

口腔粘膜鳞癌发生发展过程中 p53 基因、P53 蛋白及 PCNA 抗原的改变

陈谦明 傅继梁 杨光华 李秉琦

摘要 两两多元相关分析发现, PCR-SSCP 分析异常、P53 染色阳性与 PCNA 指数之间无论是在口腔粘膜癌前损害、口腔粘膜鳞癌原发灶或淋巴结转移灶中, 均有明显的相关关系; 将患者的性别、年龄共同引入进行多元判别分析, 获得利用这些指标进行口腔粘膜癌前损害病理分度、口腔粘膜鳞癌病理分级, 以及判定口腔粘膜鳞癌患者是否淋巴结转移的多元判别方程; 初步的判别结果显示其判别准确率分别达 82.5%, 78%, 80%, 说明这些方程已具备了临床应用前景。通过这些研究同时也说明分子、细胞水平的研究不仅仅在探索疾病的发病机理方面具有重要的意义, 而且在疾病分类、疾病转归预测等方面也可能有应用潜力。

关键词 人类口腔粘膜癌前损害 鳞状细胞癌 p53 基因 突变 聚合酶链反应-单链构象多态性

作者曾报道采用自行建立的银染聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析方法, 对口腔粘膜鳞癌发生发展过程中 p53 基因的突变进行研究的结果¹, 后又对 P53 蛋白的异常表达情况及其与基因异常的一致性和可能意义进行了讨论^{2,3}。但是, 这些异常改变与细胞增殖状态之间的关系如何? 能否利用这些指标来辅助病理学分级及判定有无淋巴结转移? 本部分即进行这些相关探索。

1 材料和方法

1.1 研究所用的标本, 进行 PCR-SSCP 分析的方法、扩增引物、条件、PCR 产物确定的杂交探针制备、杂交过程均同参考文献 1。

1.2 P53 蛋白的免疫组织化学染色分析

方法、抗体及流程同参考文献 2, 3。

1.3 细胞增殖状态的免疫组织化学染色分析

以增殖细胞核抗原(PCNA)为指标, 反映细胞增殖状态。鼠抗 PCNA 单克隆抗体可以与所有脊椎动物细胞中的增殖细胞群细胞核特异性结合。采用微波煮沸脱交联 ABPA 法。具体流程同参考文献 2, 3。

实验中以 PBS 代替第 1 抗体作为空白对照, 以正常鼠血清代替第 1 抗体作为替代对照, 以已知免疫组织化学染色阳性的结肠癌标本作为阳性对照。

结果判定: PCNA 染色则根据阳性细胞数所占上皮细胞(正常或癌前)或肿瘤细胞(癌及淋巴结转移灶)中的百分比分为 4 级记录: I < 25%; II 为 26% ~ 50%; III 为 51% ~ 75%; IV > 76%。

2 结果

2.1 p53 基因 PCR-SSCP 分析结果、P53 蛋白免疫组织化学染色

结果详见参考文献 1, 2。

2.2 PCNA 免疫组织化学染色

所有 PCNA 阳性反应均定位于细胞核。在 5 例正常口腔粘膜, PCNA 总指数平均为 1.5 例口腔粘膜上皮单纯性增生患者为 1.2, 而 30 例口腔粘膜癌前损害组织中, 总的 PCNA 平均指数达 2.633, 34 例无淋巴结转移的鳞癌患者平均为 1.794, 15 例已有淋巴结转移的浸润性鳞癌则为 2.811。

在正常口腔粘膜及口腔粘膜上皮单纯性增生组, PCNA 阳性染色仅局限于基底细胞层及少许棘细胞下层细胞; 在口腔粘膜癌前损害组织中, PCNA 阳性细胞定位情况与上皮异常增生度之间存在一定关系。在上皮轻、中度异常增生组织中, PCNA 阳性定位情况与正常组织及上皮单纯性增生者相差无几, 仅是阳性细胞数明显增加; 而上皮重度异常增生组中, PCNA 阳性细胞可在上皮增生状态下出现在颗粒细胞层或上皮细胞全层。在口腔粘膜鳞癌口腔原发灶及淋巴结转移灶中, 当上皮岛中心有角化物质形成(或形成趋势)时, PCNA 阳性细胞主要定位于外周基底细胞及棘细胞, 而当原发灶或转移灶上皮岛没有角化物质形成时, PCNA 阳

本课题获国家自然科学基金及纽约中华医学基金会(CMB)资助

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院口腔粘膜病学研究室(陈谦明, 李秉琦), 第一临床医学院(杨光华), 上海第二军医大学生物学教研室(傅继梁)

