DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.010

人肝细胞癌 p53蛋白免疫组化研究

王 东 史景泉* 柳凤轩** (第三军医大学附属大坪医院病理科) 重庆, 630042

提 要 目的: 探讨 p53基因突变与肝细胞癌 (HCC)发生发展的关系。方法: 应用敏感的免疫组化方法检测 80例人原发性肝癌及其癌旁组织 (包括正常肝组织、肝硬化组织及不典型增生肝细胞) p53基因蛋白的表达。结果: 80例肝癌组织中 35例 p53蛋白阳性,阳性反应产物主要位于细胞核,其对应癌旁组织未见 p53蛋白的表达。p53蛋白的阳性表达与肝癌的转移显著相关,但与肿瘤大小及分化程度无关。结论: 结果表明 p53蛋白过度表达不一定是肝癌进展的晚期事件,作为肿瘤的侵袭表型,可能在肝癌发生的早期业已存在。

关键词 肝细胞癌; p53; 免疫组化

中图法分类号 R735.7

正常情况下 p53蛋白的半衰期极短 (5 min~ 20 min),用一般方法不能检测。只有当 p53基因发生突变时,突变型 p53蛋白半衰期延长而在细胞核内聚集,即可用免疫组化方法检测。因此,一般认为用免疫组化方法检测到 p53蛋白的高表达,即反映了 p53基因有突变的发生。用免疫组化方法在众多肿瘤中,如在肺癌、乳腺癌和结肠癌都发现有 p53蛋白的高表达[1]。而有关人肝细胞癌 (HCC)的研究尚不多见[2,3]。

本研究应用一种敏感的免疫组化方法检测本地区 80例 HCCs石蜡切片中 p53蛋白的表达水平,旨在从蛋白水平间接检测 p53基因的突变,并进一步探讨 p53基因突变与 HCC发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 病例及标本

收集本校附属西南医院 1988年~ 1993年 HCC标本 80例。常规福尔马林固定,石蜡切片。按 WHO肿瘤国际组织学分类标准: 梁状型 23例,假腺管型 31例,实团型 22例,纤维硬化型 4例。其分化程度分别为高分化 23例,中等分化者 29例,低分化 28例。手术时发现肝内转移 29例,肝外转移者 1例,共计 30例。

1.2 试剂来源

单克隆抗体 Pab1801,能识别人 p53多肽中位于第 32~ 73氨基酸残基之间的抗原决定簇,与野生型和突变型 p53蛋白均起反应 (英国 ICRF Crowford博士惠赠)。多克隆抗体 CM-1能识别 p53蛋白全长序列 (英国 Dundee大学 Lane博士惠赠)。所用 ABC试剂盒为丹麦 DAKO公司产品。

1.3 免疫组化染色

参照文献 [4]报道的提高免疫组化染色强度的方法进行: ① 石蜡切片 5μm,常规脱蜡。② 将切片放入含 1%硫酸锌的 PBS的溶液中,微波炉加热 95℃, 10 min。③ 室温冷却 15 min,分别用蒸馏水和 PBS洗涤。④ 以下步骤按常规 ABC方法进行。用 PBS代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定及统计学处理

以细胞核或细胞浆有明确棕黄或棕褐色着色为阳性细胞,整个切片观察 10个高倍视野,表达阳性信号的细胞> 10个即为阳性病例。四格表 χ^2 检验作统计学处理, $P < 0.05$为相差显著。

2 结果

2.1 HCC组织中 p53蛋白的表达

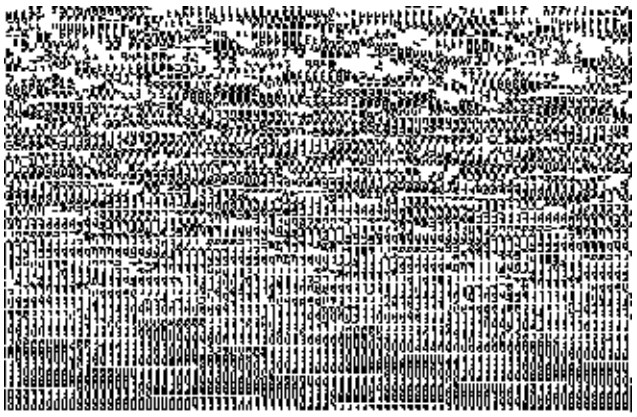
80例 HCCs组织经免疫组化染色, 35例有 p53蛋白的过度表达 (43.8%),在其对应的癌旁组织中,包括正常肝组织、肝硬化组织和不典型增生肝细胞均未见 p53蛋白的表达。p53蛋白主要定位于肿瘤细胞核,见图 1,在个别病例亦可见于部分细胞胞浆,见图 2。

