

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.018

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.018

P53和Ki-67在喉鳞状细胞癌中的表达及与短期预后的关系

郭珍珍¹, 王春², 孙振柱²

(1. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆维吾尔自治区人民医院病理科, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的: 探讨P53和Ki-67在喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)中的表达情况及临床病理参数和短期预后相关分析。方法: 选择手术切除LSCC标本35例, 肿瘤分期均为T3~4N0M0。采用SP法染色进行P53和Ki-67免疫组织化学标记, 结合临床病理参数和2年随访结果及无病生存情况进行统计学分析。结果: LSCC标本P53阳性率为60.00%; 2年复发率P53阳性患者76.19%高于P53阴性28.59%, 差异具有统计学意义($P=0.013$)。年龄大小、是否抽烟、增殖指数高低及肿瘤不同分级方面, 患者2年内复发率差异均无统计学意义。T3~4N0M0分期患者的短期预后与P53表达高低相关。结论: P53的过表达对晚期LSCC短期预后评估具有一定的临床意义, 可考虑作为晚期LSCC分层治疗指标。

[关键词] 喉鳞状细胞癌; P53; Ki-67; 免疫组织化学; 预后

Expression of P53 and Ki-67 in laryngeal squamous cell carcinoma and the short-term prognosis

GUO Zhenzhen¹, WANG Chun², SUN Zhenzhu²

(1. Shihezi University Medical College, Shihezi Xinjiang 832000; 2. Department of Pathology, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Wulumuqi 830000, China)

Abstract **Objective:** To study the expression of P53 and Ki-67 protein in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and the relation with parameters of clinicopathology and short-term prognosis. **Methods:** The expression of P53 and Ki-67 was examined by SP immunohistochemistry in 35 cases of LSCC, with tumor stage were T3-4N0M0. The results were subjected to statistics analysis, combined with the clinical pathologic data and short-term prognosis. **Results:** In 35 cases LSCC, 2-year recurrence of the P53 positive expression was 60.0%; the recurrence rate of P53 positive (76.19%) was higher than that of P53 negative (28.59%), The difference was statistically significant ($P=0.013$). There was no significant difference in the recurrence rate between the two groups in age, smoking, value added index, and tumor grade. The short-term prognosis of patients with T3-4N0M0 stage was correlated with the expression of P53. **Conclusion:** Overexpression of P53 may play a role in the judgment of prognosis of later period LSCC and can be used as index of later period LSCC stratification treatment. The number of cases studied is less, and more data are needed to verify.

Keywords laryngeal squamous cell; P53; Ki-67; immunohistochemistry; prognosis

收稿日期 (Date of reception): 2016-12-22

通信作者 (Corresponding author): 孙振柱, Email: m15864653258@163.com

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)发病率不断增加,在2012年,全世界新诊断喉癌157 000例^[1]。过去10年,手术和放射治疗都有显著的提高,但喉癌患者的5年生存率却有所降低,美国的统计数据由57.1%降至51.9%^[2]。P53基因是目前发现的与人类肿瘤关系最为密切肿瘤抑制基因,位于17p13号染色体上,在由癌前病变到侵袭性肿瘤的进展过程中起着关键作用;P53基因产物可以调控细胞周期和促使损伤细胞凋亡,是人类基因的守护者^[3]。Ki-67抗原是一类与细胞周期相关的增殖细胞核抗原,是反应恶性肿瘤增殖率的可靠指标^[4]。本实验应用免疫组织化学方法检测P53和Ki-67在LSCC中的表达,旨在探索P53和Ki-67抗原表达与LSCC短期预后的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

标本选自新疆维吾尔自治区人民医院病理科2011年6月至2014年9月临床随访资料完整的存档蜡块35例,临床随访资料完整,随访时间超过2年。常规石蜡切片,HE染色,由两位高年资病理医师复审。LSCC中男34例,女1例。年龄38~85(平均58.29)岁。全部病例术前均无化疗、放疗及生物免疫治疗史,术后均给予规范的放射及化疗。按照国际抗癌协会联盟(Union for International Cancer Control, UICC),分期均为T3~4N0M0;2年内复发患者20例。

