

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00413

喉癌组织及手术切缘 P53、PCNA 蛋白表达与局部复发的关系

孙广滨^{1*}, 唐海红², 方勤¹, 周水森², 李兆基²

1. 上海浦东新区公利医院耳鼻咽喉科, 上海 200135

2. 第二军医大学长海医院耳鼻咽喉科, 上海 200433

[摘要] **目的:**检测喉癌组织及手术切缘中 P53 及 PCNA 蛋白表达情况,探讨两者的表达与术后局部复发的关系。**方法:**选择 36 例原发灶为鳞状细胞癌、手术切缘组织病理学肿瘤阴性者,对喉癌组织及切缘连续切片,行 H-E 染色,以免疫组化染色方法分别进行 P53 及 PCNA 蛋白检测。**结果:**36 例中原发灶组织中 P53 阳性率是 55.6%(20/36),PCNA 阳性率 88.9%(32/36);手术切缘组织 P53 阳性率 25%(9/36),PCNA 阳性率 30.6%(11/36)。喉癌原发灶组织中 P53 及 PCNA 阳性者的复发率 35%(7/20)和 25%(8/32)高于阴性者 12.5%(2/16)和 25%(1/4)。手术切缘中 P53 及 PCNA 阳性者的复发率 44.4%(4/9)和 72.7%(8/11)高于阴性者 18.5%(5/27)和 4%(1/25)。喉癌组织中 P53、PCNA 蛋白表达同时异常,且手术切缘组织 P53 及 PCNA 蛋白表达也同时异常,术后复发率为 100%(4/4)。**结论:**P53 及 PCNA 蛋白检测可以作为预测喉癌术后局部危险性的生物学标志,在病理学阴性手术切缘组织中两者联合检测对于判断术后局部复发有更大的意义。

[关键词] P53;PCNA;喉肿瘤;局部复发

[中图分类号] R 739.65 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0413-05

Relationship of local recurrence with expression of protein P53 and PCNA in laryngeal carcinoma and its surgical margins

SUN Guang-bin^{1*}, TANG Hai-hong², FANG Qin¹, ZHOU Shui-miao², LI Zhao-ji²

1. Department of Otolaryngology, Gongli Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200135, China;

2. Department of Otolaryngology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the relationship of the local recurrence with the expression of protein P53 and PCNA in the primary lesions and the surgical margins of laryngeal carcinoma. **Methods:** The primary lesions and the surgical margins of laryngeal carcinoma of 36 patients were made into serial sections. Immunochemical method (H-E staining) was used to detect the expression of P53 and PCNA protein. **Results:** The positive rates of protein P53 and PCNA were 55.6% (20/36) and 88.9% (32/36) in the primary lesions, and 25% (9/36) and 30.6% (11/36) in the surgical margins, respectively. The recurrent rates of the primary lesions positive for P53 and PCNA were 35% (7/20) and 25% (8/32), respectively, which were higher than those negative for them (12.5% [2/16] and 25% [1/4]). The recurrent rates of surgical margins positive for p53 and PCNA were 44.4% (4/9) and 72.7% (8/11), respectively, which were higher than those negative for them (18.5% [5/27] and 4% [1/25]). The expression of P53 and PCNA proteins in the primary lesions and surgical margins was abnormal; the recurrent rate of the laryngeal carcinoma was 100% (4/4) after surgery. **Conclusion:** P53 and PCNA protein can be used as biomarkers for local recurrence of laryngeal carcinoma after operation. Detection of P53 and PCNA in both the primary lesions and the surgical margins may be of greater significance in forecasting local recurrence.

