

# Clinicopathological Significance of p53 Gene Expression and Telomerase Activity in Circulating Tumor Cells of Patients with Colorectal Carcinoma

## 循环肿瘤细胞 p53 基因表达和端粒酶活性在大肠癌临床病理学中的意义

周建农<sup>1</sup>/马国建<sup>2</sup>/何晓松<sup>2</sup>/  
沈宗丽<sup>2</sup>/薛开先<sup>2,\*</sup>

(1. 江苏省肿瘤医院普外科, 江苏 南京 210009; 2. 江苏省肿瘤防治研究所遗传学研究室, 江苏 南京 210009)

ZHOU Jian-nong<sup>1</sup>, MA Guo-jian<sup>2</sup>, HE Xiao-song<sup>2</sup>, SHEN Zong-li<sup>2</sup>, XUE Kai-xian<sup>2,\*</sup>  
(1. Department of General Surgery, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009; 2. Laboratory of Genetics, Jiangsu Institute for Cancer Research, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

**【摘要】**背景与目的：探讨大肠癌患者循环肿瘤细胞 p53 基因的表达和端粒酶活性的变化及其临床病理学意义。材料与方法：113 例大肠癌患者、13 例良性大肠肿瘤患者术前的外周血和 28 例健康供血员的外周血，用分层液分离含有循环肿瘤细胞的单个核细胞，应用流式细胞仪和 TRAP-ELISA 法，分别检测 p53 基因表达和端粒酶活性。结果：在 105 例有信息的大肠癌患者中，p53 基因表达和端粒酶活性的阳性率分别为 74.3% (78/105) 和 61.0% (64/105)。异常的 p53 基因表达和端粒酶活性水平均与大肠癌患者的淋巴结转移显著相关 (P < 0.05)，两者的联合检测提高了对大肠癌淋巴结转移的预测水平。p53 基因异常表达还与大肠癌细胞分化程度显著相关 (P = 0.003)。结论：循环肿瘤细胞异常的 p53 基因表达和端粒酶活性是大肠癌的恶性生物学标志，两者密切相关，联合检测可提高对淋巴结转移状态的预测水平。

**【关键词】**大肠癌；p53 基因；端粒酶；转移；循环肿瘤细胞

中图分类号：R735.7 文献标识码：A 文章编号：1004-616X(2009)02-0145-04

**【ABSTRACT】** BACKGROUND AND AIM: To study the clinicopathological significance of p53 gene expression and telomerase activity in circulating tumor cells of patients with colorectal carcinoma. **MATERIALS AND METHODS:** Mononuclear cells containing circulating tumor cells were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation in peripheral blood from 113 preoperative patients with colorectal carcinomas, 13 patients with benign colorectal disease, and 28 healthy volunteers. FCM and TRAP-ELISA were used to evaluate p53 gene expression and telomerase activity, respectively. Experimental data were analyzed by SPSS 11.0 software and  $\chi^2$  test. **RESULTS:** Among 105 informative patients with colorectal carcinoma, positive rate of p53 expression and telomerase activity were 74.3% (78/105) and 61.0% (64/105), respectively. Aberrant expression levels of both p53 gene and telomerase in patients with colorectal cancer were significantly correlated with lymph node metastasis (P < 0.05) and their simultaneous measurement could raise the prediction accuracy of metastasis. Expression of p53 gene was also significantly correlated with differentiation degree of colorectal carcinoma (P = 0.003). **CONCLUSION:** Aberrant p53 gene expression and telomerase activity in circulating tumor cells might be malignant biomarkers. Both were closely related and could predict nodal involvement.