1.2 方法

所有标本均经10%的中性福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm厚连续切片,分别作HE和SP染色。鼠抗人P53(选取浓度1:200)和Ki-67(选取浓度1:300)抗原、SP试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥公司。SP染色按试剂盒说明

操作,3%的H₂O₂室温孵育10 min除去内源性过氧化物酶活性,热修复,常规免疫组织化学标记。DAB显色,苏木素复染,中性树胶封固。乳腺癌作为阳性对照,PBS取代抗体做阴性对照。

1.3 结果判断

两抗体均为核着色,以细胞核内出现棕黄色颗粒视为阳性。选取5个代表性区域,观察5个400倍视野,计数阳性细胞数,计算百分率。P53阳性率<10%视为阴性,阳性率≥10%视为阳性。Ki-67增殖指数的平均值为51.00,因此Ki-67阳性率≤50%视为低表达记为阴性,阳性率>50%视为高表达记为阳性。切片均有两位高年资病理医师复审评估。

1.4 统计学处理

采用SPSS20.0统计软件进行分析,用Fisher确切概率法,Kaplan-Meier法做复发曲线,各因素见得相关性用spearman相关性检验,相关因素用COX比较风险模型。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在 LSCC 中, P53 和 Ki-67 的表达与临床病理参数及复发情况的关系

在LSCC中,P53和Ki-67蛋白表达高低在临床病理参数中差异均无统计学意义。仅分析2年随访时间,P53阳性复发率76.19%显著高于P53阴性复发率28.59%,差异具有统计学意义($P=0.013$)。Spearman相关性分析,P53表达高低与2年随访结局显著相关($P=0.004$,表1~2)。

2.2 不同 P53 表达水平患者生存曲线

P53阳性复发曲线较P53阴性下降更为陡峭,P53高表达患者复发更早。两者Breslow检验差异有统计学意义($P=0.003$,图1)。

表1 P53和Ki-67与临床病理参数和复发的关系

Table 1 Relationship of P53 and Ki-67 with clinicopathological parameters and recurrence

临床病理学参数	n	P53			Ki-67			肿瘤复发		
		+	-	P	≤50%	>50%	P	复发	未复发	P
年龄/岁				0.737			0.733			0.728
≤60	21	12	9		10	11		11	10	
>60	14	9	5		8	6		9	5	
抽烟				0.296			0.500			1.000
有	15	11	4		9	6		9	6	
无	20	10	10		9	11		11	9	
肿瘤分化				0.052			1.000			0.258
高	9	6	3		4	5		5	4	
中	19	9	10		10	9		9	10	
低	7	6	1		4	3		6	1	
P53										0.013
+								16	4	
-								5	10	
Ki-67				1.000						0.500
≤50%	18	11	7					9	11	
>50%	19	10	7					9	6	

Fisher确切概率法。

Fisher's exact probability method.

表2 无病生存期与相关因素的相关性

Table 2 Correlation of disease-free survival and clinicopathological parameters

参数	P53	Ki-67	抽烟	肿瘤分级
r	0.471	0.147	0.050	0.177
P	0.004	0.394	0.775	0.308

Spearman相关性检验。

Spearman correlation test.

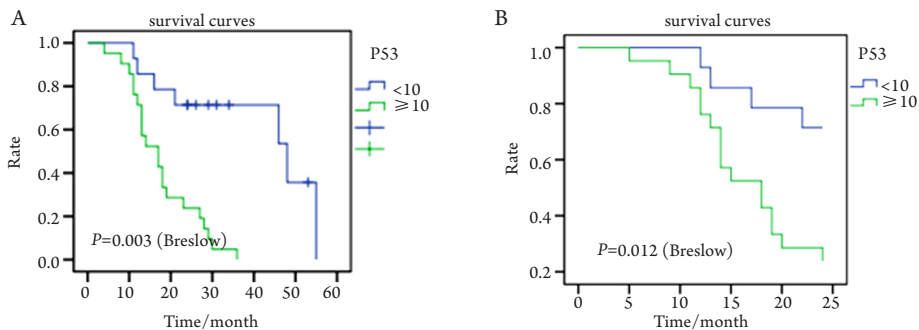


图1 P53相关无病生存期及2年预后生存曲线

Figure 1 P53-related disease-free survival and 2-year survival curve

(A)Kaplan-Meier复发曲线分析, P53阳性阴性患者无病生存曲线, 两者差异具有统计学意义(P=0.003); (B)寿命表分析P53阳性和阴性患者两年内复发曲线, 阳性阴性患者短期复发差异具有统计学意义(P=0.012)。

