

胃癌组织中 p53 蛋白表达和微卫星不稳定及其与预后的相关性研究

屈重行¹, 刘艳红¹, 葛瑞瑞², 李琨琨¹, 吴慧丽¹

(1. 郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450000;

2. 郑州市第六人民医院, 河南 郑州 450000)

摘要: [目的] 探讨胃癌组织中 p53 蛋白表达与微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)与胃癌临床病理特征及预后的关系。[方法] 选取行胃癌手术患者 104 例, 采用免疫组织化学法检测肿瘤组织中 p53 蛋白和错配修复蛋白 (mismatch repair protein, MMRP)(MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2) 表达, 分析 p53 表达和 MSI 与患者临床病理参数的关系。术后患者随访 2 年, 采用 Logistics 回归分析影响患者预后的危险因素。[结果] 胃癌组织中 p53、MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 均定位于肿瘤细胞核。104 例胃癌中 p53 阳性 46 例 (44.23%); MMRP 阳性 65 例 (62.50%), 39 例 MMRP 表达缺失 (37.50%), 其中 MLH1、MSH2、MSH6 及 PMS 表达缺失分别为 25 例 (24.04%)、19 例 (18.27%)、18 例 (17.31%) 和 22 例 (21.15%)。胃癌低分化组及 III 期组中 p53 阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$)。p53 在癌组织中的表达与 MSI 呈负相关 ($r = -0.486$, $P < 0.05$)。Logistic 多因素回归分析显示, TNM 分期、MSI 和 p53 阴性是影响患者预后的独立危险因素。[结论] 胃癌组织中 p53 与 MSI 呈负相关。对胃癌组织监测 p53 与 MSI 对制定给药方案及评估预后具有重要意义。

关键词: 胃肿瘤; 微卫星不稳定; p53; 预后

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)08-0698-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.08.B004

P53 Protein Expression and Microsatellite Instability in Gastric Carcinoma and Their Relationship with Prognosis

QU Chong-xing¹, LIU Yan-hong¹, GE Rui-rui², LI Kun-kun¹, WU Hui-Li¹

(1. Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China;

2. Zhengzhou Sixth People's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the relationship of p53 expression and microsatellite instability (MSI) with the clinicopathological features and prognosis of gastric cancer. [Methods] One hundred and four patients with gastric carcinoma undergoing gastrectomy were enrolled. Expression of p53 protein and mismatch repair protein (MMRP) MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in gastric carcinoma tissues were detected by immunohistochemistry. The relationship between p53 expression and MSI with clinicopathological parameters were analyzed. All patients were followed up for 2 years, the risk factors affecting the prognosis of patients was analyzed by Logistic regression. [Results] The expressions of P53, MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 were localized in nuclei in gastric carcinoma cells. Among 104 cases of gastric cancer, 46 cases were p53 positive (44.23%), 65 cases (62.50%) were MMRP positive and 39 cases (37.50%) were MMRP negative. Among them, the missing of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 was 25 cases (24.04%), 19 cases (18.27%), 18 cases (17.31%) and 22 cases (21.15%), respectively. The expression of p53 was significantly lower in the poorly differentiated and stage III gastric carcinoma ($P < 0.05$). The expression of p53 was negatively correlated with MSI ($r = -0.486$, $P < 0.05$). Logistic multivariate regression analysis showed that higher TNM staging, MSI and negative p53 were independent risk factors for poor prognosis in gastric carcinoma. [Conclusion] P53 is negatively correlated with MSI in gastric cancer tissues. The detection of p53 expression and MSI is of value for treatment monitoring and prognosis of gastric carcinoma patients.

