

p53 过度表达与结直肠癌淋巴结转移、微转移关系的研究

邓昊, 邓羚, 陈莹, 刘丽江

Correlations between p53 overexpression and lymph node metastasis and micrometastasis

DENG Hao, DENG Lin, CHEN Yin, et al

Department of Pathology and Pathophysiology, Medical and Life Science College, Jian'gan University, Wuhan 430056, China

Abstract: Objective To characterize the relationship of p53 nuclear overexpression to lymph node metastases and micrometastases in colorectal cancer. Methods Specimens of curative dissection were collected between 1989 and 2001. All 74 cases had complete examination data. 3503 lymph nodes were found using oil-clearing fat method. The interrupted serial 4-μm sections, routine hematoxylin and eosin staining and CK₁₈+EMA immunohistochemistry method were conducted to search for lymph node metastases and micrometastases.

p53 staining was performed by immunohistochemistry (DO-07) on primary tumor. Results Metastases were detected in 223 lymph nodes and micrometastases in 38 lymph nodes. 31 cases of p53 overexpression were found in colorectal cancer. No definite correlation was found of p53 nuclear overexpression to lymph node metastasis and micrometastasis in colon cancer ($r = 0.19$, $P = 0.20$; $r = -0.23$, $P = 0.13$) and rectal cancer ($r = 0.02$, $P = 0.90$; $r = 0.13$, $P = 0.32$). Conclusion p53 nuclear overexpression was not correlated to lymph node metastasis and micrometastasis in colorectal cancer.

Keywords: Colorectal neoplasm; p53 overexpression; Lymph node metastases; Lymph node micrometastases; Prognosis

摘要: 目的 探讨结直肠癌病例中 p53 过度表达与淋巴结转移、微转移间关系。方法 收集 1989 ~ 2001 年根治性手术切除, 有完整检查资料的结直肠癌标本 74 例经溶脂法检查淋巴结共 3503 枚, 均经 4 μm 间断连续切片, HE 染色及免疫组织化法 (CK₁₈+EMA) 检查淋巴结转移和微转移。肿块经免疫组化法 (DO-07) 检查 p53 过度表达。结果 检出转移淋巴结 223 枚, 微转移淋巴结 38 枚。全组中 31 例有 p53 过度表达。结肠癌中 p53 过度表达与淋巴结转移、微转移无关 ($r = 0.19$, $P = 0.20$; $r = -0.23$, $P = 0.13$)。直肠癌中 p53 过度表达与淋巴结转移、微转移无关 ($r = 0.02$, $P = 0.90$; $r = 0.13$, $P = 0.32$)。

结论 p53 过度表达与结直肠癌淋巴结转移、微转移程度无明显相关性。

关键词: 结直肠肿瘤; p53 过度表达; 淋巴结转移; 淋巴结微转移

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2003) 06-0486-03

0 引言

结直肠癌淋巴结转移是结直肠癌重要的预后指标。虽然结直肠癌淋巴结检查的方法准确, 但是费时、费力并且费用较高, 在临床实践中具有一定难度。能否通过对结直肠癌原发肿瘤细胞中与淋巴结转移相关指标的检查推测淋巴结转移及转移的程度以提示预后。

变型 p53 蛋白 (Mp53 蛋白) 在结直肠癌病例中检出率为 45.5% ~ 62.1%^[1,2]。Mp53 蛋白在肿瘤细胞中的过度表达被认为可能与结直肠癌淋巴结转移有关。

本研究的目的是观察有完整淋巴结检查资料的结直肠癌病例 p53 过度表达与结直肠癌淋巴结转移和微转移以及 UICC 淋巴结分期、Dukes 淋巴结分期等病理学指标间关系, 探讨结直肠癌中 p53 过度表达在推测淋巴结转移及转移的程度中意义及其预后意义。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 1988 ~ 2001 年结直肠癌根治性手术切除, 有完整淋巴结检查资料的标本 74 例, 其中结肠癌 46 例, 直肠癌 28 例。结肠癌中男性 23 例, 女性 23 例。年龄 21 ~ 87 岁, 中位年龄 68 岁。肿块大小(按

