362-364

维普资讯 http://www.cqvip.com

(11)

文章编号：0253-3626(2000)04-0362-03

R737.330.2

子宫内膜腺癌P53蛋白与基因突变的研究

何 畏[1]，魏丽惠[2]，卞度宏[1]，王建六[2]，富 琪[2]，庹 幸[2]

（1. 重庆医科大学临床学院妇产科 重庆 400016；2. 北京医科大学人民医院妇产科 北京 100038）

摘 要：目的 研究p53基因突变对子宫内膜腺癌临床病理特点及转归的影响。方法 运用免疫组化染色和聚合酶联反应-单链构象多态性分析（PCR-SSCP），检测子宫内膜腺癌患者P53的蛋白表达与基因突变。结果 子宫内膜腺癌患者P53蛋白表达阳性率为34.15%，阳性者5年存活率明显低于阴性者（P=0.037），核过表达仅与组织分化相关，而与患者年龄、分期、浸肌程度、淋巴结转移、附件转移均无关（P> 0.05）；肿瘤患者p53突变率23.08%，且集中在外显子7、5、6；两法的一致率高（76.92%）。结论 P53突变与子宫内膜癌组织分化有关，与临床预后有关。

关键词：子宫内膜癌；p53；基因突变 p53蛋白

中国图书分类法分类号：R730.231 **文献标识码**：A **收稿日期**：2000-03-14

腺

P53 overexpression and mutation in endometrial carcinoma

HE Wei, et al

（Department of Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016）

Abstract: **Objective** To investigate p53 gene mutations in endometrial carcinoma (EC) and their correlation with clinical features and prognosis. **Methods** Using immunohistochemical staining (IMH) and polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) methods, examine the protein expression and gene mutation of p53 in EC. **Results** The general positive rate of P53 protein was 34.15%. The expression of p53 was not correlated with age, clinical stage, myometrial invasion, lymph node or ovarian metastasis (P >0.05), but the pathologic grade (P<0.05). Survival curves determined by Kaplan-Meier method showed that p53 overexpression was associated with a poor prognosis in EC (P<0.05). The positive rates of p53 gene mutation was 23.08% in EC, and the mutation were located on exon 5, 6, and 7. The concordance rate of IMH and PCR-SSCP was 76.92%. **Conclusion** The mutation of p53 gene were associated with the pathologic grade and poor prognosis in EC.

Key Words: Endometrial carcinoma; p53; gene mutation

子宫内膜癌是常见的妇科恶性肿瘤之一，且发病率呈上升趋势，但是有关其癌变的分子机制尚不清楚。作为人类肿瘤中最常见的抑癌基因p53在子宫内膜癌中的作用迄今为止国外报道观点不一，且国内报道甚少，主要限于P53蛋白的研究。本文旨在进一步探讨P53蛋白与基因突变对子宫内膜腺癌临床病理特点及转归的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料：收集本院1991～1998年收治的子宫内膜腺癌患者41例，平均年龄55.58岁，五年存活率63.42%。所有病例均按FIGO1989年手术病理分期标准核实：I期18例、II期9例、III期10例、IV期4例；G1 18例、G2 14例、G3 9例。38例为手术标本（扩大或广泛子宫+双附件切除术+盆腹腔淋巴结清除术；术前未经治疗、术后孕激素治疗结合放疗和/或化疗），另3例为诊断性刮宫标本（仅行孕激素治疗结合放疗和/或化疗）。随访时间6～84月。取20例妇科良性肿瘤患者（子宫肌瘤和卵巢囊肿各10例）的子宫内膜作对照。

1.1.2 主要试剂：P53（AB-6）单克隆抗体（ONCOGENE公司产品），SP试剂盒（DAKO公司产品），Taq DNA多聚酶（SANGO公司产品）。

P53引物在军科院微生物所合成，序列如下：

外显子5：正义链5'TTCCACTTCCTGCAGTACTC—3'

反义链5'GCAAATTTCCTTCCACTCGG—3'

外显子6：正义链5'AGTTGCAAACCAGACCTCAG—3'

反义链5'ACCATGAGCGCTGCTCAGAT—3'

外显子7：正义链5'GTGTTGCTCCTAGGTTGGC—3'

反义链5'CAAGTGGCTCCTGACCTGGA-3'

基金项目：美国中华医学会奖学金项目（北医奖学金第022号）

作者介绍：何 畏（1970- ），女，主治医师，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

外显子8：正义链5'CCTACCCTGAGTAGTGGTAA-3'
反义链5'CCAAGACTTAGTACCTGAAG-3'

