

p53、p21waf1 和增殖细胞核抗原 诊断肺癌的评估

丁续红 杨炯 胡苏萍 吴小军 李清泉

【摘要】 目的 评价 p53、p21waf1 和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达对肺癌的诊断价值。方法 采用免疫组化法检测 114 例肺癌和 89 例肺良性疾病组织标本 p53、p21waf1 和 PCNA 蛋白表达状况 , 计算三项指标及其组合诊断肺癌的各项参数。结果 (1)肺癌 p53、p21waf1 及 PCNA 表达阳性率分别为 47.37%、75.44% 和 80.70% , 明显高于肺良性疾病组织($P < 0.001$)。其 OR 值分别为 39.15、5.75 和 6.76。(2)p53、p21waf1 及 PCNA 蛋白表达与肺癌 TNM 分期无关。不同病理类型 p53 和 p21waf1 蛋白表达也无差异 , 但鳞癌 PCNA 表达阳性率高于小细胞癌。(3)p53 诊断肺癌的阳性似然比为 21.08 , 高于 p21waf1 和 PCNA , 但灵敏度较低。(4)PCNA 诊断鳞癌的 Youden 指数为 0.514 6 , 显著高于小细胞癌。但其阳性似然比为 2.29 , 仍低于 p53。(5)p53 和 PCNA 平行试验的灵敏度为 89.47% , 特异度为 60.67% , 其综合评价参数最高。结论 (1)肺癌 p53、p21waf1 和 PCNA 表达均上调 , 三者与肺癌均有很强联系。(2)p53 是一项很好的肺癌诊断单项指标。p53 和 PCNA 平行试验诊断肺癌的综合价值较高。

【关键词】 肺肿瘤 ; 抑癌基因 增殖细胞核抗原

Evaluation of p53 , p21waf1 and PCNA in the diagnosis on lung cancer DING Xuhong , YANG Jiong , HU Suping , et al. Department of Respiratory Medicine , the First Affiliated Hospital of Hubei Medical University , Wuhan 430060 , China

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic value of p53 , p21waf1 and PCNA on diagnosis of lung cancer. **Methods** One hundred and fourteen lung cancer patients and 89 cases with benign pulmonary diseases were studied on the expression of p53 , p21waf1 and PCNA by immunohistochemical staining. The differences of p53 , p21waf1 and PCNA expression status between these two groups were compared and the diagnostic value of these three markers was evaluated. **Results** (1)The positive rates of p53 , p21waf1 and PCNA expression in lung cancer were 47.37% , 75.44% and 80.70% all significantly higher than that in benign pulmonary diseases($P < 0.001$) , with odds ratio 39.15 , 5.75 , 6.76 respectively. (2)The positive likelihood ratio of p53 was 21.08 , higher than that of p21waf1 and PCNA. Specificity and Youden index were also higher than those of p21waf1 and PCNA , but the sensitivity of p53 was low. (3)The sensitivity and specificity of p53 and PCNA parallel test were 89.47% and 60.67% respectively. **Conclusions** (1)The expression of p53 , p21waf1 and PCNA in lung cancer cases were all upregulated. These three markers all seemed to have strong links with lung cancer. (2)p53 was shown a good marker for lung cancer diagnosis. (3)The diagnostic value of p53 and PCNA parallel test was rather high.

【Key words】 Lung neoplasm ; Tumor suppressor gene ; Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)

如何早期诊断肺癌以降低其死亡率是肺癌研究者面临的重大难题。肺癌演变的分子模式表明 , 在细胞过度增生至原位癌期间出现的基因和蛋白质改变均有早期诊断肺癌的潜在价值。p53 基因突变发生于鳞状化生期^[1]。p21waf1 是细胞周期素依赖性激酶抑制因子 , 支气管不典型腺样增生上皮中可检

出 p21waf1 蛋白表达^[2]。增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen , PCNA) 在肺癌演变的最早期即过度增生期已能检出阳性反应^[3]。表明 p53、p21waf1 和 PCNA 等均可用于肺癌早期诊断。p53、p21waf1 与 PCNA 功能相互关联 , 协同进行细胞周期调控。笔者采用方法简便、结果稳定可靠的免疫组化技术检测肺癌组织中这三种蛋白质的表达状况 , 并运用分子流行病学方法 , 研究这三种蛋白质分子诊断肺癌的价值 , 以期将来用于痰或纤维支气