收稿日期: 2003-04-08; 修回日期: 2003-10-28

作者单位: 430056 武汉, 江汉大学医学与生命科学学院
病理学与病理生理学教研室

最大截面面积) $3 \sim 130\text{cm}^2$, 中位大小 15cm^2 ; 直肠癌中男性 13 例, 女性 15 例。年龄 37 ~ 76 岁, 中位年龄 60 岁。肿块大小 $0.8 \sim 144\text{cm}^2$, 中位大小 12cm^2 。

转移淋巴结按 Dukes 分期标准, 肠壁淋巴结为第一站, 支气管周围淋巴结为第二站, 命名血管周围淋巴结及顶端淋巴结为第三站。按 UICC 标准, 无淋巴结转移为 N₀, 1 ~ 3 枚淋巴结转移为 N₁, 4 枚淋巴结转移为 N₂, 命名血管周围淋巴结及顶端淋巴结转移为 N₃。全组资料淋巴结检查数据见表 1。

表 1 74 例结直肠癌病例淋巴结检查数据

	结肠癌		直肠癌		
	例数	构成(%)	例数	构成(%)	
Dukes 淋巴 结分期	N ₀	15	32.6	14	50
	N ₁	7	15.2	6	21.4
	N ₂	12	26.0	4	14.3
	N ₃	6	13.1	3	10.7
	N _x *	6	13.1	1	3.6
UICC 淋巴 分期	N ₀	20	43.5	13	46.4
	N ₁	11	23.9	5	17.9
	N ₂	9	19.6	7	25.0
	N ₃	6	13.0	3	10.7

* Nx 为按 Dukes 淋巴结分期要求淋巴结检查数据不全的病例。

全组病例均经临床复查及电话随访。随访时间至 2002 年 7 月止。

1.2 方法

所有病例肿块均经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, HE 染色及 p53 免疫组织化学染色。p53 单克隆抗体(DO-07) 及超敏 SP(鼠/兔)试剂盒由福州迈新生物技术开发公司提供。染色程序严格按说明书进行, 瘤细胞核着棕色为阳性, 着色肿瘤细胞数 > 30% 为 p53 过度表达。

所有淋巴结均经 $4\mu\text{m}$ 间断连续切片 6 张或淋巴结三平面剖面各切 3 ~ 6 张、常规 HE 染色和免疫组化染色, 以确定有无淋巴结转移和微转移(微转移定义为瘤团直径 0.2 mm 或瘤细胞数 50 个)。免疫组化采用 SABC 法, 以 CK₁₈+EMA(victor 公司产品)作为上皮性肿瘤标记物, 试剂均由武汉博士德生物工程公司提供。

1.3 统计学处理

将全部病例分为结肠癌和直肠癌两组。全部数据经 SAS 8.1 统计学软件处理, 使用 Kaplan-Meyer 法绘制生存曲线, $P < 0.05$ 有统计学意义。各病理学指标及其与生存之间的关系使用 Spearman 等级相关和 Cox 模型回归方法进行分析。

2 结果

2.1 病理学检查结果

淋巴结经溶脂法检查共 3503 枚, 47.3 枚/例($13 \sim 128$ 枚, 中位数 45 枚, 95%CI: 41.7 ~ 52.9)。结肠癌检查淋巴结总数 2074 枚, 45.1 枚/例($13 \sim 120$ 枚, 中位数 42 枚, 95%CI: 37.8 ~ 52.4); 直肠癌检查淋巴结总数 1429 枚, 51.0 枚/例($17 \sim 128$ 枚, 中位数 49 枚, 95%CI: 41.8 ~ 60.2)。全组病例共检出转移淋巴结 223 枚(223/3503, 6.37%), 微转移淋巴结 38 枚(38/3503, 1.08%)。结肠癌检出转移淋巴结 124 枚(124/2074, 6.0%), 微转移淋巴结 16 枚(16/2074, 0.77%)。直肠癌检出转移淋巴结 99 枚(99/1429, 6.9%), 微转移淋巴结 22 枚(22/1429, 1.54%)。

