论著

文章编号:1000-5404(2009)02-0140-04

原发性肝癌患者血清 P53 蛋白检测的临床意义

曹晓静,王 东,张沁宏,仲召阳,李增鹏,王 阁 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

摘 要:目的 评价血清 P53 蛋白对原发性肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)诊断的临床价值,分析并探讨血清 P53 蛋白对 HCC 动态监测及治疗的临床意义。**方法** 采用 ELISA 检测血清 P53 蛋白的浓度,同时结合 Western blot 和免疫组化结果分析 130 例标本 P53 蛋白的表达情况,利用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)比较血清 P53 蛋白和 AFP 检测结果。**结果** ELISA 检测显示 HCC 患者血清 P53 蛋白浓度显著高于健康体检者及肝硬化患者($P<0.05$);血清 Western blot 结果显示在 53×10^3 处可检测到单一的条带,血清 P53 蛋白浓度升高与 Western blot 检测的光密度值密切相关。免疫组化检测 P53 蛋白阳性率为 64.62%,血清 P53 蛋白检测与免疫组化检测结果符合率达 84.62%;ROC 曲线分析显示血清 P53 蛋白检测和 AFP 检测曲线下面积分别为 0.910 和 0.954,二者 Kappa = 0.657,P = 0.000,表明 2 种方法的检测结果有正相关关系,检测结果吻合。**结论** 血清 P53 蛋白浓度升高能较好地反映 p53 基因的突变,对肝癌的临床诊断、治疗和动态监测有一定的临床意义,并可作为 HCC 手术后动态监测和指导临床治疗的一个的生物学指标。

关键词: 肝细胞癌;P53 蛋白;ELISA

中图法分类号: R730.23;R730.43;R735.7 **文献标识码:** A

Serum P53 protein detection for hepatocellular carcinoma patients

CAO Xiao-jing, WANG Dong, ZHANG Qin-hong, ZHONG Zhao-yang, LI Zeng-peng, WANG Ge (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical significance of serum P53 protein level in the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC). Methods Serum P53 protein levels were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for 327 HCC patients, 91 hepatic cirrhosis (HC) patients and 80 healthy subjects. Immunohistochemical staining (IHC) and Western blotting were performed to detect the expression of P53 protein for 130 HCC patients who received biopsy and operation. Receiver operating characteristic curve (ROC) was used to analyze the concordance of serum P53 protein and alpha fetoprotein (AFP) level. Results A significant increase of serum p53 levels was found in HCC patients compared to healthy subjects and HC patients ($P<0.05$). A single band of 53 000 was detected in the corresponding sera by Western blot assay. The elevation of serum P53 protein levels was validated by the results of Western blotting. The coincidence rate of the results by ELISA and IHC was 84.62%. The area under curve (AUC) of P53 protein and AFP was 0.910 and 0.954, respectively (Kappa = 0.657, P = 0.000), suggesting no significant difference exists between the two methods. Conclusion The elevation of serum P53 protein level reflects the mutation of p53 gene. P53 protein can be regarded as the serum tumor marker and used in the prognosis of HCC and the guidance of clinical therapy.

Key words: hepatocellular carcinoma; P53 protein; ELISA

血清学检测是肿瘤早期诊断的重要手段之一。P53 蛋白是 p53 肿瘤抑制基因的表达产物。目前已发现在多种肿瘤中存在 p53 基因异常表达,其突变率可达 40% ~80%[1-3]。p53 基因的突变引起 P53 蛋白空间构象的改变,使之失去了抑制细胞生长的功能,与肿瘤的发生、发展密切相关。已有研究报道血清 P53 蛋白水平与 p53 基因的改变呈正相关,P53 蛋白异常表达的患者多预后不良[4]。

