DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.019

P53及 Bcl-2蛋白在大肠腺瘤及腺癌中的表达

梁智勇* 柳凤轩 刘丽梅 贺光友 闫晓初 (第三军医大学附属西南医院病理科)重庆,400038

提 要 目的:检测大肠腺瘤及腺癌中 P53蛋白及 Bcl-2蛋白的表达,探讨 p53基因、bcl-2基因在大肠癌发生发展过程中的作用。方法:应用免疫组织化学 ABC法检测 10例正常大肠粘膜、30例大肠腺瘤、100例大肠腺癌及癌旁粘膜中 P53蛋白及 Bcl-2蛋白的表达。结果:大肠腺瘤 P53、Bcl-2蛋白阳性率分别为 26.7%及 76.7%,大肠腺癌 P53、Bcl-2蛋白阳性率分别为 43%及 67%,均显著高于正常粘膜与癌旁粘膜($P<0.01$);随着腺瘤不典型增生程度的加重,P53蛋白阳性率显著增高($P<0.01$),而 Bcl-2蛋白表达与腺瘤分级无关;大肠腺癌 P53蛋白阳性率显著高于腺瘤Ⅰ级不典型增生($P<0.01$),与Ⅱ、Ⅲ级不典型增生间差异无统计学意义($P>0.05$),分化差的大肠腺癌 P53蛋白阳性率显著高于分化好的大肠腺癌($P<0.01$),而分化差的大肠腺癌 Bcl-2蛋白阳性率显著低于分化好的大肠腺癌($P<0.05$),大肠腺癌 P53、Bcl-2蛋白表达呈负相关($P<0.05$);P53蛋白表达患者复发率高、5年生存率低($P<0.05$),Bcl-2蛋白过度表达的大肠癌患者复发率低、5年生存率高($P<0.05$)。结论:bcl-2基因主要在大肠癌发生过程的早期起作用,p53基因突变主要在腺瘤转化为腺癌的过程中其作用,并与大肠癌的侵袭发展有关;P53蛋白表达的大肠癌患者预后差,Bcl-2蛋白表达的大肠癌患者预后好,二者可以作为判断大肠癌预后的参考指标;突变型 p53基因可能对 bcl-2基因有负性调控作用。

关键词 大肠肿瘤;癌基因;P53蛋白;Bcl-2蛋白
中图法分类号 R735.34

临床与实验资料表明,大多数大肠腺癌是由腺瘤演变而来的,国内外对于腺瘤癌变机制的研究均很多,但至今尚未完全阐明[1]。本实验通过检测大肠腺瘤及腺癌组织中 p53及 bcl-2癌基因蛋白产物的表达,探讨两种基因在大肠癌发生发展过程中的作用,为大肠癌的诊断与治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

30例大肠腺瘤,100例大肠腺癌及癌旁粘膜,10例正常大肠粘膜组织,均来自本院 1987~1993年手术切除及活检病例,经 10%福尔马林固定,石蜡包埋。

30例大肠腺瘤中,男 13例,女 17例,平均年龄 52.34岁。组织学类型:管状腺瘤 17例,绒毛状腺瘤 5例,管状绒毛状腺瘤 8例。不典型增生程度:Ⅰ级 12例,Ⅱ及 14例,Ⅲ级 4例。部位:直肠 22例,左半结肠 6例,右半结肠 2例。大小:直径 <1 cm的 8例,>1 cm的 22例。

100例大肠腺癌中,男 54例,女 46例,平均 54.08岁。高、中、低分化管状腺癌分别为 22例、20例及 19例;乳头状腺癌 24例;粘液腺癌 15例。部位:直肠 57例,结肠 43例。Dukes分期:A期 46例,B期 33例,C期 21例。