Pab1801和 CM-1两种抗体染色结果基本一致,后者的染色强度有时略强些。肝癌组织中 p53蛋白的表达呈明显的异质性,阳性细胞或弥散分布,或灶性、单个散在分布。替代对照实验阴性。

* 病理学教研室

** 附属西南医院病理科

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



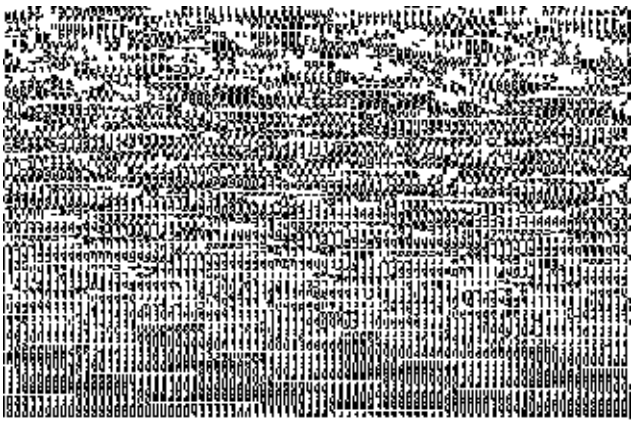


图 1 中等分化肝癌细胞核 p53蛋白弥漫阳性 CM-1免疫组化染色× 400

Fig 1 Moderately differentiated HCC showing p53 nuclear staining of tumor cells in diffuse pattern Immunostaining with CM-1× 400

图 2 高分化肝癌细胞核 p53蛋白散在阳性 Pab1801免疫组化染色× 400

Fig 2 Well differantiated HCC showing p53 nuclear staining of tumor cells in scatred pattern, Cytoplasmic staining is also seen in occasional cells Immunostaining with Pab1801× 400

2.2 p53蛋白表达与肿瘤大小的关系

80例 HCCs中肿瘤直径≤ 3 cm 11例, 3 cm~ 5 cm者 19例,≥ 5 cm者 50例。p53蛋白染色阳性分别为 7,5和 23例。统计学检验差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 p53蛋白表达与组织学类型及分化程度的关系

80例 HCCs p53蛋白染色阳性者分别为梁状型 8例,假腺管型 17例,实团型 8例,纤维硬化型 2例;高分化者 7例,中等分化者 18例,低分化者 15例。统计学检验差异无显著性。

2.4 p53蛋白表达与肿瘤转移的关系

35例 p53蛋白阳性病例中肝内转移者 19例,肝外转移者 1例(57.1%),45例阴性病例中肝内转移者 10例(22.2%)。两者相差极为显著($P < 0.01$),表明 p53蛋白高表达与肝癌转移密切相关。

3 讨论

3.1 p53蛋白表达与 p53基因突变的关系

很多的研究表明 p53蛋白的过度表达与 p53基因的突变密切相关。在中国启东[5]和南部非洲约 50%的肝癌存在 p53基因的点突变,并且大多数为第 7外显子 249位密码子的第 3个碱基发生 G→ T颠换突变(Transversion),从而引起其编码的精氨酸被丝氨酸替换。在对人乳腺癌细胞系 BT549的研究中,有作者证实用 Pab1801能够检测到上述这种突变型蛋白。我们的结果也表明当 p53基因发生 249位密码子突变时,免疫组化即为阳性反应。因此,应用敏感的免疫组化方法检测肿瘤的 p53蛋白水平,借以反映 p53基因的突变,不失为一种有价值的方法。