**【KEY WORDS】** colorectal carcinoma; p53 gene; telomerase; metastasis; circulating tumor cells

大肠癌是工业化国家常见的恶性肿瘤之一，近年来我国大肠癌的发病率和死亡率明显上升，因此研究、开发能发现早期大肠癌和术后高复发风险患者的方法，具有重要

的临床意义<sup>[1-2]</sup>。肿瘤抑制基因 p53 是人体最常见的抑癌基因，也是大肠癌最常见的有遗传学改变的基因，p53 基因的突变和表达改变与肿瘤侵袭性和治疗反应相关<sup>[3-6]</sup>。

收稿日期：2008-05-12；修订日期：2008-11-25  
基金项目：江苏省科技厅基金资助项目 (BS99056)  
作者简介：周建农 (1959-)，男，江苏沐阳人，博士，教授，主任医师，研究方向：结直肠肿瘤外科及相关分子生物学研究。  
\* Correspondence to: XUE Kai-xian, Tel: 025-83283482, E-mail: xuekx@yahoo.com.cn

端粒酶是当今肿瘤诊疗研究中另一个受重视的靶点,端粒酶的激活是细胞永生化的基本条件和癌变的关键步骤,并且是大肠癌的诊断和预后的标志<sup>[7-8]</sup>。近年来研究发现,P53和端粒酶与癌变关系密切,P53是端粒酶活性的关键调节因子,并影响端粒缩短对细胞的后果<sup>[9-10]</sup>,然而鲜见联合评价P53基因表达、端粒酶活性改变在大肠癌临床病理学中的意义;而循环肿瘤细胞的检测具有微创、无需瘤体采样和敏感性高等特点<sup>[4,11-12]</sup>,这样在循环肿瘤细胞中联合上述恶性肿瘤分子生物学标志,更有利于肿瘤的早期发现、疗效监测和预后判断。因此,本研究对散发性大肠癌患者以及良性肿瘤和健康对照人群进行了比较研究。

## 1 材料与方法

**1.1 病例与血样** 收集2001年11月至2003年11月江苏省肿瘤医院收治的大肠癌患者126例,其中女性55例,男性71例。年龄从28岁至82岁,平均为53岁。术前未经任何治疗,抽取外周血供进一步实验用。术后病理学检查确证,其中大肠癌患者113例,良性肿瘤患者13例。另本院血库获得健康供血员28例。

**1.2 P53蛋白检测** 直标法进行流式细胞仪(FCM)检测,详见本所已往报告<sup>[13]</sup>,FCM型号为Facs Calibur(美国BD公司),15 mW 氩离子激光,激发光波长488 nm。1 ml 抗凝外周血,用淋巴细胞分层液分离外周血单个核细胞,PBS洗涤,70%酒精固定过夜。离心去除乙醇,用PBS洗涤,调节细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。加入鼠抗人突变型P53-FITC单抗(Ancell公司),并设同批试剂本底对照管,暗处反应30 min,PBS洗涤后上机。用Cellquest软件自动获取 $10^4$ 个细胞样品并分析结果,记录P53蛋白阳性细胞百分率。

**1.3 端粒酶活性检测** 3 ml 抗凝外周血,用淋

巴细胞分层液分离外周血中的单个核细胞,用生理盐水洗涤后,-20℃保存待用。应用端粒重复序列扩增(TRAP)反应及ELISA法测定端粒酶活性,采用罗氏公司端粒酶TRAP-ELISA检测试剂盒,按该试剂盒所提供的操作程序进行。阳性对照为293肾细胞,标本经65℃、加热30 min灭活端粒酶后作为阴性对照。用酶标仪测定结果,以450 nm的吸光度(参照波长690 nm)判定。阳性对照吸光度应大于1.5,阴性对照吸光度应小于0.25,待测标本 $\Delta A = \text{标本吸光度} A \text{值} - \text{阴性对照吸光度} A \text{值}$ ,若标本 $\Delta A > 0.2$ ,即为端粒酶阳性<sup>[14]</sup>。

**1.4 统计学方法** 实验数据用SPSS 11.0软件包进行统计学处理,其中p53基因异常表达率在大肠癌不同分化组及良恶性肿瘤组间的差异分析用 $\chi^2$ 检验;端粒酶阳性率在不同性别、年龄及在良恶性大肠癌和不同肿瘤分化程度间的差异分析用 $\chi^2$ 检验;淋巴结转移阳性率与端粒酶不同活性分组以及p53表达、端粒酶活性不同组合状态间的差异分析用 $\chi^2$ 检验;当分组后某组频数小于5时,采用Fisher's精确检验法。

