技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)08-1066-04

大肠癌 ER、PR 表达和 DNA 倍体、p53 基因的检测及其临床意义

罗 琪,张颂恩,张诗峰,卢毅卓

(厦门大学附属中山医院 福建医科大学厦门中山教学医院普外科,厦门 361004)

【摘 要】目的:探讨大肠癌(Colorectal cancer)、雌激素受体(Estrogen receptor,ER)、孕激素受体(Progesterone receptor,PR)表达和 DNA 倍体、p53 基因的检测结果与临床分类、预后评估的关系。方法:采用 RBA 法、免疫组织化学方法和流式细胞术对 286 例大肠癌标本分别进行 ER、PR 表达和 p53 基因检测及 DNA 倍体分析并结合患者的临床资料进行分析。结果:ER、PR 表达和 p53 基因检测及 DNA 倍体分析与大肠癌患者预后均有明显相关,差异有极显著性意义($P<0.01$)。DNA 二倍体、p53 基因表达越低其患者预后越好;ER、PR 的表达越强说明肿瘤与激素依赖性越强,肿瘤的生物学行为较好。结论:大肠癌 ER、PR 表达和 p53 基因检测及 DNA 倍体分析有助于大肠癌患者的临床分类及预后评估。

【关键词】大肠癌;雌激素受体;孕激素受体;p53;DNA 倍体

【中国图书分类法分类号】R735.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-03

The detection of ER, PR and DNA ploidy, p53 gene in colorectal cancer and its clinical value

LUO Qi, et al

(*Department of General Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University*)

【Abstract】*Objective*: To study the clinical value of detecting estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and p53 gene, DNA ploidy in colorectal cancer. *Methods*: Combined with clinical data, 286 specimens of colorectal cancer were detected with ER, PR, p53 gene and DNA ploidy analysis by radiobioassay(RBA), immunohistochemistry and flow cytometry. *Results*: The expressions of ER, PR, p53 gene and of DNA ploidy analysis correlated with the prognosis of colorectal cancer patient($P<0.01$). The higher the expressions of ER, PR, P53 gene and DNA ploidy analysis, the better the prognosis. *Conclusion*: The detection of ER, PR, p53 gene and DNA ploidy analysis is useful for clinical classification and prognosis of colorectal cancer.

【Key words】Colorectal cancer; Estrogen receptor; Progesterone receptor; p53; DNA ploidy

大肠癌由于其临床及病理特征的不同,治疗措施及预后也明显不同。近年来雌激素受体(Estrogen receptor,ER)和孕激素受体(Progesterone receptor,PR)的研究在非激素依赖性器官肿瘤也得到拓展。多数学者认为,性激素在某些肿瘤的发生及控制过程中,起到相当重要的作用[1]。雌激素可以看作是一种"生长激素",能使靶器官产生更多的结构蛋白和酶,使细胞增殖和分化。许多作者认为 ER、PR 的测定结果可视为观察胃肠道肿瘤预后的一个因素。另一方面,也有研究发现抑癌基因 p53(野生型)检测及 DNA 倍体类型分析对预后判断有重要意义。本研究通过检测大肠癌组织 p53、DNA 倍体的状况和 ER、PR 表达,探讨它们与大肠癌发生发展的内在联系及其在临床中的实际应用价值。

1 对象与方法

1.1 对象

标本取自 2003 年 3 月至 2007 年 3 月在我院接受结直肠癌手术治疗的 286 例患者。所有标本都经病理证实为结直肠癌并完成 ER、PR、p53 及DNA 倍体检测。286 例患者中男性 191 例,女性 95 例;年龄 18~84 岁,中位年龄 48 岁;Dukes A 期 38 例,Dukes B 期 133 例,Dukes C 期 89 例,Dukes D 期 26 例;右半结肠癌 79 例,左半结肠癌 52 例,直肠癌 155 例;高分化腺癌 87 例,中分化腺癌 153 例,低分化腺

作者介绍:罗 琪(1958-),男,教授,博士,研究方向:消化系统肿瘤。

通讯作者:卢毅卓,男,主治医师,E-mail:docter2@163.com。

基金项目:厦门市卫生局重点科研项目(2003-7-21)。

癌 46 例;术后随访 246 例(86%),随访时间 9～48 个月,中位随访时间 32 个月;其中 3 年生存率为 65.9%,死亡 49 例(死亡率 17.1%,Dukes B 期 6 例,Dukes C 期 20 例,Dukes D 期 23 例),将失访的 40 例归于死亡组,总死亡率为 31.1%。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 标本离体后,即对标本进行解剖,用生理盐水冲洗干净后,取约 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小的肿瘤组织,另在距肿瘤约 10 cm 的部位取约 1 cm × 1 cm × 1 cm 的结直肠粘膜组织(病理证实为正常组织),置于 -41℃ 环境下保存,待检测。

