), but not with age and gender of patients, pathological stage, lymph node metastasis and anatomic site of tumor were not found ($P>0.05$). **Conclusion** These results suggest that the presence of P53 protein in tumor surgical margins correlates with the development of HNSCC after operation. P53 protein may serve as one prognostic factor for tumor local recurrence.

Key words: Head and neck squamous cell carcinoma; P53; Margin; Local recurrence

摘 要:目的 探讨头颈鳞癌手术切缘 P53 蛋白的表达及其与肿瘤临床病理学参数和局部复发的关系。**方法** 用免疫组织化学的方法检测 82 例头颈鳞癌手术切缘标本和 10 例正常口腔黏膜组织中 P53 的表达情况,并分析其与肿瘤局部复发和临床病理参数的关系。**结果** 在 82 例头颈鳞癌患者中,切缘突变型 P53 阳性表达率为 59.76%(49/82)。阳性表达主要定位于切缘上皮基底细胞核。突变型 P53 蛋白在头颈鳞癌手术切缘中的表达显著高于其在正常口腔黏膜组织中的表达($P<0.05$)。头颈鳞癌患者手术切缘突变型 P53 的表达与肿瘤分化程度和局部复发显著相关($P<0.05$),但与患者年龄、性别、肿瘤病理分期、淋巴结转移及肿瘤部位无关($P>0.05$)。**结论** 切缘突变型 P53 的阳性表达与头颈鳞癌术后肿瘤的进展有关,它有望成为判定肿瘤局部复发的预测因子。

关键词: 头颈鳞状细胞癌;P53;切缘组织;局部复发;

中图分类号:R739.91 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)01-0052-04

0 引言

外科手术切除是头颈部良、恶性肿瘤主要和有

效的治疗手段。而术后肿瘤的局部复发是手术治疗失败和影响患者预后的重要原因。彻底地切除肿瘤,是减少肿瘤局部复发的首要因素。手术切缘的病理学诊断目前仍是头颈外科医生判断手术彻底性的“金标准”。然而,在病理学诊断为切缘阴性的患者中,仍有 10%~30% 的病例出现了肿瘤的局部复发^[1]。因此,探求一种更为准确的判定方法明确手术切缘的性质具有重大的理论研究价值和临床实际

收稿日期:2008-12-02;修回日期:2009-07-02
基金项目:四川省卫生厅科研课题资助项目(070030)
作者单位:1. 610041 成都,四川省肿瘤医院研究所头颈外科,2. 病理科;3. 贵阳医学院附属医院口腔颌面外科
通信作者:李伦, E-mail: sclichao@qq.com
作者简介:李超(1979-),男,硕士,主治医师,主要从事头颈肿瘤防治研究

意义。

本文通过对头颈鳞癌病检阴性的手术切缘 P53 的检测并分析它与临床病理参数和肿瘤局部复发的关系,探讨 P53 作为一种分子切缘诊断标记物对预测肿瘤术后局部复发的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 资料

收集 1998~2004 年四川省肿瘤医院头颈外科和贵阳医学院附属医院口腔颌面外科手术治疗的头颈鳞癌患者 82 例。男性 59 例,年龄 33~76 岁,平均年龄 54.50 岁,其中有区域淋巴结转移 34 例。由于低分化癌仅 5 例,故将中、低分化癌共 34 例并为一组进行统计分析。原发肿瘤切除缺损创面上切取 2~4 个粘膜切缘标本命名为 M1~M4,取基底切缘命名为 M5 用做组织学分析。有两个或两个以上原发灶或原发灶病损不连续者不列为研究对象。另取 10 例取自无烟酒嗜好的外伤或拔牙病人的正常口腔粘膜作对照(所有患者知情同意科研取材,并签订同意书)。复发期和生存期的时间从出具病理学诊断时开始计算。平均随访时间为 50.76 月(6~60 月)。

1.2 方法

所有标本经 40 g/L 中性甲醛液固定,常规石蜡包埋 4 μm,切片水化后行免疫组化 LABC 染色。LABC 试剂盒购于 Dako 公司。抗人 p53 单克隆抗体购自 Santa-Cruz 公司。实验步骤参照试剂盒说明进行,采用微波修复抗原(400 w,20 min)及 DAB 显色、苏木素复染,严格控制实验条件,每组实验均设阳性对照和用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照,每组均作 HE 染色。