[KEY WORDS] P53; PCNA; laryngeal neoplasms; local recurrence

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4): 413-417]

喉癌是头颈外科常见的肿瘤之一,局部复发是治疗失败的主要原因,随着分子生物学的发展,人们

发现即使在病理学肿瘤阴性的手术切缘组织中仍然能检测到一些基因或蛋白的改变,如 P53^[1-2]、

[收稿日期] 2007-07-20 **[接受日期]** 2008-01-18

[基金项目] 上海市浦东新区医学优秀学科带头人资金资助课题(PWRd2006-07);上海市浦东新区卫生系统重点学科建设资助课题(PWEXK2007-12). Supported by the Advanced Medical Developing Plan of Pudong New Area, Shanghai(PWRd2006-07) and the Fund of Advanced Department in Health Field of Pudong New Area Shanghai(PWEXK2007-12).

[作者简介] 孙广滨,博士,副教授、副主任医师,硕士生导师. E-mail: sgb223@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-58858730, E-mail: sgb223@hotmail.com

eIF4E^[1-2]、PCNA^[3]、p16^[4-5]、survivin^[6]、hTERT mRNA^[7],而且有些基因或蛋白改变者的预后明显较没有上述基因或蛋白改变者差。本研究通过检测喉癌组织及手术切缘中 P53 及 PCNA 蛋白表达情况,来探讨两者单独及联合表达与术后局部复发的关系,以期能通过两种以上的生物学标志在手术病理阴性切缘中表达,更加准确地预测喉癌术后局部复发的危险性,为进一步有针对性地采取预防措施,降低局部复发率提供有益的参考。

1 材料和方法

1.1 临床资料 资料取自 1998 年 1 月 1 日至 2002

年 4 月 31 日在我科进行手术治疗、随访时间 ≥ 4 年、临床与病理资料齐全、术中留取了切缘标本的 94 例喉癌病例,从中选择 36 例原发灶为鳞状细胞癌、手术切缘组织病理学肿瘤阴性者,进行 P53 及 PCNA 蛋白检测。其中男性患者 34 例,女性患者 2 例;年龄范围 44~78 岁。36 例喉鳞状细胞癌患者,其中声门上型喉癌 9 例,声门型 25 例,声门下 2 例,其 TNM 分期见表 1,部分喉切除术 28 例,单侧声带切除术 5 例,全喉切除术 3 例。颈淋巴结清扫术 7 例,其中根治性颈清扫术 5 例,分区性颈清扫术 2 例。

表 1 36 例喉癌 TNM 分期的分布

Tab 1 Distribution of TNM stage in 36 patients with laryngeal cancer

Group	T ₁ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₁ M ₀	T ₂ N ₂ M ₀	T ₃ N ₀ M ₀	T ₃ N ₁ M ₀	T ₄ N ₀ M ₀	Total
Supraglottic type	1	0	1	1	2	1	3	9
Glottic type	7	10	1	0	4	2	1	25
Subglottic type	0	0	0	0	1	1	0	2
Total	8	10	2	1	7	4	4	36

1.2 材料和试剂 鼠抗人 P53 单克隆抗体工作液,工作效价 1:50,由 Santa Cruz 公司提供;鼠抗 PCNA,工作效价 1:50。LSAB 试剂盒(K0681 通用型)购于 DAKO 公司。

1.3 手术切缘标本的留取 在喉癌手术时,手术切缘:声门型喉癌为 5 mm,声门上型和声门下型为 10 mm。肿瘤整块切除后,选择切缘前、后、左、右、基底等部位残留风险较大处切取少量组织,在有黏膜处尽量切取部分黏膜组织。标本常规置于 10% 甲醛溶液中固定,随后石蜡包埋。连续切片,厚 4 μ m,行 H-E 染色及免疫组化染色,H-E 染色切片请病理科医师审定,证实肿瘤标本均为鳞癌且切缘为阴性。