74 例结直肠癌中发现 31 例有 p53 过度表达(31/74, 41.89%), 其中结肠癌 18 例(18/46, 39.13%), 直肠癌 13 例(13/28, 46.43%)。p53 过度表达与结直肠癌淋巴结转移、微转移的发生之间的关系见表 2。

表 2 p53 过度表达与淋巴结转移、微转移检出之间的关系

		p53(+)		p53(-)		
		病例数	构成(%)	病例数	构成(%)	
结肠癌	转移	有	12	26	15	33
		无	6	13	13	28
淋巴结	微转移	有	2	4	8	17
		无	16	35	20	44
直肠癌	转移	有	7	25	6	21
		无	6	21	9	33
淋巴结	微转移	有	3	11	4	13
		无	12	43	9	33

2.2 结肠癌病理学指标统计学分析结果

p53 过度表达与结肠癌各病理学指标 Spearman 等级相关分析:p53 过度表达与淋巴结转移数($r = 0.19$, $P = 0.20$)、淋巴结微转移数($r = -0.23$, $P = 0.13$)等各病理学指标无关, 与有无粘液分化正相关($r = 0.36$, $P = 0.016$)。

结肠癌 COX 模型回归分析: 结肠癌中 p53 过度表达与生存时间无关($\chi^2 = 0.53$, $P = 0.82$)。淋巴结转移数($\chi^2 = 9.52$, $P = 0.002$)、AJCC/UICC 淋巴结分期($\chi^2 = 8.96$, $P = 0.0167$)与生存时间相关。

2.3 直肠癌病理学指标统计学分析结果

p53 过度表达与直肠癌各病理学指标 Spearman 等级相关分析:p53 过度表达与淋巴结转移数($r = 0.02$, $P = 0.920$)、淋巴结微转移数($r = 0.13$, $P = 0.32$)等指标无关。

直肠癌 COX 模型回归分析: 直肠癌中 p53 过度表达与生存时间无关($\chi^2 = 2.11$, $P = 0.15$)。淋巴结转移数($\chi^2 = 9.94$, $P = 0.0016$)、有无粘液分化

($\chi^2 = 5.80$, $P = 0.016$)、Dukes 淋巴结分期 ($\chi^2 = 6.82$, $P = 0.009$) 及 AJCC/UICC 淋巴结分期 ($\chi^2 = 8.34$, $P = 0.0039$) 均与生存时间有关。

3 讨论

3.1 结肠癌 p53 过度表达与淋巴结转移之间关系

p53 基因是抑癌基因,正常情况下,p53 基因编码的蛋白产物被称为野生型 p53 蛋白 (Wp53 蛋白),具有保护细胞基因组免受 DNA 损伤剂的作用。当基因损伤时,Wp53 蛋白通过诱导细胞分裂阻滞进行 DNA 修复,待修复完成后,再继续进行 DNA 复制。若基因损伤太严重而不能修复,p53 蛋白则通过触发凋亡机制以去除损伤的细胞。Wp53 蛋白的半衰期仅 20 分钟,很难检测到。当 p53 基因发生变异时其编码的蛋白产物称为变异型 p53 蛋白 (Mp53 蛋白),Mp53 蛋白不再具有上述功能,从而可能引发肿瘤的形成。Mp53 蛋白因为空间构象的改变而使半衰期延长,所以可以被检测到。通过免疫组化染色方法检查结直肠癌原发肿瘤细胞中 Mp53 蛋白,发现其在细胞核表达。Mp53 蛋白在结直肠癌病例中检出率为 45.5% ~ 62.1%^[1,2]。

Mp53 蛋白在细胞核中的过度表达被认为可能与结直肠癌淋巴结转移有关。Yamaguchi 等检测了 100 例结直肠癌患者,发现 p53 过度表达与淋巴结转移等临床病理指标无关^[3]。而 Gan 等检测了 66 例结直肠癌患者,发现 p53 过度表达与淋巴结转移发生率相关^[4]。

免疫组化染色检测肿瘤细胞 p53 过度表达尚无统一的标准。有人将结直肠癌细胞核着棕色即视为阳性。而 Klaus 等认为 p53 免疫组化结果有两种模式,A 模式——全部或部分肿瘤细胞成片着色,认为是 p53 功能不活跃的表现,B 模式——散在性细胞着色,认为是未变异 p53 基因功能活跃的表现^[5]。Kim 等将判断免疫组化检测 p53 过度表达的标准定为细胞核着色的阳性细胞数 >30%^[6]。

