

p53、MDR 基因在食管癌及癌旁组织中表达的分析

杨廷桐,李秀杰

Analysis of Expression of p53 MDR Genes in the Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Cancerous Beside

YANG Ting-tong,LI Xiurjie

Department of paphology Xinxiang medical college, Xinxiang 453003, China

Abstract :Objective To study clinicopathologic significance of expression of p53 ,MDR genes in esophageal squamous cell carcinoma and cancerous beside. **Methods** Histochemistry ABC and RT-PCR method was used to detect the expression of p53 ,MDR genes in 50 carcinoma and 37 cancerous beside. **Results** p53 gene protein was marked expression in the cancer 68 % (34/ 50) ,and was expression in the cancerous beside 59 % (22/ 37) ,among 54 % (13/ 24) was normal ,69 % (9/ 13) was atypical hyperplasia ;Expression of Mdr-1 was marked difference , in tumor of high middle ,low differentiation ,has marked difference in cancer and normal tissue , and both no differences in ages ,sex ,size of tumor. **Conclusion** p53 ,MDR genes was high level experssion in the esophagus carcinoma MDR was experssioned in the cancerous beside ,p53 gene mutation was early than change of histology forming.

Key words :p53 gene ; MDR gene ; Reversartranscription-polymerase ; Esophageal squamous cell carcinoma ; Tissue of cancerous beside

摘 要:目的 探讨食管癌和癌旁组织中 p53、MDR 基因的表达及其临床意义。方法 采用免疫组化 ABC 法及逆转录酶—聚合酶链反应的方法,对 50 例食管癌和 37 例癌旁组织中 p53、MDR 基因的表达情况进行检测。结果 p53 基因蛋白在食管癌中有显著表达为 68 % (34/ 50) ,癌旁组织中有表达为 59 % (22/ 37) ;其中在癌旁正常组织中占 54 % (13/ 24) ,在癌旁非典型增生中占 69 % (9/ 13) 。MDR 基因在食管癌高、中、低分化中的表达水平有极显著意义,癌与正常组织有极显著意义。在不同年龄、性别、肿瘤大小上 p53、MDR 基因的表达无显著意义。结论 p53、MDR 基因在食管癌中均呈高水平表达,癌旁组织中 MDR 有表达,p53 基因突变早于组织形态学改变。

关键词: p53 基因蛋白 ; MDR 基因 ; 逆转录—聚合酶链反应 ; 食管癌 ; 癌旁组织

中图分类号: A735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2005) 08-0460-03

0 引言

食管癌是常见的恶性肿瘤之一,严重危害人们的身体健康。如何才能做到早期诊断,进行有效的治疗,这乃是当今肿瘤界研究的热点。p53 基因突变与食管癌的发生密切相关^[1],临床食管癌化疗失败的主要原因是瘤细胞对化疗药物产生耐受性,多药耐药(MDR)就是耐药的一个主要类型^[2],为进一步研究 p53 基因与食管癌发生的关系,以及 p53、MDR 基因在食管癌和癌旁组织中表达的相关性及其临床意义,我们进行了本项课题的研究,为临床早期诊断食管癌和克服 MDR 提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 标本均来自新乡医学院三附院,50 例

食管鳞癌(高分化 18 例,中分化 20 例,低分化 12 例),经病理学确诊。其中 24 例食管正常黏膜、13 例非典型增生均取自癌旁组织。男 38 例,女 12 例。55 岁以下 34 例,56 岁以上 16 例。

1.2 方法

1.2.1 p53 免疫组化(IHC)试剂、染色方法及评估标准见文献[3]。

1.2.2 RNA 提取采用异硫氰酸胍一步法^[4]。

1.2.3 引物 由北京医科大学病理学系合成:

5' GTACCCA TCA TTGCAA TAGC 3'

5' CAAACTTCTGCTCCTGA GTC 3'

5' CACCCCCACTGAAAAA GA TG 3'

5' CTTCAA TCCA TGA TGCT 3'

1.2.4 RT-PCR 逆转录反应条件:42 30min。PCR 反应条件:94 5min;94 1min;50 1min;72 1min,35 个循环后延伸 5min。取 10μL 扩增产物在 2 % 琼脂糖凝胶上点样,电压 100V,电泳

收稿日期:2004-09-06;修回日期:2005-01-26
基金项目:河南省科技攻关课题(001170632)
作者单位:453003 河南新乡医学院病理学教研室

120min 后鉴定 *mdr-1*, B2MG 分别为 147bp 和 114bp, 与设计的相符。

1.2.5 *mdr-1* 定量分析 应用 Shimadzu 公司的 CS-910 色谱扫描仪对 *mdr-1* 和 B2MG 两条带进行扫描, 狭缝长 × 宽 = 2.1 × 0.1mm; 波长 为 550nm, 输入计算机进行相对定量分析。*mdr-1*/B2MG 为 *mdr-1* 的相对含量。

2 结果

2.1 p53 IHC 的阳性表达率 食管鳞癌为 68% (34/50), 癌旁组织中有表达为 59% (22/37); 其中在癌旁正常黏膜为 54% (13/24), 癌旁非典型增生为 69% (9/13)。