基金项目 湖北省自然科学基金资助项目(96J070)

作者单位 430060 武汉 , 湖北医科大学附属第一医院呼吸内科

管镜刷片标本早期诊断肺癌的研究提供前期实验资料。

材料与方 法

1. 标本 :

(1) 病例组 :从 1996 年 10 月至 1999 年 10 月在湖北医科大学附属第一和第二医院行肺叶切除或纤维支气管镜检的全部肺癌病例中 ,选择具有较详细的临床资料者 114 例 ,均经病理检查明确诊断。其中男 80 例 ,女 34 例。年龄 18 ~ 74 岁。包括鳞癌 44 例(44/114 ,38.60%) ,腺癌 30 例(30/114 ,26.31%) ,小细胞癌 25 例(25/114 ,21.93%) ,大细胞癌 11 例(11/114 ,9.65%) ,未定型癌 4 例。具有明确 TNM 分期者 87 例 ,I 期 21 例 ,II 期 33 例 ,III 期 27 例 ,IV 期 6 例。

(2) 对照组 :选择同期手术或行纤支镜检、具有较详细临床资料的肺良性疾病患者 89 例 ,均经病理或临床检查明确诊断。其中男 63 例 ,女 26 例 ,年龄 16 ~ 70 岁。包括肺结核 39 例 ,慢性支气管炎 19 例 ,肺大疱 14 例 ,支气管扩张 8 例 ,肺炎 4 例 ,炎性假瘤 2 例 ,肺脓肿 2 例 ,肺囊肿 1 例。

2. 试剂和方法 :抗 p21waf1 单克隆抗体 4D10 (novocastra) 抗 p53 单克隆抗体 DO7(DAKO) 抗 PCNA 单克隆抗体 PC10(DAKO) 以及免疫组化染色试剂盒 S-P Kit 均购自福州迈新生物公司。免疫组织化学染色步骤按常规方法及试剂盒说明进行。

3. 结果判定 :p53 和 p21waf1 染色阳性判断标准^[4] :计数连续 5 个高倍镜视野中胞核染成黄褐色的细胞所占比例 ,以 $\geq 10\%$ 为阳性 , $< 10\%$ 为阴性。PCNA 阳性判断标准 :计数方法同 p21waf1 和 p53 ,以见到阳性细胞为阳性 ,未见阳性细胞为阴性。

4. 统计学处理 :两种率的比较采用四格表 χ^2 检验 ,Youden 指数比较采用 u 检验。肺癌组织蛋白表达与分期关系采用 Kolmoyonov-Smirnov 检验 ,不同病理类型肺癌的蛋白表达比较采用 Ridit 分析。

结 果

1. p53、p21waf1 和 PCNA 病例 - 对照研究 :肺癌组织 p53、p21waf1 和 PCNA 染色阳性率分别为 47.37%、75.44% 和 80.70% ,而肺良性疾病组织则分别为 2.25%、34.83% 和 38.20%(表 1)。

87 例具有明确 TNM 分期的肺癌病例中 ,I、II、

III、IV 期 p53 染色阳性率分别为 40.00%、43.48%、50.00% 和 83.33% ;p21waf1 染色阳性率分别为 86.67%、69.56%、77.27% 和 75.00% ;PCNA 染色阳性率为 80.00%、91.30%、72.73% 和 83.33%。经检验三种蛋白表达与肺癌分期均无关($P > 0.05$)。

表1 两组病例应用免疫组化法检测 p53、p21waf1、PCNA 的病例对照研究

	病例数			χ^2 值	P 值	OR 值及 95% 可信限
	肺癌	肺良性疾病	合计			
p53 +	54	2	56	50.94	<0.001	39.15(14.30 ~ 107.18)
-	60	87	147			
p21waf1 +	86	31	117	33.75	<0.001	5.75(3.19 ~ 10.37)
-	28	58	86			
PCNA +	92	34	126	38.34	<0.001	6.76(3.69 ~ 12.38)
-	22	55	77			
合 计	114	89	203			