目前对 P53 的研究多采用免疫组织化学法或检测血清中 P53 抗体的含量,而研究血清 P53 蛋白测定意

作者简介:曹晓静,女,河北省保定市人,硕士研究生,主要从事 DNA 损伤修复及肿瘤基因治疗方面的研究。电话:(023)68757151

通信作者:王 东, E-mail:dongwang64@hotmail.com

收稿日期:2008-04-10;修回日期:2008-05-09

义的报道尚不多。本研究采用双抗体夹心 ELISA 方法测定原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者血清 P53 蛋白含量,并结合免疫组化和 Western blot 分析其临床应用价值,同时用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析比较 P53 蛋白检测与甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)检测对 HCC 诊断的结果,探讨 P53 蛋白作为一种肿瘤标志物用于临床诊断及治疗的意义。

1　资料与方法

1.1　临床资料

肝癌组:收集我院 2003 年 12 月至 2008 年 2 月的 327 例肝癌患者。入选标准: 2001 年 9 月召开的第八届全国肝癌学术会议(广州)正式通过的《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》。男性 275 例,年龄 25 ~ 90 岁,平均 55.1 岁;女性 52 例,年龄 32 ~ 80 岁,平均 56.4 岁;男女比例约为 5∶1;272 例为 Ⅱb 期或Ⅲ期,55 例在 Ⅱa 期以下。其中取活检或手术标本行免疫组化检测的有 130 例,行根治性手术切除者 48 例,19 例手术切除术后获 3 个月以上随访。

肝硬化组:收集我院 2004 年 1 月至 2008 年 2 月的 91 例肝硬化患者。入选标准:根据症状、肝功能异常和影像学改变、肝穿刺活检等确诊。包括肝炎后肝硬化 85 例,药物性肝硬化 4 例,酒精性肝硬化 2 例。其中男性 69 例,年龄 23 ~ 79 岁,平均 51.2 岁;女性 22 例,年龄 31 ~ 81 岁,平均 57.25 岁。

对照组:健康体检者 80 例,其中男性 50 例,年龄 25 ~ 63 岁,平均 45.2 岁;女性 30 例,年龄 22 ~ 70 岁,平均 50.6 岁。

以上病例均在检查时或手术前取肘静脉血约 3 ml,待血液充分凝固后 2 h 内 2 000 r/min 离心,收集血清,贮存于 -80 ℃冰箱中待检。

1.2　试剂

人 P53 ELISA 检测试剂盒购自美国 US CNLIFE 公司,鼠抗人 P53 单克隆抗体(DO-1)购自 Santa Cruz 公司,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购自美国 Pierce 生物公司,ECL 发光试剂盒购自 UK GE Healthcare 公司,S-P 免疫组化试剂盒购自北京中杉公司。

1.3　血清 P53 蛋白浓度测定

采用 ELISA 方法检测,实验操作遵循试剂盒提供的使用指导,简述如下:微量反应板预先包被鼠抗 P53 单克隆抗体,每孔先加 100 μl 各标准液和待测血清样品,37 ℃孵育 1 h;再加 100 μl 兔抗 P53 多克隆体,37 ℃孵育 2 h,洗涤 5 次;再加 100 μl HRP-IgG 羊抗兔抗体,37 ℃孵育 1 h,洗涤 5 次;滴加 100 μl TMB 底物溶液,37 ℃避光显色 10 min,最后加 50 μl 终止液;置酶标仪中测吸光度值[$D(450)$],根据标准曲线计算所测血清 P53 蛋白浓度。以健康体检者血清 P53 蛋白浓度 $x + 1.96s$ 为临界值计算阳性率, >临界值为阳性;≤临界值为阴性。