性细胞则散在分布于癌巢区域内。

口腔粘膜癌前损害组中不同上皮异常增生度间 PCNA 指数的比较显示: 各组 PCNA 指数呈逐渐上升趋势, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。无淋巴结转移的粘膜鳞癌与已有淋巴结转移的粘膜鳞癌间差异也具有显著性 ($P < 0.01$), 说明淋巴结转移组较无淋巴结转移组 PCNA 指数为高, 但口腔粘膜鳞癌组总的 PCNA 指数较口腔粘膜癌前损害组相比略低。有淋巴结转移患者的淋巴结转移灶与其相应的口腔原发灶相比, PCNA 指数间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 p53 基因 SSCP 分析异常、P53 免疫组织化学染色阳性及 PCNA 指数间的相互关系及应用意义

采用严格双盲方法分别获得各样本的 SSCP 分析、P53 免疫组织化学染色及 PCNA 指数后, 再进行两两多元相关分析发现, SSCP 分析异常、P53 染色阳性与 PCNA 指数间无论在口腔癌前损害、口腔粘膜鳞癌原发灶及粘膜鳞癌的淋巴结转移灶中, 均有明显的相关关系 ($P < 0.01$), 证明它们在反映问题的本质上是一致的。

为了评估 SSCP 分析结果、P53 免疫组织化学染色及 PCNA 指数与口腔粘膜鳞癌发生、发展各阶段的关系, 探讨在实际工作中应用这些指标辅助进行病理学分级及预测患者的预后的价值, 作者将已有研究证实与口腔粘膜癌前损害及鳞癌的发生、淋巴结转移具有一定关系, 且在病理资料中又易获得的信息——患者的性别、年龄共同引入作为自变量, 患者的病理分级或预后作为应变量进行了多元逐步判别分析⁴。其代号分别是性别 (X_1), 男性计为 1, 女性计为 0, 年龄 (X_2), SSCP 分析 (X_3), P53 蛋白染色阳性率 (X_4), PCNA 指数 (X_5)。

当利用这些指标进行正常粘膜、口腔粘膜上皮单纯性增生以及口腔粘膜癌前病损的 3 个不同程度上皮异常增生的鉴别时, 获得了如下的方程:

$$\text{正常粘膜} = - 9.2403 + 0.8768X_1 + 0.3674X_2 - 0.4822X_3 + 4.3163X_4 - 1.1144X_5$$

$$\text{单纯性增生} = - 28.0805 - 1.5680X_1 + 0.8343X_2 - 1.6642X_3 + 5.7257X_4 + 0.3182X_5$$

$$\text{轻度异常增生} = - 37.0293 - 2.7379X_1 + 0.8510X_2 + 10.6053X_3 + 8.5627X_4 + 0.4616X_5$$

$$\text{中度异常增生} = - 58.3208 - 5.0631X_1 +$$

$$1.0872X_2 + 12.6705X_3 + 10.3233X_4 + 4.8421X_5$$
$$\text{重度异常增生} = - 54.1044 - 3.6297X_1 + 0.9243X_2 + 12.2217X_3 + 11.4526X_4 + 9.6044X_5$$

这 5 个方程的回代自动鉴别判断时, 40 例患者中 33 例与原临床病理诊断相符, 仅 7 例鉴别有误, 准确率达 82.5%, 鉴别错误的主要原因在于将 3 例上皮中度异常增生中 2 例归入了上皮重度异常增生, 1 例归入轻度异常增生。3 例上皮轻度异常增生分别判为 1 例上皮单纯性增生和 1 例上皮中度异常增生和 1 例上皮重度异常增生。1 例上皮重度异常增生判为轻度异常增生。

利用这些指标辅助进行口腔粘膜鳞癌病理学分级时获得的方程如下:

$$\text{I 级分化} = - 22.0259 - 5.1838X_1 + 0.7739X_2 - 11.6601X_3 + 6.6448X_4 + 4.9138X_5$$

$$\text{II 级分化} = - 34.6074 - 5.8116X_1 + 0.9728X_2 - 18.9396X_3 + 9.1244X_4 + 8.3803X_5$$

$$\text{III 级分化} = - 43.4743 - 7.0862X_1 + 1.0554X_2 - 20.6909X_3 + 10.3337X_4 + 10.2089X_5$$

根据这些方程, 将 49 例口腔粘膜鳞癌患者的病理诊断资料自动回代, 38 例自动计算判定与原病理诊断相符, 判别准确率为 78%。判别错误主要发生在将 3 例 I 级分化判为 II 级分化, 3 例 II 级分化归入 I 级分化, 5 例 II 级分化纳入 III 级分化。