(A) Kaplan Meier recurrence curve analysis, disease-free survival curve of P53 positive and negative patients, the difference was statistically significant (P=0.003); (B) the life table analysis of 2-year recurrence curve of P53 positive and negative patients, the difference of short-term recurrence in patients was statistically significant (P=0.012).

3 讨论

LSCC是头颈部肿瘤中最常见的组织学类型,近年来患病率有所增加。外科技术和放射治疗不断更新,多种新型治疗方式不断涌现,使得LSCC患者的喉功能保存率和生存质量获得了提高。但是,喉癌患者的生存率并未有明显改善^[5-6]。治疗后复发是一个影响患者预后的主要因素,而切缘是否干净与肿瘤复发密切相关;但是选取切缘阴性和淋巴结未转移患者研究发现也有较高的复发率,35例T3~4N0M0患者中两年内复发率57.14%,可能是由于最早期的癌症浸润灶很难仅仅通过光学显微镜观察到。因此,寻找能够提示LSCC生物学行为的预后指标非常重要。野生型的P53基因是最常见的肿瘤抑制基因,通过多种方式维护人类基因的稳定性抑制肿瘤的发生;突变的P53基因具有原癌基因作用可促进肿瘤的发生与发展。几乎人类所有的肿瘤中都可以发现P53基因突变。野生型的P53蛋白半衰期非常短,很难通过免疫组织化学检测,突变后P53蛋白半衰期延长,蛋白质水平可通过免疫组织化学检测^[7]。据研究^[8]报道:LSCC中P53阳性率40%~60%,是目前发现的与喉癌发生关系最为密切的肿瘤抑制基因。

P53蛋白在正常及增生性上皮中表达缺失,轻度、重度异型增生到侵袭性鳞癌表达逐渐增加^[9]。正如肖自安等^[10]学者早期提出的P53基因突变发生在早期阶段,中晚期只是P53基因突变细胞克隆增殖的过程,使P53蛋白积累增加。研究发现:P53蛋白在LSCC的不同临床因素和不同肿瘤分级中表达均无显著差异。有学者^[11]提出烟草致癌物质可以导致P53肿瘤抑制基因的失活,但这种现象可能只是发生在致癌作用的早期,与后期侵袭性的生物学行为没有必要联系,这种现象在乳腺癌中得到证实。该研究也未发现烟草与P53和Ki-67及肿瘤复发有任何统计学意义。Ki-67抗原是与细胞周期相关的增殖细胞核抗原,是反应恶性肿瘤增殖情况的可靠指标,其高表达是肿瘤增殖活跃的重要指标,它与多种恶性肿瘤的发展、转移及预后具有相关性。研究^[4]发现肿瘤Ki-67指数保持较高水平,但与各临床病理参数无关,与一些学者研究一致,且与复发两年内无病生存期长短均不相关性。

由于P53在头颈部肿瘤的研究人群、数量以及研究方法等原因,使P53在头颈部肿瘤研究结果存在异质性,P53预后价值一直存在争议^[12]。大多数肿瘤抑制基因突变失活导致蛋白合成缺失或合成截断蛋白;而80%以上的P53基因的改变是错义突

变,导致稳定完整蛋白质的合成。P53基因突变产生氨基酸替换的位置主要是DNA结合的区域,导致DNA结合活动失败无法转录激活目的基因,失去了生长抑制和促凋亡特性;同时,突变出现在基因结合区域将提示肿瘤预后不良^[13]。当P53基因突变的细胞未能产生P53蛋白的积累或正常细胞产生了稳定的P53蛋白都可能造成假阴性或假阳性,因此通过免疫组织化学检测P53蛋白过表达结果不一定与P53基因改变完全一致,这也是造成结果异质性的原因之一。针对这个问题也有学者做了相关研究,通过PCR检测100%基因突变,免疫组织化学P53过表达95%^[9],同时免疫组织化学检测P53蛋白表达相对于PCR更实用便宜。本研究中,P53阳性患者复发风险高,两年内无病生存期更短,复发时间早,短期预后相对于P53阴性患者差。有学者^[14]在细胞学中做了P53基因联合化疗的相关研究,结果显示此方案可明显抑制肿瘤生长。

