

突变型 P53 和 Ki67 在人肝细胞癌中的表达及临床意义

杨丽¹, 吴雪铭², 黄炳臣²①

(1. 广西玉林市第一人民医院病理科, 广西 玉林 537000 E-mail: yali14339@qq.com;

2. 右江民族医学院附属医院病理科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 检测人肝细胞癌(HCC)中突变型 P53 和 Ki67 的表达, 并探讨其与临床病理特征的关系及其在预后评估中的意义。 **方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测病理确诊的 102 例 HCC 中突变型 P53 和 Ki67 的表达, 分析两者与 HCC 临床病理特征的关系。 **结果** HCC 中突变型 P53 和 Ki67 表达率分别为 50.98%(52/102)和 48.04%(49/102); 突变型 P53 和 Ki67 的表达分别在有无肿瘤脉管浸润组间、有无淋巴结转移组间、TNM I + II 期与 III + IV 期组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 在患者性别、年龄、肿瘤大小、Edmondson 分级、有无肝硬化、HBsAg 阳性/阴性组间分别比较突变型 P53 和 Ki67 的表达率, 结果差异均无统计学意义($P > 0.05$); 突变型 P53 和 Ki67 的阳性表达呈正相关($r = 0.472$, $P < 0.001$)。 **结论** 检测突变型 P53 和 Ki67 的表达可能对 HCC 的发展和预后判断具有临床价值。

关键词: 肝细胞癌; 免疫组织化学; 突变型 P53; Ki67

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)03-0172-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.03.003

Expressions and clinical significances of mutant P53 and Ki67 in human hepatocellular carcinoma

Yang Li¹, Wu Xueming², Huang Bingchen²

(1. Department of Pathology, the First People's Hospital of Yulin City, Yulin 537000, Guangxi, China

E-mail: yali4339@qq.com; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical

University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To detect the expressions of mutant P53 and Ki67 in human hepatocellular carcinoma (HCC), and to explore their relationships with clinicopathological parameters of HCC. **Methods** An immunohistochemical staining SP method was used to detect the expressions of mutant P53 and Ki67 in 102 cases of human hepatocellular carcinoma proven by pathological examination. The correlation of expressions of mutant P53 and Ki67 in hepatocellular carcinoma with clinicopathological features were analyzed. **Results** The positive expression rates of mutant P53 and Ki67 in tissues of hepatocellular carcinoma were 50.98% (52/102) and 48.04% (49/102), respectively. Comparing the mutant P53 and Ki67 expressions in patients with tumor vascular invasion and without vascular invasion, and in patients with lymph node metastasis and without lymph node metastasis, and in patients with TNM stages I + II and with stages III + IV, results yielded statistical differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$), respectively. Comparing the mutant P53 and Ki67 expression rates in patients of sex groups, of age groups, of tumor size groups, of Edmondson grading groups, of groups with or without cirrhosis, and of positive- and negative-groups showed no statistical significant differences ($P > 0.05$). Mutant P53 was positively correlated with positive expression of Ki67 ($r = 0.472$, $P < 0.001$).

Conclusion Detection of mutant P53 and Ki67 has clinical value in predicting the development and prognosis of human hepatocellular carcinoma.

Key words: hepatocellular carcinoma; immunohistochemistry; mutant P53; Ki67

① 通信作者, E-mail: hbc9928@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见消化道恶性肿瘤之一,由于HCC恶性程度高、病情进展快,发病较隐匿,多数患者在诊断时即已出现肝内或肝外转移,失去了根治性手术治疗的机会,而且放、化疗效果也不理想^[1]。P53基因作为一个重要的抑癌基因,在肿瘤中具有非常高的突变率,P53突变导致P53蛋白正常功能的丧失,引发显性负向调节,并可获得新的生理功能,如由抑制细胞增殖转换为促进细胞生长^[2]。因此,P53成为当前HCC研究的热点之一。本文通过分别检测102例HCC中突变型P53和Ki67的表达情况,并分析其与临床病理特征关系及两者表达相关性,为临床治疗及预后判断提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2012—2015年玉林市第一人民医院和右江民族医学院附属医院病理科存档的102例HCC手术切除标本,所有病例均经病理证实。102例中男性80例、女性22例,年龄29~76岁(平均49.6岁)。按Edmondson分级标准I~II级68例、III~IV级34例,有脉管浸润35例、无脉管浸润67例,有淋巴结转移30例、无淋巴结转移72例,按TNM分期I+II期67例、III+IV期35例,伴肝硬化82例、无肝硬化20例,伴HbsAg阳性50例、阴性52例。所有病例术前均未接受过放疗或化疗。