利用这些指标判定口腔粘膜鳞癌患者是否已有淋巴结转移时, 其方程为:

$$\text{无淋巴结转移} = - 18.0133 - 4.6825X_1 + 0.6475X_2 - 6.8663X_3 + 4.5057X_4 + 2.0093X_5 - 2.2683X_6$$

$$\text{已淋巴结转移} = - 19.5268 - 3.7291X_1 + 0.5700X_2 - 4.9603X_3 + 5.2144X_4 + 2.1253X_5 - 1.5383X_6$$

用此 2 方程将 49 例口腔粘膜鳞癌患者的临床病理诊断资料回代, 39 例判定与原临床病理诊断相符, 判别准确率为 80%, 判别错误主要是将 4 例无淋巴结转移者判为了有淋巴结转移, 而 6 例已有转移者判为了无淋巴结转移。

3 讨 论

3.1 PCNA 免疫组织化学染色与口腔鳞癌的发生及发展

PCNA 作为 DNA 多聚酶 δ 的辅助蛋白直接参

与了DNA合成,它在细胞周期G1期始升高,在G1与S期交界处达高峰。在经去垢剂处理过的标本中,PCNA仅标记S期细胞,而未经去垢剂处理过的标本中,PCNA抗体可以在G1,S,G2,M期细胞均有标记反应^{5,6},本研究标本在未经去垢剂处理的情况下,PCNA指数在口腔粘膜癌前病损时期较正常口腔粘膜和单纯性上皮增生组为高,说明上皮细胞群体中存在着代偿性修复无效,处于增殖活跃的细胞群;另外,作者的研究结果还显示,有淋巴结转移的口腔粘膜鳞癌较无淋巴结转移的口腔粘膜鳞癌PCNA指数为高,说明虽同属增殖失控的状态,但增殖活跃细胞多的病例更易发生淋巴结转移;这组病例的SSCP异常率,P53免疫染色阳性率都高于无淋巴结转移组,而且PCNA与SSCP异常,P53免疫组织化学染色阳性率之间密切相关,也证明了p53基因与细胞的生长、分化具有一定的关系,从一个侧面支持作者将口腔粘膜癌前损害的细胞群分为3个亚群的观点^{2,3}。至于口腔粘膜癌前损害PCNA指数较无淋巴结转移的鳞癌组为高则可能与所研究的上皮重度异常增生组中含有部分原位癌病例有关,也可能与口腔粘膜癌前损害中各种不同程度上皮异常增生的病例量不大相关,有待加大样本量进一步明确两组之间的PCNA指数差异的实质及意义。

3.2 SSCP分析、P53蛋白免疫染色、PCNA指数检测的实践意义

多元逐步判别分析方法是一种判别个体所属类别的一种统计学方法,它在医学上的用途主要在于根据患者的各种症状,综合判别患者所患的疾病,根据检查结果,综合判定患者的预后等等⁴。作者的初步探试结果表明,利用SSCP分析、P53蛋白免疫组织化学染色以及PCNA指数,结合患者的性别、年龄进行口腔癌前损害的分类、口腔粘膜鳞癌组织的病理学分级以及预测口腔粘膜鳞癌是否有淋巴结转移等方面,与实际情况符合率(回代率)分别为82.5%,78%和80%。据统计学家经验,由于从临床病例所得实际资料个体变异较大,因此,若回代率达70%已属较好的判别方程,在实践中即有实际应用价值。因此,在实践中只要测得患者上述指标的实际值,并根据相应的目的,选择代入所得的3组方程,所获得最大值的方程,即为该患者的归类。也就是说,只要获得方程所需的

指标进行计算,就有约80%的把握判定患者的实际病理分级或有无淋巴结转移,供临床作出相应的处理作参考。假如将口腔粘膜癌前损害患者所测指标输入方程,患者被判为上皮轻、中度异常增生,则提示临床上应加强随访、积极保守治疗;若患者被判为上皮重度异常增生,根据临床治疗原则,则提示有可能要实施手术治疗。对口腔粘膜鳞癌患者来说也具有相似意义。假如被判为淋巴结转移,则提示临床医生在处理口腔原发灶的同时,还应注意收寻有无淋巴结转移灶,并采取相应的措施及时处理,定期检查,追踪观察。这在口腔粘膜癌前损害异常增生分度存在较大主观性,早期判定鳞癌患者是否已有淋巴结转移缺乏客观指标的临床实践中,可能是一个良好的辅助手段。我们曾试图单独利用3项指标中的单指标进行判别分析,但回代率都不理想,说明在实际工作中仍以多指标进行判别为好。此外,通过多元相关分析发现,SSCP分析结果异常、P53蛋白染色阳性及PCNA指数两两之间存在着密切的相关关系,而且都被选入了判别方程,说明它们在反映患者的病情方面在本质上是统一的。作者分别从30例和49例患者的检测结果及病例资料所求得的判别方程就已得到了近80%的良好回代率,假如进一步扩大研究对象,再结合其它细胞或分子水平的检测,可能会将回代率进一步提高,使其临床应用可能更进一步。由此,也可以看出,分子、细胞水平的研究不仅仅在探索疾病的发病机制方面具有重要的意义,而且在疾病分类、疾病转归预测等方面也可能同样具有应用潜力,值得进一步深入探索。