1.3 结果判断

在光镜下结合染色强度和阳性细胞百分比两个参数综合判定 P53 的阳性染色^[2]:在病理学检查为阴性的 2~5 个手术切缘样本中有一个切缘样本 P53 为阳性染色定义为该病例手术切缘 P53 表达阳性。结果的判定由对实验不知情的三位病理科医师进行,取至少两位意见相同的结果进行统计分析。

1.4 统计学方法

所有统计数据均在统计软件 SPSS 13.0 上进行,阳性率之间的比较用 χ^2 检验;无复发率采用 Kaplan-Meier 法,计算组间差异用 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 被视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P53 在头颈鳞癌病检阴性手术切缘中的表达

手术切缘 P53 阳性表达率为 59.76%(49/82)。P53 的表达主要位于口腔粘膜鳞状上皮细胞核,尤以基底细胞核阳性染色最为多见,见图 1;而正常对照组织无一例样本 P53 呈阳性表达,见图 2。手术切缘与正常对照组织之间 P53 阳性率的比较差异具有显著性($\chi^2 = 10.497, P < 0.05$),见表 1。

表 1 P53 在病检阴性手术切缘及正常对照组织的表达
Table 1 The expression of P53 in the tumor-free surgical margins with and nomal control tissues

Groups	n	Comparison of positivity		
		n(%)	χ^2	P
Surgical margins	82	49(59.76)	10.497	0.001
Normal control tissues	10	0(0.00)		

^a: The positive expression of P53

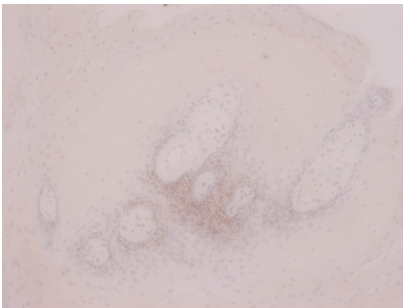


图 1 手术切缘组织 P53 阳性染色 (LASC×200)
Figure 1 The positive staining of P53 in the surgical margin (LASC×200)

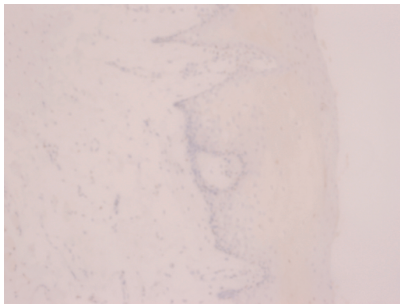


图 2 对照正常组织 P53 阴性染色 (LASC×200)
Figure 2 The positive staining of P53 in the nomal control tissue (LASC×200)

2.2 P53 表达与临床病理参数之间的联系

病理学检测阴性的手术切缘中 P53 的表达与肿瘤的病理分化程度密切相关,中低分化组 P53 阳性表达率显著高于高分化组($P < 0.05$)。与患者年龄、性别、肿瘤病理分期以及淋巴结转移无显著关系($P > 0.05$),见表 2。

2.3 P53 在不同解剖部位的表达

82 例患者中不同解剖部位的 P53 阳性表达率分别为口腔癌(61.76%)、口咽癌(61.54%)、咽喉癌(58.33%)、喉癌(56.52%),阳性率间两两比较差异

均无统计学意义(P 均 >0.05),见图 3。

表 2 P53 表达与临床病理学参数之间的关系
Table 2 The relationship between the expressions of P53 and clinicpathologic parameters

Clinicpathologic parameters	n	Expressions of P53		
		n(%) ^a	χ^2	P value
Age				
≥60	28	16(57.14)	0.121	0.728
<60	54	33(61.11)		
Gender				
male	59	34(69.39)	0.397	0.529
female	23	15(75.76)		
Tumor cell differentiation				
moderately-poorly differentiated	34	28(82.35)	12.332	0.000
well-differentiated	48	21(43.75)		
Clinical stage				
I, II	45	26(57.78)	0.162	0.687
III, IV	37	23(62.16)		
Lymph node metastasis				
absent	48	26(54.17)	1.504	0.220
present	34	23(67.65)		