入组者血清均行 C-12 蛋白芯片(湖州数康公司)检查,检测原理为双抗体夹心法,与上述操作步骤类似。取其中 AFP 浓度与血清 P53 蛋白浓度做相关性分析。

1.4　Western blot 检测血清 P53 蛋白

用已做免疫组化的 130 例肝癌患者和健康体检者血清做 Western blot 分析。血清用 5 × 蛋白上样缓冲液处理后,沸水煮 5 min。每孔上样量 15 μl(蛋白含量约 80 μg),SDS-PAGE 分离蛋白,经湿转至 PVDF 膜,恒流 400 mA,2 h。取出 PVDF 膜,1% BSA 封闭,4 ℃过夜;TBST 洗 3 次,鼠抗人 p53 单克隆抗体(DO-1)1∶1 000 稀释,4 ℃孵育过夜;TBST 洗 3 次,HRP 标记羊抗鼠 IgG 1∶20 000 稀释,37 ℃孵育 1 h;TBST 洗 3 次,将膜晾干,至暗室显影后观察结果。并用 Quantity One 软件分析条带的光密度值。

1.5　HE 和免疫组化法检测 P53 蛋白的表达

对已取活检或手术的 130 例标本同时做 HE 染色及免疫组化分析,采用 S-P 法,按试剂说明书进行:鼠抗人 p53 单克隆抗体(DO-1),工作浓度 1∶100,微波热修复,DAB 显色,同时用 PBS 代替一抗作阴性对照,用预实验中已知的 p53 表达阳性片作阳性对照。整个切片观察 10 个高倍视野,阳性细胞数 >10% 即为阳性病例。根据阳性细胞所占百分比不同分 4 级: ≤10% 为阴性, ≤25% 为(+)级, ≤50% 为(++)级, >50% 为(+++)级。

1.6　统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料比较采用 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验;ROC 曲线分析比较 P53 蛋白检测与 AFP 检测对肝癌诊断的一致性。

2　结果

2.1　血清 P53 蛋白浓度定量分析

表 1 显示肝癌组血清 P53 蛋白浓度及阳性率明显高于肝硬化组和对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);肝炎肝硬化组和对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

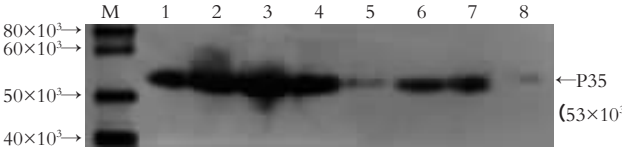
表 1　各组间血清 P53 蛋白浓度

组别	n	P53 浓度(ρ/pg · ml^{-1})	阳性率(%)
肝癌组	327	190.15 ± 44.56	70.43
肝硬化组	91	120.76 ± 38.40[a]	35.26[a]
对照组	80	105.57 ± 12.26[b]	13.37[a]

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与肝癌组比较

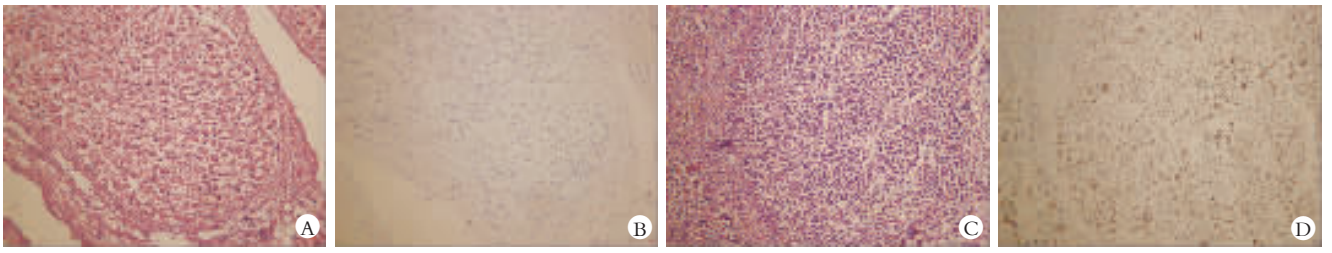
2.2　Western blot 检测结果

我们将 130 例肝癌患者和健康体检者的血清做 Western blot 分析,结果显示在 53×10^3 处可检测到单一的条带(图 1)。用 Quantity One 软件分析,肝癌患者光密度值为(5 136.32 ± 1 355.02,健康体检者光密度值为(1 996.31 ± 876.06)。以健康体检者光密度值 $x + 1.96s$ 为临界值,大于此值定为阳性,阳性率达 75.38%。