P53单克隆抗体 DO-7及 Bcl-2单克隆抗体为英国牛津大学 Kevin Gatter博士惠赠,ABC试剂盒为 Vector Lab公司产品。

1.2 方法

石蜡包埋组织连续切片,厚 4μm,其中一张行 HE染色,组织学按《全国大肠癌病理研究统一规范》进行分类。

免疫组化染色:按 ABC试剂盒使用说明书及有关文献略作改良。主要步骤:①常规脱蜡至水;②0.03% HO-甲醇溶液浸泡 30 min;③浸于 0.1 mol/L柠檬酸缓冲液(pH值 6.0),750 W微波处理 10 min;④滴加 10%正常马血清,37℃,孵育 30 min;⑤同一组织的两张切片,分别滴加两种抗体,P53(1∶50),Bcl-2(1∶50),室温,过夜;⑥滴加生物素标记的二抗(1∶200),37℃,孵育 30~60 min;⑦滴加 ABC溶液,37℃,孵育 60 min;⑧DAB-HO显色;⑨Bcl-2染色经苏木素复染,P53染色经甲基绿复染,脱水,透明,封片。各步骤间用磷酸生理缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH7.4)洗 3次,每次 5 min.以 PBS代替第一或第二抗体作为阴性对照,以已知阳性的大肠癌及淋巴结作为阳性对照。

染色结果判定:Bcl-2蛋白阳性表达主要为细胞浆及核膜着色,P53蛋白阳性表达主要为细胞核着色。按染色强度及范围分别计分,无色(0分),淡黄(1分),棕黄(2分),棕褐(3分);染色范围:<5%(0分),5%~20%(1分),20%~50%(2分),>50%(3分)。累积 0~1分为阴性(-),2~3分为弱阳性(+),4~5分为阳性(++),6分为强阳性(+++)。

* 梁智勇,男,31岁,主治医师,硕士

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

统计学分析: 所有资料进行 i^2检验。

2 结果

2.1 P53, Bcl-2蛋白表达检测结果,见表 1

正常大肠粘膜,癌旁粘膜无 P53蛋白的表达, Bcl-2蛋白主要表达在正常大肠粘膜及癌旁粘膜隐窝底部,散在分布,呈弱阳性。

表 1 P53 Bcl-2蛋白表达检测结果

Tab 1 Immunohistochemical results of P53 and Bcl-2 expression

Histotype	Cases	P53				Bcl-2			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Normal mucosa	10	10	0	0	0	8	2	0	0
Adjacent mucosa	100	100	0	0	0	91	9	0	0
Adenoma	30	22	1	3	4	7	7	9	7
Adenocarcinoma	100	57	11	14	18	33	19	25	23

2.2 P53, Bcl-2蛋白表达与腺瘤分级的关系,见表 2

30例腺瘤中, 8例 (26.7%) P53蛋白阳性表达, 23例 (76.7%) Bcl-2蛋白阳性表达,均显著高于正常大肠粘膜及癌旁粘膜 ($P < 0.05$)。P53蛋白表达水平随着腺瘤不典型增生程度增高而增高 ($P < 0.05$),Ⅰ级不典型增生腺瘤无 P53蛋白表达。而 Bcl-2蛋白阳性表达与腺瘤分级无关 ($P > 0.05$)。

表 2 P53 Bcl-2蛋白表达与腺瘤分级的关系

Tab 2 Relationship between P53, Bcl-2 expression and adenoma grade

Grade	Cases	P53				Bcl-2			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Ⅰ	12	12	0	0	0	3	2	3	4
Ⅱ	14	10	1	2	1	4	3	2	5
Ⅲ	4	0	0	1	3	0	0	1	3

2.3 P53, Bcl-2蛋白表达与大肠癌分化程度的关系,见表 3

100例大肠腺癌中,43例 (43%) P53蛋白阳性表达, 67例 (67%) Bcl-2蛋白阳性表达。P53蛋白阳性率显著高于腺瘤Ⅰ级不典型增生 ($P < 0.01$),而与腺瘤Ⅱ、Ⅲ级不典型增生间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。并且大肠腺癌阳性组织的染色范围及染色强度均显著增加。大肠腺癌中 P53蛋白与 Bcl-2蛋白表达呈负相关 ($P < 0.05$),分化差的腺癌 (低分化腺癌和粘液腺癌) P53蛋白阳性率显著高于分化好的腺癌 (高、中分化腺癌及乳头状腺癌) ($P < 0.01$),分化差的腺癌 Bcl-2蛋白阳性率显著低于分化好的腺癌 ($P < 0.05$)。

Bcl-2蛋白表达与大肠癌分期无关, P53蛋白表达从 Duke's A期至 C期有增高的趋势,但无统计学意义。

表 3 P53 Bcl-2蛋白表达与大肠癌分化程度的关系

Tab 3 Relationship between P53, Bcl-2 expression and differentiation of adenocarcinoma

