

文章编号:1005-6947(2006)09-0664-04

· 胃癌专题研究 ·

Ki-67 抗原和 p53 蛋白在胃癌中的表达及其临床意义

易伟¹, 胡志前², 龚振斌²

(1. 解放军第九十四医院 普通外科, 江西 南昌 330000; 2. 第二军医大学附属长征医院 普通外科, 上海 200003)

摘要:目的 研究 Ki-67 抗原和 p53 蛋白在胃癌组织中的表达水平及其与胃癌生物学行为和预后的关系。方法 应用免疫组化方法检测 232 例胃癌组织中 Ki-67 抗原和 p53 蛋白的表达水平。结果 Ki-67 抗原和 p53 蛋白表达之间呈显著正相关 ($P < 0.001$)。Ki-67 抗原和 p53 蛋白表达水平与胃癌淋巴结转移均密切相关, 而与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、组织类型、浸润深度、远处转移、pTNM 分期无关。Ki-67 抗原、p53 蛋白表达阳性其 3 年生存率均显著低于表达阴性者 ($P = 0.006, 0.007$), 且 Ki-67 - / p53 - 组的胃癌患者 3 年生存率显著高于其他组 (Ki-67 - / p53 +, Ki-67 + / p53 -, Ki-67 + / p53 +) ($P = 0.011, 0.017, 0.001$)。多因素生存分析显示 p53 蛋白水平是独立的预后因素 ($P = 0.002$)。结论 Ki-67 抗原和 p53 蛋白表达与胃癌淋巴结转移及预后有关, p53 蛋白水平是独立影响胃癌预后的重要参数; 联合检测 Ki-67 抗原和 p53 蛋白时, 只要任 1 项阳性即提示不良预后。

关键词: 胃肿瘤/病理学; 癌基因蛋白质 p53; 抗原 Ki-67; 预后

中图分类号: R735.2; R392.116

文献标识码: A

Clinical significance of Ki-67 antigen and p53 protein expression in gastric carcinoma

YI Wei¹, HU Zhi-qian², GONG Zhen-bin²

(1. Department of General Surgery, the 94 Military Hospital, Nanchang 330000, China; 2. Affiliated Chang Zheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in human gastric carcinoma, and the relation of the 2 parameters to biological behavior and prognosis. **Methods** The expressions of Ki-67 antigen and p53 protein were determined by immunohistochemistry technique in 232 patients with gastric carcinoma. **Results** The expression intensity of Ki-67 antigen was directly proportional to that of p53 protein ($P < 0.001$). The expression levels of Ki-67 antigen and p53 protein were both closely correlated with regional lymph node metastasis, but not with patient's sex, age and tumor size, location, histological type, infiltration depth, distant metastasis, nor pTNM stage. The 3-year survival rate of those with positive expression of Ki-67 antigen or p53 protein was higher than those with negative expression ($P = 0.006, 0.007$). The 3-year survival rate of the group Ki-67 - / p53 - was significantly higher than the other three groups (Ki-67 - / p53 +, Ki-67 + / p53 -, Ki-67 + / p53 +) ($P = 0.011, 0.017, 0.001$). Multivariate survival analysis confirmed that p53 protein expression was independently associated with the 3-year survival rate ($P = 0.002$). **Conclusions** Ki-67 antigen and p53 protein expression levels were both significantly correlated with regional lymph node metastasis and prognosis. P53 protein expression is an independent indicator of gastric carcinoma prognosis. Combined analysis of Ki-67 antigen and p53 protein expression showed that positive expression of anyone of them suggests a poor prognosis.

收稿日期:2005-06-27; 修订日期:2006-02-17。

作者简介:易伟,男,江西南昌人,解放军第九十四医院医师,主要从事消化系统肿瘤的临床和基础方面的研究。

通讯作者:胡志前 E-mail:huzq62@163.com。

Key words: Stomach Neoplasms/pathol; Oncogene Protein p53; Ki-69 Antigen; Prognosis

CLC number: R735.2; R392.116

Document code: A

无论是从患病率,还是从病死率的角度看,胃癌始终是对人类健康威胁最大的恶性肿瘤之一。对胃癌生物学行为及预后相关因子的研究仍然是一个重要课题。Ki-67 抗原是与增殖细胞相关的核抗原,p53 是重要的肿瘤抑制基因,二者被广泛应用于各种恶性肿瘤的研究中。本研究通过检测 Ki-67 抗原和 p53 蛋白在胃癌中的表达,分析二者的关系及其与胃癌生物学行为和预后的关系,为临床提供参考指标。