## 2 结果

**2.1 P53蛋白表达** 在检测p53基因表达有信息的105例大肠癌患者外周血单个核细胞中,P53蛋白阳性细胞率超过在健康人群分布上限(5.68%)<sup>[13]</sup>者共78例,阳性率为74.3%。P53异常表达与部分临床病理特征间的关系见表1。从表1可见,在105例大肠癌患者中,P53异常表达与淋巴结转移状态显著相关( $P = 0.003$ )。p53基因异常表达率与大肠癌分化程度显著相关,并在良、恶性大肠肿瘤组间存在显著差异(分别为 $P = 0.006$ , $P = 0.004$ ),但未发现p53基因异常表达与性别、年龄间存在相关。

表1 大肠癌患者循环肿瘤细胞p53基因表达和端粒酶与临床病理特征的关系

Table 1 p53 gene expression and telomerase activity in circulating tumor cells of patients with colorectal carcinoma and its clinicopathological significance

Index	Total	P53 expression		P value	Telomerase activity		P value
		+	-		+	-	
Sex	Male	71	45	22	42	24	0.722
	Female	55	37	14	30	19	
Ages	≥70	20	13	7	11	7	0.710
	41~69	72	49	23	47	25	
	≤40	26	20	6	14	11	
Pathological diagnosis	cancer	105	78	27	64	41	0.397
	begin	13	4	9	10	3	
Lymphatic metastasis	metastasis	59	48	11	39	22	0.225
	no metastasis	46	30	16	25	19	
Differentiation degree	++++	4	1	3	3	0	0.133
	+++	69	53	16	41	32	
	++	22	15	7	14	5	
	+	10	9	1	6	4	

**2.2 端粒酶活性** 在用外周血单个核细胞检测端粒酶活性的 105 例大肠癌患者中,64 例为阳性,阳性率为 61.0% ;28 例健康供血员中均为阴性。尽管大肠癌转移和未转移组间端粒酶阳性率的差异无统计学意义(表 1),但在端粒酶阳性表达组中,与低表达组相比,随着端粒酶活性水平的提高,大肠癌细胞的淋巴结转移率显著增加( $P < 0.05$ )。在端粒酶阴性表达组肿瘤转移率较低表达组增加了 77%,值得关注(表 2)。未发现端粒酶活性与性别、年龄以及在良、恶性大肠肿瘤和不同肿瘤分化程度间有明显相关(表 1)。

表 2 大肠癌循环肿瘤细胞端粒酶活性与淋巴转移  
Table 2 Telomerase activity in circulating tumor cells of patients with colorectal carcinoma and lymphatic metastasis

Telomerase activity (A value)	0 ~ 0.20	> 0.20 ~ 0.40	> 0.40 ~ 0.60	> 0.60
Total	39	23	26	17
Lymphatic metastasis	21	7	18	14
Metastasi rate (%)	53.8	30.4	69.2*	82.4*

Compared with low activity group (0~0.40), \* $P < 0.05$

**2.3 P53 蛋白和端粒酶活性的联合检测** 对 97 例大肠癌患者联合检测了 P53 基因表达和端粒酶活性,发现这两种生物学标志异常改变间显著相关( $P < 0.05$ );它们不同组合的检测与淋巴结转移的关系参见表 3。其中 P53 蛋白(-)/端粒酶活性(-)组大肠癌患者的肿瘤转移发生率最低,仅为 25%;其他 3 组淋巴结转移率均有明显增加,其中又以 P53 蛋白质(+)/端粒酶活性(+)组增加最为明显,为 64.4%;两者相比提高达 2.5 倍以上,尽管因为阴性组病例数少未显示有统计意义,但数倍的差异已初步显示,P53 基因表达和端粒酶活性联合检测提高了对肿瘤淋巴结转移状态的预测能力,有待扩大样本进一步验证。

表 3 大肠癌患者循环肿瘤细胞 p53 表达和端粒酶活性状态与淋巴转移  
Table 3 p53 expression and telomerase activity status in circulating tumor cells of patients with colorectal carcinoma and lymphatic node status

	p53(-)/telomerase(-)	p53(-)/telomerase(+)	p53(+)/telomerase(-)	p53(+)/telomerase(+)
Total	8	13	31	45
Lymphatic metastasis	2	6	18	29
Metastasis rate (%)	25.0	46.2	58.1	64.4