1.2 试剂 即用型鼠抗人突变型P53单克隆抗体、即用型鼠抗人Ki67单克隆抗体、SP免疫组化试剂盒及DAB显色剂均购自福州迈新试剂生物技术开发公司。

1.3 方法 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法即SP法进行染色,组织标本均经10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm厚切片,依次脱蜡、水化。采用柠檬酸抗原修复液高温高压修复法进行抗原修复。用磷酸缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。一抗室温下60 min或4℃过夜,DAB显色。

1.4 结果判断 参照文献^[3]进行结果判定:细胞核着棕黄色颗粒即为突变型P53或Ki67阳性表达细胞。双人双盲法观察切片,选取至少5个具有代表性的视

野,不少于1000个细胞,根据阳性细胞所占比例计算阳性率。根据2011年St. Gallen会议共识,Ki67阳性细胞<14%为低表达,定义为阴性;Ki67阳性细胞≥14%为高表达,定义为阳性。P53阳性细胞≥26%为高表达,定义为阳性。

1.5 统计学方法 应用SPSS 17.0软件进行统计学分析。组间比较用 χ^2 检验或者用 χ^2 检验的连续性校正,两者之间相关性分析应用Spearman等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 突变型P53和Ki67在肝细胞癌组织中的表达

突变型P53和Ki67蛋白阳性表达呈黄色或棕黄色颗粒状,主要定位于细胞核(见图1~图4)。突变型P53和Ki67在102例HCC中的表达率分别为50.98%(52/102)和48.04%(49/102)。

2.2 突变型P53和Ki67表达与HCC临床病理特征的关系 突变型P53在有脉管浸润组的表达(68.57%,24/35)高于无脉管浸润组的表达(41.79%,28/67),差异有统计学意义($\chi^2 = 6.598, P = 0.010$);在有淋巴结转移组中的表达(83.33%,25/30)高于无淋巴结组的表达(37.50%,27/72),差异具有统计学意义($\chi^2 = 17.801, P < 0.001$);在TNM III+IV期中的表达(82.86%,29/35)高于TNM I+II期的表达(34.33%,23/67),差异具有统计学意义($\chi^2 = 21.666, P < 0.001$)。Ki67在有脉管浸润组的表达(71.43%,25/35)高于无脉管浸润组的表达(35.82%,24/67),差异有统计学意义($\chi^2 = 11.678, P = 0.001$);在有淋巴结转移组中的表达(80.00%,24/30)高于无淋巴结组的表达(34.72%,25/72),差异有统计学意义($\chi^2 = 17.392, P < 0.001$);在TNM III+IV期中的表达(77.14%,27/35)高于TNM I+II期的表达(32.84%,22/67),差异有统计学意义($\chi^2 = 18.081, P < 0.001$)。两者表达在患者性别、年龄、肿瘤大小、Edmondson分级、肝硬化、HBsAg组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

