

POLD3、p53 在肝癌中的表达及临床意义分析^①

王娟¹, 黄炳臣², 卢运龙², 罗春英², 吴雪铭², 苏群英², 黄永秩²,
陆海善², 林洁², 黄小英^{2②}, 龙喜带^{2,3,4③}

- (1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000 E-mail:827640076@qq.com;
2. 右江民族医学院附属医院病理科, 广西 百色 533000;
3. 上海交通大学医学院附属仁济医院肝脏外科, 上海 200127;
4. 广西肝胆系统疾病临床医学研究中心, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 探讨 DNA 聚合酶 $\delta 3$ (eukaryote DNA polymerase $\delta 3$, POLD3)、p53 在肝细胞癌(以下简称“肝癌”, Hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及临床意义。**方法** 收集进行了根治性切除的 HCC 患者 108 例, 并收集相应的手术切除标本。采用免疫组化 EnVision 法分别检测肝癌组织及癌旁组织中 POLD3、p53 蛋白的表达; 分析 POLD3、p53 在肝癌组织中的表达与临床病理参数之间的关系。**结果** ①POLD3、p53 在肝癌组织中的表达率均高于癌旁组织, 差异均有统计学意义($P < 0.001$)。②p53 在肝癌中的表达与组织学分化有关($P < 0.001$), 与其他指标无关($P > 0.05$)。③POLD3 在肝癌中的表达与组织学分化有关($P < 0.05$), 与其他指标无关($P > 0.05$)。④POLD3 和 p53 在肝癌组织中的表达呈正相关性($r = 0.276, P = 0.004$)。**结论** ①POLD3 异常表达促进肝细胞癌的增殖、分化。②p53 基因突变在某种程度上是导致 POLD3 在肝癌组织中高表达的原因之一。

关键词: POLD3; p53; 肝肿瘤

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)06-0436-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.06.003

An analysis of POLD3 and p53 expression in the hepatocellular carcinoma and its clinical significance

Wang Juan¹, Huang Bingchen², Lu Yunlong², Luo Chunying², Wu Xueming², Su Qunying²,
Huang Yongzhi², Lu Haishan², Lin Jie², Huang Xiaoying², Long Xidai^{2,3,4}

- (1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi E-mail:827640076@qq.com;
2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi;
3. Department of Liver Surgery, Renji Hospital Affiliated to School of Medicine of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127;
4. Guangxi Clinical Medicine Research Center for Hepatobiliary System Diseases, Baise 533000, Guangxi)

Abstract: **Objective** To explore the expression levels of eukaryote DNA polymerase $\delta 3$ (POLD3) and p53 in the hepatocellular carcinoma (hereinafter referred to liver cancer, HCC) and its clinical significance. **Methods** A total of 108 patients with HCC undergone radical resection were selected and the corresponding surgical resection samples were collected. The expressions of POLD3 and p53 protein in hepatocellular carcinoma tissues and adjacent tissues were detected by EnVision method. The relationship between the expressions of POLD3 and p53 and the clinicopathological parameters were analyzed. **Results** ① The expression rates of POLD3 and p53 in hepatocellular carcinoma tissues were significantly higher than those in adjacent tissues.

① **基金项目:** 国家自然科学基金(81760502, 81572353, 81372639, 81472243, 81660495, and 81460423); 广西自然科学基金(2017GXNSFAA198002; 2016GXNSFDA380003, 2015GXNSFAA139223, 2013GXNSFAA019251, 2014GXNSFDA118021, and 2014GXNSFAA118144); 广西肝胆疾病临床研究中心专项(No. 2016-11)

② **通信作者,** E-mail: huangxiaoying3770@163.com

③ **通信作者,** E-mail: sjtulongxd@263.net

there were all statistically significant differences ($P < 0.001$). ②The expression of p53 in hepatocellular carcinoma was associated with histological differentiation ($P < 0.001$), but not with other indexes ($P > 0.05$). ③The expression of POLD3 in hepatocellular carcinoma was associated with histological differentiation ($P < 0.05$), but not with other indexes ($P > 0.05$). ④POLD3 expression had a positive correlation with p53 expression in HCC ($r = 0.276$, $P = 0.004$). **Conclusion** ①Abnormal expression of POLD3 promotes the proliferation and differentiation of hepatocellular carcinoma. ②To some extent, p53 gene mutation is one of the causes of high POLD3 expression in cancerous tissues of hepatocellular carcinoma patients.

