

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.04.006

p53 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义

刘伟伟 马 洪

(济宁医学院口腔医学系, 山东 济宁 272067; 贵阳医学院附属医院, 贵州 贵阳 550004)

摘 要 **目的** 探讨 p53 在口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)中的表达及意义。**方法** 采用免疫组化 S-P 法, 检测 10 例正常口腔黏膜组织和 50 例口腔鳞癌组织标本中 p53 的表达情况。**结果** 1) p53 在 OSCC 中的表达率明显高于正常口腔黏膜组织, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。2) p53 在伴有淋巴结转移的 OSCC 中阳性表达率明显高于无淋巴结转移组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 而与 OSCC 病理分化程度和临床分期无关($P > 0.05$)。**结论** 1) p53 突变与 OSCC 发生发展关系密切。2) p53 表达可能对 OSCC 预后的评估有参考价值。

关键词 口腔鳞状细胞癌; p53; 免疫组织化学

中图分类号: R739.85 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)08-247-04

The expression and its significance of p53 in oral squamous cell carcinoma

LIU Wei-wei, MA Hong

(Department of oral medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and its significance of p53 protein in oral squamous cell carcinoma. **Methods** The expression of p53 in 10 cases of normal oral mucosa and 50 cases of OSCC were detected by S-P immunohistochemical method. **Results** 1) The positive rate of p53 in OSCC was 58%, while negative expression of p53 was detected in normal oral mucosa ($P < 0.05$). 2) The positive rate of p53 in lymph node metastasis was significantly higher than that without lymph node metastasis ($P < 0.05$), but it uncorrelated with pathological differentiation and clinical staging ($P > 0.05$). **Conclusion** 1) The mutation of p53 may contribute to the occurrence and development of the OSCC. 2) The expression of p53 may be important to evaluate the prognosis.

Key words: Oral squamous cell carcinoma; p53; Immunohistochemistry

目前, 恶性肿瘤已成为危害人类健康最严重的一种疾病^[1]。在我国, 口腔颌面部恶性肿瘤以鳞状细胞癌(OSCC)为最多见, 占口腔颌面部恶性肿瘤的 80% 以上, 其发生和发展是一个多因素、多阶段、多基因参与的复杂生物学过程。其中, 癌基因或抑癌基因对细胞周期及细胞凋亡调节的失控是细胞癌变的重要原因之一^[2]。p53 基因是目前研究最为广泛深入的基因之一^[3], 也是迄今为止所发现的与人类肿瘤相关性最高的基因。近年来研究表明, 约 50% 的恶性肿瘤可发现 p53 基因突变, p53 基因突变也是口腔肿瘤最常见的基因改变之一, 在口腔鳞癌和癌前病变中均可检出 p53 的过度表达和 p53 基因的突变^[4], 且 p53 的表达水平对于口腔黏膜癌变的早期诊断、预防、临床评估具有重

要意义。本研究通过检测 p53 OSCC 中的表达, 探讨 p53 与 OSCC 发生发展的关系及其意义。

1 材料和方法

标本: 收集 2000—2008 年贵阳医学院附属医院口腔科临床活检或手术切除的 OSCC 组织 50 例, 患者术前均未接受任何手术或放化疗。临床分期按 2002 年国际抗癌联盟(UICC)TNM 标准: I、II 期 12 例, III、IV 期 38 例; 病理分化程度: 高分化 29 例, 中低分化 21 例; 有淋巴结转移者 32 例, 无淋巴结转移者 18 例。另选取 10 例正常口腔黏膜组织作为对照组。所有标本经 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋, 5 μ m 连续切片, HE 染色明确病理诊断。

主要试剂:p53 鼠抗人单克隆抗体、通用型 S-P 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒及抗原修复液、PBS 缓冲液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

