

分子标记物在肺腺癌预后评估中的意义

周宝森¹ 戴晓淳² 何安光² 杨春林³ 朱继江⁴

摘要 对 93 例肺腺癌患者做分子流行病学研究,应用免疫组织化学染色方法,用 Cox 多因素回归模型,分析 p21 蛋白、p53 蛋白、细胞增殖活性(PCNA)与预后的关系。结果表明:肺腺癌 p21 蛋白阳性的,预后不好,表达阳性的死亡危险性是阴性的 2.08 倍;p53 蛋白与肺腺癌预后无关;PCNA 阳性百分比高的,预后不好,肺腺癌 PCNA 阳性百分比 50% 以上的死亡危险性是肺腺癌 PCNA 阳性百分比 20% 以下的 3.27 倍。

关键词 肺腺癌 p21 蛋白 p53 蛋白 细胞增殖活性

Molecular Marker As An Indicator in Presaging Prognosis of Human Lung Adenocarcinoma Zhou Baosen, Dai Xiaochun, He Anguang, et al. *Department of Epidemiology, China Medical University, Shenyang 110001

Abstract The paper discusses 93 cases of human lung adenocarcinoma in terms of molecular epidemiology. The relationship between p21 protein and p53 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was analysed by immunohistochemical methods. Prognosis by Cox model was used for prognosis prediction of adenocarcinoma in human lung. Results showed that the prognosis of adenocarcinoma was poor when of p21 protein expression was positive and the relative ratio was 2.08. However, p53 protein expression was not related to the prognosis of adenocarcinoma. The higher the positive rate of PCNA was, the poorer the prognosis of adenocarcinoma appeared, with a ratio of 3.27.

Key words Lung, adenocarcinoma p21 Protein p53 Protein Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)

从分子水平阐述癌症的发生机理,一般认为是癌基因的激活,抑癌基因的失活。有关肺腺癌的癌基因、抑癌基因表达情况已有文献报道,但文献多局限在临床某一方面,本文旨在通过肺腺癌的分子流行病学研究,明确肺腺癌预后与 ras 癌基因、p53 抑癌基因的表达产物 p21 蛋白、p53 蛋白及 PCNA 的关系。

材料与方法

一、标本:93 例原发肺腺癌组织来自中国医科大学第一临床学院手术切除标本,其中男性 66 例,女性 27 例,组织学类型按 WHO 标准分类,组织病理学分级和 pTNM 分期按国际抗癌联盟标准。标本取材后用 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,制成 5 μ m 切片,涂片按常规方法制备。

二、免疫组织化学染色:采用链菌素亲生物素-过氧化物酶免疫组化方法(简称 S-P 法),S-P 试剂盒为 Zymed, Inc. 产品(购自北京中山生物公司)。步骤如下:石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,PBS 洗 5min;

1 中国医科大学流行病学教研室 沈阳 110001

2 中国医科大学肿瘤研究所肺癌研究室

3 中国医科大学研究生处

4 中国医科大学病理学教研室

本课题为国家八五科技攻关资助项目

3% H₂O₂ 10min PBS 洗 5min; 10% 山羊血清 (1:15) 15min; 一抗为抗 p53 单克隆抗体 DO-1, 工作浓度为 1:400, 60min, PBS 洗 5min; 生物素标记二抗(1:150)15min PBS 洗 5min; SP(1:150) 15min, PBS 洗 5min; DAB (Sigma 公司)显色 5~10min, 自来水充分冲洗; 苏木精或甲基绿复染; 脱水、透明、封固。p21 染色同上, 工作浓度为 1:100。对照: 以 PBS 置换一抗作空白对照, 用已知阳性切片作阳性对照。结果判断: p53 蛋白的表达以细胞核呈清晰棕色或胞核胞浆同时呈棕色为阳性, 单纯胞浆着色而无胞核着色或胞核胞浆均无着色为阴性。p21 蛋白的表达以细胞浆呈清晰棕色为阳性, 细胞浆无棕色或与背景着色一致为阴性。PCNA 以细胞核呈清晰棕色为阳性, 每例切片计数 300~500 个癌细胞, 算出标记指数 (LI), $LI = (\text{阳性细胞数} / \text{计数细胞数}) \times 100\%$ 。