1.2.2 试剂 配体:^{3}H - 雌二醇,活度 3.19 TBq/mmol,纯度 >95%,^{3}H - 孕酮,活度 2.80 TBq/mmol,纯度 >95%,New England Nuclear center 产品。缓冲液:TEDGM、STM。

1.2.3 受体蛋白的制备 将标本组织剪碎,加 TEDGM 缓冲液,高速细胞分散器匀浆,770 r/min 4℃ 离心 10 min,其上清 30 000 r/min 离心 40 min 后所得上清为胞浆,其内含胞浆受体蛋白;首次离心后的沉淀用 STM 悬浮,细胞用尼龙网过滤,770 r/min 离心 10 min,重复 3 次,所得沉淀加 STM 成胞核悬液,其内含胞核受体蛋白。

1.2.4 ER 和 PR 的检测 胞浆及胞核 ER 和 PR 的测定均采用 RBA 法,样品用水浴(37℃)保温 15 min,胞浆受体分析采用 Dcc (Dextran -coated Charcoal technique)法(1%活性碳,0.1%葡聚糖,TEDGM 缓冲液)。胞核受体采用滤膜法,滤膜采用 3 层 9999 型玻璃纤维滤纸(上海红光造纸厂)。滤膜烘干后用液体闪烁计数仪测量其放射性,将测得的总结合值减去非特异结合值即得特异结合值,蛋白浓度按 Lowry 方法测定。

1.2.5 p53 的检测 p53 抗体及免疫组化检测试剂盒(北京中山生物公司);按大肠癌细胞 p53 免疫组化检测按说明书操作。

1.2.6 流式 DNA 倍体分析 组织标本室温下解冻,在 PBS 液中用机械法制成细胞悬液,经 180 目钢网过滤清除残渣,PBS 液洗 2 遍后 70%冷乙醇固定,4℃保存过夜。上机前 PBS 液洗 2 遍,制成浓度为 1×10^6 个 /ml 的细胞悬液,PI 染色 30 min,经 300 目尼龙网过滤后上机检测。用人外周血淋巴细胞作流式细胞仪的校准和外参。采用美国 Coulter 公司 Profile Ⅱ 型流式细胞仪,Muticycle 专业软件分析结果,依据 DNA 指数(DI)判定肿瘤细胞倍性状态,DI=1.0 ± 0.05 为二倍体,超过此范围为异倍体。

1.2.7 统计学方法 所有统计应用 SPSS11.0 统计软件统计。两组间差异应用 t 检验、多组间差异应用方差分析及两组间相关应用相关分析,相关分析用 Spearmen 相关分析。取 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 ER 和 PR 在大肠癌组织中的表达

ER 和 PR 主要在癌细胞核表达,ER 和 PR 的表达随肿瘤浸润深度增加而减少,随肿瘤分化程度降低而减少。ER 和 PR 的表达水平及其与临床和病理之间的关系见表 1。

表 1 ER 和 PR 的表达水平与临床、病理之间的关系

临床及病理	例数	ER					PR				
		-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++
总例数	286										
正常组织	286	103	102	21	60	0	106	110	20	50	0
肿瘤部位											
结肠	131	25	28	51	19	8	31	33	51	10	6
直肠	155	35	35	26	37	22	34	35	35	29	21
肿瘤类型											
溃疡型	186	29	33	55	41	28	46	36	51	34	19
增殖型	57	21	10	11	11	4	15	14	12	10	6
浸润型	43	12	15	10	4	2	10	16	12	4	1
组织类型											
高分化腺癌	87	6	26	27	20	8	20	34	22	8	7
中分化腺癌	153	11	41	52	33	16	19	34	46	36	20
低分化腺癌	46	10	20	8	5	3	12	16	9	7	2
Dukes 分期											
A 期	38	5	7	8	12	6	3	4	11	8	12
B 期	133	31	21	32	32	17	32	28	47	15	11
C 期	89	17	24	22	16	4	25	22	20	19	3
D 期	26	10	8	4	2	2	8	9	5	3	1

表 2 DNA 倍体类型与病理分类的关系

病理	例数	二倍体	异倍体
DukesA	38	33	5
B	133	92	41
C	89	43	46
高、中分化	240	158	82
低分化	46	14	32
淋巴结(+)	115	23	92
淋巴结(-)	171	129	42
生存率(3 年)	197	65.5%	34.5%