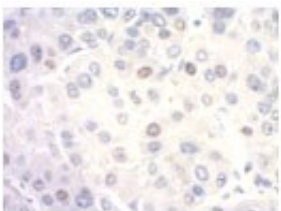


图1 突变型P53阴性,SP法

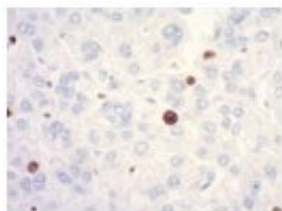


图2 Ki67阴性,SP法

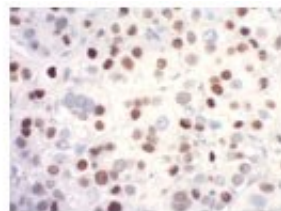


图3 突变型P53阳性,SP法

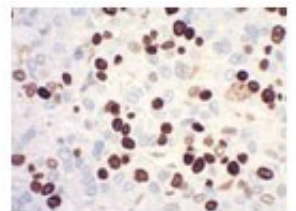


图4 Ki67阳性,SP法

表 1 突变型 P53 和 Ki67 表达和 HCC 临床病理特征的关系

参数	n	P53				Ki67			
		阳性	阴性	χ^2	P	阳性	阴性	χ^2	P
性别									
男	80	39	41	0.738	0.390	40	40	0.571	0.450
女	22	13	9			9	13		
年龄(岁)									
≤ 50	52	28	24	0.349	0.555	24	28	0.151	0.698
> 50	50	24	26			25	25		
肿瘤直径(cm)									
≤ 5	52	27	25	0.038	0.846	25	27	0.001	0.994
> 5	50	25	25			24	26		
脉管浸润									
有	35	24	11	6.598	0.010	25	10	11.678	0.001
无	67	28	39			24	43		
Edmondson 分级									
I + II	68	37	31	0.961	0.327	31	37	0.491	0.484
III + IV	34	15	19			18	16		
肝硬化									
有	82	41	41	0.161	0.688	40	42	0.092	0.762
无	20	11	9			9	11		
HBsAg									
阳性	50	26	24	0.041	0.840	25	25	0.151	0.698
阴性	52	26	26			24	28		
淋巴结转移									
有	30	25	5	17.801	< 0.001	24	6	17.392	< 0.001
无	72	27	45			25	47		
TNM 分期									
I + II	67	23	44	21.666	< 0.001	22	45	18.081	< 0.001
III + IV	35	29	6			27	8		

2.3 突变型 P53 和 Ki67 蛋白表达的相关性 在 52 例突变型 P53 阳性病例中有 37 例 Ki67 阳性表达, 15 例阴性; 在 49 例 Ki67 阳性表达的病例中突变型 P53 阳性表达 37 例, 两者同为阴性表达 38 例, Spearman 等级相关分析显示, 突变型 P53 和 Ki67 蛋白表达呈正相关($r = 0.472$, $P < 0.001$), 见表 2。

表 2 P53 和 Ki67 表达的相关性

P53	Ki67		r	P
	阳性	阴性		
阳性	37	15	0.472	< 0.001
阴性	12	38		

3 讨论

肿瘤抑制基因 P53 突变是许多肿瘤发生的重要原因之一, P53 基因突变后其功能即刻发生改变, 从抑癌基因转变成了对肿瘤发生和发展起促进作用的癌基

因, 且在肿瘤中高表达, 约 50% 的人类肿瘤有 P53 突变^[4]。发生突变的 P53 基因引起构型变化, 使蛋白半衰期延长, 并在核内聚集, 可通过免疫组织化学检测出表达^[5]。近来研究发现在胃癌、肝癌中 P53 有较高的突变率, 其高表达与肿瘤的分化、复发转移有关^[6-7]。我们通过免疫组织化学染色观察, 发现突变型 P53 蛋白在肝细胞癌定位于细胞核呈棕黄、棕褐色表达, 总表达率为 50.98% (52/102), 与文献报道^[8-9]的相符。本研究发现, 在有脉管浸润、淋巴结转移和临床分期越高的癌组织中, 突变型 P53 蛋白表达越强, 说明突变型 P53 蛋白促进肝细胞癌侵袭、转移和扩散, 是预后不良的指标之一。但我们也发现, 在发生脉管浸润、淋巴结转移和扩散的病例中存在部分病例突变型 P53 蛋白表达缺失, 说明在肝癌侵袭、转移和扩散中存在其他机制的参与。近来研究发现某些微小分子 RNA 如 miR-429 以及血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶-9 等的高表达参与肝细胞癌的发生发展并与肝细胞癌的不良

