

结直肠癌患者血清及粪便中 P53 基因检测的临床意义

Clinical Significance of P53 gene in Serum and Stool of Patients with Colorectal Cancer

欧玉荣¹/张洪福^{2,*}/刘德纯¹

(1. 蚌埠医学院病理学教研室, 安徽 蚌埠 233003; 2. 安徽医科大学病理学教研室, 安徽 合肥 230032)

OU Yu-rong¹, ZHANG Hong-fu^{2,*}, LIU De-chun¹

(1. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, Anhui, China; 2. Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China)

【摘要】背景与目的: 研究大肠癌患者血清 P53-Ab、粪便 P53 基因突变与癌组织中 P53 蛋白表达之间关系, 以探讨 P53 基因在大肠癌发生与早期诊断中的作用及临床意义。材料与方法: 运用酶联免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测 34 例大肠癌患者及 10 例健康人血清 P53-Ab, 运用聚合酶链反应-单链构象多态性分析 (Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 分析 16 例大肠癌患者粪便 P53 基因第 5~8 外显子突变, 同时运用 PCR-SSCP 与免疫组化法分析癌组织中 P53 基因突变及蛋白表达状况。结果: 大肠癌中血清 P53-Ab 阳性率为 17.6%, 正常对照组为阴性。癌组织中 P53 基因突变率及蛋白表达率分别为 52.9% 和 55.9%, 正常黏膜未见 P53 基因突变及蛋白表达。16 例 P53 基因突变的患者其粪便中基因突变率为 43.8%。P53 基因突变及蛋白表达与 P53-Ab 存在及临床病理因素无关。结论: P53 基因突变是参与和影响 P53 蛋白表达的主要因素, P53 蛋白表达可诱导 P53-Ab 产生。大肠癌患者粪便中可检测出 P53 基因突变, 粪便 P53 基因及血清 P53-Ab 检测可有助于大肠癌的诊断及高危人群的筛检普查。

【关键词】 大肠肿瘤; 基因; P53; 聚合酶链反应; 酶联免疫吸附分析; 免疫组化

中图分类号: R735.34; Q343.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)06-0370-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the relationship between serum P53 antibody, gene mutation, protein expression and their roles in the early diagnosis and clinical significance in colorectal tumors. MATERIAL AND METHODS: P53 antibody of preoperative serum from 34 patients with colorectal cancer and 10 healthy persons was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At the same time, by using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and immunohistochemistry (IHC) (S-P methods), the mutations in exon 5-8 of the P53 gene and protein expression were examined. RESULTS: P53 antibody was positive in 6 of 34 (17.6%) patients with colorectal cancers, but was not found in serum of normal controls. The mutation of exon 5-8 and protein expression of P53 gene were found in 18 of 34 (52.9%) and 19 of 34 (55.9%) cases, respectively. No mutation and protein expression were positive in normal mucosa. Of 16 patients who were positive for P53 gene mutation in their tumor tissue, 7 (43.8%) had evidence of alterations in the P53 gene within the stool. No relationship was found between P53 antibody, protein expression, P53 gene mutation and clinopathological factors. CONCLUSION: Our data indicate that mutation of P53 gene was one of the main factors which caused its protein expression, hence inducing serum P53 antibody formation. P53 gene mutation could be detected within the stools. Detection of P53 serum antibody and gene mutation in stool may provide new ways for the early diagnosis and survey of population at high risk of colorectal cancers.

收稿日期: 2004-10-22; 修订日期: 2005-03-01

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金资助 (No. 2000JL123)

作者简介: 欧玉荣 (1974-), 女, 安徽省怀远人, 讲师, 硕士, 研究方向: 大肠肿瘤病理。

* Correspondence to: ZHANG Hong-fu Tel: 86-551-8922025. E-mail: snowyc1220@163.com

【KEY WORDS】colorectal neoplasms; gene; *P53*; polymerase chain reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay; immunohistochemistry