2.2 p53 基因检测和 ER 和 PR 的表达与大肠癌临床生物学行为和预后的关系

p53 基因检测和 ER 和 PR 的表达结果显示，p53 基因检测 Dukes A 期突变为 12%、Dukes B 期突变为 22%、Dukes C 期突变为 29%。p53 基因检测和 ER 和 PR 的表达水平与大肠癌患者肿瘤部位、大体类型等无明显相关性(r<0.40, P>0.05)，但与 Dukes 分期、组织学类型有关，Dukes 分期越低，组织分化越低，p53 基因检测率越低和 ER 和 PR 的表达水平越低(r>0.56, P<0.01)有明显相关性。

2.3 大肠癌 DNA 倍体类型与病理分类的关系

286 例中 Dukes A 期 DNA 异倍体率明显低于 C 期(P<0.01)；高分化、中分化腺癌的异倍体率明显低于低分化腺癌(P<0.01)；淋巴结转移组的异倍体率显著高于无淋巴结转移组(P<0.01)，异倍体生存率 65.5%(129/197)明显低于二倍体 34.5%(68/197)(P<0.01)(表 2)。

2.4 DNA 倍体、p53 基因检测和 ER、PR 的表达水平与大肠癌患者生存率的关系

本组患者行根治性术后 3 年生存率为 65.9%。利用回归分析进行多因素生存分析表明，DNA 倍体分析、p53 基因检测和 ER、PR 的表达水平与结、直肠癌患者预后均有明显相关，差异有显著性意义(P<0.01)。DNA 二倍体、p53 基因检测率越高和 ER、PR 的表达水平越高其患者预后越好；相反则患者预后越差。

3 讨 论

20 世纪 70 年代以来有文献报道人结直肠癌组织中存在 ER、PR。此后，ER、PR 在结直肠癌组织的表达及其临床生物学意义日益受到人们的关注[2]。一些流行病学资料显示结直肠癌和乳腺癌发病有相关性，Nanda 报道应用抑制雌激素(单用或联用孕激素)替代疗法估计可减少绝经期妇女患结肠癌的风险 30%~40%。另有研究报道应用抑制雌激素替代疗法对结肠癌有保护效应。Harrison 等报道生理剂量的雌激素可以促进人结直肠癌细胞株的生长，用他莫昔芬后可以抑制其生长。这些研究表明结直肠癌与雌激素密切相关。本研究应用 RBA 法定量测定 286 例结直肠癌组织及正常组织的 ER、PR，结果示 286 例标本的结直肠癌组织及正常结直肠组织都可表达 ER、PR；但正常结直肠组织表达低呈弱阳性而结直肠癌组织 ER、PR 表达明显高于正常组织，胞核 ER、PR 的表达高于胞浆。表明结直肠癌组织表达 ER、PR 主要在胞核中表达，这与很多免疫组化法的结果相似，且符合甾体激素作用的“二步机制”学说[3,4]，即甾体激素通过扩散方式穿过细胞膜进入胞浆，与胞浆内特异性受体蛋白结合，形成激素受体复合物，然后依赖温度的变构很快移位于细胞核内与染色质结合从而影响 DNA 转录，产生新的 mRNA，在基因水平上调节大分子合成，最终发挥一系列相应的生物效应。

消化系统肿瘤传统概念属于非激素依赖性[5]，故对其组织中 ER、PR 存在的意义，目前的认识尚不一致[5,6]。就雌激素与大肠癌的关系而言，肿瘤组织内雌激素受体存在与否是判该肿瘤对雌激素依赖的关键，若大肠癌组织中存在雌激素受体，则说明该肿瘤有雌激素依赖性，应用内分泌治疗就有可能抑制它的发展。本组资料显示，大肠癌组织确有 ER、PR 的阳性表达，这一结果支持部分大肠癌具有激素依赖性的观点。大多数学者认为，ER、PR 的阳性表达与大肠癌患者的性别、年龄及肿瘤发生部位无相关性，本实验结果亦证实了这一点。实验中已