三、资料统计分析: 资料处理用 WHO 和 CDC 编制的 EPI5-INFO 软件, 建立数据文件并分析统计处理。预后分析用 EGRET 软件。

结 果

肺腺癌 ras 癌基因、p53 抑癌基因表达与预后的关系, 用 Cox 多因素回归模型, 分析肺腺癌的术后生存时间与肺腺癌 ras 癌基因、p53 抑癌基因表达的关系, 多因素分析调整性别、细胞分化程度、肿瘤临床分期后, p21 蛋白阳性、p53 蛋白阳性的 RR 值分别为 1.39、0.75(附表)。绘制 p21 蛋白阳性、p53 蛋白阳性、阴性生存率曲线显示, p21 蛋白阳性的生存率曲线低于 p21 蛋白阴性的, 经 log-rank 检验差异显著, p53 蛋白阳性的生存率曲线高于 p53 蛋白阴性, 经 log-rank 检验无显著差异。肺腺癌细胞增殖活性与预后的关系, 用 Cox 多因素回归模型, 分析肺腺癌的术后生存时间与肺腺癌 PCNA, 将 PCNA 数量化, 按 PCNA 阳性百分比 20%、

50% 为界分为三个等级, 多因素分析调整性别、细胞分化程度、肿瘤临床分期后, 结果表明肺癌 PCNA 阳性百分比高的, 预后不好, 肺癌 PCNA 阳性百分比 50% 以上的死亡危险性是肺癌 PCNA 阳性百分比 20% 以下的 3.27 倍。PCNA 不同数量级生存率曲线, 经 log-rank 检验差异有显著性。

附表 肺腺癌癌基因、抑癌基因表达、细胞增殖活性与预后的关系

	B	RR	ARR	RR 95% CI	P 值
p53	-0.3031542	0.74	0.75	0.40~1.42	0.32
p21	0.7321302	2.08	1.39	0.54~3.57	0.06
PCNA	0.5917197	1.81	1.97	1.18~3.33	0.01

讨 论

有关 ras 癌基因的突变, Miyamoto 等^[1]报告临床四期的 p21 蛋白免疫组化染色阳性率明显高于低期的, p21 蛋白免疫组化染色阴性的有较长的存活时间。Nishio H 等^[2]也报道肺腺癌 p21 蛋白免疫组化染色阳性有不良的预后, 本研究结果 p21 蛋白表达与预后和上述报道结果一致, 为控制临床分期、细胞分化、性别对预后的影响, 本研究应用了 Cox 多因素模型控制上述因素, 结果, p21 蛋白免疫组化染色阴性的生存曲线优于 p21 蛋白免疫组化染色阳性的。Nishio H 等^[2]报道肺腺癌 p21 蛋白免疫组化染色阳性率为 80.5%, 而本研究结果 p21 蛋白腺癌免疫组化染色阳性率为 81.25%, 两个结果极为相似。

肺癌 p53 抑癌基因的突变, p53 蛋白表达与临床分期、细胞分化、吸烟、不良预后大多数研究有关^[3-5]。Tetsuya Mitsdomi 等^[3]用 Cox 多因素回归模型报道 p53 蛋白表达提示不良的预后。本研究结果与 Tesuya Mitsdomi 等^[3]报道不一致, p53 抑癌基因表达产物 p53 蛋白与预后无关; 这可能和研究的样本为腺癌, p53 蛋白表达的阳性率较低有关。