2.2 50 例食管鳞癌的高、中、低分化组织中以及癌与正常组织中 *mdr-1* 表达水平具有显著意义; 正常组织中 *mdr-1* 也有较高水平的表达, 见表 1。

表 1 食管癌与正常食管黏膜之间 *mdr-1* 表达情况

组织学	例数	均数	标准差	变异系数
高分化癌	15	0.382	0.062	16.07
中分化癌	26	0.326	0.041	12.41
低分化癌	9	0.215	0.086	38.97
正常黏膜	10	0.077	0.031	39.21

注: *t* 检验: 高与中之比 $P < 0.002$, 中与低之比 $P < 0.001$, 低与正常之比 $P < 0.001$

2.3 p53 IHC 和 *mdr-1* 在各年龄组、性别及肿瘤大小、临床分期之间的表达无显著意义, 见表 2。

表 2 p53 基因蛋白在不同情况中的表达

临床病理因素	例数	p53 IHC	
		- (%)	+ (%)
年龄 35~45 岁	4	2 (50)	2 (50)
46~55 岁	30	17 (57)	13 (43)
56~65 岁	13	6 (46)	7 (54)
66~75 岁	3	1 (33)	2 (67)
肿物大小 >5cm	38	17 (45)	21 (55)
5cm	12	5 (42)	7 (58)
组织学分级 高	18	6 (33)	12 (67)
中	20	7 (35)	13 (65)
低	12	3 (35)	9 (75)
非典型增生 ~ 级	13	4 (31)	9 (69)
预后 >5 年	33	19 (58)	14 (42)
5 年	17	6 (35)	11 (65)
正常黏膜	24	11 (46)	13 (54)

注: $P > 0.05$

3 讨论

MDR 是指细胞可耐受结构、功能及杀伤机制不同的多种药物的致死剂量, *mdr-1* 的表达使其编码之膜糖蛋白 P-gp 增加, 导致细胞内药物聚集减

少, 这是临床上食管癌患者耐药形成过程中不可忽视的相关机制。Pirker 等发现来源于正常结肠组织 *mdr-1* 表达水平较高组织的肿瘤常表现为天然 MDR, 且于性别、年龄、肿瘤的大小无关, 这于本研究结果一致。正因为食管癌组织中存在着先天性的 MDR, 所以在临床上对其进行化疗时多表现为不敏感。MDR 在以往大部分肿瘤的研究中都有影响, 这也是当今临床化疗中出现的主要障碍, 同时对于正常组织来源的 *mdr-1* 基因是一种防御或应激性基因, 临床医师在应用 MDR 理论指导化疗时应注意到化疗增敏剂本身的毒性对机体的负影响, 更要想到先天性的 MDR 保护机体正常组织免受损害的积极作用。

与 MDR 相关的药物称之为 MDR 药物, 一般包括植物碱类; 抗生素类; 烷化剂类; 激素类等一些分子量较大的亲脂类化合物^[5]。我们检测 *mdr-1* 在食管癌组织中的表达, 是为了临床逆转 MDR 提供准确的理论依据, 以指导临床用药。所以当肿瘤组织中 *mdr-1* 高表达时应避开 MDR 药物, 这样疗效会更好。

p53 属于抑癌基因, 能维持细胞的正常生长, 启动细胞的程序性死亡, 抑制恶性增殖。突变型的 p53 基因使细胞 DNA 的损伤不能修复, 细胞的遗传不稳定, 且可向恶性转化。在对某些肿瘤的研究中业已证明 p53 基因的突变主要出现在肿瘤的发展晚期^[3,6]。令人感兴趣的是在本研究中我们发现了在癌旁正常鳞状上皮的 24 例中, 有 13 例 (54%) 呈 p53 基因蛋白阳性; 在非典型增生的 13 例中, 有 9 例 (69%) 呈 p53 基因蛋白阳性。这一现象说明癌旁的正常黏膜上皮从组织形态学上看似正常, 但从我们的实验中已检测出了 p53 基因有明显表达, 实际上它已经从分子水平上发生了质的变化, 并可逐渐向癌前病变和癌这一方向演变, 随着这一趋势的变化 p53 基因的表达水平也越来越高。因此, p53 基因的突变早于组织形态学改变, 这为我们在临床上使用胃镜对食管病变活检组织进一步做 p53 基因检测, 寻找到了非常重要的一种早期诊断食管癌的客观标记物, 尤其在食管癌的高发区、食管癌的高危人群中早期发现、早期诊断、早期治疗食管癌无疑具有十分重要的现实意义。因此, 我们推测是否 p53 基因在不同肿瘤中表达的情况也不尽相同。p53 突变在食管癌发生中可能是一个早期的生物学事件, 并可作为早期食管癌发生的生物学标记物^[7]。也有人认为^[8] 正常食管黏膜中 p53 基因的阳性表达是来自突变的 p53 基因, 还是由于其它原因造成的尚需更深入的研究。