Subject words: gastric carcinoma; microsatellite instability; p53; prognosis

胃癌(gastric carcinoma, GC)是消化道恶性肿瘤之一,

发病率高,对人类健康产生严重威胁^[1]。临床监测缺乏特异性标志物,患者确诊时多为晚期^[2]。目前胃癌主要以手术治疗为主,仍有部分患者术后预后不理想,探讨影响接受手术治疗胃癌患者预后的影响因素对于改善患者的术后有一定

基金项目: 河南省科研立项 (162102310228)

通信作者: 吴慧丽, 主任医师, 硕士; 郑州大学附属郑州中心医院消化内科, 河南省郑州市中原区桐柏路 195 号 (450000); E-mail: Wuhuilili616161@126.com

收稿日期: 2018-10-15; **修回日期:** 2018-12-19

意义^[3]。基因研究认为胃癌的发生是一个多因素参与的复杂生物学过程^[4-5],p53 基因作为一种转录因子,属于最早发现的抑癌基因之一,细胞对多种形式的应激反应需要其通过复杂的网络来调节,从而监测基因组的完整性,稳定细胞状态^[6]。微卫星状态(microsatellite,MS)是人类基因组中小于 10 个核苷酸的短重复序列,约占基因的 10%,微卫星不稳定(microsatellite instability,MSI)现象首次于遗传性非息肉性直肠癌中被发现,后又在乳腺癌及子宫内膜癌中发现^[7-9]。我们拟通过在胃癌组织中观察 p53 表达与 MSI 与胃癌临床病理特征的关系,评价其对患者预后的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

104 例胃癌原发灶标本取自 2014 年 5 月至 2016 年 3 月在我院普外科行手术治疗的患者,术后病理均确诊为胃癌,且无肿瘤家族史,术前均未行放化疗。其中男性 66 例,女性 38 例;年龄 43~75 岁,平均年龄 58.3±5.7 岁。胃癌 TNM 分期根据国际抗癌联盟(UICC)于 2010 年制定的标准判定^[10]:I 期 12 例、II 期 36 例、III 期 56 例;组织分化:低分化及黏液性腺癌 76 例、中分化腺癌 11 例、高分化腺癌 17 例。肿瘤部位:贲门胃底部 14 例、胃窦部 54 例、胃体部 36 例。最大径区分肿瘤大小:>5cm 64 例,≤5cm 40 例。患者均签署知情同意书。

1.2 仪器与耗材

LABvision Autostainer 360 自动染色仪系统(福建迈新科技公司);Dp70 型图像采集分析仪(日本 Olympus 公司);半自动组织包埋机(德国 SLEE 医疗有限公司);恒温水箱(青岛海尔公司);全自动真空脱水机(德国徕卡公司);石蜡切片机(上海跃进医疗器械厂);烤箱(上海跃进医疗器械厂);光学显微镜(日本 Olympus 公司);p53、MLH1、MSH2、MSH6 及 PMS2 鼠抗人单克隆抗体(美国 Abcam 公司)。

1.3 免疫组织化学染色

免疫组化法检测胃组织的 p53 蛋白及 4 种错配修复蛋白(mismatch repair protein,MMRP):MLH1、PMS2、MSH2 和 MSH6 的表达。标本以中性福尔马林固定,石蜡包埋切片。免疫组化步骤:二甲苯脱蜡,

酒精梯度清洗,PBS 洗涤,柠檬酸缓冲液恢复,微波炉加热,置于 H₂O₂,PBS 冲洗,加入一抗(p53、MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 鼠抗人单克隆抗体,工作液浓度均为 1:500),室温孵育石蜡切片,PBS 冲洗,加入 HRP 二抗(1:1000),DAB 显色,苏木精复染,树胶封片观察。PBS 为一抗作为免疫组织化学染色的阴性。

1.4 结果判断标准

由 2 名经验丰富的病理科医生对染色后的标本进行双盲读片。P53 与错配修复蛋白阳性标准:定位于细胞核,阳性细胞染色强度按无色、浅黄色、黄色和棕黄色分别计为 0、1、2、3 分;阳性细胞数计分:无阳性细胞 0 分,1%~10%计 1 分,10%~50%计 2 分,50%~80%计 3 分,≥80%计 4 分。最终染色强度和阳性细胞数的乘积 0~3 分为阴性,≥4 分为阳性。

1.5 随访

随访截止时间为 2018 年 3 月,记录所有患者的生存状况及全因死亡情况。

1.6 统计学处理

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量数据分析采用 *t* 检验,计数资料分析采用 χ^2 检验,采用 Spearman 相关性分析变量之间的相关性,对各因素进行 Bonferroni 校正再代入 Logistics 回归分析影响胃癌随访期间预后的风险因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果

