

p53 基因蛋白在大肠腺瘤中的表达 及其与细胞增殖的关系^①

文卓夫^② 袁世珍

(中山医科大学孙逸仙纪念医院消化疾病研究中心; 广州, 510120)

摘 要 用免疫组化及双标记法研究 p53 蛋白在大肠腺瘤中的表达, 以及 p53 蛋白与增殖细胞核抗原、核仁区嗜银蛋白的关系。结果表明, p53 蛋白表达率及强度随腺瘤不典型增生程度和体积增加而增加。p53 蛋白阳性者增殖细胞核抗原标记指数, 细胞核仁区嗜银蛋白平均银染颗粒数明显高于 p53 蛋白阴性者, 提示 p53 蛋白过度表达在大肠腺瘤发生、发展及癌变过程中起重要作用, p53 蛋白可能有促进细胞增殖的作用。

主题词 结直肠肿瘤/病理学; 蛋白质 p53; 增殖细胞核抗原; 核仁组成区

中图分类号 R 735.3

大肠腺瘤是大肠癌最重要的癌前病变。不少研究表明 p53 基因突变、丢失或 p53 蛋白过度表达在大肠癌发生中起重要作用^[1], 但目前研究大肠腺瘤中 p53 基因蛋白表达与细胞增殖关系的报道还较少, 本研究拟通过检测大肠腺瘤中 p53 基因蛋白、增殖细胞核抗原(PCNA)、核仁区嗜银蛋白(AgNORs)的表达来探讨 p53 蛋白在大肠腺瘤、大肠癌发生中的意义以及与其与细胞增殖的关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源

大肠腺瘤来自纤维结肠镜下电凝摘除回收标本, 大肠癌为手术切除癌组织标本, 正常大肠为纤维结肠镜及病理检查未发现明显异常的大肠粘膜活检标本。

1.2 染色方法

组织经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 作连续切片, 分别作常规 HE 染色、p53 蛋白、PCNA 和 AgNORs 免疫组织化学或组织化学染色。鼠抗人 p53 蛋白单克隆抗体 D-7(1:50), LSAB 试剂盒为 Dako 公司产品; 鼠抗人 PCNA 单克隆抗体为 Signet Laboratories Inc. 产品。p53 蛋白、PCNA 检测用 LSAB 法; AgNORs 检测参照 Ploton 一步银染法; p53 蛋白与 AgNORs 套染先银染后再用 LSAB 法检测 p53 蛋白, 显色参照 Hsu 和 Soban 的方法, 用 DAB 显色^[2]。

p53 蛋白、AgNORs 染色前均用微波处理。

1.3 计数方法

1.3.1 p53 蛋白染色 p53 蛋白阳性表现为细胞核呈棕褐色, 根据染色阳性细胞范围分级: 强阳性(++)、一低倍视野中的腺组织 $\geq 50\%$ 腺细胞染色阳性; 阳性(+), 一低倍视野中的腺组织 $< 50\%$ 腺细胞染色阳性。阳性细胞成串、成簇分布。所有切片经两位研究者观察分级。

1.3.2 PCNA 标记指数(PCNA-LI) 阳性细胞核染成棕褐色。每例随机计数 1 000 个分布清晰的腺细胞, 计算其阳性细胞的比率。

1.3.3 AgNORs 染色 选择染色好、无重叠细胞的区域, 在油镜下随机连续定量观察 50 个腺细胞核, 计数每个细胞核内银颗粒均数。

1.3.4 p53 蛋白与 AgNORs 套染 AgNORs 颗粒呈棕色, p53 阳性细胞核呈蓝色, 阴性细胞核不着色, 分别计数 50 个 p53 蛋白阳性细胞和 50 个阴性细胞核内平均银颗粒数。

2 结果

2.1 p53 蛋白表达

正常大肠粘膜 p53 蛋白表达均为阴性, 大肠腺瘤和大肠癌的阳性率分别为 43%(37/86) 和 49%(24/49)。p53 蛋白阳性腺瘤组织中阳性细胞多位于不典型增生较重的区域。p53 蛋白表达与大肠腺