主要设备:电热恒温干燥培养箱(DH4000B, 天津市泰斯特仪器有限公司);高压锅(苏泊尔);数显式电热恒温三用水温箱(上海跃进医疗器械厂);4℃冰箱(海尔)。

方法:免疫组化 S-P 法 1)脱蜡:烤片(60℃, 30min),经过 3 缸二甲苯(10min/缸)。2)水化:经过梯度酒精 100%→90%→80%→70%(5min/缸),并在双蒸水中浸泡 5min。3)3% H₂O₂ 浸泡 20min,灭活内源性过氧化物酶,再于双蒸水浸泡 5min。4)抗原修复:采用高温高压热修复。取柠檬酸盐缓冲液 2L(pH6.0)于高压锅内,加热至沸腾,将装有切片的修复架置入,使切片位于液面以下,关好锅盖,加热加压,待高压锅喷汽后计时 3min,然后脱离热源冷却至室温。5) PBS 缓冲液洗 3 次(5min/次)。6) 每张切片擦干边缘,各滴加 50μl 的 10% 正常山羊血清封闭液(即用型),湿盒孵育 20min,甩干。7) 每张切片分别滴加 50μl 一抗工作液(即用型),4℃冰箱过夜。8) PBS 洗 3 次(5min/次),滴加生物素标记的二抗(通用型),37℃水浴箱中孵育 20min。9) PBS 洗 3 次(5min/次),滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液(即用型),37℃水浴箱中孵育 20min。10) PBS 洗 3 次(5min/次),双蒸水浸泡 5min。11) DAB 显色:每张切片滴加新鲜配制的 DAB 显色液(每 1.2ml 双蒸水中分别先后滴加 A、B、C 液各 1 滴混匀),显微镜下控制显色 5~10min,自来水终止显色。12) 苏木素复染,0.5% 盐酸酒精分化,氨水反蓝。13) 梯度酒精脱水(70%→80%→90%→100%),二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。以上步骤中, p53 检测以已知阳性的乳腺癌组织切片作阳性对照,以 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。

2 结果

2.1 p53 在不同性质口腔黏膜组织中的表达

p53 阳性表达主要位于胞核,为棕黄色颗粒。根据判定标准,p53 在正常口腔黏膜中为阴性,细胞核呈淡蓝紫色(图 1);其在 OSCC 中阳性表达率为 58%,癌细胞胞核呈棕黄色,轮廓清晰,胞浆不着色(图 2)。p53 在 OSCC 中的表达率明显高于

正常口腔黏膜组织,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

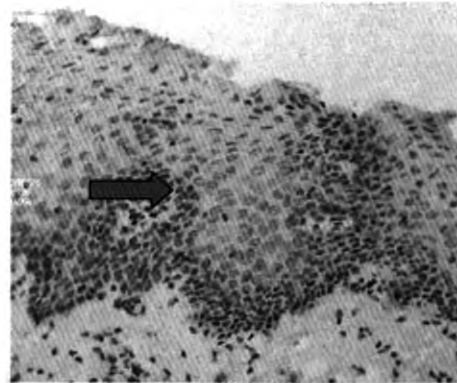


图 1 正常口腔黏膜中 p53 的表达(×200)

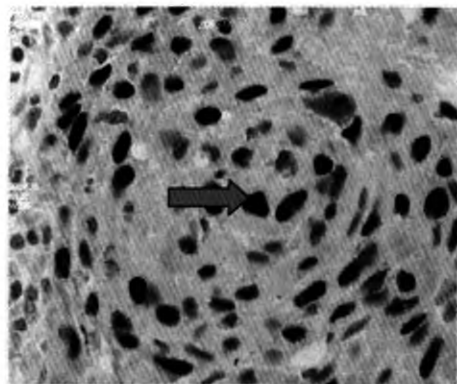


图 2 OSCC 中 p53 的表达(×400)

表 1 p53 在不同口腔黏膜组织中的表达情况

组织类型	n	p53			阳性率 (%)	χ^2	P
		-	+	++			
正常口腔黏膜	10	10	0	0	0	15.082	0.001
口腔鳞状细胞癌	50	21	7	22	58		

2.2 p53 表达与 OSCC 临床病理参数的关系

p53 在高分化 OSCC 中阳性率为 58.6% (17/29), 阳性细胞分布于癌巢周边增生活跃的基底层样细胞, 中央角化区多为阴性(图 3); 在中/低分化 OSCC 中阳性率为 57.1% (12/21), 可见阳性细胞明显增多且弥漫分布于癌组织中(图 4、图 5)。经统计学分析,p53 的表达在不同分化程度和不同临床分期的 OSCC 组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);而与是否伴有淋巴结转移有关,且在伴有淋巴结转移的 OSCC 中阳性率明显高于无淋巴结转移组($P < 0.05$),见表 2。

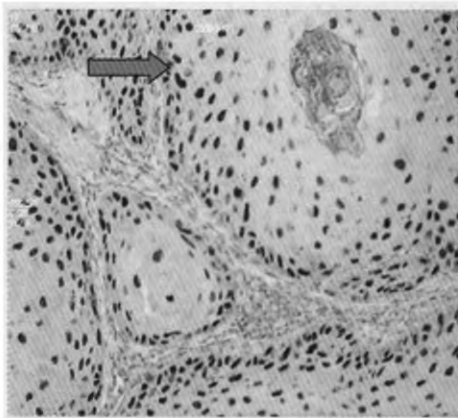


图 3 高分化 OSCC 中 p53 的表达(×100)