M:标准蛋白分子量;1 ~ 4:不同的肝癌患者;5 ~ 8:健康体检者

图 1　肝癌患者及健康体检者血清 Western blot 结果



A:肝硬化 HE 染色;B:肝硬化 P53 免疫组化染色;C:肝细胞癌 HE 染色;D:肝细胞癌 P53 免疫组化染色

图2 P53 蛋白在肝硬化和肝细胞癌组织的表达 (×400)

2.3 免疫组化检测 P53 蛋白表达情况

P53 蛋白阳性表达呈棕黄色颗粒,主要分布在细胞核,极少数在细胞质可见少量表达;130 例中 84 例有 P53 蛋白过度表达(64.62%),其中(+)20 例,(++)51 例,(+++)13 例。突变的 P53 蛋白在癌旁组织和肝硬化组织中均未见表达(图2)。

2.4 3 种方法检测 P53 蛋白表达结果的比较

将上述3种方法的检测结果做 χ^2 检验,结果显示三者之间的差异没有统计学意义($\chi^2=3.724$, $P=0.155$)。ELISA 检测结果与免疫组化检测结果密切相关,符合率达 84.62%,且 ELISA 检测血清 P53 蛋白的含量多少与 Western blot 分析的光密度值大小也是相符的。见表2。

表2 3 种方法检测 P53 蛋白表达结果

检测方法	n	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
ELISA	130	93	37	71.54
免疫组化	130	84	46	64.62
Western blot	130	98	32	75.38

2.5 ROC 曲线分析比较 P53 蛋白检测与 AFP 检测的一致性

对2种检测方法进行 ROC 曲线分析,结果显示 P53 蛋白检测曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.910,AFP 检测 AUC 为 0.954(图3)。二者做相关性分析,Kappa = 0.657, P = 0.000,说明2种方法的检测结果有正相关关系,可认为2种方法的检测结果相吻合。综上所述,P53 蛋白检测的诊断准确度虽略差于 AFP 检测,但仍具有较好的可靠性。

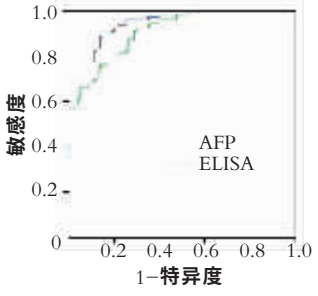


图3 AFP 和 P53 蛋白检测 ROC 曲线

2.6 血清 P53 蛋白表达的动态观察

对19例行手术切除的肝癌患者于术前、术后1周和3个月分别测定血清 P53 蛋白浓度,结果显示,术前血清 P53 蛋白浓度为(260.23 ± 55.23) pg/ml;术后1周 P53 蛋白仍为阳性,但浓度值有所下降,为(208.35 ± 48.37) pg/ml;术后3个月基本降为阴性,为(133.78 ± 37.08) pg/ml。提示血清 P53 蛋白可能对肝癌动态监测有一定的意义。

3 讨论

在人类肿瘤发生中,约 50% 以上与 p53 基因突变有关。p53 是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因。其突变 95% 以上发生在高度保守区内第 5 ~ 8 外显子编码的 130 ~ 290 位氨基酸残基,以 175、248、249、273、282 位点突变率最高[5]。不同的肿瘤又各自有不同的突变位点,表现为突变的特异性。即使在同一肿瘤不同个体也存在突变的多样性。在原发性肝癌中,p53 基因点突变率可达 25% ~ 60%[6]。HCC p53 基因突变存在地区性差异,在中国启东和南部非洲等肝癌高发区,突变率在 50% 以上,而且存在一热点突变,即第 249 位密码子第 3 个碱基 G→T 颠换,研究初步证实这一特征性突变与黄曲霉毒素的摄入有关[7]。慢性乙肝病毒感染合并肝硬化患者是我国 HCC 发生的高危人群。