Key words: POLD3; p53; liver neoplasms

肝癌是全世界最常见、恶性度最高的恶性肿瘤之一,有“癌中之王”之称,该肿瘤的发病机制仍是该研究领域的重要热点问题。肝癌的发病率、死亡率在全世界范围有明显的地域差别,如:在美国,肝癌的发病率和死亡率呈上升趋势,而在日本却逐渐下降^[1-2];在我国,60岁以下的男性人群中其发病率和死亡率均位居第一位^[3-6]。由于肝癌早期症状隐匿、进展迅速,很多患者临床确诊时已为晚期,因而需从新的角度去进一步探讨肝癌发生发展的精确机制,寻求新的治疗靶点。p53基因在大部分肝癌中存在突变已成为共识,突变型p53基因失去了对细胞生长的抑制作用,导致肿瘤发生。DNA聚合酶 δ 3(DNA polymerase δ 3, POLD3)是一种重要的DNA修复功能基因,其表达紊乱影响基因组的结构稳定性,并参与胃腺癌、结直肠癌、卵巢癌等肿瘤发生发展过程^[7-9]。但POLD3在肝癌中的表达及临床意义如何,至今为止国内外很少报道。本文应用免疫组化方法检测核蛋白基因POLD3和p53在肝癌中的表达情况,分析它们表达的相关性,探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2013年1月—2017年5月在右江民族医学院附属医院住院行手术治疗的肝癌患者108例作为研究对象,其中男性95例,女性13例,年龄22~74岁。患者术前均未进行任何抗癌治疗,且所有病例均无明确肝外转移,按Edmondson分级法进行分级:I~II级为高分化75例,III~IV级为低分化33例。病理资料包括肿瘤直径、肿瘤个数、肝硬化、门脉

癌栓等。

1.2 检测方法 每例均手术切取肝癌组织及对应癌旁肝组织(距肿瘤边缘2cm)各一份,所有标本经10%的福尔马林固定24h,常规石蜡包埋切片。HE染色:切片经过烘烤、脱蜡后在苏木精染液中进行HE染色,然后分解、返蓝、脱水,最后经二甲苯透明后封片。免疫组化染色采用EnVision两步法,DAB显色。使用PBS缓冲液替代一抗为阴性对照。p53抗体和试剂盒均购自福州迈新,POLD3抗体和试剂盒购自上海自艾博抗,所有操作步骤均按照说明书描述进行。

1.3 结果判断 POLD3蛋白的阳性定位于细胞核,以核内有明显的棕色颗粒作为核阳性的判定标准^[10];p53阳性定位于细胞核,以核内有明显的棕色颗粒作为核阳性的判定标准。肿瘤细胞有黄色颗粒分布并明显高于背景着色为阳性表达;阳性细胞数 $< 10\%$ 为阴性(-), $11\% \sim 25\%$ 为弱阳性(+), $26\% \sim 50\%$ 为中等阳性(++), $> 50\%$ 为强阳性(+++).

1.4 统计学方法 应用SPSS 23.0软件对数据进行分析,计数资料采用 χ^2 检验,相关性行Spearman检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染色结果 正常的肝组织形态改变,癌组织排列成小梁状、实性巢状、假腺样结构;癌细胞大小不一,形态怪异(见图1);POLD3蛋白的阳性定位于细胞核,核内有明显的棕色颗粒(见图2);p53阳性定位于细胞核,核内有明显的棕色颗粒(见图3)。

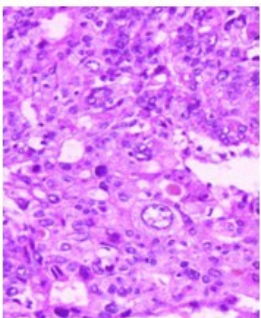


图1 肝癌组织常规HE染色组织形态学改变

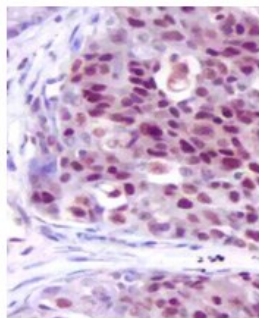


图2 POLD3细胞核阳性表达

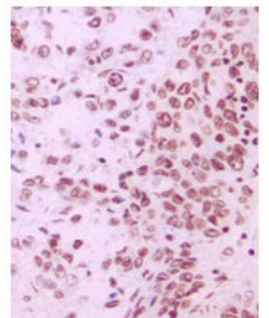


图3 p53细胞核阳性表达

2.2 肝癌组织和癌旁组织中 POLD3 和 p53 蛋白的表达 POLD3 在肝癌组织、癌旁组织中阳性率分别为 76.85%(83/108)和 0.93%(1/108);p53 在肝癌组织、癌旁组织中阳性率分别为 40.74%(44/108)和 2.78%(3/108),二者在癌组织中的表达均高于癌旁组织,差异均有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。