鳞癌、腺癌、大细胞癌及小细胞癌 p53 染色阳性率分别为 48.27%、45.00% ,50.00% 和 47.06% ;p21waf1 染色阳性率分别为 79.31%、80.00%、50.00% 和 70.59% ;PCNA 染色阳性率为 89.66%、85.00%、100.00% 和 47.06%。四种病理类型之间 p21waf1 和 p53 蛋白表达均无差异。鳞癌 PCNA 表达阳性率明显高于小细胞癌 ,但与腺癌和大细胞癌之间差异无显著性。

2. 三项指标及其联合诊断肺癌价值 :

(1) p53、p21waf1 和 PCNA 单项指标诊断肺癌价值评价见表 2。患病率为 56.16%。

(2) PCNA 诊断鳞癌与诊断小细胞癌的价值比较见表 2。因不同病理类型之间 p21waf1 和 p53 蛋白表达无差异 ,而鳞癌 PCNA 表达阳性率明显高于小细胞癌 ,故在此仅比较 PCNA 诊断鳞癌与诊断小细胞癌的价值。两者 Youden 指数比较 , $u = 2.695$, $P < 0.05$ 。

(3) 因本研究进行之前未能获得肺良性疾病 p53、p21waf1 和 PCNA 的表达阳性率资料 ,无法计算样本大小。现根据表 2 数据 ,计算各指标所需病例组与对照组例数。

设 $\alpha = 0.05$ $\delta = 0.10$;

p53 病例组 $N_1 = 95.77$ 对照组 $N_2 = 12.51$

p21waf1 $N_1 = 71.18$ $N_2 = 87.20$

PCNA $N_1 = 59.83$ $N_2 = 90.69$

3. p53、p21waf1 和 PCNA 联合检测诊断肺癌价值评价经 u 检验 ,B 种组合的 Youden 指数显著高于 G 种组合($u = 2.301 > 1.96$, $P < 0.05$) ,p53 单项指标的 Youden 指数也显著高于 G 种组合($u =$

表2 p53、p21waf1 和 PCNA 诊断肺癌价值评价

指标	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预告值 (%)	阴性预告值 (%)	阳性似然比	阴性似然比	符合率 (%)	Youden 指数	Kappa 值
三项指标诊断									
p53	47.37	97.75	96.43	59.18	21.08	0.538 4	69.46	0.451 2	0.421 1
p21waf1	75.44	65.17	73.50	67.44	2.16	0.376 9	70.93	0.406 1	0.407 6
PCNA	80.70	61.80	73.01	71.43	2.11	0.312 3	72.41	0.425 0	0.431 4
PCNA 诊断									
鳞癌	89.66	61.80	53.06	92.31	2.29	0.169 5	70.45	0.514 6	0.431 1
小细胞癌	47.05	61.80	25.81	80.00	1.21	0.867 6	57.89	0.080 7	0.062 4

2.082, $P < 0.05$), 但与 PCNA、p21waf1 单项指标及其他组合比较差异无显著性(表 3)。

讨 论

本文采用病例对照研究方法,探讨了 p53、p21waf1 和 PCNA 这三种在肺癌早期即出现表达异常的蛋白质与肺癌的联系。根据本研究所获数据计算,为使样本的灵敏度和特异度与其总体值相差小于允许误差 0.10,病例组例数应为 96 例,对照组为 91 例,而本研究所取样本例数为病例组 114 例,对照组 89 例,基本符合所要求的样本数。为避免选择偏倚,本文所选研究对象为 1996 年 10 月至 1999 年 10 月具有较详细临床资料的所有行肺叶切除或纤支镜检者。肺癌病例包括了四种主要病理类型,且各类型所占比例与文献报道一致,并覆盖 TNM 分期 I ~ IV 期,具有较好的代表性。试验过程中采用双盲原则,实验者不知道病理诊断,而病理科在本实验进行之前已完成标本病理诊断,从而避免了信息偏倚。

p53、p21waf1 和 PCNA 在肺癌组织中的表达均明显上升。肺癌组织 p53 基因突变相当普遍,有研究观察到致癌物 BPDE 正是通过与 p53 基因形成加成物导致 p53 基因突变从而致癌的,提示 p53 突变与肺癌发生密切相关^[5]。本文肺癌病例组 p53 蛋白