P53的表达高低与Ki-67指数无相关性,P53表达高低与患者预后相关,P53过表达可以作为提示患者预后不良的指标,可考虑作为LSCC的分成治疗指标,对于高危患者及时给予干预,有利于减少复发延长患者总生存期。但是,本研究纳入标本数量较少,作分层预后分析结果具有一定的局限性,后期希望可以做大数据分析,进一步验证P53表达与预后相关性。

参考文献

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
2. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, et al. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival[J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(9 Pt 2 Suppl 111): 1-13.
3. Cabanillas R, Rodrigo JP, Astudillo A, et al. P53 expression in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx and its lymph node metastases: new results for an old question[J]. *Cancer*, 2007, 109(9): 1791-1798.
4. 赵海英,曹金玲,宋学章. bcl-2、ki-67和p53在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. *现代诊断与治疗*, 2010, 21(2): 68-70. ZHAO Haiying, CAO Jinling, SONG Xuezhang. Expression of bcl-2, ki-67 and p53 in the larynx squamous carcinoma and its clinical significance[J]. *Modern Diagnosis & Treatment*, 2010, 21(2): 68-70.
5. MacNeil SD, Liu K, Shariff SZ, et al. Secular trends in the survival of patients with laryngeal carcinoma, 1995-2007[J]. *Curr Oncol*, 2015,

- 22(2): e85-e99.
6. van Dijk BA, Karim-Kos HE, Coebergh JW, et al. Progress against laryngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2010[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(3): 674-681.
 7. Yang JQ, Liu HX, Liang Z, et al. Over-expression of p53, p21 and Cdc2 in histologically negative surgical margins is correlated with local recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7): 4295-4302.
 8. Sittel C, Eckel HE, Damm M, et al. Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma[J]. *Laryngoscope*, 2000, 110(6): 1012-1017.
 9. Rodrigues RB, Motta Rda R, Machado SM, et al. Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2008, 74(6): 855-859.
 10. 肖自安, 罗勇, 曾益慈. 喉鳞癌中增殖细胞核抗原和 p53 蛋白表达的临床意义及其相互关系[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 1997, 3(2): 103-106.
XIAO Zian, LUO Yong, ZENG Yici. Clinical significance and correlation of PCNA and p53 oncoprotein in laryngeal squamous cell carcinomas[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology-skull Base Surgery*, 1997, 3(2): 103-106.
 11. Barbatis C, Loukas L, Grigoriou M, et al. p53 Overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia[J]. *Clin Mol Pathol*, 1995, 48(4): M194-M197.
 12. Tandon S, Tudur-Smith C, Riley RD, et al. A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(2): 574-587.
 13. Peltonen JK, Vähäkangas KH, Helppi HM, et al. Specific TP53 mutations predict aggressive phenotype in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective archival study[J]. *Head Neck Oncol*, 2011, 3: 20.
 14. 敬光怀, 杨凯. p53基因联合化疗治疗喉鳞癌的实验研究[J]. *中国当代医药*, 2010, 17(4): 14-15.
JING Guanghuai, YANG Kai. Experimental Study of laryngeal squamous cell carcinoma by p53 gene therapy combined with chemotherapy[J]. *China Modern Medicine*, 2010, 17(4): 14-15.

本文引用: 郭珍珍, 王春, 孙振柱. P53和Ki-67在喉鳞状细胞癌中的表达及与短期预后的关系[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(3): 552-556. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.018

Cite this article as: GUO Zhenzhen, WANG Chun, SUN Zhenzhu. Expression of P53 and Ki-67 in laryngeal squamous cell carcinoma and the short-term prognosis[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(3): 552-556. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.018