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色（SP法）：根据试剂盒说明完成染色。光镜下观察肿瘤细胞核内出现棕黄色颗粒或团块为阳性，0～25%为（+）、25%～50%为（++）、50%以上为（+++）。（++）以上为核强染，癌细胞核内无染色为阴性。实验同时设置阳性和阴性对照。

1.2.2 聚合酶链反应（PCR）：从41例中任选26例子宫内膜腺癌标本（I期9例、II期6例、III期7例、IV期4例；$G_1$4例、$G_2$7例、$G_3$5例），取6微米/片的子宫内膜腺癌石蜡切片5～10片，常规法提取DNA，按50μl体系加入反应物（引物、dNTP、Taq DNA多聚酶、缓冲液、Mg^{2+}、三蒸水）。反应条件为94℃预变性10min，94℃变性50s，55℃复性50s，72℃延伸30s。35次循环后再延伸7min。扩增产物保存在4℃。同法另取5例正常内膜组织作为对照。

1.2.3 聚合酶链反应-单链构象多态性分析（PCR-SSCP）：取PCR产物10μl与上样缓冲液混合煮沸后，于冰浴中快速上样于8%非变性聚丙烯酰胺凝胶，恒压200V电泳2h。电泳完毕后卸胶于平皿，依次加入10%乙醇、1%硝酸、染色液、显色液，灯下观察显色程度，待条带清晰后加10%乙酸终止反应，观察分析单链构象。每次电泳以正常内膜的扩增产物做对照，若同时电泳的肿瘤组织与正常相比显示条带增多或减少、或位置移动说明该肿瘤标本存在基因突变（每一样本均多次重复）。

1.3 统计学处理

采用计数资料的精确χ^2检验、率检验，并行Kaplan-Meier生存曲线分析及时序检验。以双侧0.05作为显著性检验标准。

2 结 果

2.1 P53蛋白的免疫组化检测

20例正常子宫内膜无一例P53染色（阴性）；41例子宫内膜腺癌组织的P53阳性率为34.15%（14/41），其中核强染10例。核过表达率与患者年龄、分期、浸肌程度、淋巴结转移、附件转移均无关（$P>0.05$）；仅与组织分化相关。在高分化（G_1）的肿瘤中P53阳性率明显低于中低分化肿瘤（G_{2+3}）。见表。

2.2 p53基因突变的检测

PCR-SSCP法检测5例正常内膜均未发现突变，而子宫内膜腺癌组织的p53突变率为23.08%（6/26），其中外显子5突变2例，外显子6突变1例，外显子7突变3例、外显子8未发现突变；I期、II期、III期、IV期的突变率分别为1/9、1/6、3/7、1/4；G_1、G_2、G_3的突变率分别为3/14、2/7、1/5；淋巴结转移的4例中1例显示突变，附件转移的4例中未发现有突变。见图1。

表 41例子宫内膜腺癌P53蛋白的结果

类别		例数	P53蛋白		P
			阳性	阴性	
年龄	>50	18	5	13	NS
	≤50	23	9	14	
分期	I+II期	28	8	20	NS
	III+IV期	13	6	7	
病理分级	G_1	18	3	15	0.037
	G_{2+3}	23	11	12	
肌层浸润度	>1/2	13	7	6	NS
	≤1/2	25	7	18	
淋巴结转移	阳性	4	2	2	NS
	阴性	34	12	22	
附件转移	阳性	4	2	2	NS
	阴性	34	12	22	

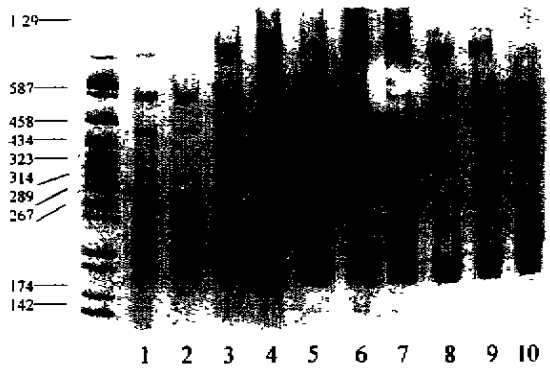


图1 PCR-SSCP检测P53基因第7外显子的图象
2、7号标本可见异常泳动带

2.3 P53免疫组化与PCR-SSCP的比较

两者的一致率为76.92%（20/26），差异率为23.08%（6/26）。两法在子宫内膜腺癌的突变检测中有明显相关性（$P=0.004$）。所有PCR-SSCP阳性标本均为P53蛋白组化显示核强染；PCR-SSCP阴性标本中P53组化阳性有6例，其中核强染2例。

2.4 生存率的比较

P53蛋白阳性者5年生存率为59.26%；而P53蛋白阴性者5年生存率为81.49%。两者差异显著（$P=0.037$）。见图2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