表达阳性率为 47.37%, 与其他研究报道相似,而对照组仅为 2.25%, 两者比较,差异有极显著性。评价 p53 与肺癌联系强度的 OR 值为 39.15, 表明 p53 与肺癌有极强的联系,是一项很有价值的肺癌诊断标志物。p21waf1 的作用主要是抑制细胞增殖,其在多种肿瘤组织中的表达均增高,如肺癌^[4,6]、结肠癌、膀胱癌^[7]等。实验表明, p21waf1 能抑制多种肿瘤细胞系细胞的体外生长,并能降低这些细胞的裸鼠成瘤率^[8]。p21waf1 表达阳性的膀胱癌患者预后明显好于阴性者^[7]。推测 p21waf1 在肿瘤组织中的高表达可能是机体对细胞无限增生采取的对抗性措施。本研究肺癌病例组 p21waf1 蛋白表达阳性率为 75.44%, 对照组为 34.83%, 差异有极显著性。OR 值为 5.75, 95% 可信限低值为 3.19, 均高于 3.0, 表明 p21waf1 蛋白与肺癌有很强的联系。PCNA 反映细胞增殖程度。本文肺癌病例组 PCNA 蛋白表达阳性率为 80.70%, 对照组为 38.20%, 病例组明显高于对照组。OR 为 6.76, 95% 可信限低值为 3.69, 均大于 3.0, 表明 PCNA 与肺癌也有很强的联系。为 p53、p21waf1 和 PCNA 用于肺癌诊断提供了理论上的可行性。

p53、p21waf1 和 PCNA 单项指标诊断肺癌时,与病理诊断比较,其 Kappa 值均大于 0.4 而小于 0.75, 说明这三项指标与病理诊断有中至高度的一

表3 p53、p21waf1 和 PCNA 联合检测诊断肺癌价值评价

联检方法*	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预告值 (%)	阴性预告值 (%)	阳性似然比	阴性似然比	符合率 (%)	Youden 指数	Kappa 值
A	38.60	97.75	95.65	55.41	17.17	0.628 1	64.53	0.363 5	0.335 4
B	89.47	60.67	74.45	81.82	2.28	0.173 5	76.85	0.501 4	0.516 1
C	39.47	100.00	100.00	56.33	-	0.605 3	66.01	0.394 7	0.363 8
D	82.46	59.55	72.31	72.60	2.04	0.294 6	72.41	0.420 1	0.428 5
E	57.89	79.77	78.57	59.66	2.86	0.527 8	67.49	0.376 6	0.363 3
F	95.61	43.82	68.55	88.64	1.70	0.100 1	72.91	0.394 3	0.417 5
G	31.58	100.00	100.00	53.29	-	0.684 2	61.58	0.315 8	0.288 1
H	97.37	46.07	69.81	93.18	1.81	0.057 1	74.88	0.434 4	0.459 9

* 联检方法中, A、B 为 p53 和 PCNA 组合, C、D 为 p53 和 p21waf1 组合, E、F 为 p21waf1 和 PCNA 组合, G、H 为 p53、p21waf1 和 PCNA 组合; A、C、E、F 为系列试验, B、D、F、H 为平行试验

致性。三项指标中 ,PCNA 的灵敏度高而特异度低 ,p53 的灵敏度低但特异度高 ,p21waf1 介于两者之间。从反映诊断方法综合价值的 Youden 指数来看 ,p53 高于 p21waf1 和 PCNA ,但三者差异无显著性。p53 的阳性似然比最高 ,达 21.08 ,而后二项的阳性似然比仅为 2.16 和 2.11 ,用于诊断肺癌时 ,p53 的价值最高。但由于 p53 的灵敏度较低 ,仅 47.37% ,容易造成漏诊。

p53、p21waf1 和 PCNA 联合检测时 ,与病理诊断比较 ,Kappa 值在 0.4 以上者有四种组合 ,包括 B、D、F 和 H 均为平行试验。其中 ,B 种组合 Kappa 值最高 ,即该诊断方法与病理诊断的一致性最高。F、H 组合的特异度和阳性似然比很低 ,但灵敏度很高 ,阴性似然比很低 ,适用于排除肺癌诊断。D 组合特异度稍高 ,但灵敏度偏低。B 组合灵敏度接近 90% ,且特异度可达 60% ,阳性似然比与阴性似然比适中 ,Youden 指数最高 ,是八种组合中比较理想的一种诊断方法。四种系列试验 A、C、E 和 G 组合的 Kappa 值均低于 0.4 ,尤其是 G 和 A 组合 ,表明其与病理诊断的一致性低。虽然 A、C、G 组合的特异度达 97% 以上 ,但灵敏度低于 40% ,其诊断肺癌的价值不及 p53 单项指标和 B 组合。