P53 基因突变是大肠癌发生、发展过程中的常发事件,且这种改变常发生在良性肿瘤向恶性肿瘤过渡时期^[1],因而 *P53* 基因检测对大肠癌的早期诊断及筛查有重要意义。我们用酶联免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、聚合酶链-单链构象多态性分析 (Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 及免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC) 法分别检测大肠癌患者血清 *P53*-Ab、粪便及组织中 *P53* 基因突变及蛋白表达,探讨 *P53* 基因及血清抗体作为一种非侵袭性肿瘤标志物在大肠癌发生中的作用和意义,为大肠癌的早期诊断提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

随机收集安徽医科大学第一附属医院胃肠外科 2001-09~2002-05 大肠癌标本 34 例,年龄 26~82 岁,平均 53 岁。其中结肠癌 12 例,直肠癌 22 例。组织分化程度:高分化腺癌 19 例,中分化腺癌 9 例,低分化腺癌 6 例。收集患者术前 1 周粪便和血清样本,分别置于 -80 ℃ 及 -20 ℃ 冷冻待测,同时收集 10 例健康人群粪便及血清作正常对照。所有患者外科手术后立即取肿瘤组织,部分投入液氮冷冻作 PCR 分析,部分经常规福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片供苏木精-伊红染色及免疫组化染色,同时收集 10 例距肿块边缘 5 cm 以上的切缘组织作对照。所有患者术前未接受过任何放疗或化疗,术后均经常规组织病理证实。

1.2 试剂来源及实验方法

鼠抗人 *P53* 单克隆抗体及 S-P 免疫组化试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。PCR-SSCP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司,*P53* 抗体 (*P53*-Ab) 试剂盒来源于 Oncogene Research Products (cat QIA53, Cambridge, MA), 由美国 Anderson 癌症研究中心徐晓春博士馈赠。ELISA 及免疫组化法均按试剂盒操作说明书进行,每次均设阳性及阴性对照。组织及粪便中 DNA 的提取参照文献方法进行^[2,3],*P53* 基因引物参照文献设计,*P53* 基因扩增的反应条件为:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 45 s, 56 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s (35 cycles), 72 ℃ 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 (80 V, 20 min) 出现一条清晰条带者可用作 SSCP 分析,否则重新扩增。SSCP 分析为:取 PCR 扩增产物 5 μl 加入等体积缓冲液 95 ℃~100 ℃ 变性 5~10 min,立即水浴,迅速上样于 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (29:1),4 ℃ 冰箱电泳 (40 V, 12~15 h) 后按常规步骤银染。

1.3 结果判断

①免疫组化检测癌组织中 *P53* 蛋白表达:采用半定量积分法判断结果,*P53* 定位于细胞核,阳性为细胞核呈黄-棕黄色颗粒。②PCR-SSCP (银染法) 检测组织及粪便中 *P53* 基因突变:观察银染后的 PAG 凝胶,与正常组织 DNA 扩增产物相比较,若被测定的样本中出现条带增加,减少或泳动移位,则说明该样本有 *P53* 基因突变。③ELISA 检测血清 *P53* 抗体:按试剂盒说明书采用半定量法判断结果,利用酶标仪检测样本平均吸光度值,计算 *P53* 自身免疫指数。*P53* 指数高于 0.03 为阳性,低于 0 为阴性,介于 0~0.03 之间样本重新分析。

1.4 统计学方法

采用配对四格表 χ^2 检验、四格表精确概率计算法、秩和检验和 Speraman 等级相关分析。

2 结果

2.1 大肠癌患者癌组织中 *P53* 蛋白表达及基因突变

10 例正常大肠黏膜未见 *P53* 表达,34 例大肠癌组织中 *P53* 蛋白表达阳性率为 55.9% (图 1)。*P53* 基因 Exon5-8 突变率为 52.9%,其中 Exon 5, Exon 7 各 4 例,Exon 6 3 例,Exon 8 7 例 (图 2),无突变热点。与正常黏膜相比,两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.69, P < 0.01$)。*P53* 蛋白表达及基因突变与肿瘤组织分化, Duke's 分期,淋巴结转移以及其它临床病理因素无关 ($P > 0.05$) (表 1)。从表 2 可见,PCR-SSCP 与免疫组化的符合率为 67.6%,两法差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.00, P = 1.00$)。经 Speraman 相关分析 *P53* 蛋白表达与基因突变呈正相关关系 ($r_s = 0.349, P = 0.043$)。