1 材料和方法

1.1 标本及一般资料

收集本院 2000—2002 年间胃癌手术标本 232 例。男 165 例,女 67 例;年龄(57.69 ± 11.85)岁。按肿瘤部位分为胃底贲门部、胃体部和胃窦部 3 组。肿瘤最大径线为(4.58 ± 2.66)cm。组织类型包括分化型(乳头状腺癌、管状腺癌)和未分化型(低分化腺癌、黏液腺癌、印戒细胞癌、未分化癌)。按 1997 年国际抗癌联盟新 TNM 分期标准进行临床分期。232 例中 185 例有完整的随访资料,随访时间 3~5 年。

1.2 实验材料及方法

所有标本均经常规甲醛固定,石蜡包埋。每例选择有代表性的组织蜡块进行连续切片,分别供 HE 染色和 SP 免疫组织化学(免疫组化)染色。一抗分别为鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体和鼠抗人 p53 单克隆抗体,一抗及 SP 超敏试剂盒、DAB 溶液等均购自福州迈新生物技术开发有限公司。SP 免疫组化染色主要步骤为:4 μ m 石蜡切片脱蜡和水化后,3% H₂O₂ 处理 5 min;修复抗原(装有柠檬酸盐缓冲

液的压力锅中煮 10~20 min,然后室温冷却 20 min);50 μ L 过氧化酶阻断溶液孵育 10 min;50 μ L 正常非免疫动物血清孵育 10 min;除去血清,加 50 μ L 的第一抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜;50 μ L 生物素标记的第二抗体孵育 10 min;50 μ L 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液孵育 10 min;加 100 μ L 新鲜配制的 DAB 溶液显色 3~10 min;苏木素复染,脱水透明封片,光镜下观察结果。

1.3 结果评定标准

以各抗体的胃癌阳性染色切片作为阳性对照,以正常血清代替一抗为阴性对照。Ki-67 抗原和 p53 蛋白均定位于肿瘤细胞核。在 40 \times 视野下观察肿瘤细胞,细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性。每视野观察 100 个肿瘤细胞,随机计算 5 个视野,阳性细胞数 > 10% 判为阳性。

1.4 统计学处理

采用统计软件 SPSS 软件包。用 χ^2 检验比较 Ki-67 抗原、p53 蛋白和胃癌各临床病理指标、3 年生存率之间的关系;用非参数统计中 Spearman 等级相关对 Ki-67 抗原和 p53 蛋白的表达进行相关性分析;用二项 Logistic 回归模型对生存进行多因素分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 Ki-67 抗原和 p53 蛋白的表达

Ki-67 抗原阳性表达(图 1)者 104 例,占 44.8% (104/232);p53 蛋白阳性表达(图 2)者 95 例,占 40.9% (95/232);这两种蛋白表达呈显著正相关性($r = 0.360$, $P < 0.001$)(表 1)。

图 1 胃癌 Ki-67 抗原在癌细胞核中的表达(免疫组化染色 SP 法 $\times 40$)

图 2 胃癌 p53 蛋白在癌细胞核中的表达(免疫组化染色 SP 法 $\times 40$)