1.4 免疫组化法染色 切片于 60℃ 恒温箱内烤片 2 h,然后脱蜡、水化、封闭。每片切片滴加 50 μ l 正常山羊血清,室温下孵育 5 min,倾去血清;分别加入 P53、PCNA 一抗 50 μ l(1:50),置于 4℃ 过夜,恢复室温后,PBS 洗涤 3 min \times 3 次,加 50 μ l 生物素标记的二抗,室温下孵育 10 min,PBS 洗涤 3 min \times 3 次;加 50 μ l 的链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,室温下孵育 10 min;PBS 洗涤 3 min \times 3 次;加 100 μ l BAD 溶液;自来水冲洗,苏木精染色 1 min,自来水冲洗,烘干,封片。

原发灶组织 P53、PCNA 蛋白阳性标准是 $\geq 10\%$ 的癌细胞有明显的核棕黄色染色;手术切缘组

织染色阳性标准是手术切缘黏膜的基底细胞中可以看到 $\geq 5\%$ 的细胞有相应的 P53、PCNA 特征染色^[8]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件的 Fisher 确切概率法。

2 结果

P53、PCNA 蛋白在癌组织及手术切缘中表达与临床分型、T 分期,淋巴结转移情况见表 2 和表 3。从表 2 可以看出声门上型和声门下型切缘组织 P53 蛋白表达阳性率(3/10,1/2)明显高于声门型(5/24);喉癌组织中也是如此(6/10,2/2,12/24)。临床分期 III/IV P53 蛋白表达阳性率切缘组织(7/15)、喉癌组织(11/15),高于 I/II(3/21,8/21)。有淋巴结转移者阳性率切缘组织(6/12)、喉癌组织(9/12),高于无淋巴结转移者(3/24,8/24)。表 3 中 PCNA 蛋白表达情况与表 2 类似。

原发灶组织和手术切缘组织 P53、PCNA 蛋白表达阳性率见表 4 和表 5。36 例中原发灶组织中 P53 阳性率是 55.6%(20/36),PCNA 阳性率 88.9%(32/36);手术切缘组织 P53 阳性率 25%(9/36),PCNA 阳性率 30.6%(11/36)。图 1A 所示,在喉癌原发灶 P53 表达阳性中大部分癌细胞核染色成棕黄色,在切缘组织中,超过 5% 的基底细胞核中染色成棕黄色。图 1B 所示,在喉癌原发灶 PCNA 表达阳

性中大部分癌细胞核染色成棕黄色,在切缘组织中,超过 5% 的基底细胞核中染色成棕黄色。本研究中,复发者切缘组织中 P53 表达阳性比率为 15%~27%,PCNA 表达阳性比率为 18%~36%。

喉癌原发灶组织中 P53 及 PCNA 阳性者的复发率 35%(7/20)和 25%(8/32)高于阴性者 12.5%

(2/16)和 25%(1/4)($P < 0.05$)。手术切缘中 P53 及 PCNA 阳性者的复发率 44.4%(4/9)和 72.7%(8/11)高于阴性者 18.5%(5/27)和 4%(1/25)($P < 0.05$)。喉癌组织中 P53、PCNA 蛋白表达同时异常,且手术切缘组织 P53 及 PCNA 蛋白表达也同时异常,术后复发率为 100%(4/4)。

表 2 手术切缘组织和原发灶组织 P53 蛋白表达阴、阳性组中各临床特征的分布

Tab 2 Clinical features of P53 positive and negative group in surgical margin and primary cancer

(n)

Index	Surgical margin			Primary cancer		
	Positive	Negative	P	Positive	Negative	P
Gender						
Male	8	26		18	16	
Female	1	1		2	0	
Site						
Supraglottic	3	7		6	4	
Glottic	5	19		12	12	
Subglottic	1	1		2	0	
Clinical stage			0.025			0.049
I / II	3	18		8	13	
III / IV	7	8		11	4	
Pathological grade						
I	6	21		14	13	
II	3	4		5	2	
III		2		1	1	
Lymph node			0.036			0.033
Positive	6	6		9	3	
Negative	3	21		8	16	

表 3 手术切缘组织和原发灶组织 PCNA 蛋白表达阴、阳性组中各临床特征的分布

Tab 3 Clinical features of PCNA positive and negative group in surgical margin and primary cancer