胃癌组织中 p53、MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 均定位于肿瘤细胞核。见 Figure 1。

104 例胃癌中 46 例 p53 表达阳性(44.23%);65 例 MMRP 表达阳性(62.50%),39 例 MMRP 表达缺失(37.50%),其中 MLH1、MSH2、MSH6 及 PMS2 表达缺失分别为 25 例(24.04%)、19 例(18.27%)、18 例(17.31%)及 22 例(21.15%),MLH1、MSH2 与 MSH6 三者均缺失 2 例(1.92%),MLH1 与 MSH2 均缺失 4 例(3.85%),MLH1 与 PMS2 均缺失 17 例(16.35%),MSH2 与 MSH6 均缺失 7 例(6.73%)。

2.2 p53 蛋白表达与胃癌病理特征的关系

不同分化程度患者 p53 阳性表达率明显不同,胃癌低分化组中 p53 阳性表达率显著较低($P<0.05$);

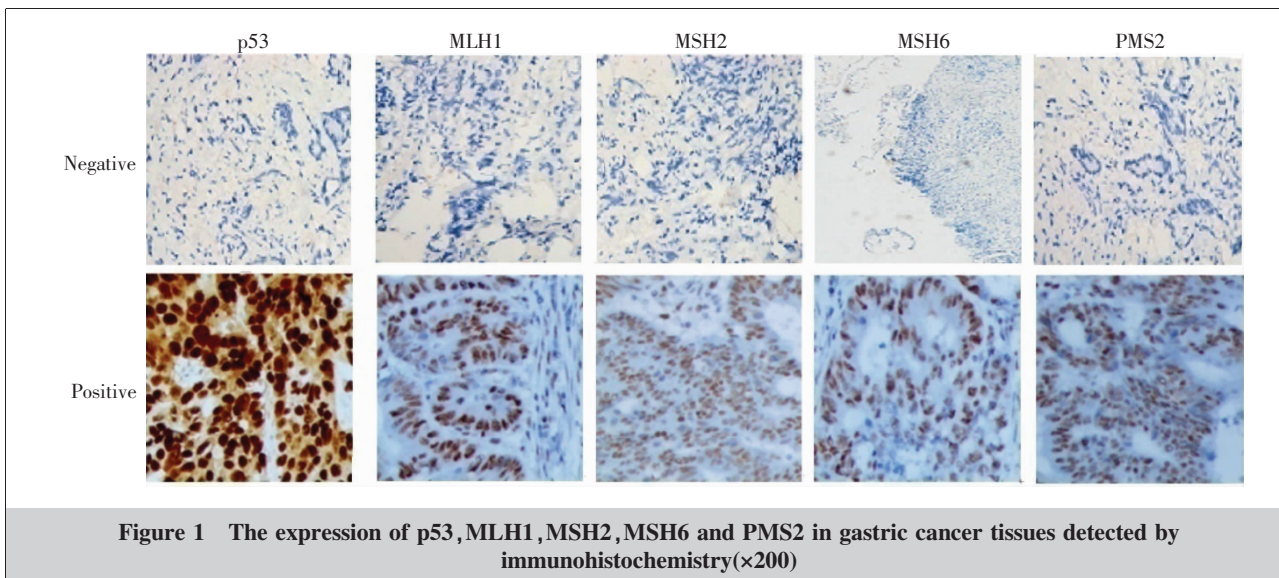


Figure 1 The expression of p53,MLH1,MSH2,MSH6 and PMS2 in gastric cancer tissues detected by immunohistochemistry(x200)

不同 TNM 分期患者 p53 阳性表达率差异显著,Ⅲ期阳性表达率较低($P<0.05$);不同年龄,性别、肿瘤部位及肿瘤大小患者的 p53 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见 Table 1。

2.3 p53 与 MSI 的相关性

根据 MMRP 的表达情况分为 2 个组:微卫星稳定(microsatellite stability, MSS)组即 4 种 MMRP 均无缺失(53 例),MSI 51 例。相关性分析显示,p53 在癌组织中的表达与 MSI 呈负相关($r=-0.486, P<0.001$)。见 Table 2。