表1 232例患者Ki-67抗原与p53蛋白表达水平之间的关系

项目	Ki-67 抗原表达		r 值	P 值
	(-)	(+)		
p53 蛋白表达 (-)	96	41	0.360	<0.001
(+)	32	63		

2.2 Ki-67 抗原和 p53 蛋白表达水平与临床病理指标间的关系

表2 232例患者Ki-67抗原和p53蛋白表达水平与临床病理指标的关系

临床指标	例数	Ki-67 抗原表达		阳性率 (%)	χ^2 值	P 值	p53 蛋白表达		阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
		(-)	(+)				(-)	(+)			
性别											
男	165	90	75	45.5	0.091	0.763	96	69	41.2	0.179	0.672
女	67	38	29	43.3			41	26	38.8		
年龄(岁)											
<58	108	59	49	45.4	0.024	0.877	66	42	38.9	0.354	0.552
≥58	124	69	55	44.4			71	53	42.7		
部位											
胃底贲门	66	30	36	54.5	3.546	0.170	32	34	51.5	4.619	0.099
胃体	55	32	23	41.8			33	22	40.0		
胃窦	111	66	45	40.5			72	39	36.1		
肿瘤大小(cm)											
≤4.5	132	69	63	47.7	0.024	0.877	77	55	41.7	0.065	0.798
>4.5	100	54	46	46.0			60	40	40.0		
组织类型											
分化型	87	43	44	50.6	1.859	0.173	47	40	46.0	1.456	0.228
未分化型	145	85	60	41.4			90	55	37.9		
浸润深度											
T ₁	37	22	15	40.5	2.364	0.500	26	11	29.7	2.456	0.483
T ₂	60	37	23	38.3			33	27	45.0		
T ₃	96	48	48	50.0			55	41	42.7		
T ₄	39	21	18	46.2			23	16	41.0		
淋巴结转移											
N ₀	92	55	37	40.2	10.860	0.013	59	33	35.9	10.158	0.017
N ₁	56	38	18	32.1			36	20	35.7		
N ₂	65	28	37	56.9			37	28	43.1		
N ₃	19	7	12	63.2			5	14	73.7		
远处转移											
M ₀	211	114	97	46.0	1.233	0.267	128	83	39.3	2.504	0.114
M ₁	21	14	7	33.3			9	12	57.1		
pTNM 分期											
I	76	46	30	39.5	3.936	0.268	49	27	35.5	3.130	0.372
II	33	20	13	39.4			19	14	42.4		
III	85	46	39	45.9			51	34	40.0		
IV	38	16	22	57.9			18	20	52.6		

2.3 影响胃癌生存率的预后分析结果

2.3.1 单因素分析 对本组185例病例进行术后生存分析,发现Ki-67抗原表达阳性的病例其3年生存率为43.8%,低于Ki-67抗原表达阴性病例的

Ki-67抗原和p53蛋白表达水平在不同胃癌淋巴结分期之间均有显著性差异($\chi^2 = 10.860$ 、 10.158 , $P = 0.013$ 、 0.017),胃癌淋巴结分期较晚者Ki-67抗原或p53蛋白阳性率则较高。而在不同性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、组织类型、浸润深度、远处转移、pTNM分期之间,Ki-67抗原和p53蛋白表达水平均无显著性差异(表2)。

64.3%,差异有显著性($\chi^2 = 7.509$, $P = 0.006$)。p53蛋白表达阳性的病例其3年生存率为43.1%,低于p53表达阴性病例的64.6%,差异有显著性($\chi^2 = 8.295$, $P = 0.004$)。Ki-67-/p53-的胃

癌患者3年生存率为71.1%,高于其他3组(Ki-67-/p53+,Ki-67+/p53-,Ki-67+/p53+的3年生存率,依次为44.8%,46.7%和41.9%),差异均有显著性($\chi^2=6.453,5.745$ 和 10.179 ; $P=0.011,0.017$ 和 0.001)。

2.3.2 多因素分析 本组病例术后影响预后的因素经二项 Logistic 回归模型多因素分析,结果显示 pTNM 分期($P<0.001$)、年龄($P=0.002$)、p53 蛋白水平($B=1.427,SE=0.455,Wald=9.848,P=0.002$)是影响预后的独立因素,而 Ki-67 抗原水平不是($P>0.05$)。

3 讨论

Ki-67 抗原是与增殖细胞相关的核抗原,分布于核内,其功能被认为与染色质相连及与细胞的有丝分裂密切相关,与其他细胞周期相关蛋白不同的是它不表达于 DNA 修复状态的细胞。Ki-67 在 G₁ 后期开始出现,S、G₂ 期升高,M 期达高峰,其后迅速降解,在 G₀ 期无表达^[1],半衰期为 1h 或更短。

多个研究均发现,胃癌中 Ki-67 抗原的阳性率与胃癌的淋巴结转移^[2-4]有显著关系,而 Ki-67 抗原表达水平与胃癌患者生存率的直接关系国内外罕见报道。本组资料显示,Ki-67 抗原表达水平与胃癌淋巴结转移密切相关,Ki-67 抗原表达阳性病例的3年生存率显著低于表达阴性者。肿瘤淋巴结转移是与肿瘤细胞的增殖活性密切相关的,Ki-67 抗原是与增殖细胞相关的核抗原,故 Ki-67 抗原表达水平高者易出现胃癌淋巴结转移。