(n)

Index	Surgical margin			Primary cancer		
	Positive	Negative	P	Positive	Negative	P
Gender						
Male	11	23		30	4	
Female	0	2		2	0	
Site						
Supraglottic	2	8		10	0	
Glottic	8	16		20	4	
Subglottic	1	1		2	0	
Clinical stage			0.04			0.125
I / II	10	11		17	4	
III / IV	2	13		15	0	
Pathological grade						
I	10	17		24	3	
II	1	6		7	0	
III	0	2		1	1	
Lymph node			0.02			0.278
Positive	7	5		12	0	
Negative	4	20		20	4	

表 4 P53、PCNA 蛋白在喉癌组织中的表达

Tab 4 Expression of protein P53 and PCNA in primary cancer

Expression in primary cancer	(n)			
	P53		PCNA	
	Recurrent group	Non-recurrent group	Recurrent group	Non-recurrent group
Negative	2	14	1	3
Positive	7	13	8	24
Total	9	27	9	27

表 5 P53、PCNA 蛋白在喉癌手术切缘中的表达

Tab 5 Expression of protein P53, PCNA in surgical margin

Expression in surgical margin	(n)			
	P53		PCNA	
	Recurrent group	Non-recurrent group	Recurrent group	Non-recurrent group
Negative	5	22	1	24
Positive	4	5	8	3
Total	9	27	9	27

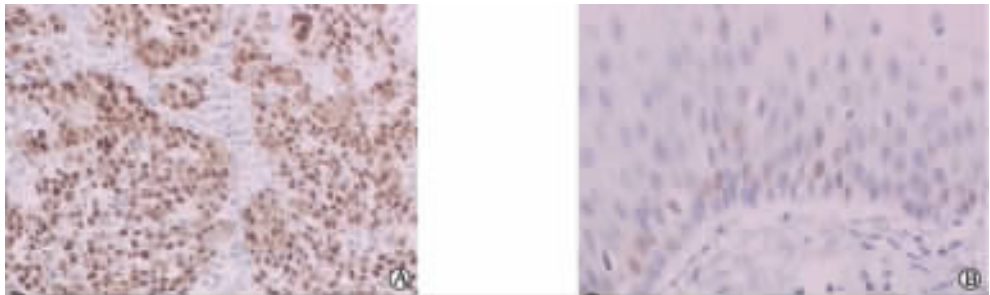


图 1 P53 阳性染色

Fig 1 Positive P53 immunohistochemical staining

A: The positive P53 immunohistochemical staining in the primary cancer. Most cancer cells were brown stained in the nuclei. Original magnification: $\times 200$; B: The positive P53 immunohistochemical staining in the surgical margin, more than 5% cells in the basal layer were brown stained in the nuclei. Original magnification: $\times 400$

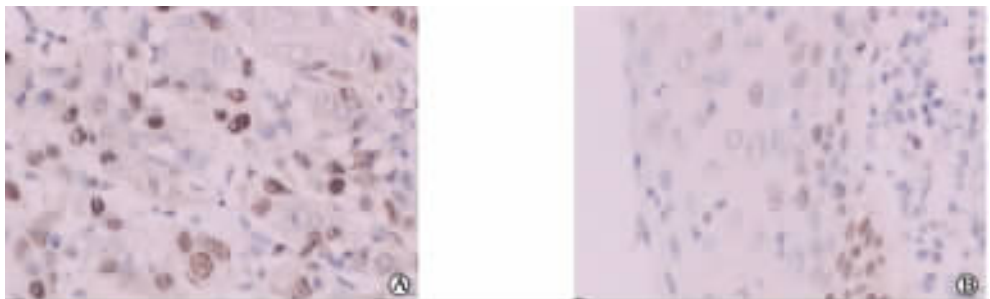


图 2 PCNA 阳性染色

Fig 2 Positive PCNA immunohistochemical staining

A: The positive PCNA immunohistochemical staining in the primary cancer. Most cancer cells were brown stained in the nuclei. Original magnification: $\times 200$; B: The positive PCNA immunohistochemical staining in the surgical margin, more than 5% cells in the basal layer were brown stained in the nuclei. Original magnification: $\times 400$