Note: ^a: The positive expression of P53

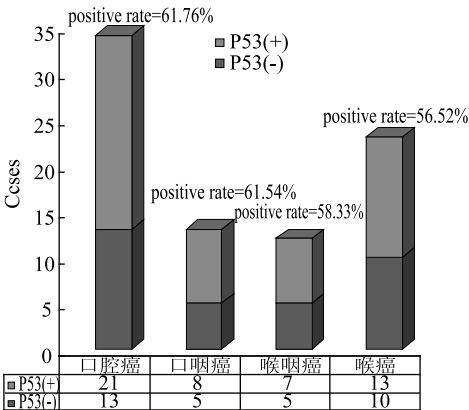


图 3 P53 在不同解剖部位的表达

Figure 3 The expression of P53 in various anatomic sites

2.4 P53 的表达状态与肿瘤局部复发的关系

82 例头颈鳞癌患者术后随访 60 月,有 14 例患者术后五年间出现肿瘤局部复发。经 Kaplan-Meier 法分析手术切缘组织 P53 蛋白阴性组 33 例、阳性组 49 例 5 年累计无复发率分别为 92.6%、68.2%;平均无复发时间分别是 (59.10 ± 1.25)、(55.75 ± 1.72) 月。术后患者手术切缘 P53 不同表达状态的 Kaplan-Meier 曲线见图 4。经 Log-rank 检验,两组的累计无复发率差异有统计学意义($\chi^2 = 5.425, P = 0.020$)。

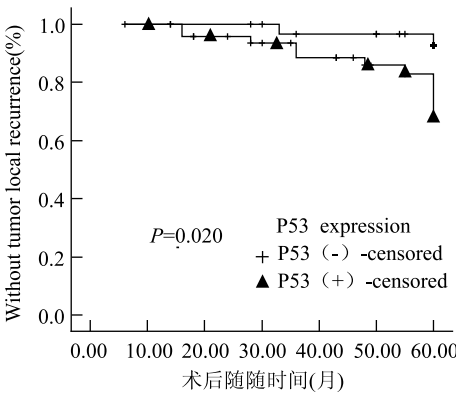


图 4 手术切缘不同 P53 表达状态的 Kaplan-Meier 局部复发曲线

Figure 4 The Kaplan-Meier curves for regional tumor recurrence in different surgical margin expressions of P53

3 讨论

p53 是一个分子量约 53kD 的蛋白质。研究表明它与头颈鳞癌发生、发展密切相关^[3]。人类许多实体肿瘤均可查见 p53 基因突变。突变的 p53 不但丧失了正常 p53 基因功能,而且自身还获得癌基因功能,使得衰老细胞、异常细胞不能按正常程序死亡或清除,而在体内不断地增殖,导致肿瘤的发生^[4]。Kawamata 等^[5]近期对头颈鳞癌研究表明:突变型 p53 可阻碍 DNA 损伤剂引起的细胞凋亡过程,使得损伤细胞的细胞周期停滞而不发生生理性死亡过程。人类头颈鳞癌 p53 突变率较高,以往研究多为探讨肿瘤原发灶中 p53 突变的情况,而对切缘样本中 p53 突变及意义的报道甚少。

本实验对病理学检查为阴性的手术切缘样本中 P53 的表达进行研究并与无烟酒嗜好的正常口腔黏膜作对照。对照组的选择是因为 P53 突变与患者是否有烟酒嗜好密切相关^[6]。结果发现: P53 在病检阴性手术切缘阳性表达率为 59.76%。阳性染色主要位于上皮基底细胞核;而正常对照组织无一例样本 P53 呈阳性表达,二者比较差异具有统计学意义。说明肿瘤切缘尽管病检虽为阴性但它与正常组织在分子水平上已经存在差异,可能存在癌基因的突变或抑癌基因的失活。因此,仅仅依靠病理学检查从细胞学形态上去判定手术切缘的性质是不够的,临床工作中需要更为精确敏感的诊断方法去指导手术切缘的判定。我们进一步分析了 P53 表达与临床病理参数之间的关系,发现 P53 表达与肿瘤发病部位等参数无关,而与肿瘤的病理分化程度密切相关,中低分化组 P53 阳性表达率显著高于高分化组。这与 Metges 等^[7]近期研究部分不符。他们认为: P53 阳性表达组病员平均年龄显著低于阴性