4 参考文献

- 1 陈谦明,傅继梁,杨光华,等.口腔粘膜鳞状细胞癌发生发展过程中p53基因突变的银染聚合酶链反应-单链构象多态分析.中华口腔医学杂志,1996,31(6):337
- 2 陈谦明,杨光华,傅继梁,等.口腔粘膜鳞癌发生发展过程中p53基因突变与P53蛋白异常表达不一致的意义.中华口腔医学杂志,1996,31(4):244
- 3 陈谦明,杨光华,傅继梁,等.口腔粘膜癌变过程中p53基因突变与P53蛋白表达的关系.华西医科大学学报,1996,24(3):240
- 4 杨树勤主编.中国医学百科全书-医学统计学.上海:上海科学技术出版社,1985
- 5 Hall PA, Levison DA, Wood AL, et al. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin s-

ections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms J Pathol, 1990, 162: 285

- 6 Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H, et al Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody agair

nst proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver diseases fixed in formaldehyde Am J Pathol, 1992, 142(2): 513

(1996- 08- 19 收稿)

A Study on the Significance of p53 Gene Mutation, P53 Protein Positive Staining and PCNA Staining

Chen Qianming, Fu Jiliang, Yang Guanghua, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

After obtaining the results of p53 gene mutation by a silver staining method to polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis, P53 protein staining and proliferation cell nuclear antigen (PCNA) index by double-blind method, multivariate correlation analysis two by two showed that PCR-SSCP, P53 positive protein staining and PCNA index had markedly correlation not only in oral precancerous lesions (OPL) but also in primary sites and regional metastatic lymph nodes of oral squamous cell carcinomas (OSCC). This indicated that the nature of the three indexes was the same. After introducing the sex and age of patients which have been proved to be related to the initiation and development of OPL and OSCC according to other researchers and are easy to be obtained in clinics, multivariate discriminatory analysis was carried on and three groups of discriminatory equations were gotten about the pathological grading of OPL and OSCC and metastasis condition of OSCC. the accuracy of these equations was 82.5%, 78% and 80%, individually. This suggests that the equations have applicable potentiality already.

Key words: human oral mucosal precancerous lesions oral squamous cell carcinoma p53 gene mutation PCR-SSCP

(上接第 116 页)

- 2 Nylander K, Stenling R, Gustafsson H, et al P53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer, 1995, 75(1): 87
- 3 Nees M, Homann N, Discher H, et al Expression of mutant P53 occurs in tumor-distant epithelia of head and neck patients: a possible molecular basis for the development of multiple tumors. Cancer Res, 1993, 53: 4189
- 4 Martin H, Filipe M, Morris R, et al P53 overexpression and prognosis in gastric carcinoma. Int J Cancer, 1992, 50:

859

- 5 Thorlacius S, Borresen AL, Eyfjord JE, et al Somatic P53 mutations in human breast carcinomas in an Icelandic population: a prognostic factor. Cancer Res, 1993, 53: 1637
- 6 Shimaya K, Shizaki H, Inoue M, et al Significance of P53 expression as a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. Virchows Arch [A], 1993, 422: 271

(1996- 03- 26 收稿)

P53 Expression and Clinical Significance in Oral Squamous Cell Carcinoma

Long Yan, Ling Disheng, Yue Wen, et al

Stomatological Hospital, Shandong Medical University

Abstract

P53 protein expression was investigated in oral squamous cell carcinomas and oral premalignant lesions by monoclonal antibody Do-1 and immunohistochemistry technique. 4 of 12 (33.3%) samples of severe epithelial dysplasia and 25 of 44 (56.8%) samples of squamous cell carcinoma expressed P53 protein while all the normal mucosa, mild and moderate epithelial dysplasia were negative. The P53 expression in carcinomas was associated with differentiation, lymph node metastasis and tumor stage. This result indicated that P53 gene mutation might be an early event in oral mucosa carcinogenesis and related to oral tumor progression. Detection of P53 protein probably has clinical significance in identifying the premalignant lesions of oral mucosa and predicting the prognosis of oral carcinoma.

Key words: P53 squamous cell carcinoma mouth neoplasms