3 讨论

P53 作为肿瘤抑制基因,其功能是使异常细胞发生凋亡。突变型 P53 能产生一种静止的但代谢稳定的 P53 蛋白,约在 50% 头颈肿瘤中可检测到,阳性率随肿瘤发展而提高。它在喉癌形成早期起了重要作用^[9]。PCNA 是一种核内蛋白,为 DNA 多聚酶的辅助蛋白,调节 DNA 的合成和细胞增殖。它的出现明显与细胞增殖有关,在正常增殖的细胞和转化的细胞中 PCNA 的量发生变化,但在静止细胞中其量很少。

大部分 G₀-G₁ 期细胞没有明显 PCNA 表达,G₁ 晚期表达大幅增加,S 期达高峰,G₂-M 期下降。因此认为它可以作为评价细胞增殖状态的一个指标^[10]。

目前判断手术切缘组织中肿瘤阴、阳性的方法还是依据常规病理学检查,阳性标准是标本中见到癌细胞,但也有人把手术切缘邻近肿瘤 5 mm 内的组织看成阳性,是因为在此范围内组织是不正常的。有学者从病理学角度发现 95% 的声门上型喉癌在癌肉眼边界外浸润距离 < 10.52 mm,而 95% 的声门型肿瘤为 < 4.41 mm^[11];李为民等^[12]用相似的方法

发现喉癌 76.6% 的标本浸润范围在 5 mm 以内。在分子水平也有相似的发现:以 5 mm 为界,DNA 含量和 ras、c-myc、P53 蛋白^[13]及 p16、p21、EGFR 蛋白^[14]的表达量的差异都有统计学意义。目前国内有不少学者将有关指标应用到肿瘤手术切缘组织的监测中来。

本资料显示,36 例中原发灶组织中 P53 阳性率是 55.6%(20/36),PCNA 阳性率 88.9%(32/36);在病理学阴性手术切缘组织中 P53 蛋白阳性率是 25%,PCNA 蛋白阳性率是 30.6%。比较 P53 及 PCNA 阳性、阴性两组的复发率,发现喉癌原发灶组织中 P53 及 PCNA 阳性者的复发率 35%(7/20)和 25%(8/32)高于阴性者 12.5%(2/16)和 25%(1/4)。手术切缘中 P53 及 PCNA 阳性者的复发率 44.4%(4/9)和 72.7%(8/11)明显高于阴性者 18.5%(5/27)和 4%(1/25)。喉癌组织中 P53、PCNA 蛋白表达同时异常,且手术切缘组织 P53 及 PCNA 蛋白表达也同时异常,术后复发率为 100%(4/4)。该结果说明在病理学阴性手术切缘组织中 P53 及 PCNA 的检测意义较大,两者联合检测对于判断术后局部复发有更大的意义。另外,本研究中有淋巴结转移者切缘组织 P53 及 PCNA 均为阳性表达,术后全部复发,也有学者认为有淋巴结转移者术后生存率较低^[15-16]。