2.4 MSI 与胃癌病理特征的关系

依据 MMRP 缺失情况将 MSI 分为 2 个亚组:MSI-L 组(23 例)和 MSI-H 组(28 例),前者为仅 1 种 MMRP 缺失,后者缺失 ≥ 2 种 MMRP。MSS、MSI-L 和 MSI-H 组的年龄、性别、肿瘤大小和组织学分化差异均无统计学意义($P>0.05$)。MSI-L 与 MSS 组的病理特征差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。MSS 与 MSI-H 组在肿瘤部位和 TNM 分期方面差异有统计学意义(P 均 <0.05),MSI-H 多发于胃窦部,MSS 多发于胃体及胃窦,MSI-H 在Ⅲ期胃癌患者中较少出现,MSS 则在Ⅲ期肿瘤中较多($P<0.05$)。见 Table 3。

2.5 胃癌预后影响因素的多因素分析

随访 3~46 个月,所有患者均获得随访,死亡 20 例(19.23%),死因均为胃癌复发或转移。将性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤大小、分化程度、TNM 分期、MSI 和 p53 作为自变量,是否存活为因变量,纳入 Logistic

Table 1 The relationship between p53 expression and pathological features of GC

Pathological features	n	p53		χ^2	P
		-	+		
Gender				0.110	0.741
Male	66	36	30		
Female	38	22	16		
Age (years)				0.403	0.526
<60	42	25	17		
≥ 60	62	33	29		
Tumor location				3.417	0.181
Gastric sinus	54	28	26		
Gastric body	36	19	17		
Tuen Mun	14	11	3		
Tumor size (cm)				1.802	0.180
<5	40	19	21		
≥ 5	64	39	25		
Differentiation				8.671	0.003
Low differentiation	76	49	27		
Medium to high differentiation	28	9	19		
TNM staging				7.187	0.007
I / II	48	20	28		
III	56	38	18		

Table 2 Correlation analysis between P53 and MSI

Groups	p53		r	P
	-	+		
MSS	17	36	-0.486	<0.001
MSI	41	10		

多因素回归分析,结果显示,TNM 分期 (OR=3.016,95%CI:1.023~6.138)、MSI (OR=1.034,95%CI:1.015~2.157)和 p53 阴性 (OR=6.130,95%CI:1.302~10.03)是影响胃癌患者预后的危险因素。见 Table 4。

Table 3 The relationship between MSI and pathological features in GC

Pathological features	n	MSS	MSI-L	MSI-H	χ^2	P
Gender					0.595	0.743
Male	66	32	16	18		
Female	38	21	7	10		
Age (years)					0.317	0.853
<60	42	20	10	12		
≥ 60	62	33	13	16		
Tumor location					10.06	0.039
Gastric sinus	54	20	14	20		
Gastric body	36	23	6	7		
Tuen Mun	14	10	3	1		
Tumor size (cm)					0.885	0.643
<5	40	21	7	12		
≥ 5	64	32	16	16		
Differentiation					0.463	0.793
Low differentiation	76	40	16	20		
Medium to high differentiation	28	13	4	8		
TNM staging					7.638	0.022
I / II	48	19	10	19		
III	56	34	13	9		

Table 4 Multivariate regression analysis of prognostic factors

Factors	B	SE	OR(95%CI)	P
Age	-1.171	0.026	0.310(0.681~1.264)	0.089
Gender	-0.396	0.007	0.672(0.261~0.961)	0.152
Tumor location	-0.442	0.013	0.643(0.268~6.314)	0.061
Tumor size	-0.442	0.013	0.643(0.268~6.314)	0.068
Differentiation	-0.962	0.003	0.382(0.001~0.698)	0.073
TNM staging	1.104	0.301	3.016(1.023~6.138)	0.001
MSI	0.033	0.051	1.034(1.015~2.157)	0.013
p53	1.813	0.076	6.130(1.302~10.03)	<0.001