表达组。Tunca^[8]等近期在头颈肿瘤原发灶 p53 的突变研究中并没发现 p53 的突变与肿瘤临床病理学特征有显著性关系,说明肿瘤原发灶与病检阴性的切缘组织中 p53 突变的生物学意义可能存在差异。

早期研究显示^[9]:在头颈鳞癌组织中 p53 的变化可发生在肿瘤恶性转变的早期,在癌前病变组织中即可出现 p53 基因的突变。因此,对 p53 基因突变的检测不仅可以发现残余肿瘤细胞还可以揭示癌前病变的存在。本研究对不同 p53 表达状况手术切缘肿瘤局部复发情况进行随访研究发现:手术切缘组织 P53 蛋白阴性与阳性组 5 年累计无复发率分别为 92.6%和 68.2%;平均无复发时间分别是(59.10±1.25)、(55.75±1.72)月。经 Log-rank 检验,两组的累计无复发率差异有统计学意义。因此,认为 p53 的突变对预示头颈肿瘤手术切缘是否安全具有一定的参考价值。同样在一项前瞻性队列研究发现^[1]:病理学阴性头颈肿瘤手术切缘中 p53 突变率为 66%,发生突变 50 例病员中有 9 例术后出现了肿瘤的局部复发;而在未发生 p53 突变的其他病员术后无一例发生肿瘤的局部复发。因此认为突变型 p53 的出现可作为术后肿瘤局部复发的一项独立的预测指标,而像肿瘤浸润性生长、切缘距肿瘤的距离等参数均不能有效地预测肿瘤的局部复发。p53 突变是头颈肿瘤发生恶性转变的早期重要事件^[7,9],头颈鳞癌手术切缘突变型 p53 的检测阳性预示病员可能存在局部高复发率和显著不良的预后^[10]。因此对于病检阴性的手术切缘,它可在细胞发生形态学改变之前提前预测切缘是否发生肿瘤性改变,以明确手术切缘的安全性以指导外科医生的进一步诊治。p53 基因突变常引起突变型 P53 蛋白的过度表达,因此,临床上可以通过对突变型 P53 蛋白的检测,从分子水平更为敏感地来判定手术切缘的安全性。p53 参与头颈肿瘤“分子切缘”诊断标准有望逐步建立。

有关 p53 基因异常在头颈鳞癌中的机理和作用

十分复杂,p53 对头颈肿瘤复发及预后的预测价值还需进一步研究。

参考文献:

[1] van Houten VMM, Leemans CR, Kummer JA, et al. Molecular diagnosis of surgical margins and local recurrence in head and neck cancer patients: A prospective study[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1): 3614-3620.

[2] Li C, Feng HC, Song YF, et al. Expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma and its significance[J]. The Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2005, 4(4): 232-237.

[3] 李超, 陈建超, 王朝晖, 等. 头颈部鳞癌安全手术切缘的评价[J]. 中华口腔医学杂志, 2006, 41(8): 478-479.

[4] Thierry S, Bernard A, Dalil H, et al. Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1): 62-69.

[5] Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, et al. Oncogenic mutation of the p53 gene derived from head and neck cancer prevents cells from undergoing apoptosis after DNA damage[J]. Int J Oncol, 2007, 30(5): 1089-1097.

[6] Brennan JA, Boyle JD, Wayne M, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck[J]. N Engl J Med, 1995, 332(11): 712-717.

[7] Metges J, Volant A, Auperin A, et al. No statistical impact of intra-tumoral overexpression of EGFR, VEGF and p53 on the overall survival in head and neck squamous cell cancer (HNSCC): Preliminary results of the GORTEC 99 02 randomized trial[J]. ASCO Meeting Abstracts, 2007, 25(18): 6010.

[8] Tunca B, Erisen L, Coskun H, et al. P53 gene mutations in surgical margins and primary tumor tissues of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Tumori, 2007, 93(2): 182-188.

[9] van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, et al. Mutated p53 as molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer[J]. J Pathol, 2002, 198(4): 476-486.

[10] Poeta LM, Goldwasser M A, Forastiere A, et al. Prognostic implication of p53 mutations in HNSCC: Results of intragroup margin study (E4393)[J]. ASCO Meeting Abstracts, 2006, 24(18): 5504.

[编辑:周永红;校对:安 凤]