### 3 讨论

癌基因的活化和肿瘤抑制基因的灭活是肿瘤发生的中心生物学过程,它提供了癌变细胞的选择性生长优势和克隆扩增<sup>[15]</sup>。P53 蛋白调控细胞的增殖、衰老和凋亡等重要过程,关于 p53 基因异常改变与大肠癌转移和预后关系的研究积累了大量的资料,并有一组国际协作

的研究肯定了 p53 基因突变对大肠癌预后判断的价值<sup>[1,2,4-6]</sup>。有学者认为,检测肿瘤细胞 p53 基因的异常表达是发现 P53 突变的有效方法,但由于不是所有的 P53 突变类型都产生蛋白质积累,还有一些病毒癌蛋白、细胞癌蛋白与野生型 P53 蛋白结合增加其稳定性而积聚,因此应用免疫组织化学方法检测 P53 蛋白用于大肠癌患者的预后研究存在一些矛盾的结果<sup>[4,6,16]</sup>,但扩大研究的样本后,得到了肯定其预后作用的结果<sup>[6,10]</sup>。同时免疫组化法检测费时、分析的细胞有限。应用 FCM 可在短时间内、自动地定量分析大量的细胞,已有研究表明,在 88 例健康人群中无 1 例存在 p53 基因异常表达<sup>[13]</sup>;本研究在较大样本的大肠癌患者中证实,p53 基因的异常表达与肿瘤淋巴结转移状态和细胞分化程度显著相关,可作为大肠癌恶性生物学标志,有助于临床更精确分组治疗,以提高疗效。随着 FCM 日益普及,该方法的临床应用价值应予以重视。

端粒位于人类染色体的末端,在保护染色体末端和 DNA 复制稳定性中起重要作用。正常细胞因 DNA 复制的“末端问题”,随着细胞分裂端粒不断缩短,在 P53 基因完整时将导致细胞衰老;在癌变过程中端粒酶被激活,维持端粒的长度,并成为癌细胞的重要特征<sup>[9]</sup>。本研究应用高灵敏度的 PCR-TRAP-ELISA 方法检测端粒酶活性比检测端粒酶 RNA 表达更有价值<sup>[7,14]</sup>,本研究结果表明,随着端粒酶活性的增加,大肠癌转移的危险性也显著提高(表 3);但同时也观察到端粒酶阴性组大肠癌患者的淋巴结转移率明显高于低表达组,这可能与端粒延长旁路(alternative lengthening of telomere,ALT)有关。这一替代途径的确切机制还未阐明,此时细胞可能是通过重组维持端粒的完整性,P53 基因突变可促进这一途径<sup>[9]</sup>。在本组同时有 P53 检测的 39 例端粒酶阴性大肠癌患者中,有 31 例为 P53 异常表达(79.5%);其中 20 例为转移性大肠癌,此 20 例中 18 例为 p53 基因异常表达(90%)。这些结果提示,p53 基因异常促进了 ALT 的发生,并提高了癌细胞的恶性程度;正因为 p53 基因异常表达和端粒酶活性在癌变过程中密切相关,并且 P53 是端粒动态过程的关键调节者<sup>[9]</sup>,故联合检测可提高对大肠癌淋巴结状态的预测水平。

大量的研究表明,脱落进入循环系统的肿瘤细胞反映原位肿瘤的生物学特征,可用来监测病情、预测化疗敏感性和早期复发等,是独立的预后指标,近几十年来这方面研究倍受关注,尤其是在大肠癌<sup>[17]</sup>。有多种敏感的方法检测循环肿瘤细胞,但近来在大肠癌等的研究表明,应用 RT-PCR 检测上皮细胞来源的标志物如 CK-20 等的 mRNA,来确定外周血中的循环肿瘤细胞,由于这