① 中山医科大学中青年科学基金资助课题; ② 第一作者, 1962 年出生, 男, 医学博士, 讲师

瘤临床、病理特征的关系见表 1、表 2。p53 蛋白表达率与大肠腺瘤患者年龄、性别, 以及腺瘤的部位、组织学类型无明显关系, 但随腺瘤大小、不典型增生程度增加而升高, 见表 1。随著不典型增生程度增加, p53 阳性程度也增加, 见表 2。

系见表 3。PCNA-LI 和 AgNORs 都随 p53 蛋白表达增加而增加, p53 蛋白表达(++)组 PCNA-LI 与 p53(-)组比较有显著性差异($P < 0.01$), 其 AgNORs 计数也较 p53(-)组及 p53(+)组明显增高($P < 0.05$), 见图 1。

表 1 p53 蛋白与大肠腺瘤临床及病理特征的关系

分 组	p53 蛋白阳性率(n, %)	χ^2	P
年龄(岁)			
<50	11/26(42)	0.01	> 0.05
≥50	26/60(43)		
性别			
男	21/54(40)	1.01	> 0.05
女	16/32(50)		
肿瘤部位			
左半结肠	28/67(42)	0.19	> 0.05
右半结肠	9/19(47)		
肿瘤大小(mm)			
<10	5/23(22)	6.66	< 0.05
10~<20	17/37(46)		
≥20	15/26(48)		
组织类型			
管状腺瘤	24/53(45)	0.33	> 0.05
管状绒毛状腺瘤	5/12(42)		
绒毛状腺瘤	8/21(38)		
不典型增生			
轻度	11/35(31)	12.22	< 0.01
中度	9/28(32)		
重度	10/15(66)		
癌变	7/8(87)		

表 3 大肠腺瘤 p53 蛋白表达与 PCNA-LI 及 AgNORs 的关系 ($\bar{x} \pm s$)

p53 蛋白	PCNA-LI % (n)	AgNORs 计数 个/核 (n)
-	44.39±22.34(46)	5.91±2.24(49)
+	52.98±21.07(22)	6.26±1.80(22)
++	64.75±22.45(14) ¹⁾	8.65±2.15(15) ²⁾

1)与(-)组比较, $q = 4.37, P < 0.01$; 2)与(+)组比较, $q = 3.68, P < 0.05$; 方差分析, q 检验



图 1 大肠腺瘤组织 p53 蛋白和 PCNA 的免疫组化分析(×200)

见 p53 蛋白强阳性的大肠腺瘤组织 PCNA 标记细胞明显增加 p53 阳性大肠腺瘤 p53 阳性细胞与 p53 阴性细胞 AgNORs 计数; 同一组织 p53 阳性细胞 AgNORs 计数(10.44±1.85)较 p53 阴性细胞(6.72±2.55)明显增加, 两者比较有极显著性差异($t = 4.62, P < 0.0001, t$ 检验), 见图 2。



图 2 大肠腺瘤(癌变)p53 蛋白与 AgNORs 套染(×400)

表 2 p53 蛋白表达强度与大肠腺瘤不典型增生的关系¹⁾ (例, %)

	例 数	p53 蛋白表达强度		
		-	+	++
不典型增生				
轻度	35	24(69)	11(31)	0(0)
中度	28	19(68)	6(21)	3(11)
重度	15	5(33)	6(40)	4(27)
癌变	8	1(12)	3(37)	4(50)