知 ER、PR 的阳性表达并非大肠癌组织所特有，并且在部分正常的大肠组织中亦有 ER、PR 的阳性表达，但正常结直肠组织表达程度低呈弱阳性表现，故其对大肠癌的诊断意义有限。然而 ER、PR 与大肠癌病理学特点的关系一直是大家感兴趣的问题。本文研究表明，ER、PR 的阳性表达与肿瘤浸润深度及分化程度有相关性。肿瘤生长于浆膜层内者 ER、PR 阳性率比肿瘤已浸润至浆膜层外者高；高、中分化腺癌者 ER、PR 阳性率比低分化腺癌者高。ER、PR 的表达从高降低，说明肿瘤细胞已获取了更大量的雌激素和孕激素，使肿瘤细胞脱离了激素依赖性，在雌激素和孕激素的作用下肿瘤生长迅速不易控制，预后不佳。说明 ER、PR 阳性的大肠癌可能有较好的生物学行为。我们认为，ER、PR 是大肠细胞分化的一种标志，在肿瘤的发生发展过程中，由于肿瘤细胞在遗传上的不稳定性，必然造成异质性，那些去分化明显、有较高侵袭性的肿瘤细胞克隆取代分化较好，较低侵袭性的细胞。因此，ER、PR 可以作为肿瘤分化程度及判断预后情况的一个客观指标。p53 基因是多种恶性肿瘤中十分常见的共同基因损伤靶位，野生型 p53 基因在维持细胞正常生长，抑制恶性肿瘤增殖过程中起重要作用。发生突变时转变为突变型 p53，其纯合子和半纯合子失去了细胞生长抑制功能而使细胞癌变。p53 基因异常与人类肿瘤特别是大肠癌、乳腺癌的发生发展有密切关系。约 50%的大肠癌发生 p53 基因突变，染色体在 5q 和 17p 等位基因的丢失在 25%~70%之间。文献报道，直接对 DNA 或 cDNA 分析发现，98%的大肠癌患者 p53 基因突变[7]。本组 p53 基因突变率为 63%。p53 基因过度表达者生存期延长，尤其在远端大肠癌和 DukesB、C 期患者中更明显。研究证实 p53 基因过度表达者预后好。因此，p53 基因检测对判断预后有重要意义。我们认为，在临床上检测 ER、PR、p53 可作为观察大肠癌患者预后的重要指标。

DNA 倍体异常在结直肠癌发生发展中起重要的作用。大多数研究显示 17p、18q 上存在等位基因缺失和 p53 基因突变[8,9]。临床上即使 Dukes 分期相同的肿瘤，由于肿瘤的生物学行为不尽相同，其预后仍有较大差异。流式细胞术 DNA 倍体分析已广泛用于结直肠患者预后的判断，虽然其预后价值尚不能肯定，但大多数研究者认为 DNA 二倍体肿瘤患者较异倍体患者有较好的生存期[9,10]。我们研究分析了我院 286 例根治性手术患者的 DNA 倍体与预后的关系，全组中位随访时间 32 个月，DNA 异倍体肿瘤患者术后总生存率明显低于二倍体患者（$P<0.01$），淋巴结(+)异倍体增加，提示 DNA 异倍体与结直肠癌不良预后有关。

本研究结果表明结直肠癌组织 ER、PR 表达高于正常组织，提示结直肠癌组织中 ER、PR 具有活性；结直肠癌的预后与 p53 基因突变，DNA 二倍体密切相关。DNA 二倍体、p53 基因检测越高其患者预后越好；ER、PR 的表达水平越强说明肿瘤与激素依赖性越强，肿瘤的生物学行为较好。本研究结果为进一步开展结直肠癌内分泌治疗提供理论依据。结直肠癌组织 ER、PR 表达水平尚不能作为结直肠癌恶性程度的单一指标。对于 ER、PR 在结直肠癌发生、发展过程中的作用及机制，尚需用基因敲除等技术进一步深入研究阐明。

参 考 文 献

[1] 华长江，殷广福，许正昌，等.大肠癌雌激素受体和孕酮受体表达及 DNA 倍体的预后意义[J].临床肿瘤学杂志，1999，4(1)：38-39.

[2] 周志伟，万德森，王国强，等.结直肠癌雌激素受体及孕激素受体的定量研究[J].癌症，2004，23(7)：851-854.

[3] Slattery M L，Samowitz W S，Holden J A. Estrogen and progesterone receptors in colon tumors. [J]. Am J Clin Pathol，2000，113(3)：364-368.

[4] Cavallini A，Messa C，Pricci M，et al. Distribution of estrogen receptor suhtypes，expression of their variant forms and clinicopathological characteristics of human colorectal cancer [J]. Dig Dis Sci，2002，47 (12)：2720 -2728.

[5] 吴小翎，张小雨.胃癌及癌前病变组织中雌激素受体和 P21 ras 的表达及意义[J].重庆医科大学学报，2000，25(3)：239-241.

[6] 秦自科，万德森，连俊彦，等. nm23 蛋白和雌激素受体的表达与大肠癌预后的关系[J].中华外科杂志，2000，38(7)：514-516.

[7] 许少峰，付 丽.p53 研究的新进展[J].中华病理学杂志，2004，33(6)：559-561.

[8] Sun X F，Rutten S，Zhang H，et al.Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma[J]. JClin Oncol，1999，17(6)：1745-1750.

[9] Chapman M A，Hardcastle J D，Armitage N C，et al. Five-year prospective study of DNA tumor ploidy and colorectal cancer survival[J]. Cancer，1995，76(3)：383-387.

[10] 王洪义，顾 晋，金 山，等.DNA 倍体分析对结直肠癌预后的判断价值[J].中华胃肠外科杂志，2002，5(1)：67-69.

（责任编辑：关蕴良）