Histological types	Cases	P53				Bcl-2			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Well differentiated									
Well	22	17	0	2	3	4	4	5	9
Moderate	20	13	1	2	4	7	2	7	2
Papillary	24	16	0	3	5	5	4	3	12
Poorly differentiated									
Poor	19	4	0	7	8	10	2	4	3
Mucinous	15	7	1	2	6	7	1	6	1

Well: well-differentiated tubular adenocarcinoma; Moderately: modeselely-differentiated tubular adenocarcinoma; Papillary: papillary adenocarcinoma; Poor: poorly-differentiated tubular adenocarcinoma; Mucinous: mucinous adenocaroinoma

本组 68例大肠癌患者获得随访资料,其随访时间为 18~104个月,复发 17例,死亡 19例。Bcl-2蛋白过度表达患者复发率 (14.6%) 显著低于 Bcl-2蛋白阴性表达患者复发率 (40.7%) ($P < 0.05$), Bcl-2蛋白过度表达患者 5年生存率 (82.9%) 显著高于阴性患者 5年生存率 (55.6%) ($P < 0.05$)。P53蛋白阳性患者复发率 (40%) 显著高于阴性患者复发率 (13.2%) ($P < 0.05$), P53蛋白阳性患者的 5年生存率 (53.3%) 显著低于阴性患者 5年生存率 (86.8%) ($P < 0.01$)。

3 讨论

目前研究表明,大肠癌的发生发展是一个有多种基因参与,多步骤的复杂过程,多种癌基因及抑癌基因分别在不同的阶段发生改变,并起着不同的作用。基因的改变将影响其蛋白产物的表达,因此,检测蛋白产物的表达能在一定程度上反映基因的改变。

P53蛋白是 p53抑癌基因编码的核蛋白,野生型 P53蛋白阻止有 DNA损伤的细胞进入 S期,使 DNA有充分的时间修复,维持正常细胞的增殖,不能修复者, P53蛋白通过诱导细胞凋亡清除损伤细胞,从而抑制肿瘤的发生。突变型 P53蛋白失去上述能力,使有损伤的细胞进入 S期,并能抑制细胞凋亡,从而为肿瘤发生创造了条件。本结果显示 P53蛋白表达与大肠腺瘤分级呈正相关,大肠癌 P53蛋白表达显著高于腺瘤Ⅰ级不典型增生,与Ⅱ、Ⅲ级不典型增生间差异无统计学意义,并且 P53蛋白表达主要为Ⅱ、Ⅲ级不典型增生,表明 P53蛋白表达主要出现在腺瘤晚期,而免疫组化方法检测的 P53蛋白均为突变型,提示 p53基因突变参与了腺瘤的恶变过程,直接或间接促进腺瘤向腺癌转化。P53蛋白阳性表达的大肠癌患者复发率高、

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

生存率低,并且分化好的大肠癌 P53蛋白阳性率高于分化差的大肠癌,表明 P53蛋白表达可能是大肠癌预后差的一项客观指标,提示 p53基因突变与大肠癌的侵袭发展有关,一方面抑制细胞凋亡,延长肿瘤细胞的寿命,另一方面协同其它基因改变促进肿瘤进一步发展。研究证实突变型 p53基因可以与 ras c-erbB-2等基因协同作用[4]。

Bcl-2蛋白是 bcl-2基因编码的蛋白,分子量 24×10^3 u,位于核膜、内质网、线粒体膜上,最初是在研究滤泡型淋巴瘤染色体易位时发现的,是一种重要的凋亡抑制基因,主要作用是抑制细胞凋亡,延长细胞寿命,但并不能直接促进细胞转化。目前研究表明 Bcl-2与多种上皮性肿瘤的发生发展密切相关,并且在不同类型的上皮肿瘤中的作用不尽相同[5]。本组大多数大肠腺瘤 Bcl-2蛋白高表达,而 Bcl-2蛋白过度表达与腺瘤分级无关,并且大肠癌 Bcl-2蛋白表达率有下降趋势,表明 Bcl-2蛋白过度表达是大肠癌发生的早期事件,与 Bosari等[6]报道的基本一致。bcl-2基因在大肠癌发生过程中的作用可能是通过延长细胞寿命,使能够促进肿瘤发生的基因改变得以累积,累积到一定程度则导致细胞转化。本组 Bcl-2蛋白过度表达的大肠癌患者复发率低、5年生存率高,分化好的大肠癌 Bcl-2蛋白表达率高于分化差的大肠癌患者,表明 Bcl-2蛋白表达可以作为大肠癌预后良好的一项参考指标,同时也提示 bcl-2基因可能与大肠癌的侵袭发展无关。