本结果显示,单一种基因不论是 P53 阳性表达或者 PCNA 阳性表达在 2 组手术切缘中均较普遍,所有手术切缘黏膜上皮中 P53 蛋白阳性表达和 PCNA 蛋白阳性表达同时发生者,其相应喉癌组织中也有相同发现,在复发组中 P53 和 PCNA 同时异常者的比例显著高于无复发组。提示 P53 和 PCNA 的表达异常是喉鳞癌产生过程中的早期事件,两者对喉癌的发生具有协同作用。因此,联合检测 P53 和 PCNA 对手术切缘生物学特性的估计有着积极意义。如果喉癌组织中 P53 和 PCNA 同时表达异常的喉癌患者其手术切缘中 P53 和 PCNA 也同时表达异常时,则其术后局部复发率高达 100%,本组中因病例数较少,其复发率有待进一步验证。因此,对于这些患者有必要采取积极措施和放射治疗、化学预防或再手术等,以期减少局部复发,改善预后。由于复发组与无复发组进行了临床分期和 TNM 分期等配对,因此避免了这些因素对结果的影响。因此认为,用免疫组化这一简单灵敏可靠的方法联合检测喉癌及其手术切缘中 P53 和 PCNA 表达状态将为医师筛选术后复发的高危患者提供有益参考,值得进一步研究和推广。

[参考文献]

- [1] Nathan C A, Amirghahri N, Rice C, Abreo F W, Shi R, Stucker F J. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients [J]. *Laryngoscope*, 2002, 112:2129-2140.
- [2] Fabricius E M, Gur U, Wildner G P. Telomerase activity levels in the surgical margin and tumour distant tissue of the squamous cell carcinoma of the head-and-neck[J]. *Anal Cell Pathol*, 2002, 24:25-39.
- [3] Georgiou A, Gomatos I P, Pararas N B, Giotakis J, Ferekidis E. Cell kinetics and apoptosis in laryngeal carcinoma patients[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2003, 112:206-213.
- [4] Wong T S, Man M W, Lam A K, Wei W I, Kwong Y L, Yuen A P. The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR[J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39:1881-1887.
- [5] Lang J C, Borchers J, Danahey D, Smith S, Stover D G, Agrawal A, et al. Mutational status of overexpressed p16 in head and neck cancer: evidence for germline mutation of p16/p14ARF [J]. *Int J Oncol*, 2002, 21:401-408.
- [6] 赵厚育, 陈乾美, 任 婕. Survivin 在喉鳞状细胞癌手术切缘中的表达及与预后的关系[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2005, 19:538-540.
- [7] Eissa S, Kenawy G, Moteleb F A, El-Magkhzangy A N, Nassar M. Real-time PCR hTERT mRNA pattern in tumor core, edge, resection margin, and lymph nodes in laryngeal tumors: relation to proliferative index and impact on prognosis [J]. *Clin Biochem*, 2005, 38:873-878.
- [8] Nathan C A, Sanders K, Abreo F W, Nassar R, Glass J. Correlation of p53 and the proto-oncogene eIF4E in larynx cancers: prognostic implications [J]. *Cancer Res*, 2000, 60:3599-3604.
- [9] 罗克强, 王直中, 王娜亚, 张小伯, 杨继生. p53 在喉鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达与生物学行为的关系及意义[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2005, 19:405-408.
- [10] 吴先光, 何淑华, 吴名耀, 周 梁. 6 种基因蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2005, 19:648-651.
- [11] 孙越峰, 杨蓓蓓. 喉癌手术切缘的显微观察和测量[J]. *中华肿瘤杂志*, 2001, 23:151-153.
- [12] 李为民, 郭 睿, 郭志祥. 喉癌手术切缘的组织病理学研究[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1998, 12:496-499.
- [13] 万保罗, 董明敏, 马季青, 贾 建, 马 嵩, 谢卫民, 等. 喉癌手术安全切缘的免疫组化研究[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1999, 13:394-396.
- [14] 戴 嵩, 孙兴如, 吴晓鑫, 赵锦荣. 免疫组化检测对喉癌手术切缘的安全性研究[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1999, 13:539-541.
- [15] Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chatelain B, Remacle M, et al. Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2003, 260:28-34.
- [16] Cabanillas R, Rodrigo J P, Astudillo A, Dominguez F, Suarez C, Chiara M D. P53 expression in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx and its lymph node metastases: new results for an old question[J]. *Cancer*, 2007, 109:1791-1798.