HCC中 p53基因的突变位点变化很大,要从分子水平探讨 p53基因结构的变化,常需要极其复杂地 DNA测序分析。与之相比免疫组化方法显得简单实用,尤其适用于肿瘤回顾性材料和大宗样本分析。值得注意的是用免疫组化方法检测 p53基因突变,有时会出现假阴性或 和假阳性结果。假阴性结果主要是由于 p53基因序列中的碱基改变产生终止密码,或两个等位基因全部缺失,而当 p53蛋白和其它人体或病毒蛋白形成复合物,或 p53蛋白降解的酶系统失活时,则可出现假阳性结果。尽管如此,用敏感的免疫组化方法检测 p53蛋白的表达,在反映 p53基因突变方面仍有着重要的价值。

3.2 p53蛋白表达和肝癌发生发展的关系

来自不同类型肿瘤的研究结果表明, p53基因突变可以是肿瘤发生早期或晚期事件,但其与肝癌进展的关系目前尚难确定。Friend等在一种显性遗传性家族癌综合征—— Li-Fraumei综合征(LFS)患者正常皮肤成纤维细胞中发现 p53基因点突变,从而第一次为 p53基因可遗传性的变异提供了佐证。由于癌周肝硬化组织及不典型增生的肝细胞中未发现 p53基因可遗传性的变异提供了佐证。由于癌周肝硬化组织及不典型增生的肝细胞中未发现 p53蛋白的异常表达,提示

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

p53基因的改变发生在肝癌启动阶段之后。Murakari等[6]的研究发现在 22例晚期肝癌中有 8例 p53基因的缺失或突变,而 21例早期肝癌未见 p53基因的异常,从而提出 p53基因的改变可能是肝癌进展的晚期事件,与肿瘤侵袭转移有关。我们的结果与此并不完全一致: p53蛋白表达,一方面与肝癌转移密切相关;另一方面与肝癌分化及大小无关,令人感兴趣的是在 7例直径≤ 3 cm的肝癌中有 4例 p53蛋白染色阳性。Bressac等[7]在 7株 HCC细胞系中,亦发现一株肝癌细胞的早期即有 p53基因的改变。因此,我们认为 p53基因的改变并不一定发生在肝癌进展的晚期,很可能在肝癌早期业已存在,提示肿瘤的高侵袭的高转移潜能。

参考文献

1 Porter P L. Gown A M, Kramp S G *et al*. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. Am J Pathol, 1992; 140(1): 145

2 Laurent-Puig P, Fiejou J F, Fabre M *et al*. Overexpression of p53: A rare event in a large series of white patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology, 1992; 16(5): 1171

3 Choi S W, Hytiroglou P, Geller S A *et al*. The expression of p53 antigen in primary malignant epithelial tumors of the liver: An immunohistochemical study. Liver, 1993; 13: 172

4 王　东,史景泉.石蜡切片 ARF免疫组化检测 p53蛋白的初步报告.第三军医大学学报, 1994; 16(1): 52

5 Hsu L C, Metcalf R A, Sun T *et al*. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. Nature, 1991; 350: 427

6 Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S *et al*. Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. Cancer Res, 1991; 51: 5520

7 Bressac B, Galvin K. M Liang T. J *et al*. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. Proc Natl Acad Sci. USA, 1990; 87: 1973

(收稿: 1996-11-13;修回: 1997-02-16)

(编辑　刘　鹏)

Study of p53 protein expression in human hepatocellular carcinoma with immunohistochemistry

Wang Dong, Shi Jinquan*, Liu Fengxuan** (Department of Clinical Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract **Objective**: To investigate the relationship between the mutation of p53 protein and the occurrence and development of human hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods**: p53 protein expression in cancerous tissue and its surrounding tissues in 80 cases of HCC was detected with a sensitive immunohistochemical method. **Results**: Nuclear immunostaining of the hepatocytes for p53 protein was positive in 35 out of the 80 cases and none of the cells in the surrounding tissues was positive. p53 protein expression was significantly correlated to metastasis of HCC but not correlated to the size and differentiation of HCC. **Conclusion**: The overexpression of p53 may not occur in the late stage of HCC but may be a sign of aggressive phenotype of HCC existing in the early stage of the carcinoma.

Key words hepatocellular carcinoma; immunohistochemistry; p53.

* Department of Pathology, Third Military Medical University

** Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net