

大肠癌患者粪便 p53 基因检测及其临床意义

欧玉荣¹, 张洪福²

[摘要] 目的: 研究大肠癌患者 p53 基因突变及蛋白表达之间关系, 并探讨从粪便中检测 p53 基因突变在大肠癌早期诊断中的临床意义。方法: 采用聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)法, 检测大肠癌患者癌组织和粪便标本中 p53 基因第 5~8 外显子突变情况; 同时运用免疫组化法分析癌组织中 p53 表达情况。结果: 34 例大肠癌患者癌组织标本中, p53 基因第 5~8 外显子突变及蛋白表达阳性率分别为 52.9% 和 55.9%, 正常黏膜未见 p53 表达 ($P < 0.01$)。p53 表达与基因突变呈正相关关系 ($P < 0.05$)。p53 表达阳性率与肿瘤组织大小有关, 肿瘤 ≤ 5 cm 者阳性率高于 > 5 cm 者 ($P < 0.05$), 但与其它临床病理因素无关。12 例癌组织中有 p53 基因突变的患者其粪便中基因突变阳性率为 41.7%, 正常人未检测出突变。结论: p53 基因突变是参与和影响 p53 表达和生物学功能的主要因素; 大肠癌患者粪便中可检测出 p53 基因突变, 粪便中 p53 基因检测可成为一种新的肿瘤标志物用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; 免疫组织化学

[中国图书资料分类法分类号] R 735.34; Q 343.1 [文献标识码] A

Detection of p53 gene in stool of patients with colorectal cancer and its clinical significance

OU Yu-rong¹, ZHANG Hong-fu²

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

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between p53 gene mutation and the protein expression, and their roles in the early diagnosis and clinical significances in colorectal cancer. **Methods:** Using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), the mutations in exon 5-8 of p53 gene were examined in the tumor tissues and stool of 34 patients and 10 healthy controls. At the same time, using immunohistochemistry (IHC) (S-P methods), p53 protein expression were examined in the tumor tissues and normal mucosa. **Results:** The mutation of exon 5-8 and protein expression of p53 gene in the tissues were found in 18 of 34 (52.9%) cases and 19 of 34 (55.9%) cases, respectively, no mutation and protein expression were positive in normal mucosa ($P < 0.01$). Of 12 patients who were positive for p53 gene mutation in tumor tissue, 5 (41.7%) had evidence of alterations in the p53 gene within the stool. The positive rates of p53 protein expression was correlates with the mutation of exon 5-8. The expression of p53 protein was correlated with tumor size ($P < 0.05$), but not correlates to other clinipathological factors. **Conclusions:** Our data indicate that gene mutation of p53 is one of the main factors which participate and affect the protein expression. p53 gene mutation can be detected within the stools. Detection of p53 gene in stool may provide new ways for the early diagnosis and census of high risk population in colorectal cancers.

[Key words] colorectal neoplasms; genes p53; polymerase chain reaction; 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检有重要意义。我们用聚合酶链-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)及免疫组化(IHC)法分别检测大肠癌患者粪便及组织中 p53 基因突变及蛋白表达, 探讨 p53 基因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 1998 年 9 月~1999 年 5 月的大肠癌标本 34 例, 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 周粪便置于 -20°C 冷冻待测, 同时收集 10 名健康人群粪便作正常对照。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, 部分经常规甲醛溶液固定, 石蜡包埋, $4\mu\text{m}$ 连续切片供苏木精-伊红(HE)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检查证实。

[收稿日期] 2004-07-29

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2000jL123)

[作者单位] 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

[作者简介] 欧玉荣(1974-), 女, 安徽怀远县人, 硕士, 讲师。

1.2 试剂及实验方法 鼠抗人 p53 单克隆抗体 (DO-7) 及 S-P 免疫组化试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司。PCR-SSCP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。免疫组化法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 °C 5 min, 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s (35 循环), 72 °C 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 °C 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 °C 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 表达: 采用半定量积分法判断结果, p53 定位于细胞核, 阳性为细胞核呈黄至棕黄色颗粒。(2) PCR-SSCP 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。