2.2 粪便中 *P53* 基因突变

18 例癌组织中有 *P53* 基因突变的患者,对其粪便进行分析,其中 2 例样本提取 DNA 扩增失败,其余 16 例中,检出 7 例 Exon 5~8 外显子突变,Exon 5 及 Exon 6 各 2 例,Exon 8 3 例,Exon 7 未见突变。

2.3 大肠癌患者血清 *P53*-Ab 与基因突变及蛋白表达的关系

根据 *P53*-Ab 自身免疫指数分析,34 例大肠癌中 6 例 *P53*-Ab 阳性 (图 3),其中 Duke's A 及 Duke's B 各 2 例, Duke's C 及 Duke's D 各 1 例,患者年龄均低于 60 岁 (平均 49 岁)。10 例正常对照组血清均为阴性。*P53*-Ab 与临床病理因素无关 ($P > 0.05$)。从表 3 可见,经配对四格表 χ^2 检验 *P53*-Ab 在 PCR-SSCP 及



表 1 大肠癌P53蛋白表达、基因突变及血清抗体与临床病理因素的关系
Table 1 Relationships between P53 alterations and clinicopathological factors

Factors	n	IHC(+)		SSCP(+)		P53-Ab(+)	
		Cases(× 10 ⁻²)	P	Cases(× 10 ⁻²)	P	Cases(× 10 ⁻²)	P
Sex Male	22	12 (54.5)	1.00	11 (50.0)	0.729	3 (13.6)	0.641
Female	12	7 (58.3)		7 (58.3)		3 (25.0)	
Age(year) < 60	24	16 (66.7)	0.068	15 (62.5)	0.134	6 (25.0)	0.148
≥ 60	10	3 (30.0)		3 (30.0)		0 (0.00)	
Tumor size ≤ 5cm	23	16 (69.6)	1.00	14 (60.9)	0.274	6 (26.1)	(Hc)
> 5cm	11	8 (72.7)		4 (36.4)		0 (0.00)	
Degree of differentiation Well	19	10 (52.6)	(Hc) *	12 (63.2)	(Hc)	4 (21.1)	0.408
Moderate	9	7 (77.8)	2.98	4 (44.4)	1.92	1 (11.1)	
Poor	6	2 (33.3)		2 (33.3)		1 (16.7)	
Lymph node metastasis Positive	13	8 (61.5)	0.728	6 (46.2)	0.725	2 (15.4)	1.00
Negative	21	11 (52.4)		12 (57.1)		4 (19.0)	
Duke's stage A	10	6 (60.0)	(Hc)	6 (60.0)	(Hc)	2 (20.0)	(Hc)
B	11	5 (45.5)		6 (54.5)		2 (18.2)	
C	5	4 (80.0)		2 (40.0)		1 (20.0)	
D	8	4 (50.0)		4 (50.0)		1 (12.5)	

* Hc: wilcoxon test

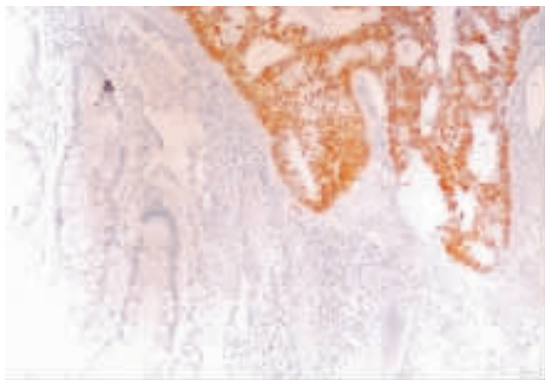


图 1 大肠腺癌标本。大肠癌组织 P53 蛋白表达阳性，正常黏膜腺体表达阴性。(SP 法, × 200)

Figure 1 Colorectal adenocarcinoma. P53 protein was positive in carcinomatous cells (upper right corner) and negative in normal glands (lower left corner). (SP method, × 200)