表 1 肝癌组织及癌旁组织中 POLD3 和 p53 蛋白的表达

组别	n	POLD3			p53		
		+	-	占比(%)	+	-	占比(%)
肝癌组织	108	83	25	76.85	44	64	40.74
癌旁组织	108	1	107	0.93	3	105	2.78
χ^2				130.987			45.713
P				<0.001			<0.001

2.3 肝癌组织中 POLD3、p53 两种蛋白的表达与临床病理指标的关系 POLD3 与组织学分化有关($P < 0.05$),与患者性别、年龄、门脉癌栓、肿瘤个数及肝硬化均无关($P > 0.05$);p53 与肿瘤组织学分化程度有关($P < 0.001$),与患者性别、年龄、门脉癌栓、肿瘤个数、肿瘤直径及肝硬化均无关($P > 0.05$),见表 2。

表 2 肝癌组织中 POLD3 和 p53 表达与临床病理指标的关系

临床参数	n	POLD3				p53			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
分化程度									
I~II级	75	53	22	5.278	0.022	20	55	20.138	<0.001
III~IV级	33	30	3			24	9		
门脉癌栓									
有	23	17	6	0.142	0.706	13	10	3.015	0.083
无	85	66	19			31	54		
肿瘤直径(cm)									
≥3	87	69	18	0.893	0.345	34	53	0.511	0.475
<3	21	14	7			10	11		
肿瘤个数									
1	101	77	24	0.012	0.911	39	62	1.719	0.190
≥2	7	6	1			5	2		
性别									
男	95	73	22	0.118	0.731	38	57	0.179	0.672
女	13	10	3			6	7		
年龄(岁)									
≥50	54	44	10	1.301	0.254	21	33	0.153	0.695
<50	54	39	15			23	31		
肝硬化									
无	15	11	4	-	0.746	5	10	0.396	0.529
有	93	72	21			39	54		

注:“-”表示采用确切概率法

2.4 POLD3、p53 在肝癌中表达的相关性 在 108 例肝癌组织中 POLD3 蛋白与 p53 蛋白共同阳性表达 40 例,根据相关性分析结果表明具有显著的相关性($r = 0.276, P = 0.004$),见表 3。

表 3 肝癌组织中 POLD3 与 p53 蛋白表达的关系

POLD3	p53		合计
	阳性	阴性	
阳性	40	43	83
阴性	4	21	25
合计	44	64	108

3 讨论

p53 基因是迄今为止发现与人类多种肿瘤相关性最高的基因,为重要的肿瘤抑制基因,同时又是促凋亡基因。正常的 p53 基因具有抑制肿瘤生长的功能,若 p53 基因功能丧失,可导致肿瘤形成。McClendon AK 等^[11]发现 p53 与肝癌的发生、发展有着密切的关系,且对化疗的敏感性有一定的影响。孙克让等^[12]发现 p53 在高分化程度肿瘤中高表达,分化程度越差,其恶性程度越高,预后不良的发生率也越高。Stroescu C 等^[13]发现 HCC 患者 Edmonson-Steiner 分级为 III~IV 级的肿瘤组织中,p53 蛋白的表达较 I~II 级高,且预后差。杨丽等^[14]检测 102 例肝癌样本发现 p53 异常表达促进肿瘤的分化、侵袭和转移,对肝癌的预后有着影响。本实验研究结果显示,HCC 组织中 p53 蛋白的阳性表达率为 40.74%(44/108),且与 HCC 分化程度有关($P < 0.001$),与其他指标有关($P > 0.001$),与某些文献报道相一致,表明 p53 不仅参与肝癌的形成,而且可能与肝癌的分化有关。

细胞增殖涉及到细胞生命活动中最重要、最基本的问题,与癌和细胞增殖性疾病有着直接关系。学者提出,癌的恶性增殖与 DNA 的大量复制有着密切的关系。因此,探讨 DNA 复制控制的机制对了解肝癌细胞分化、恶性增殖至关重要。作为 DNA 复制中关键的基因之一,POLD3 表达异常可能与癌细胞的恶性增殖有关。近些年来,国内外学者发现 POLD3 与多种肿瘤的发病机制有着密切联系。陆茵茵等^[7]检测 82 例符合要求的胃腺癌样本发现 POLD3 异常表达能够促进肿瘤的分化、增殖。Dunlop 等^[8]通过大样本病例对照研究发现 POLD3 的基因其中一个位点的突变体与大肠癌的关系,且 POLD3 在该位点突变后形成的突变体能够增加结直肠癌的发病风险,但是他们并没有分析 POLD3 在肿瘤组织中的表达及临床意义。Willis 等^[9]采用 Meta 分析众多卵巢癌中 POLD3 的表达情况,结果发现在预后不良的卵巢癌患者中 POLD3 低表达。最新的研究表明,POLD1 和 POLD3 基因系突变增加结直肠癌和其他恶性肿瘤的风险^[15-17]。因为肿瘤细胞的快速增殖需要 DNA 聚合酶 δ 指导下的大量 DNA 合成,所以负责编码 DNA 聚合酶 δ 催化亚基 P66 的 POLD3 也许与肝癌的恶性增殖、分化相关? 为