我们还注意到了 *mdr-1* 基因的表达与 *p53* 基因表达之间存在着正相关性这一特殊现象, *p53* 基因表达与恶性肿瘤的分化度有关, 随分化度越来越低 *p53* 基因的表达就越来越高, 与此同时 *mdr-1* 基因的表达也越来越高。这也使我们注意到了 *p53* 基因的表达与患者预后的关系, 从表 2 中我们可以看出 *p53* 基因的表达越高患者 5 年生存率就越低, 联想到 *p53* 与 *mdr-1* 基因二者之间表达的正相关性, 这一现象的出现使我们推测是否与同时伴随的 *mdr-1* 基因的表达增高有关。因此, 在临床上对肿瘤患者的治疗过程中应注意及时的调整药物的类型, 以提高患者的生存率。另外, *p53* 基因与 *mdr-1* 基因表达的正相关性也提示我们, 临床上通过对食管癌组织中 *p53* 基因表达水平的检测, 可估计出同一组织中 *mdr-1* 基因表达的水平, 预测患者对化疗药物的敏感性。从另一角度来看, 只要我们从病理诊断中了解了肿瘤的分化程度, 不是也可直接评估肿瘤组织中 *mdr-1* 表达水平吗? *p53*、*mdr-1* 基因二者结合应用形成了一个整体, 为临床提出了一个新的科学依据, 同时也给临床医师在诊断和治疗食管癌方面带来了一个全新的思路。*p53* 基因表达是否能上调 *mdr-1* 基因的表达有待于我们更进一步的研究。

参考文献:

- [1] Stemmermann G, Heffelfinger SC, Noffsinger A, ET AL. The molecular biology of esophageal and gasyric cancer and their precursors: Oncogenes, tumor suppressor genes and growth factors[J]. Hum Pathol, 1994;25(10):968-970.
- [2] 李春海. 肿瘤生物学研究进展[M]. 第 1 版. 北京: 军事医学科学院出版社, 1997. 81-83.
- [3] 杨廷桐, 张骏, 郑杰, 等. 人小细胞肺癌 *p53* 基因突变的研究[J]. 肿瘤防治研究, 1998, 25(6):445-447.
- [4] Chomezynski P. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162(4):156-159.
- [5] Musto P. High risk of early resistance relaps forleukemic patients with presence of multidrug resistance associated polycor-protein positive cells in comytete remission[J]. Br J Haematol, 1991, 77(2):50-56.
- [6] Levin A J, Momand J, Finlay C A. The *p53* tumor suppressor gene[J]. Nature, 1991, 354(12):453-459.
- [7] Parent AR, Ruggie M, Frizzera E, et al. *p53* overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis[J]. Am J Surg Pathol, 1995, 19(21):1418-1422.
- [8] Stemmermann G, Hefferfing Sc, Noffsinger A, et al. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: Oncogenes, Tumor Suppressor genes and Growth factors[J]. Hum Pathol, 1994, 25(10):968-970.

[编辑:刘红武]

· 动态 · 简讯 ·

《中国肿瘤》杂志、《肿瘤学杂志》联合征订征稿启事

《中国肿瘤》杂志卫生部主管, 中国医学科学院、全国肿瘤防治研究办公室主办, 是中国肿瘤防治领域惟一一份综合类科技月刊, ISSN 1004 - 0242 CN11 - 2859/R, 大 16 开, 70 页, 单价 8 元, 全年 96 元, 邮发代号: 32-100。自 1992 年创刊以来, 以研究肿瘤控制为特点, 围绕我国肿瘤防治研究工作的学术问题, 发掘特色主题, 在肿瘤期刊界独树一帜。《中国肿瘤》已成为社会各方了解我国肿瘤防治研究工作进展和动态的重要途径, 也是肿瘤防治研究理论与实践活动的重要论坛, 中国科技核心期刊。

《肿瘤学杂志》是面向全国学术类科技双月刊, ISSN 1671-170X CN 33-1266/R 大 16 开, 80 页, 单价 8 元, 全年 48 元, 邮发代号: 32-37。该刊由浙江省卫生厅主管, 浙江省肿瘤医院和浙江省抗癌协会联合主办, 将及时反映我国肿瘤学术研究新领域的新技术、新成果和新进展, 以指导科研和临床实践。该刊公平公正, 择优录用稿件, 力求高质量, 好稿快发。

以上两刊均为国内外公开发行, 均已加入“中国期刊网”、“万方数据库”、“中文生物医学期刊文献数据库”、“中国生物医学期刊引文数据库”、“中文科技期刊数据库”、“中华医学杂志网”等, 并专递中国肿瘤网站 (<http://www.zgzl.net>)。

读者可在当地邮局订阅, 脱订者可直接向两刊编辑部订阅。

联系地址: 浙江省杭州市半山桥广济路 38 号浙江省肿瘤医院内

《中国肿瘤》编辑部 《肿瘤学杂志》编辑部

邮政编码: 310022

电话: 0571-88122280 0571-88147297; 传真: 0571-88147297

《中国肿瘤》编辑部 E-mail: zgzl@mail.hz.zj.cn

《肿瘤学杂志》编辑部 E-mail: zlxzz04@126.com