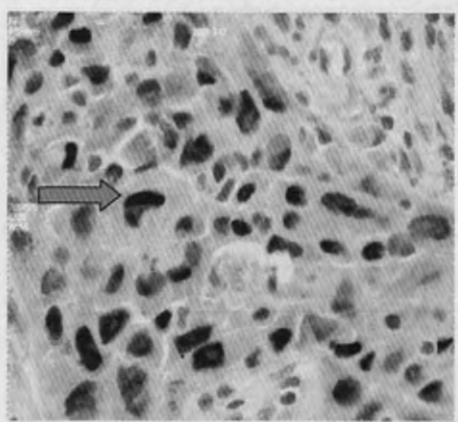


图 4 中分化 OSCC 中 p53 的表达(×400)

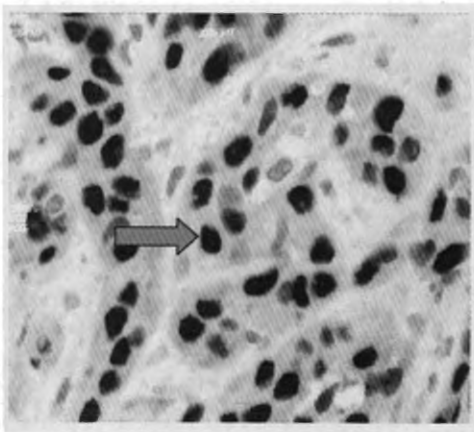


图 5 低分化 OSCC 中 p53 的表达(×400)

表 2 p53 表达与 OSCC 临床病理参数的关系

临床病理参数	n	p53		阳性率 (%)	χ^2	P
		阳性	阴性			
病理分化程度						
高分化	29	17	12	58.6	0.11	>0.05
中/低分化	21	12	9	57.1		
临床病理分期						
I~II 期	12	5	7	41.6	2.21	>0.05
III~IV 期	38	25	13	65.8		
淋巴结转移						
有	32	23	9	71.9	7.025	<0.05
无	18	6	12	33.3		

3 讨论

p53 基因是一种重要的细胞调控基因,人类 p53 基因定位于第 17 号染色体短臂(17p13.1),由 393 个氨基酸组成,其编码产物为相对分子质量为 53×10^3 的核酸蛋白,亦称为 p53 蛋白。p53 基因分为野生型(wt-p53)和突变型(mt-p53)两种^[5]。野生型 p53 作为抑癌基因可以通过停止细胞生长和启动细胞凋亡机制而发挥抑癌作用。一旦发现细胞染色体中的 DNA 有损伤或缺陷,p53 蛋白就会使细胞周期阻滞在 G1、G2 期^[6],并启动相应的修复机制修复损伤或缺陷的 DNA;如果修复失败,p53 则启动细胞凋亡机制,防止细胞由于遗传信息出现错误而演变为肿瘤细胞。然而 p53 基因容易发生突变,是人体肿瘤突变率最高的抑癌基因之一。如果 p53 基因发生突变,成为突变型 p53,则无法修复异常的 DNA,也无法启动细胞凋亡机制,使含有错误遗传信息的细胞异常增殖,形成肿瘤。而且研究表明,突变型 p53 不仅丧失了野生型 p53 的功能,反而还具有和野生型 p53 形成异源寡聚体抑制野生型 p53 的作用,从而使突变型 p53 获得癌基因的功能。且突变型 p53 还能与 p53 家族成员 p63、p73 结合干扰他们的抑癌功能,促进肿瘤的发生发展。正常情况下,野生型 p53 表达水平较低,而且不稳定,半衰期短,一般免疫组织化学较难检测。而突变型 p53 因为空间构象的改变使半衰期延长,可用免疫组化法检出,因此,可认为免疫组化检测阳性提示突变型 p53 基因的存在^[7]。

近年来研究表明,约 50% 的恶性肿瘤可发现 p53 基因突变。统计数字显示,p53 基因在结肠癌、肺癌、肝癌中的突变率达 53%~70%。p53 基因突变也是口腔肿瘤最常见的基因改变之一,在口腔鳞癌和癌前病变中也可检出 p53 的过度表达和 p53 基因的突变^[4]。研究发现,p53 在头颈鳞癌中表达阳性率为 45%、上皮异常增生中为 45%、上皮单纯性增生中为 29%、癌旁正常上皮中为 21%,而在正常组织中为 0。p53 阳性细胞数量变化与口腔上皮恶性转化早期阶段有关。张文建等^[8]研究发现,口腔黏膜异常增生及口腔鳞状细胞癌均存在 p53 基因突变,而在正常口腔黏膜中未见 p53 基因突变,而且突变的部位在第 6、8 外显子。王莉红等^[9]发现 p53 基因突变及其过量表达与口腔舌鳞癌的发生、发展密切相关。本研究结果显示:10 例正常口腔黏膜中 p53 表达均为阴(下转第 254 页)