根据近年来的研究报道推断,HCC 患者血清中可能存在 3 种形式的 P53 蛋白:①突变型 P53 蛋白;②病毒蛋白-P53 蛋白复合物;③野生型 P53 蛋白。由此可知,肿瘤细胞内 P53 蛋白的改变主要是突变型 P53 蛋白和病毒蛋白-P53 蛋白复合物,这 2 种形式的蛋白结构稳定,半衰期长,可在细胞内大量聚积。当机体免疫功能下降时,大量分裂增殖的肿瘤细胞可向周边浸润,部分进入血液循环,并向远处转移,这时聚积的 P53 蛋白可随肿瘤细胞的自溶或胞吐作用释放到胞外,进入血液循环,因而可用 ELISA 方法检测出[8-10]。

国内外已有报道采用 ELISA 方法检测血清 P53 蛋白:Sen 等[11]报道其检测的肺癌患者血清 P53 蛋白阳性率为 3.2%,P53 蛋白浓度从 1 U/ml 到 31.25 U/ml 不等; Attallah 等[12]报道血清 P53 蛋白阳性率在胃肠道肿瘤中达 69%,胆管癌达 100%,胰腺癌为 76%,肝细胞癌为 75%,结肠癌约为 70%。

本实验中,有慢性乙肝病毒感染的肝癌病例占

77.06%(252/327),符合我国流行病学统计资料。检测结果论证了上述推断。其中对照组为(105.57 ± 12.26)pg/ml,反映了正常人血清中野生型 P53 蛋白水平;肝硬化组为(120.76 ± 38.40)pg/ml,反映了野生型 P53 蛋白和病毒蛋白-P53 蛋白复合物水平;肝癌组为(190.15 ± 44.56)pg/ml,反映了血清中 3 种形式 P53 蛋白的总水平;肝癌组血清 P53 蛋白的阳性率为 70.43%,与对照组和肝硬化组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 分析也显示肝癌患者血清 P53 蛋白条带的平均光密度值比健康体检者要高,条带光密度值的高低与血清 P53 蛋白浓度是相符的。免疫组化检测 130 例标本,84 例有 P53 蛋白过度表达(64.62%),突变的 P53 蛋白在癌旁组织和肝硬化组织中均未见表达。本实验结果显示血清 P53 蛋白检测、Western blot 分析及免疫组化三者的检测结果密切相关,差异无统计学意义($P>0.05$),血清 P53 蛋白检测与免疫组化检测的符合率达 84.62%。因此,我们推测肝癌患者血清 P53 蛋白水平间接反映了 p53 基因突变的情况。

ROC 曲线分析因不受患病率和诊断阈值的影响,可对 2 个诊断试验的准确度进行综合比较,因而成为目前公认的诊断试验最佳评价指标[13,14]。本实验结果显示 P53 蛋白检测 AUC 为 0.910,而 AFP 检测 AUC 为 0.954,二者 Kappa = 0.657,$P = 0.000$,说明 2 种方法的检测结果有正相关关系,二者的检测结果相吻合。虽然 P53 蛋白检测的诊断准确度比 AFP 检测稍差,但仍具有较好的可靠性。综上所述,血清 P53 蛋白对肝癌的辅助诊断、临床治疗和基因治疗都具有一定的指导意义,可作为一种血清肿瘤标志物辅助肝癌的诊断和治疗。