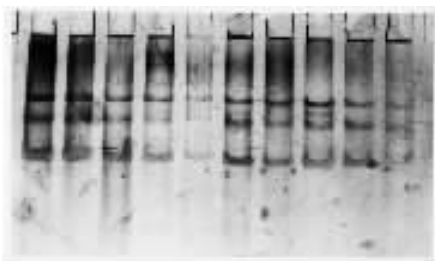


图 2 P53 基因 exon8 突变, PCR-SSCP, 其中第 8 样本条带增多为突变样本

Figure 2 Exon 8 mutation of P53 gene, PCR-polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), sample 8 was P53 gene mutation

IHC 间的差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 8.64, P < 0.05$; $\chi^2 = 9.60, P < 0.05$)。经 Sperman 相关分析, 血清 P53-Ab 与基因突变及蛋白表达均无相关性 ($r_s = 0.282, P = 0.106$; $r_s = 0.256, P = 0.144$)。

表 2 P53 基因突变与蛋白表达的关系

Table 2 Relationship between p53 gene mutation and protein expression

SSCP	n	IHC		Consistence rate (× 10 ⁻²)
		+	-	
+	18	13	5	72.2
-	16	6	10	62.5
Total	34	19	15	67.6

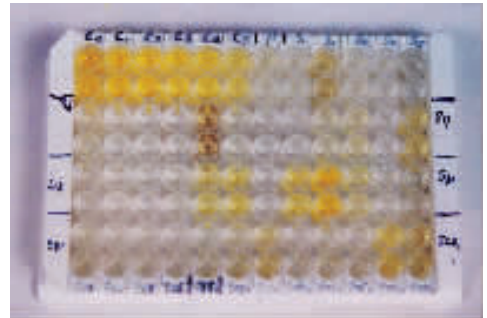


图 3 大肠癌患者血清中 P53-Ab 检测, ELISA 法。C: 0~5 : 阳性对照; N: 阴性对照; S: 患者血清

Figure 3 Detection of P53 antibodies in serum with colorectal cancer, ELISA. C: 0~5: positive control; N: negative control; S: serum of patients

表 3 血清 P53 抗体与 P53 基因突变及蛋白表达的关系

Table 3 Relationship between serum P53 antibodies and P53 gene mutation & protein expression

P53-Ab	n	SSCP		Consistence rate(× 10 ⁻²)	IHC		Consistence rate(× 10 ⁻²)
		+	-		+	-	
+	6	5	1	83.3	5	1	83.3
-	28	13	15	53.6	14	14	50.0
Total	34	18	16	58.8	19	15	55.9

3 讨论

P53 基因是大肠癌发生过程中起重要作用的常见突变基因。P53 基因突变可改变 P53 蛋白结构, 使其半

衰期延长,稳定性增加,在细胞内聚积。多数研究证实,聚积的突变型 P53 蛋白可作为免疫原诱导机体产生 P53-Ab,多数 P53-Ab 阳性的患者其肿瘤细胞中出现突变型 P53 蛋白聚积,利用 IHC 可以检测到^[4],而 P53-Ab 可以在血清中发现。由于患者血清取材容易,可重复性操作,患者无痛苦而易于接受,可替代组织中基因突变的检测,成为大肠癌诊断及高危人群普查的新方法。但关于大肠癌患者血清及粪便中 P53 基因检测及其在大肠肿瘤诊断中的作用,国内外均报道甚少。我们利用 ELISA 检测大肠癌患者血清中 P53-Ab,结果发现正常对照组均为阴性,而 34 例大肠癌中有 6 例(17.6%)阳性,6 例 P53-Ab 阳性者,5 例有 P53 基因突变和蛋白表达,说明 P53 蛋白稳定性增加及在细胞内聚积是产生 P53-Ab 的前提条件。Hammel 等^[5,6]报道大肠癌 P53-Ab 阳性率为 29.4%(14/34),明显高于本组研究。可能为突变型 P53 蛋白释放入血量较少且具有不连续性,或与某些蛋白结合易于被机体清除、降解,或仅在肿瘤坏死时释放入血,另外判断标准及样本选择也可导致 P53-Ab 检测率较低。血清 P53-Ab 阳性率虽较低,但 6 例阳性者均为大肠癌患者且 4 例为早期大肠癌患者,提示检测血清 P53-Ab 具有较高特异性^[5,6],无假阳性,说明血清 P53-Ab 检测可用于大肠癌的早期诊断。