预后有关^[10-11]。随着研究的深入,还会发现更多的分子机制和信号转导途径,对 HCC 的治疗和预后判断提供帮助。

Ki67 在 DNA 合成中发挥着重要作用,是调节细胞周期不可缺少的组成部分,只在增殖细胞 G1、G2 和 M 期表达,是细胞增殖活性的可靠指标^[12]。研究表明 Ki67 阳性表达能可靠反映恶性肿瘤的增殖,与多种恶性肿瘤的发展、转移、预后有关。张莹等^[13]在对不同分子分型乳腺癌组织 Ki67 表达的观察中发现,Ki67 表达与肿瘤的更大直径和腋窝淋巴结转移密切相关,是判断乳腺癌预后的重要指标。Ki67 在结直肠癌中的高表达促进肿瘤的浸润和转移^[14]。本研究发现 Ki67 在 102 例 HCC 中的表达率为 48.04%,在有脉管浸润、淋巴结转移和更晚的临床分期的 HCC 中 Ki67 表达越强,验证了高增殖活性的肝癌细胞更具有侵袭转移和扩散的能力,检测 HCC 中 Ki67 表达,了解肿瘤增殖活性,有助于评估 HCC 的预后。

对两者进一步行 Spearman 相关性分析结果($r = 0.472, P < 0.001$)提示,突变型 P53 和 Ki67 的表达具有一致性,可以推测突变型 P53 蛋白和 Ki67 在 HCC 的增殖、浸润和转移中可能发挥了协同的作用,高表达的突变型 P53 蛋白诱导 Ki67 表达增强,促进肿瘤的增殖、侵袭转移和扩散,不利于预后。并预示通过阻断突变型 P53 蛋白活性,抑制 Ki67 过表达,达到治疗肝癌的目的。

参考文献:

- [1] Morise Z, Kawabe N, Tomishige H, et al. Recent advances in liver resection for hepatocellular carcinoma[J]. *Front Surg*, 2014, 1: 21. DOI: 10.3389/fsurg.2014.00021.
- [2] Bossi G, Lapi E, Strano S, et al. Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer lines through abrogation of mutant p53 expression[J]. *Oncogene*, 2006, 25(2): 304-309.
- [3] 徐婷,何奇,吴克瑾,等.三阴性乳腺癌中 P53 和 Ki67 表

达的相关研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2013, 33(6): 833-837.

- [4] Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(9): 1006-1010.
- [5] Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(20): 1442-1455.
- [6] 赵伟,陈锐,李亮,等.内脏脂肪素在胃癌组织中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(10): 1335-1342.
- [7] 高建芝,杜经丽,李佳,等. VEGF 相关信号通路在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(1): 75-78.
- [8] 王玉兰,杜经丽,石怀银,等. CyclinD1、P21WAF1、P53 及 Ki67 在肝细胞癌中的表达及与预后的关系[J]. *解放军医学杂志*, 2014, 39(1): 20-24.
- [9] 陈漫霞,陈思东,姚振红,等.原发性肝细胞癌中 P-糖蛋白的表达及其与 P53 的关系分析[J]. *现代预防医学杂志*, 2013, 40(12): 2310-2312.
- [10] 刘懿霄,马韵,黄小英,等. MicroRNA-429 表达与肝细胞癌预后的关系研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2013, 35(6): 758-761.
- [11] 赵海亮,黄桂柳,黄赞松,等.苦参碱抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖及其对 VEGF、MMP-9 表达的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(1): 1-5.
- [12] Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan M, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(34): 5569-5575.
- [13] 张莹,任占平,张莞. Ki67 表达与乳腺癌分子分型及临床病理特征的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(11): 1220-1223.
- [14] 钟华,刘迪群. 结直肠癌组织中 Ki67 和 COX-2 的表达及其临床意义[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2016, 42(6): 1168-1172.

收稿日期:2017-04-26;修回日期:2017-06-01