3 讨论

p53 蛋白是重要的细胞凋亡调控蛋白,按是否突变为野生型和突变型 2 种,野生型 p53 可修复损伤细胞,在细胞周期调控以及细胞分化中扮演多种角色,从而维持基因组的稳定性^[6],具有明显的抑癌作用,Teodoro 等研究发现野生型 p53 能激活脯氨酰羟化酶(prolylhydroxylase,PHDs),利用 PHDs 抗血管生成作用,抑制肿瘤血管生成,达到抗肿瘤的目的^[11]。突变型 p53 可促进肿瘤生长,研究表明 p53 基因突变在大多数恶性肿瘤都有出现,40%的胃癌中可检出 p53 基因突变^[12-13]。本研究结果所示,104 例胃癌患者癌组织中 p53 阳性表达 46 例(44.23%),与文献报道类似,且在低分化组中 p53 阳性表达率显著较低,Ⅲ期患者阳性表达率较低,进一步随访结果也显

示 p53 阴性患者 2 年生存率较低,影响胃癌患者预后。有关 p53 蛋白表达与肿瘤大小的关系尚无统一观点,Tzanakis 等^[14]认为 p53 蛋白高表达与大病灶密切相关,但本研究显示 p53 蛋白表达与病灶大小无明显关系,与 Ohashi^[15]等的研究一致。

胃癌的病变特点在于宿主的遗传不稳定性,其中包括癌基因的激活和 MSI 等^[16]。MSI 在直肠癌和遗传性非息肉病中被发现以来,后续在肺癌、食管癌和子宫癌等恶性肿瘤中也有报道,提示 MSI 可能也参与了胃癌的发生发展。MSI 是短的重 DNA 序列(微卫星)发生了高频的缺失或插入等改变,由基因组在复制转录过程中因为错配修复系统出现缺陷而导致^[16-17]。当 MLH1、MSH2、MSH6 及 PMS2 这些蛋白基因发生甲基化或突变时,会造成 MMR 蛋白表达沉默,导致 MSI,诱导肿瘤生成^[18-19]。Palli 等^[20]回顾性分析了 126 例胃癌患者,其中 43 例(34.1%)检出 MSI。另一方面,肿瘤的发生发展还伴随抑癌基

因失活,Nan 等^[13]发现 MLH1 启动子的超甲基化与 MSI 显著相关,与 p53 基因突变呈负相关,本研究也得到类似结论,组织中 p53 阳性表达和 MSI 阳性呈显著负相关关系,表明其可能在肿瘤发生发展的不同阶段发挥作用。本研究的 104 例胃癌中,53 例 MSI,其中 MSI-L 组 23 例,MSI-H 组 28 例,前者为仅 1 种 MMRP 缺失,后者缺失 ≥ 2 种 MMRP,结果显示 MSI-H 与 TNM 分期及肿瘤发生位置有关,MSI-H 主要出现在胃窦,Ⅲ期 MSI-H 显著低于 I/Ⅲ期,由此可见 MSI 的不稳定程度也影响到胃癌的发生发展程度,现有的报道证实 MSI-H 患者对 5-氟尿嘧啶化疗的受益有限^[21],可见对确诊的胃癌患者检测 MSI 并确认是否 MSI-H 在制定给药方案及评估预后方面具有积极意义。

综上所述,胃癌癌组织的 p53 与 MSI 呈负相

关,p53 与 MSI 及 TNM 分期相关,TNM 分期、MSI 和 p53 阴性是影响患者预后的危险因素,对胃癌组织监测 p53 及 MSI 对制定给药方案及评估预后具有重要意义。

参考文献:

[1] Park JS, Kim J, Elghiaty A, et al. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(37): e12390.

[2] Zuo TT, Zheng RS, Zeng HM, et al. Epidemiology of stomach cancer in China [J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2017, 44(1): 52-58. [左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(1): 52-58.]

[3] Hu JK, Chen XZ. Selection and assessment of digestive tract reconstruction patterns for gastric cancer [J]. *Chinese Journal of Digestive Surgery*, 2013, 12(1): 25-29. [胡建昆, 陈心足. 胃癌手术消化道重建方式的选择及评价 [J]. *中华消化外科杂志*, 2013, 12(1): 25-29.]