1.4 统计学方法 采用四格表配对 χ^2 检验、四格表确切概率法、秩和检验和等级相关分析。

2 结果

2.1 大肠癌患者癌组织中 p53 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 阳性为 19 例 (55.9%) (见图 1)。p53 基因 exon 5 ~ 8 突变率为 52.9% (18/34), 其中 exon5、exon7 各 4 例, exon6 3 例, exon8 7 例, 无突变热点。与正常黏膜相比, 两者差异具有显著性 ($\chi^2=7.69, P<0.01$)。p53 表达阳性率与肿瘤组织大小有关, 肿瘤 ≤ 5 cm 者阳性率高于 > 5 cm 者 ($P<0.05$), 但与其它临床病理因素无关; p53 基因突变与肿瘤组织分化程度、Duke's 分期、淋巴结转移以及其它临床病理因素无关 ($P>0.05$) (见表 1)。

2.2 p53 表达与基因突变之间的关系 PCR-SSCP 与免疫组化的符合率为 67.6%, 两法差异无显著性 ($P>0.05$)。p53 表达与基因突变呈正相关关系 ($r_s=0.349, P<0.05$) (见表 2)。

2.3 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 6 例样本提取 DNA 扩增失败, 其余 12 例中, 检出 5 例 (41.7%) exon5 ~ 8 外显子突变, exon5 及 exon6 各

2 例, exon8 3 例 (见图 2), 未检出 exon7 突变。

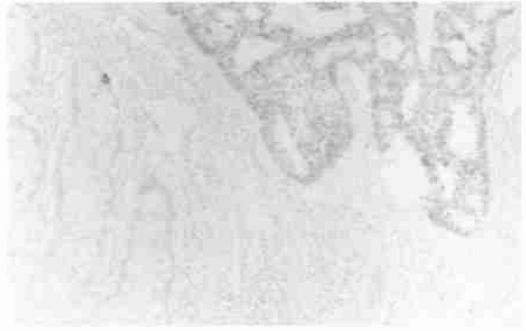


图 1 大肠腺癌 p53 表达阳性

表 1 大肠癌 p53 表达及基因突变与临床病理因素关系

临床参数	n	免疫组化		阳性率 (%)	Hc	P	SSCP		阳性率 (%)	Hc	P
		+	-				+	-			
性别											
男	22	12	10	54.5	-	1.00	11	11	50.0	-	0.729
女	12	7	5	58.3			7	5	58.3		
年龄											
< 60	24	16	8	66.7	-	0.068	15	9	62.5	-	0.134
≥ 60	10	3	7	30.0			3	7	30.0		
肿瘤大小											
≤ 5 cm	23	16	7	69.6	-	0.030	14	9	60.9	-	0.274
> 5cm	11	3	8	27.3			4	7	36.4		
组织分化											
高分化	19	10	9	52.6			12	7	63.2		
中分化	9	7	2	77.8	2.98	> 0.05	4	5	44.4	1.92	> 0.05
低分化	6	2	4	33.3			2	4	33.3		
淋巴结转移											
有	13	8	5	61.5	-	0.728	6	7	46.2	-	0.725
无	21	11	10	52.4			12	9	57.1		
Duke's 分期											
A	10	6	4	60.0			6	4	60.0		
B	11	5	6	45.5			6	5	54.5		
C	5	4	1	80.0	1.79	> 0.05	2	3	40.0	0.56	> 0.05
D	8	4	4	50.0			4	4	50.0		

表 2 p53 表达与基因突变的关系

SSCP	n	IHC		符合率 (%)	χ^2	P
		+	-			
+	18	13	5	72.2		
-	16	6	10	37.5	0.00	> 0.05
合计	34	19	15	67.6		

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 结构, 使其半衰期延长, 稳定性增加, 在细胞内聚积, 利用免疫组化法可以检测到。Soussi 等^[4] 认为免疫组化是检