Haldar等[7]报道转染突变型 p53基因的乳腺上皮 Bcl-2蛋白表达受抑制,认为突变型 p53基因对 bcl-2基因有调控作用,而 Daidone等[8]对乳腺癌的研究以及 Lu等[9]对膀胱癌的研究认为 p53基因与 bcl-2基因没有明确的关系,因此对于 p53基因是否对 bcl-2基因有调控作用尚存在争议。本研究结果显示大肠腺癌 Bcl-2蛋白表达与 P53蛋白表达呈负相关,提示腺癌发展过程中突变型 p53基因对 bcl-2基因可能具有负性调解作用,突变型 p53基因抑制了 bcl-2基因,因此表现为大肠腺癌 Bcl-2蛋白表达率比腺瘤有一定程度的下降,但其具体作用机制尚有待进一步研究。

参考文献

1 Williams A C, Harper S J, Paraskeva C. Neoplastic transformation of a human colonic epithelial cell line: *in vitro* evidence for adenoma to carcinoma sequence. Cancer Res, 1990, 50(15): 4724

2 Hamilton S R. Molecular genetics of colorectal carcinoma. Cancer, 1992, 70(5 Suppl): 1216

3 el-Deiry W S, Harper J W, O´Connor P M, *et al*. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 1994, 54(5): 1169

4 梁智勇,柳凤轩,罗元辉,等.大肠腺瘤与腺癌 P21 P53 P185蛋白表达及 ras p53基因突变的检测.中华病理学杂志, 1995, 24(6): 352

5 Colombel M, Symmans F, Gil S, *et al*. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. Am J Pathol, 1993, 143(2): 390

6 Bosari S, Moneghini L, Graziani D, *et al*. Bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas and adenocarcinomas. Hum Pathol, 1995, 26(5): 534

7 Haldar S, Negrini M, Monne M, *et al*. Down-regulation of Bcl-2 by p53 in breast cancer cells. Cancer Res, 1994, 54(8): 2095

8 Daidone M G, Silvestrini R, Luisi A, *et al*. Changes in biological markers after primary chemotherapy for breast cancers. Int J Cancer, 1995, 61(3): 301

9 Lu Q L, Laniado M, Abel P D, *et al*. Expression of bcl-2 in bladder neoplasms is a cell lineage associated and p53-independent event. J Clin Pathol, 1997, 50(1): 28

(收稿: 1997-10-05;修回: 1998-06-20)

(编辑 刘 鹏)

Expression of P53 and Bcl-2 proteins in colorectal adenoma and adenocarcinoma

Liang Zhiyong, Liu Fengxuan, Liu Limei, He Guangyou, Yan Xiaochu (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To determine the expression of P53 and Bcl-2 proteins in colorectal adenoma and adenocarcinoma to explore the possible role of p53 and bcl-2 genes in occurrence and development of colorectal carcinoma. **Methods**: The expression of P53 and Bcl-2 proteins was determined with immunohistochemical ABC method in 10 normal individuals, 30 patients with colorectal adenoma and 100 patients with colorectal adenocarcinoma and the adjacent mucosa. **Results**: The positive rates of P53 and Bcl-2 proteins were significantly higher in colorectal adenoma and adenocarcinoma than in normal mucosa and adjacent mucosa of adeno-

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

carcinoma ($P < 0.01$). The expression of P53 was increased with aggravation of dysplasia in adenoma but that of Bcl-2 showed no evidence to relate to the grade of adenoma. In colorectal adenocarcinoma, the expression Bcl-2 protein was inversely correlated to P53 protein accumulation. The recurrence rate and mortality in patients with P53 overexpression were significantly ($P < 0.05$) and those in patients with Bcl-2 overexpression were significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Bcl-2 gene may play an important role in the early stage of colorectal adenocarcinoma while the mutation of p53 gene participates in the transformation from colorectal adenoma to adenocarcinoma and is associated with the invasion of colorectal adenocarcinoma. The expression of P53 and Bcl-2 proteins can be used to determine the prognosis of colorectal carcinoma. bcl-2 gene might be negatively regulated by mutated p53 gene.