1)轻与重度比较, $\chi^2 = 6.58, P < 0.01$; 轻、中、重度与癌变比较, 直接概率法, $P < 0.05$

2.2 p53 蛋白表达与细胞增殖的关系

大肠腺瘤 p53 蛋白表达与 PCNA、AgNORs 的关

3 讨论

3.1 p53 蛋白在大肠腺瘤发生及恶性转化中的作用

野生型 p53 蛋白量少、半衰期短,一般免疫组化不能检出;而突变型 p53 蛋白半衰期长,可被免疫组化检出,一般认为免疫组化 p53 蛋白阳性即提示有 p53 基因的突变^[3]。本研究中大肠腺瘤 p53 蛋白阳性率达 43%,高于一般报道的 8%~10%,而与 Pignatelli 的报道相似^[4],这可能与本研究中伴高度不典型增生的腺瘤比例较高、使用的 p53 蛋白抗体以及检测方法不同等有关。我们观察到, p53 蛋白阳性率随着腺瘤直径及不典型增生程度增加而增加, p53 强阳性多见于腺瘤伴重度不典型增生和癌变者,且在同一腺瘤中, p53 强阳性部位也多是不典型增生程度最重的区域,提示 p53 蛋白表达与腺瘤的恶性化趋势密切相关, p53 蛋白可作为反映腺瘤恶性转变的一项良好指标。

3.2 p53 蛋白表达与细胞增殖的关系

PCNA 为 DNA 多聚酶的轴心蛋白,直接参与 DNA 合成,其水平直接与细胞增殖率及 DNA 合成有关^[5]。AgNORs 是位于核仁形成区上与 rRNA 相关的酸性非组蛋白, AgNORs 数目主要与核仁形成区的 rDNA 转录的活动水平、染色体组中核仁形成区数目及所处的细胞周期有关,因此 AgNORs 数目可反映细胞增殖、分化和癌变过程中细胞内蛋白代谢活性的变化^[6]。PCNA 和 AgNORs 可作为反映细

胞增殖的良好指标。近年来,有学者发现大肠腺瘤 p53 蛋白表达与 PCNA-LI 有一定关系,本研究中大肠腺瘤 PCNA-LI 和 AgNORs 计数在 p53 阳性者要高于 p53 阴性者,并且与 p53 阳性强度有关。我们首次将 p53 蛋白与 AgNORs 套染发现, p53 阳性细胞 AgNORs 计数要明显高于 p53 阴性细胞。此外,还显示 p53 蛋白阳性率和/或阳性程度随大肠腺瘤不典型增生程度及直径大小增加而增加,提示 p53 蛋白表达与细胞增殖密切相关,在大肠腺瘤发展过程中可能有促进细胞增殖的作用。

参 考 文 献

- 1 Pundie CA, Ognady J, Piris J, *et al*. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol*, 1991, 138(4):807
- 2 Hsu SM, Soban E. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 1982, 30(10):1079
- 3 Kaklamamas L, Gatter KC, Mortensen N, *et al*. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol*, 1993, 142(1):87
- 4 Pignatelli M, Stamp GW, Kafiri G, *et al*. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in colorectal adenomas. *Int J Cancer*, 1992, 50(4):683
- 5 Hall PA, Levison DA, Woods AL, *et al*. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 1990, 162(4):285
- 6 Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer in lymphomas. *J Pathol*, 1987, 151(2):111

(1996-05-01 收稿 1997-02-25 修回)

EXPRESSION OF p53 PROTEIN IN COLORECTAL ADENOMAS AND ITS RELATIONSHIP TO CELLULAR DYSPLASIA

Wen Zhuofu Yuan Shizhen

(Digestive Diseases Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital,
Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510120)

The expression of p53 protein in colorectal adenomas and its relationship to the clinicopathologic characteristics cellular proliferation indexes (PCNA, AgNORs) were investigated using immunohistochemical and histochemical-immunohistochemical double-staining method. The results showed the positive rate and degree of staining enhanced with the increase of dysplasia and sizes of the adenomas. PCNA labeling index and AgNORs count were significantly higher in the adenomas with p53 protein expression than that without p53 protein expression. The results suggested that the over-expression of p53 protein might play an important role in the development and malignant transversion of the adenomas. p53 protein may promote cellular proliferation.

Subject headings colorectal neoplasms/ pathology; protein p53; proliferating cell nuclear antigen; nucleolus organizer region