此,我们从蛋白质表达水平来探讨 POLD3 的异常表达与肝癌细胞的分化、增殖之间的关系。本实验研究结果表明:POLD3 在肝癌组织中的表达率为 76.85% (83/108),且与组织学分化有关 ($P < 0.05$),与其他指标无关 ($P > 0.05$),表明 POLD3 可能不仅参与肝癌的形成,而且其异常表达可能与肝癌的恶性增殖和促进肿瘤的分化之间有着密切关系。因此,无论是正常的生命活动还是肿瘤发生发展的过程中,POLD3 将是一个有待深入研究的、具有重要价值的肿瘤标志物。

此外本研究对 POLD3、p53 进行相关性分析结果 ($r = 0.276$, $P < 0.05$)提示,二者表达具有一致性,某种程度上可以表明 p53 基因突变是导致 POLD3 在肝癌患者癌组织中高表达的原因之一。但本课题目前仅研究二者在蛋白水平方面的表达,他们在基因水平方面的表达与蛋白水平的表达是否具有一致性尚不明确,因此需进一步检测 POLD3 和 p53 在基因水平中的表达,明确其与肿瘤分化、增殖之间的关系。

综上所述,我们猜测突变型 p53 高表达能够抑制 POLD3 基因转录,二者在肝癌的增殖可能发挥着协同作用,但具体的调控机制有待进一步研究,这将会为提高肝细胞癌的诊断率、判断肝癌的恶性程度,以及为发展有效的新的抗细胞增殖性疾病药物提供理论基础。

参考文献:

- [1] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma[J]. The New England Journal of Medicine,2011,365(12):1118-1127.
- [2] Kudo M. Japan's Successful Model of Nationwide Hepatocellular Carcinoma Surveillance Highlighting the Urgent Need for Global Surveillance[J]. Liver Cancer,2012,1(3-4):141-143.
- [3] 陈万青,张思维,曾红梅,等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤,2014,23(1):1-10.
- [4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin,2016,66(1):7-30.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin,2015,65(1):5-29.
- [6] Sonia P, Ivan H, Javier I. New advances in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology,2016,8(7):421-438.
- [7] 陆茵茵,王超,吴雪铭,等. POLD3 在胃腺癌中的表达及临

床意义分析[J]. 右江医学,2016,44(1):1-5.

- [8] Dunlop MG, Dobbins SE, Farrington SM, et al. Common variation near CDKN1A, POLD3 and SHROOM2 influences colorectal cancer risk[J]. Nature Genetics,2012,44(7):770-776.
- [9] Willis S, Villalobos VM, Gevaert O, et al. Single Gene Prognostic Biomarkers in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis [J]. PLoS One,2016,11(2):e0149183.
- [10] Long XD, Ma Y, Zhou YF, et al. Polymorphism in xeroderma pigmentosum complementation group C codon 939 and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma in the Guangxi population [J]. Hepatology,2010,52(4):1301-1309.
- [11] McClendon AK, Dean JL, Ertel A, et al. RB and p53 cooperate to prevent liver tumorigenesis in response to tissue damage[J]. Gastroenterology,2011,141(4):1439-1450.
- [12] 孙克让,李健,白长杰,等. p53、p16、GPC-3、CK-19 应用于肝癌及病情发展诊断的临床价值分析[J]. 临床合理用药杂志,2014,7(31):123-124.
- [13] Stroescu C, Dragnea A, Ivanov B, et al. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma [J]. J Gastrointest Liver Dis,2008,17(4):411-417.
- [14] 杨丽,吴雪铭,黄炳臣. 突变型 p53 和 Ki67 在人肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 右江民族医学院学报,2017,39(3):172-175.
- [15] Rayner E, van Gool IC, Palles C, et al. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer [J]. Nat Rev Cancer,2016,16(2):71-81.
- [16] Spier I, Holzapfel S, Altmüller J, et al. Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas [J]. Int J Cancer,2015,137(2):320-331.
- [17] Valle L, Hernández-Illán E, Bellido F, et al. New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis [J]. Hum Mol Genet,2014,23(13):3506-3512.

收稿日期:2017-11-02;修回日期:2017-12-19