Key words colorectal neoplasm; oncogene; apoptosis; immunohistochemistry

胃非何杰金淋巴瘤 6例报告

Six cases of non-Hodgkin's lymphoma of the stomach

赵国鹏* 赵晓晏 柏健鹰 (第三军医大学附属新桥医院消化内科) 重庆, 400037

我院 1992年 2月至 1997年 2月共收治 263例恶性淋巴瘤,其中胃肠恶性淋巴瘤 26例,占 9.8%,胃恶性淋巴瘤 6例,均为非何杰金淋巴瘤,占胃肠恶性淋巴瘤 23.1%。现报道如下。

1 一般资料

男 5例,女 1例。年龄 27~ 61岁,平均 42.6岁。均符合 Dawson提出的诊断标准[1]。

临床表现: 上腹部疼痛 6例,恶心、呕吐 3例,呕血、黑便 2例,消瘦 2例,上腹部压痛 5例,贫血 4例,上腹部包块 1例。临床诊断为胃癌 2例,消化性溃疡 3例,慢性胃炎 1例。

胃镜检查结果: 6例均于手术前行胃镜检查。病变部位: 胃体部 4例,窦部 1例,全胃 1例。根据 Fork分型[2]: 溃疡型 5例,结节型 1例。胃镜误诊为胃溃疡癌变 4例,胃恶性肿瘤 1例,胃体癌 1例。活检病理疑诊为淋巴瘤 3例,胃体低分化腺癌 1例,慢性胃溃疡 2例。

手术所见及病理检查结果: 术中见肿块分布无一定规律,肿块大小自 3.5 cm× 1 cm至 12 cm× 11 cm不等;有 5例表面可见溃疡;多数病例有肿大的淋巴结,但仅 1例发现有转移灶。病理组织学类型复杂。

2 讨论

胃恶性淋巴瘤在临床上诊断比较困难,其术前误诊率可达 90%[3]。Ogawa等[4]报道了 100例胃恶性淋巴瘤,仅有 3例术前确诊。本组 6例患者在临床及胃镜直视下均被误诊,活检病理 3例疑诊为恶性淋巴瘤,占 50%,但仍未能作出明确诊断。分析其误诊原因: ① 本病少见,其发病年龄与胃癌相似,常见临床症状缺乏特异性; ② 胃镜检查医师常忽略本病的发病规律及内镜下的变化特征,有时只满足于辨别病灶的良、恶性,而欠更仔细地观察; ③ 胃镜活检病理是确诊的可靠手段之一,但该病常表现为粘膜下病灶,活检常因组织挤压变化,或由于活检取材浅或钳取的组织块太小,而导致误诊、漏诊; ④ 原发性胃恶性淋巴瘤一般无淋巴结累及,即使术中可见肿大的淋巴结,但病理检查极少有阳性发现。本组 6例共检查 40枚淋巴结,仅一枚出现阳性。

如何提高本病的术前诊断,我们的体会是病灶位于胃体部,范围较大,特别是病变延至十二指肠球部者;溃疡位于增生粗大的粘膜皱襞间,周边不规则,深浅不一,尤其是多发性溃疡,溃疡周围粘膜粗大松软状,以及溃疡浸润肿块等多种病变存在者。对可疑为恶性淋巴瘤者,取活检时应多部位深取,尤其注意在溃疡边缘的突起部,巨大皱襞的基底部以及结节的表面等处取材,对可疑病例应进行相对特异的免疫组织化学染色,以提高检出率。

关键词 胃肿瘤;非何杰金淋巴瘤
中图法分类号 R735.2

参考文献

1 Platz C E. Lymphoid proliferation of the stomach, In: Appelman H D, ed, Pathology of the esophagus, stomach and duodenum, New York: Churchill Livingstone, 1984. 143~168
2 沈 明. 消化系统恶性肿瘤. 北京: 知识出版社, 1983. 205~208
3 蔡则骥,潘文生,卢家祥. 124例原发性结外淋巴瘤的临床病理研究. 中华血液学杂志, 1992, 13(2): 75
4 Ogawa Y, Chung Y S, Nakata B, *et al*. A case of primary Hodgkin's disease of the stomach. J Gastroenterol, 1995, 30(1): 103

(收稿: 1998-04-23; 修回: 1998-10-07)
(编辑 王 红)

* 赵国鹏,男,38岁,主治医师,进修生,铜仁地区第二人民医院 铜仁, 554300

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