PCNA 是 DNA 多聚酶 - delta 的一种辅酶^[6], 在 DNA 合成和细胞周期的启动中起

重要作用,在 G1 晚期开始合成, S 期达高峰,在 G2 和 M 期又开始下降,是细胞增殖的一个较好标志物^[7]。关于 PCNA 染色在肺癌中的生物学意义,文献报道和预后有关,是预后的一个独立因素^[8]。本研究表明,PCNA 阳性细胞数 50% 以上的死亡危险性是 20% 以下的 3.27 倍。与文献报道,在 125 例一期肺癌中,5 年生存率在 PCNA(+)(阳性细胞数 > 5%) 为 47%,在 PCNA(-)(阳性细胞数 < 5%) 为 76%,各组之间有显著差别 ($P < 0.05$) 的结果一致,故认为 PCNA(+) 的肺癌具有高的增殖活性,PCNA 可用于肺癌预后的评价^[9]。是反应肺癌细胞的增殖活性的一个良好的标志物。

参 考 文 献

- Miyamoto H, Harada M, Isobe H, et al. Prognostic value of nuclear DNA content and expression of the ras oncogene product in lung cancer. *Cancer Res*, 1991, 51:6346.
- Nishio H, Nakamura S, Horai T, et al. Clinical and histopathological evaluation of the expression of Ha-ras and fes oncogene products in lung cancer. *Cancer*, 1992, 269:1130.
- Tetsuya Mitsudomi, Tsunehiro Oyama, Takuo Kusano, et al. Mutation of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85:2018.
- Curtis CH, Monica Hollstein. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl J Med*, 1993, 28:1318.
- Yoshitsugu Horio, Takashi Takahashi, Tetsuo Kuroishi, et al. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 1993, 53:1.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 1987, 326:515.
- Robbins BA, Vega D dela, Ogata K, et al. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignances. *Arch Pathol Lab Med*, 1987, 111:841.
- Fujii M, Motol M, Saeki H. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression in non-small-cell lung cancer. *Acta Medial Okayama*, 1993, 47:103.
- Ishisa T, Kanekos, Akazawa K, et al. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res*. 1993, 53:5000.

(收稿:1998-04-07 修回:1998-05-04)

四川省首次从空调冷却水中分离到嗜肺军团菌

罗隆泽 谢仁栋 吕强 祝小平 兰纪康 孙莉

自 1978 年军团菌正式命名以来,目前军团菌属已分离出 39 个种、61 个血清型。我们于 1997 年 11 月在成都市两星级宾馆冷却塔循环水分离到 2 株军团菌(编号为 97004、97008),经送请中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所鉴定,确认为嗜肺军团菌血清 1 型(*Lp1*)。两阳性标本在双抗 BCYE 培养基上第 5 天长出单个菌落,菌落直径 1~2mm、灰白色、圆形、凸起、湿润、有光泽。该菌为革兰氏阴性杆菌,BCYE-Cys 培养基和普通琼脂经 10 天培养不生长。两株菌具有相同的生长性状:具动力,氧化酶、过氧化氢酶试验均阳性,明胶酶弱阳性,能分解淀粉,不发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖,尿素酶阴

性,与军团菌特性相符。PCR 检查,两株菌均有军团菌特异的 386bp 16 s rRNA 基因片段和 206bpmpim 基因片段,判定这二株菌均属于军团菌属嗜肺军团菌种。在 IgM 介导的玻片凝集和试管凝集反应中,两株菌与 *Lp1* 标准血清呈明显凝集,与 *Lp8*、*Lp9*、*Lp10* 虽有不同程度的交叉凝集,但在 IgG 介导的 DFA、IFA 中,只与 *Lp* 多价及 *Lp1* 标准血清呈阳性反应,从而确定两株菌均为 *Lp1* 型。

从空调冷却塔水分离到军团菌国内外已有报道,但在四川省尚属首次,表明我省存在这种病原菌,并对人群构成潜在威胁。

(本文承蒙中国预防医学科学院流研所万超群教授指导,特此致谢)