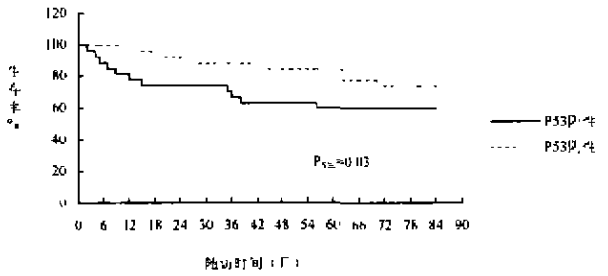


图2 子宫内膜腺癌P53阳性患者与阴性患者的生存曲线

3 讨 论

人类p53基因定位于染色体17p13，含11个外显子和10个内含子，其正常基因产物（野生型）位于核内，是一种转录因子，通过生长抑制、诱导细胞调亡、促进细胞终末分化达到抑制肿瘤的作用。此外，它还在维持机体基因组稳定性中发挥重要作用。当p53发生基因突变后，其蛋白产物不仅丧失特有的抑瘤作用，而且具有致瘤作用。因此，它与肿瘤的关系一直是研究的焦点。许多人类和动物肿瘤中都有p53基因丢失和/或突变，其突变多集中于第5-8外显子。本研究运用的p53（AB-6）抗体可同时识别野生型和突变型P53蛋白，由于野生型蛋白半衰期短且量少，难以测量，故文中免疫组化法测得阳性结果应代表突变型蛋白。PCR-SSCP法利用P53热点突变集中在外显子5-8，检测p53突变的敏感率可高达95%，但相对方法繁琐。本文结果表明子宫内膜腺癌P53蛋白阳性率为34.15%，基因突变率为23.07%与Schneider、Enomoto等报道类似[1-2]，同时还发现P53的核过表达率仅与组织分化相关，这一结果与Enomoto等、Soong等[3]人的报道不完全一致，可能与病理类型不同、所用P53单抗不同有关。实验未检出p53第8外显子突变，间接证实了子宫内膜癌p53的第8外显子突变多发生在浆液性、透明细胞癌等类型[4]。此外，由于在不同分期的肿瘤中p53检出率无差异，尚不能推断它与肿瘤发生密切相关，但突变P53的持续表达对肿瘤细胞有利[5]。

P53蛋白阳性患者3年、5年生存率明显低于P53阴性者，说明它对预后的提示有重要作用。这一结果与文献相似[6-7]。原因可能包括：P53突变和等位基因丢失更易产生对化疗药物耐受和放疗的不敏感，从而影响临床治疗；其二野生型P53是一些肿瘤放、化疗时凋亡反应必需的，突变后肿瘤细胞凋亡机制出现障碍。因此，建议临床上以P53作为常规指标用于子宫内膜癌的预后预测和高危患者的筛选。

由于野生型p53稳定性增高时也可被显色（假阳性），免疫组化的结果是否反应真实突变呢？本研究表明对于子宫内膜腺癌，P53蛋白免疫组化法与PCR-SSCP检测突变的结果有良好的一致性，临床上运用快速、简便的免疫组化技术检测是可行的。

参 考 文 献

[1] Schneider J, Rubio MP. Rodrignez-Escudero FJ, et al. Identification of p53 mutations by means of singlestrand conformation polymorphism analysis in gynaecological tumors: comparison with the result of immunohistochemistry[J]. Eur J Cancer 1994; 30A:504-508.

[2] Enomoto T, Fujita M, Inove M, et al. Alteration of p53 tumor suppressor gene and its association with activation of the c -K-ras -2 protooncogene in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium[J]. Cancer Res 1993;53:1883-1888.

[3] Soong R, Knowles S, Williams KE, et al. Overexpressioin of p53 protein is an independent prognostic indicator in human endometrial carcinoma[J].Br J Cancer 1996;74:562-567.

[4] Lm SF, Pizer ES. Ronnett BM, et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrial carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous,mucinous,secretory,and ciliated cell differeatiation[J]. Hum Pathol 1998;29:924-931.

[5] Jiko K, Sasano H, Ito K, et al. Immunochemical and in situ hybridization analysis of P53 in human endometrial carcinoma of the uterus[J].Anticancer Res 1993;13:305-310.

[6] Ho K, Sasano H, Matsunaga G, et al. Correlation between p21 expression and clinicopathological findings,p53 gene and protein alterations,and survival in patients with endometrial carcinoma[J]. J Pathol 1997;183:318-324.

[7] Coppola D,Fu L,Nicosia SV,et al.Prognostic significance of p53 ,bcl-2,vimentin ,and S100 protein-positive langerhas cells in endometrial carcinoma[J].Hum Pathol 1998;29(5):455-462.