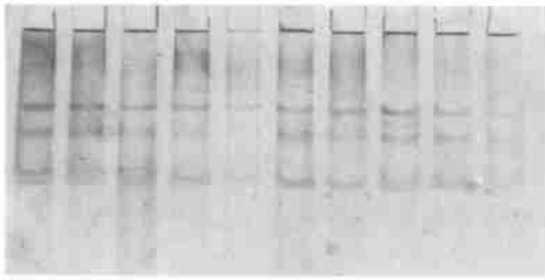


图 2 大肠腺癌 p53 基因 exon 8 SSCP 分析

测 p53 表达最为常用的方法之一,可基本反映 p53 基因突变情况。由于患者粪便取材容易,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 PCR-SSCP 法检测大肠癌组织中 p53 基因突变,阳性率为 52.9% (18/34),与免疫组化相比,两者符合率为 67.6%,说明 p53 基因突变是参与和影响 p53 表达的主要因素。但两者不是完全对应关系,原因可能为:(1)应用 p53 单克隆抗体 DO-7 可识别 p53 35~45 位氨基酸序列^[9],只能检测错义突变所表达的蛋白;(2)DNA 损伤等刺激可增加野生型 p53 活化,表达增加;(3)肿瘤细胞具有较强的异质性;(4)正常 p53 与其它基因产物形成稳定复合物,引起 p53 聚积。因此 p53 表达不能完全说明 p53 基因突变情况,尚需进一步测序证实。本实验研究发现 p53 表达及基因突变与肿瘤组织分化、淋巴结转移、Duke's 分期及其它临床病理因素无关 ($P > 0.05$),提示 p53 表达及基因突变可能是一个独立的预后因素;而 p53 表达阳性率与肿瘤组织大小有关,肿瘤 ≤ 5 cm 者阳性率高于 > 5 cm 者 ($P < 0.05$);Vogelstein 等^[6]综合以往的报道,认为大肠肿瘤中 p53 突变主要发生在晚期腺瘤向癌转化的最后阶段,提示 p53 突变可能是腺瘤向癌转化的最关键因素。p53 的作用呈阶段性,主要在恶变的初期,因此大肠癌形成后其突变情况与恶性程度及生物学行为无明显相关性。

粪便是反映消化道病变的一个窗口。粪便成分复杂,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^[7,8],整个大肠黏膜约 3~4 天即可重新更换一次,而生长旺盛的肿瘤细胞则更新更快^[9]。由于粪便物质,脱落细胞学分析难以发现癌变细胞,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 6 例样本 DNA 提取失败,其余 12 例中 p53 基因突变阳性率为 41.6% (5/12)。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 基因检测对大肠肿瘤早期诊断、高危人群筛检普查具有重要临床意义。而粪便中 p53 基因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%^[10],PCR-SSCP 难以检测;(4)某些类型的肿瘤组织细胞不易脱落;(5)PCR-SSCP 敏感性低于 100%,提示一部分突变无法检测到;(6)p53 基因突变约 90%位于第 5~8 外显子,但仍有 10%位于其它的外显子不能检测到。

本组研究证明大肠癌 p53 基因突变可以从患者粪便中检测到,对大肠癌的诊断具有重要意义。对于如何提高粪便中 p53 基因突变的检出率,用于大肠癌高危人群筛检和早期诊断,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(Suppl 8): 1707~1710.
- [4] Soussi T, Legros Y, Lubin R, et al. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: A review. [J]. *Int J Cancer*, 1994, 57(1): 1~9.
- [5] Stephen CW, Helminen P, Lane DP. Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: Insights into antibody peptide interactions[J]. *J Mol Biol*, 1995, 248(1): 58~78.
- [6] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development[J]. *N Engl J Med*, 1998, 319(9): 525~532.
- [7] Iyengar V, Albaugh GP, Lohani A, et al. Human stool as a source of viable colonic epithelial cells[J]. *FASEB J*, 1991, 5(13): 2856~2859.
- [8] Albaugh GP, Iyengar 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.
- [9] Battifora H. p53 immunohistochemistry: A word of caution[J]. *Hum Pathol*, 1994, 25(5): 435~437.
- [10] 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): 1273~1275.