当 p53 基因发生突变,便失去了对细胞生长、凋亡、DNA 修复等的调控作用,因而由抑癌基因转变成癌基因。在正常细胞及组织中,p53 蛋白的半衰期很短,浓度很低。而肿瘤中有突变体 p53 蛋白,其稳定性增强,大量积聚,可用免疫组化法测出。众多研究表明,p53 蛋白的表达水平与胃癌的淋巴结转移^[5-10]以及预后^[7-13]等有显著关系。Lee 等^[8]和 Fondevila^[13]等的多变量生存分析还证明 p53 是预后的独立因素。p53 蛋白的大量聚集是胃癌恶性程度高的表现。本组资料显示,p53 蛋白表达水平与胃癌淋巴结转移密切相关,p53 蛋白表达阳性的病例其3年生存率显著低于表达阴性者。多因素分析亦证实 p53 蛋白水平是影响胃癌患者预后的独立危险因素。胃癌组织中 p53 蛋白的积聚不仅仅只是与肿瘤的临床病理学指标所表达的特征相关联,可能还存在临床病理学指标所不能体现的基因、分子等改变,故它可作为胃癌预后的一项重要参数。

本组资料显示,Ki-67 抗原表达强度随 p53 蛋

白表达强度的增强而增强。肿瘤细胞恶变后,包括 p53 在内的众多抑癌基因失活及癌基因激活,从而引起一系列改变,肿瘤组织代谢旺盛,合成 DNA 和 RNA 聚合酶活性增高,细胞增殖旺盛,Ki-67 抗原出现高表达。本组资料还提示 Ki-67-/p53- 的胃癌患者3年生存率显著高于其他三组的3年生存率。这说明联合检测 Ki-67 抗原和 p53 蛋白更有助于胃癌病人的预后判断,只要任1项阳性即提示不良预后。如联合检测 Ki-67 抗原和 p53 蛋白发现两种指标任1项阳性者都应加强术后的综合治疗及随访力度;而 p53 蛋白水平更是独立影响胃癌预后的一项重要参数。

参考文献:

- [1] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 [J]. *J Immunol*, 1984, 133(4): 1710-1715.
- [2] Czyzewska J, Guzinska-Ustymowicz K, Lebelt A, *et al.* Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers [J]. *Rocz Akad Med Bialymst*, 2004, 49(1): 64-66.
- [3] Goishi H, Tanaka S, Haruma K, *et al.* Predictive value of cathepsin D and Ki-67 expression at the deepest penetration site for lymph node metastases in gastric cancer [J]. *Oncol-Rep*, 2000, 7(4): 713-718.
- [4] 蔡颖,蔺玉昌. 胃癌 p53 和 Ki-67 表达与淋巴结转移的相关性 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2001, 22(11): 1236-1237.
- [5] 黄扬,陈丽英. p53 和增殖细胞核抗原与胃癌临床病理及预后关系 [J]. *中华医学写作杂志*, 2004, 11(3): 182-184.
- [6] 金锡尊,焦成斌,姚海涛,等. 胃癌 p16、p53、C-erbB-2 基因表达与淋巴转移关系的研究 [J]. *中国实用外科杂志*, 2004, 24(4): 252.
- [7] 王怀志,吴金生,赖大年,等. 胃癌组织中 p16、p53 蛋白的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 1998, 7(3): 161-164.
- [8] Lee HK, Lee HS, Yang HK, *et al.* Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in gastric cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2003, 18(6): 518-525.
- [9] Aoyagi K, Koufujii K, Yano S, *et al.* The expression of p53, p21 and TGF beta 1 in gastric carcinoma [J]. *Kurume Med J*, 2003, 50(1-2): 1-7.
- [10] 林超鸿,朱孝成. p53 基因和 C-erbB-2 基因在胃癌中的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 1998, 7(6): 337-340.
- [11] Lee KE, Lee HJ, Kim YH, *et al.* Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(4): 173-179.
- [12] Bani-Hani KE, Almasri NM, Khader YS, *et al.* Combined evaluation of expressions of cyclin E and p53 proteins as prognostic factors for patients with gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(4): 1447-1453.
- [13] Fondevila C, Metges JP, Fuster J, *et al.* p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(1): 206-215.