种方法很难区分这些 mRNA 是来自少量癌细胞, 还是造血细胞的非常规转录, 因此这类研究逐渐减少, 转而应用肿瘤特异性标志物如端粒酶等, 并取得了良好的结果<sup>[11, 17]</sup>。本研究直接在从外周血分离的单个核细胞, 应用 FCM 和 TRAP-ELISA 法分别检测 p53 基因的表达和端粒酶的活性, 结果证明外周血确实存在循环肿瘤细胞, 已如上述它们的存在与肿瘤淋巴结转移和细胞分化程度明显相关, 联合检测可提高对大肠癌患者淋巴结状态的预测水平。因此, 应用肿瘤特异性标志物检测循环肿瘤细胞值得深入研究, 可望用于致癌物易感人群筛查<sup>[18]</sup>、肿瘤早期发现、病情监测、预测化疗敏感性和肿瘤转移复发等<sup>[4, 17, 19]</sup>。

(致谢: 本文由陈森清副研究员协助统计处理, 实验过程中得到周晓明副研究员、朱月清和戴美红主管技师等的大力支持, 一并致以衷心的感谢)

### 参考文献:

- [1] Diep CB, Thorstensen L, Meling GI, et al. Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(5): 820 - 829.
- [2] Russo A, Bazan V, Iacopetta B, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of P53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(5): 7518 - 7528.
- [3] Lane DP, Fischer PM. Turning the key on P53[J]. Nature, 2004, 427(6977): 789 - 790.
- [4] 马国建, 周建农, 沈宗丽, 等. 循环癌细胞 P53 表达在大肠癌患者检测中的临床意义 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(2): 186 - 188.
- [5] Mollevi DG, Serrano T, Ginesta MM, et al. Mutations in TP53 are a prognostic factor in colorectal hepatic metastases undergoing surgical resection[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(6): 1241 - 124
- [6] Chang SC, Lin JK, Lin TC et al. Genetic alteration of P53, but not overexpression of intratumoral P53 protein, or serum P53 antibody is a prognostic factor in sporadic colorectal adenocarcinoma[J]. Int J Oncol, 2005, 26(1): 65 - 75.
- [7] Malaska J, Kunicka Z, Borsky M, et al. Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma[J]. Neoplasma, 2004, 5(2): 90 - 96.
- [8] Komuro Y, Watanabe T, Tsurita G et al. Expression pattern of telomerase reverse transcriptase in rectal carcinoma predicts tumor radiosensitivity, local recurrence and disease-free survival [J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52(63): 985 - 989.
- [9] Velicescu M, Dubeau L. P53: a key player in the telomere dynamics[J]. Cancer Biol Ther, 2002, 1(5): 518 - 519.
- [10] Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and P53 in senescence, apoptosis, and cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 331(3): 881 - 890.
- [11] Molnar B, Sipos F, Galamb O et al. Molecular detection of circulating cancer cells. Role in diagnosis, prognosis and follow-up of colon cancer patients[J]. Dig Dis, 2003, 21(4): 320 - 325.
- [12] Iinuma H, Okinaga K, Egami H et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2006, 28(2): 297 - 306.
- [13] 周振英, 朱月清, 吴晓柳, 等. 健康人血细胞流式细胞术参数正常值的建立及其意义 [J]. 肿瘤防治杂志, 2000, 7(2): 123 - 125.
- [14] 何晓松, 周晓明, 戴美红, 等. 大肠癌患者外周血循环癌细胞端粒酶活性的表达及其临床意义 [J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5(9): 1263 - 1264.
- [15] 薛开先. 概论 [M] // 吴 旻, 薛开先, 孙开来, 等. 肿瘤遗传学. 北京: 科学出版社, 2004: 3 - 26.
- [16] Pan ZZ, Wan DS, Chen G, et al. Co-mutation of P53, K-ras genes and accumulation of P53 protein and its correlation to clinicopathological features in rectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(24): 3688 - 3690.
- [17] Schuster R, Max N, Mann B, et al. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers[J]. Int J Cancer, 2004, 108(2): 219 - 227.
- [18] Salazar AM, Calderon-Aranda E, Cebrian ME, et al. P53 expression in circulating lymphocytes of non-melanoma skin cancer patients from an arsenic contaminated region in Mexico. A pilot study[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 255(1/2): 25 - 31.
- [19] Lan YT, Chang SC, Fen-Yau LA, et al. P53 protein accumulation as a prognostic marker in sporadic colorectal cancer[J]. Int J Colorectal Dis, 2007, 22(5): 499 - 506.