本组资料在全数检查淋巴结的基础上,将细胞核着色的阳性细胞数 >30% 作为判断免疫组化检测 p53 蛋白过度表达的标准。结果显示:p53 过度表达与结直肠癌淋巴结有无转移、淋巴结转移数无关。

3.2 结肠癌 p53 过度表达与淋巴结微转移之间关系

当前,关于 p53 蛋白过度表达与结直肠癌淋巴结微转移关系的研究不多。Maruyama 等研究了 41 例非小细胞肺癌,发现原发灶 p53 过度表达与淋巴结微转移无关^[7]。Offner 等研究了 114 例结直肠

癌、胃癌等肿瘤病例,发现原发灶 p53 蛋白过度表达与微转移无关^[8]。

本组 74 例结直肠癌经规范病理学检查共检查出淋巴结微转移 38 枚 (1.08%), 经统计学分析,结果提示结直肠癌淋巴结微转移与预后有关但不能成为独立的预后指标,p53 过度表达与结直肠癌淋巴结有无微转移以及淋巴结微转移数之间也无明显相关性。

3.3 结肠癌 p53 过度表达与预后之间关系

p53 过度表达在结直肠癌中是否能作为独立的预后指标存在争议。Okubo 等检查了 110 例结直肠癌患者,发现 p53 过度表达和变异均与生存相关,而且在远端结直肠癌的危险性更高^[9]。Bouzourone 等检查了 122 例结直肠癌患者,发现 p53 过度表达与预后相关,且对预后的提示作用优于对 p53 基因变异的检查^[1]。而 Gallego 等检测了 126 例术后 5 年的患者,发现 p53 过度表达与预后无关^[10]。

本项研究结果显示:p53 过度表达与结直肠癌生存时间无明显相关性,可能与本组资料样本较小,随访时间不够长有关。

参考文献:

- BouzoureneH,GervazP,CerottiniJP,etal. p53andKirkasas prognosticfactorsforDukes' stageBcolorectalcancer[J].EurJCan - cer,2000,36 (8):1008-1015.
- DiezM,MedranoA,MuñozguerzaJM,etal.InfluenceofTumorLocalizationonthe prognosticValueof p53ProteinincolorectalAdenocarcinomas[J].AnticancerRes,2002,20:3907 - 3912.
- YamaguchiA,KurosakaY,FushidaS,etal.Expressionof p53 proteinincolorectalcanceranditsrelationshipto short - term prognosis [J].Cancer,1992,70 (12):2778-2784.
- GanH,Ou yangQ,Wan gY.Expressionof p53 proteinincolorectal canceranditsrelationshipto cell proliferativeactivity and prognosis Zhonghua[J].ZhonggongLiuZaZhi,1996,18 (4):244-246.
- KlausKaserer,JudithSchmaus,UlrikeBeth,etal.Staining patternsof p53immunohistochemistry andtheirbiologicalsignificance incolorectalcancer[J].JPathol,2000,190 (4):450-456.
- KimYW,LeeS,ParkJH,etal.Animmunohistochemicalstudy of theexpressionof p53 proteinincoloncancer[J].JKoreanMedSci,1995,10 (3):176-182.
- MaruyamaR,SugioK,FukuyamaY,etal.Evaluationof p53AlterationsinOccultLymphNodeMetastasis[J].JSurg Oncol,2000,73:143 - 147.
- OffnerS,SchmansW,WitterK,etal. p53GeneMutationsarenot RequiredforearlyDisseminationofCancerCells[J].MedicalSciences,1999,96:6942 - 6946.
- OkuboR,MasudaH,NemotoN. p53mutationfoundtobeasignificant prognosticindicatorindistalcolorectalcancer[J].OncolRe p,2001,8 (3):509-514.
- Galle MG,Acenero MJ,Ortega S,etal.Protein expressionincolorectalcarcinoma[J].DisColon Rectum,2000,43 (7):971-975.

(周永红校对)