p53 基因测序分析是检测 p53 突变的金标准,但由于其技术要求高且费用较高,还很难应用于临床。检测血清中 P53 蛋白表达的方法简便易行,特异性强,目前已有针对突变型 P53 蛋白检测的试剂盒。但是,p53 突变有多种类型,并不是所有的突变均能产生 P53 蛋白的过量表达,而且由于抗体的存在可以加速突变型 P53 蛋白的清除,或减少蛋白在血液中的检出率,造成假阴性[15]。不同研究的 P53 蛋白阳性率差异较大,与研究纳入患者的种族、肿瘤分期、P53 基因突变的部位、类型有关[16],也可能与所选用的试剂盒及临界值不同有关。但通过不断改进检测方法及与其他各项生物学指标的联合应用,血清 P53 蛋白检测仍能取得较理想的结果。本研究为避免单一方法检测造成的偏差,采用 ELISA 检测血清 P53 蛋白的同时,还采用 Western blot 和免疫组化分析 HCC 中 P53 蛋白的表达情况,同时 ELISA 检测 P53 蛋白水平与 C-12 蛋白芯片检测 AFP 浓度做 ROC 曲线分析,从不同侧面反映 p53 的突变情况。4 种检测方法综合分析,结果显示血清 P53 蛋白对 HCC 早期诊断、动态检测等都具有很重要的临床指导意义,可作为一种血清肿瘤标志物指导 HCC 的诊断和治疗。

参考文献:

[1] Diez M, Pollan M, Ramos P, *et al*. Variation in the prognostic value of P53 protein in relation to tumoral stage in patients with colorectal adenocarcinoma [J]. Cir Esp, 2005, 77(4): 213 - 220.

[2] Khan S A, Thomas H C, Toledano M B, *et al*. p53 Mutations in human cholangiocarcinoma: a review [J]. Liver Int, 2005, 25(4): 704 - 716.

[3] 王　东, 史景泉. 肝细胞癌肿瘤抑制基因 p53 过度表达及点突变的研究[J]. 癌症,1997, 16(2): 102 - 104, 107.

[4] Husgafvel-Pursiainen K, Kannio A, Oksa P, *et al*. Mutations, tissue accumulations, and serum levels of p53 in patients with occupational cancers from asbestos and silica exposure [J]. Environ Mol Mutagen, 1997, 30(2): 224 - 230.

[5] Harris C C, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene [J]. N Engl J Med, 1993, 329(18): 1318 - 1327.

[6] 王　东, 张新立, 史景泉. 肝细胞癌肿瘤抑制基因 p53 改变及其与乙型肝炎病毒关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(6): 474 - 477.

[7] 王　东, 史景泉. 肝细胞癌肿瘤抑制基因 p53 过度表达及点突变的研究[J]. 癌症, 1997, 16(2): 102 - 104.

[8] Mocci F, Nettuno M. Plasma mutant-P53 protein and anti-p53 antibody as a marker: an experience in vinyl chloride workers in Italy [J]. J Occup Environ Med, 2006, 48(2): 158 - 164.

[9] Reddy S B, Patel T. Current approaches to the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2006, 8(1): 30 - 37.

[10] 白华龙, 张水军, 赵永福, 等. 原发性肝细胞癌组织中 Livin 和 Smac 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(2): 345 - 347.

[11] Sen E, Gonullu U, Akar N. The detection of quantitative serum P53 protein in lung cancer [J]. Tuberk Toraks, 2005, 53(3): 231 - 237.

[12] Attallah A M, Abdel-Aziz M M, El-Sayed, A M, *et al*. Detection of serum P53 protein in patients with different gastrointestinal cancers [J]. Cancer Detection and Prevention, 2003, 27(2): 127 - 131.

[13] Yonelinas A P, Parks C M. Receiver operating characteristics (ROCs) in recognition memory: a review [J]. Psychol Bull, 2007, 133(5): 800 - 832.

[14] Dwyer A J. In pursuit of a piece of the ROC [J]. Radiology, 1996, 201(3): 621 - 625.

[15] Balogh G A, Maillo D A, Corte M M, *et al*. Mutant P53 protein in serum could be used as a molecular marker in human breast cancer [J]. Int J Oncol, 2006, 28(4): 995 - 1002.

[16] Oh M J, Choi J H, Lee Y H, *et al*. Mutant p53 protein in the serum of patients with cervical carcinoma: correlation with the level of serum epidermal growth factor receptor and prognostic significance [J]. Cancer Lett, 2004, 203(1): 107 - 112.

(编辑　吴培红)