[4] Liao Y, Deng Y, Fu JW. Progress in research on molecular mechanism of gastric cancer [J]. *China Cancer*, 2014, 23(1): 58-62. [廖毅, 邓媛, 傅建伟. 胃癌分子机制的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2014, 23(1): 58-62.]

[5] Quandt J, Schlude C, Bartoschek M, et al. Long-peptide vaccination with driver gene mutations in p53 and Kras induces cancer mutation-specific effector as well as regulatory T cell responses [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(12): e1500671.

[6] Qin Y, Liang LP, Zheng XZ, et al. Value of detection of DNA mismatch repair proteins deficiency by immunohistochemistry in predicting tumor microsatellite status [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2015, 44 (10): 704-708. [秦云, 梁莉萍, 郑兴征, 等. 免疫组织化学法检测结直肠癌四种 DNA 错配修复蛋白表达缺失对判断肿瘤微卫星状态的价值 [J]. *中华病理学杂志*, 2015, 44(10): 704-708.]

[7] Sun D, Fan YJ, Xu H, et al. BRCA1 microsatellite instability in endometrial carcinoma and its relationship with clinical pathology [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2015, 31 (22): 3717-3719. [孙丹, 范余娟, 徐红, 等. 子宫内膜癌中人类乳腺癌易感基因 1 微卫星不稳定性及其与临床病理的关系 [J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(22): 3717-3719.]

[8] Ye M, Sun DZ, Wei PK. The DNA microsatellite instability and gastric carcinoma [J]. *Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition)*, 2013, (9): 151-152. [叶敏, 孙大志, 魏品康. DNA 微卫星不稳定性与胃癌 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2013, (9): 151-152.]

[9] De MC, Forman D, Plummer M. Gastric cancer: epidemiol-

ogy and risk factors [J]. *Gastroenterol Clin N*, 2013, 107 (3): 230-236.

[10] Ahn HS, Kim SH, Kodera Y, et al. Gastric cancer staging with radiologic imaging modalities and UICC staging system [J]. *Dig Surg*, 2013, 30(2): 142-149.

[11] Teodoro JG, Parker AE, Zhu X, et al. p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolylhydroxylase [J]. *Science*, 2006, 313(5789): 968-971.

[12] Alexandrov LB, Nikzainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer [J]. *Nature*, 2013, 500(7463): 415-21.

[13] Nan HM, Song YJ, Yun HY, et al. Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(25): 3834-3841.

[14] Tzanakis NE, Peros G, Karakitsos P, et al. Prognostic significance of p53 and Ki67 proteins expression in Greek gastric carcinoma patients [J]. *Acta Chir Belg*, 2009, 109 (5): 606-611.

[15] Ohashi S, Okamura S, Urano F, et al. Clinicopathological variables associated with lymph node metastasis in submucosal invasive gastric carcinoma [J]. *Gastric Carcinoma*, 2007, 10(4): 241-250.

[16] Zhang JQ, Fu GZ, Wu HH, et al. Germline mutation analysis, microsatellite instability and clinical pathology in Hazakh in China hereditary nonpolyposis colorectal cancer pedigree [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2014, 31(2): 245-247. [张剑权, 符国珍, 吴海红, 等. 遗传性非息肉病性大肠癌微卫星不稳定性临床病理和错配修复基因变异的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(2): 245-247.]

[17] Ma Y, Tao Y. Research progress of MSI colorectal cancer [J]. *Practical Oncology Journal*, 2017, 31 (4): 376-380. [马悦, 陶冀. MSI 结直肠癌的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2017, 31(4): 376-380.]

[18] Copija A, Waniczek D, Witko A, et al. Clinical significance and prognostic relevance of microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 107.

[19] Hernâni-Eusébio J, Barbosa E. Phenotypic heterogeneity by germline mismatch repair gene defect in Lynch syndrome patients [J]. *Acta Med Port*, 2016, 29(10): 587-596.

[20] Palli D, Russo A, Ottini L, et al. Red meat, family history, and increased risk of gastric cancer with microsatellite instability [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(14): 5415-5419.

[21] Saridakis Z. Prognostic and predictive significance of MSI in stages II/III colon cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(22): 6809.