粪便是反映消化道病变的一个窗口。粪便成份复杂,除了细菌、食物残渣和代谢废物外,还有不少脱落的肠上皮细胞,粪便中收集到的脱落细胞均为大肠脱落细胞^[7],整个大肠粘膜约 3~4 d 即可重新更换一次,而生长旺盛的肿瘤细胞则更新更快^[8]。由于粪便物质的存在,脱落细胞学分析难以发现癌变细胞的存在,而利用分子生物学技术检测粪便样本中脱落癌细胞的相关基因突变,则不受粪便中其他物质的影响,可为大肠癌的筛选和早期诊断提供一种敏感而有效的方法。对 18 例癌组织中存在 P53 基因突变的患者进行粪便分析,其中 2 例样本 DNA 提取失败,其余 16 例中 P53 基因突变阳性率为 43.8%。虽然分析例数较少,但说明突变的基因可以从粪便脱落细胞中检测出来。P53 基因突变检测对大肠肿瘤早期诊断、高危人群筛查普查具有重要临床意义。而粪便中 P53 基因突变检出率较低可能与以下原因有关:①粪便成分复杂,含杂质较多,为 DNA 提取带来困难;②粪便标本不够新鲜,DNA 多数被降解;③用作分析的粪便样本含脱落细胞较少,或癌细胞与正常

细胞比值小于 10%^[9],PCR-SSCP 难以检测;④某些类型的肿瘤组织细胞不易脱落;⑤PCR-SSCP 敏感性低于 100%,提示一部分突变无法检测到;⑥P53 基因突变约 90%位于第 5~8 外显子,但仍有 10%位于其外未能检测到。

本组研究证明大肠癌 P53-Ab 与 P53 基因突变可以从患者血清及粪便中检测到,对大肠癌的诊断具有重要意义。对于如何提高血清与粪便中 P53-Ab 及 P53 基因突变的检出率,用于大肠癌高危人群筛查和早期诊断,尚需作进一步研究。

参考文献:

- [1] Scott N, Quirke P. Molecular biology of colorectal neoplasia [J]. *Gut*, 1993, 34(3): 289-292.
- [2] 宁向群, 宫恩聪, 吕愈敏, 等. 运用 PCR-SSCP 及免疫组化方法检测大肠肿瘤及粪便脱落细胞中 P53 基因突变[J]. *中华消化杂志*, 1996, 16(2): 115-117.
- [3] Eguchi S, Kohara N, Komuta K, et al. Mutations of the P53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer [J]. *Cancer*, 1996, 77:1 707-1 710.
- [4] Soussi T, Legros Y, Lubin R, et al. Multifactorial analysis of P53 mutation[J]. *Int J Cancer*, 1994, 57(1): 1-9.
- [5] Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, et al. Detection and monitoring of serum P53 antibodies in patients with colorectal cancer[J]. *Gut*, 1997, 40(3): 356-361.
- [6] Hammel P, Leroy-Viard K, Chaumette MT, et al. Correlations between P53-protein accumulation, serum antibodies and gene mutation in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 1999, 81(5): 712-718.
- [7] Albangh GP, Lyengar V, Lohani A, et al. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel non-invasive approach to the study of cellular markers[J]. *Int J Cancer*, 1992, 52(3): 347-350.
- [8] Battifora H. P53 immunohistochemistry: a word of caution[J]. *Hum Pathol*, 1994, 25(5): 435-437.
- [9] Wu JK, Ye Z, Barras BT. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism(sscp) analysis in detecting P53 point mutations in tumors with mixed cell populations[J]. *Am J Hum Genet*, 1993, 52(6): 1 273-1 275.