- 2002[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2005, 55(2): 74-108.
- [6] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions [J]. A meta-analysis update. International Journal of Cancer, 2007, 121(3): 621-632.
- [7] Snijders PJF, Steenbergen R, Heideman D, et al. HPV-mediated cervical carcinogenesis, Concepts and clinical implications [J]. Journal of Pathology, 2006, 208(2): 152-164.
- [8] 郎景和. 迎接子宫颈癌预防的全球挑战与机遇[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 287(18): 2428-2429.
- [9] Tarkkanen J, Auvinen E, Nieminen P, et al. HPV DNA testing as an adjunct in the management of patients with low grade cytological lesions in Finland [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2007, 86(3): 367-372.
- [10] Clifford G, Franceschi S, Diaz M, et al. Chapter 3: HPV type distribution in women with and without cervical neoplastic diseases [J]. Vaccine, 2006, 24(3): S26-S34.
- (收稿日期 2011-07-05)

(上接第 246 页)

从各脏腑主干平性药中可以看出, 均含有党参、人参等补气药, 也在一个方面反映出前人“五脏皆有气虚”(《景岳全书·辨丹溪》)的观点。

总之, 以上对于常用平性药和主干平性药的筛选, 与临床实际用药情况较为吻合, 对其应用规律的分析, 将有利于指导临床辨证组方用药。本数据分析系统具有较高的学术价值, 不仅可用于平性药(方)的分析, 亦可用于有关寒性、热性药物的应用规律的分析, 值得进一步开发和推广应用。

参考文献:

- [1] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.

(上接第 249 页)性, 50 例 OSCC 中有 29 例 p53 表达阳性, 阳性率为 58%, 二者比较有显著差异($P < 0.05$)。这与卢虹等对正常口腔黏膜(0/8)和 OSCC(21/43)中 p53 检测结果基本相符。结果提示 p53 突变与 OSCC 发生发展关系密切。近来, 有学者提出 p53 基因表达与恶性肿瘤预后有关。在食管癌中 p53 的表达已被认为是一项预后指标。Yutaka 等^[10]研究认为, 发生在 p53 基因特定区域的突变往往提示临床预后较差, 包括局部切除预后、颈部淋巴结转移、远处转移、放疗敏感性等。本实验研究发现, p53 表达与 OSCC 的病理分化程度和临床分期无关($P > 0.05$), 而与是否发生淋巴结转移有关($P < 0.05$), 提示 p53 突变可能与 OSCC 的预后有关。

参考文献:

- [1] Kawamata N, Inaaki N, Mizumura S, et al. Methylation status analysis of cell cycle regulatory genes (p16INK4A, p15INK4B, p21Waf1/Cip1, p27Kip1 and p73) in natural killer cell disorders [J]. Eur J Haematol, 2005, 74(5): 424-429.

- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科技出版社, 1998.
- [3] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [4] 《中华人民共和国药典 临床用药须知·中药卷》(2005 年版).
- [5] 邓家明. 试论平性药“体平用偏”的药性特征[J]. 世界中医药, 2007, 2(5): 302-303.
- [6] 孙冰. 平性药药性理论及其应用规律研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2010.
- [7] 邓家明, 秦华珍, 郭宏伟. 平性药药性定位及其作用特点的理论探讨[J]. 广西中医药, 2007, 30(2): 32-33.

(收稿日期 2011-06-11)

- [2] Mo L, Zheng X, Huang HY, et al. Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis [J]. J Clin Invest, 2007, 117(2): 314-325.
- [3] 李维冬, 张劲松. p53 基因及其在口腔鳞状细胞癌中的研究进展 [J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(4): 635-637.
- [4] 冯昭飞, 陈瑞扬. p53 基因突变与口腔肿瘤关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2008, 14(14): 2113-2115.
- [5] 张勤, 刘虹. p53 在三阴性乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(4): 214-217.
- [6] 申龙树, 贺亚敏, 朱长乐. 胃肠道间质肿瘤的分化及 p53, ki67 的表达及意义 [J]. 吉林医学, 2009, 30(21): 2572-2575.
- [7] 苏振波, 梁作文, 赵丹, 等. TGF- β 和 p53 蛋白在前列腺癌组织中的表达及意义 [J]. 吉林大学学报, 2010, 36(2): 364-367.
- [8] 张文建, 李辉基, 范崇德, 等. 口腔白斑和鳞癌中 p53 基因突变的免疫组化及 PCR-SSCP 分析 [J]. 现代口腔医学杂志, 1998, 12(3): 168-170.
- [9] 王莉红, 陈波, 耿莉, 等. 口腔舌鳞癌 p53 基因突变及其表达的相关性研究 [J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(6): 648-649.
- [10] Yutaka Y, Chiba I, Hirai A, et al. Specific p53 mutations predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma [J]. Oral Oncology, 2003, 39(2): 163-169.

(收稿日期 2011-07-19)