与大多数文献报道一样 ,肺癌不同病理类型之间 p53 与 p21waf1 蛋白表达无差异。但鳞癌 PCNA 表达阳性率明显高于小细胞癌。PCNA 不仅参与 DNA 的复制 ,还参与 DNA 的核苷酸外切修复。研究表明 ,肺癌细胞无血清培养时 ,由于这些细胞的 PCNA 表达被完全抑制 ,DNA 修复功能显著降低 ,在氧自由基损伤细胞 DNA 后 ,很快出现细胞凋亡^[9]。鳞癌与小细胞癌之间 PCNA 表达水平的不同 ,可能反映了这两种类型肺癌细胞的 DNA 损伤修复能力的不同。鳞癌细胞 DNA 损伤修复能力可能强于小细胞癌 ,因而其生物恶性度相对地低于后者。比较 PCNA 诊断鳞癌与小细胞癌价值发现 ,PCNA 诊断鳞癌时的 Youden 指数为 0.514 6 ,显著高于小细胞癌。表明其诊断鳞癌的价值高于诊断小细胞癌。但由于其阳性似然比仅为 2.29 ,因而 PCNA 诊断鳞癌的价值仍低于 p53。

Boers 等^[10]研究了支气管鳞状上皮化生组织不典型增生程度、p53、MIB-1 及 bcl-2 免疫活性这四项指标预测癌症发生的价值 ,结果发现 ,p53 免疫活性

与不典型增生程度两项指标的癌症阳性预测值分别达 91% 和 80%。表明 p53 免疫活性的检测具有早期诊断价值。本研究提示 ,p53、p21waf1 和 PCNA 免疫组化染色阳性率与肺癌分期无关 ,表明这三种蛋白质表达异常在肺癌发生的早期即已出现 ,可用于早期诊断肺癌。临床上纤支镜活检所取标本通常较小 ,组织结构不很完整 ,比较容易出现病理漏诊 ,辅以 p53、p21waf1 和 PCNA 免疫组化染色这种客观指标可在一定程度上避免肺癌漏诊 ,同时联合应用纤支镜刷片或痰涂片 ,则可望提高细胞学检查的阳性率 ,并且有可能早期诊断肺癌。

参 考 文 献

- 1 Rusch V , Klimstra D , Linkov I et al. Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia , and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* , 1995 , 55:1365-1372.
- 2 Hayashi H , Miyamoto H , Ito T , et al. Analysis of p21waf1/cip1 expression in normal , premalignant , and malignant cell during the development of human lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* , 1997 , 151: 461-470.
- 3 Hirano T , Franzen B , Kato H , et al. Genesis of squamous cell lung carcinoma. Sequential changes of proliferation , DNA ploidy , and p53 expression. *Am J Pathol* , 1994 , 144:296-302.
- 4 Stefanaki K , Rontogiannis D , Vamvouka C , et al. Immunohistochemical detection of bcl2 , p53 , mdm2 and p21waf1 proteins in small-cell lung carcinomas. *Anticancer Res* , 1998 , 18:1689-1696.
- 5 Denissenko MF , Pao A , Tang M et al. Preferential formation of benzo (a) pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science* , 1996 , 274:430-432.
- 6 Marchetti A , Doglioni C , Barbareschi M , et al. p21waf1 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas : evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene* , 1996 , 12: 1319-1324.
- 7 Stein JP , Ginsberg DA , Grossfeld GD , et al. Effect of p21waf1/cip1 expression on tumor progression in bladder cancer. *JNCI* , 1998 , 90:1072-1079.
- 8 Cheng YQ , Ciptano SC , Arenkiel JM , et al. Tumor suppression by p21waf1. *Cancer Res* , 1995 , 55:4536-4539.
- 9 Driscoll B , Buckley S , Barsky L , et al. Abrogation of cyclin D1 expression predisposes lung cancer cells to serum deprivation-induced apoptosis. *Am J Physiol* , 1999 , 276:L679-L687.
- 10 Boers JE , Ten Velde GPM , Thunnissen FBJM. p53 in squamous metaplasia : a marker for risk of respiratory tract carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* , 1996 , 153:411-416.

(收稿日期 2000-04-24)