

根治术大肠癌预后因素和个体预后预测模型的研究

杨艳芳 李佩珍 梁小波 韩晓立 李耀平 丛娟

【摘要】 目的 寻找影响大肠癌患者根治术后生存的预后因素。**方法** 选取根治术大肠癌原发病例 120 例,查阅病历及 5 年以上随访资料。并取病例的存档石蜡块,切片后进行 SP 免疫组化方法检测 p53、C-erbB-2、nm23-H₁、Ras 四个基因蛋白表达物。**结果** p53、C-erbB-2、Ras、nm23-H₁ 蛋白在 120 例大肠癌组织中阳性表达率分别为 62.5% (75/120)、25.8% (31/120)、80.0% (96/120)、60.8% (73/120)。将分子生物学标志物与临床病理指标相结合,经 Cox 单因素分析,在 $\alpha = 0.05$ 水平,结果显示:肿瘤大体分型、组织学分级、浸润深度、淋巴结转移、Dukes' 分期、p53、Ras、nm23-H₁ 为有意义的预后影响因素 ($P < 0.05$)。Cox 多因素分析结果显示,在 $\alpha = 0.05$ 水平,Dukes' 分期、p53、nm23-H₁ 是影响大肠癌患者预后的独立指标 ($P = 0.000$),其 RR 值分别为 3.06、6.02、0.40。由此建立的预后预测模型为: $h(t, x) = h_0(t) \exp(-0.9269 X_{14} + 1.1197 X_{10} + 1.7948 X_{11})$, 其预测预后的灵敏度为 79.1%, 特异度为 83.0%, 符合率为 80.8%, Kappa 值为 0.62。**结论** Dukes' 分期、p53、nm23-H₁ 是影响大肠癌患者根治术后生存重要的预后指标,由此建立的预后预测模型具有较高的信度和效度,可为临床医师对大肠癌患者个体预后结局估计提供有力的工具。

【关键词】 大肠癌; 预后; Cox 模型

Study on the prognostic factors of colorectal cancer after radical resection and on suggested model for prediction YANG Yan-fang*, LI Pei-zhen, LIANG Xiao-bo, HAN Xiao-li, LI Yao-ping, Cong Juan.
 *Department of Epidemiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
 Corresponding author: LI Pei-zhen, Email: lipz228@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To study the factors of colorectal cancer (CRC) after radical resection to provide data predicting the prognosis of the patients. **Methods** 120 cases of CRC were collected in this study. Medical clinical records and 5-year follow-up data were reviewed. Streptavidin-peroxidase immunohistochemical technique was used to detect the expression of p53, C-erbB-2, nm23-H₁ and Ras on formalin-fixed, paraffin embedded sections of CRC from the 120 patients. **Results** Results showed that the rates of positive expression of p53, C-erbB-2, Ras and nm23-H₁ were 62.5% (75/120), 25.8% (31/120), 80.0% (96/120) and 60.8% (73/120) respectively in the CRC tissue. All pathological variables and biological markers were analyzed with Cox regression model ($\alpha = 0.05$). Eight distinguished prognostic factors were identified in the univariate analysis as: macroscopic configuration, histology grade, depth of invasion of intestinal, lymph nodes metastasis, Dukes' classification, p53, Ras and nm23-H₁. The results of multivariate analysis ($\alpha = 0.05$) indicated that the independent prognostic factors were Dukes' classification, p53 and nm23-H₁ ($P = 0.000$), with relative risk of 3.06, 6.02 and 0.40, respectively. A prognostic model: $h(t, x) = h_0(t) \exp(-0.9269 X_{14} + 1.1197 X_{10} + 1.7948 X_{11})$ was established. Sensitivity, specificity agreement and reliability of the model and Kappa were 79.1%, 83.0%, 80.8% and 0.62, respectively. **Conclusion** Dukes' classification, p53 and nm23-H₁ seemed to be independent and important prognostic factors. This prognostic model could be used to evaluate the prognosis of patients with CRC by clinicians.

【Key words】 Colorectal cancer; Prognosis; Cox model

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(991076)

作者单位:030001 太原,山西医科大学流行病学教研室(杨艳芳、李佩珍、韩晓立);山西省肿瘤医院(梁小波、李耀平、丛娟)

通讯作者:李佩珍, Email: lipz228@sina.com.cn

近年来,由于食物结构和生活方式的改变,我国大肠癌的发病率和死亡率呈逐步上升趋势。随着分子生物学的发展,为从分子水平寻找大肠癌的早期诊断及预后奠定了一定的基础。可是大肠癌的预后却无明显改观,5 年生存率仍在 50% 左右。众所周知,影响大肠癌预后的因素是多方面的。本研究对若干临床病理因素和 p53、Ras、C-erbB-2、nm23-H₁ 等蛋白的表达情况与大肠癌预后的相关性进行了分析,筛选出影响大肠癌预后的有关因素,为临床医师从多方面、客观、准确地判断患者的预后提供参考依据。

对象与方法

1. 研究对象及标本来源:研究对象来自 1989 年 1 月至 1991 年 12 月期间在山西省肿瘤医院肛肠科行根治性切除术的大肠癌原发病例 120 例。3 年期间该科共收治大肠癌病例 462 例,其中实施根治术者 309 例,去除无生存记录、缺失病理资料、无组织标本的 138 例,剔除根治术前有放疗、化疗的 51 例,余 120 例为本次研究对象。120 例根治术大肠癌中,男性 66 例,女性 54 例;年龄 20~72 岁,平均年龄 49 岁。取上述病例的存档石蜡块,做 5 μm 厚的连续切片。

2. 调查方法及内容:采用临床资料回顾性分析的方法。由经过培训的调查员查阅病历,根据事先拟定好的调查表逐项填写。调查内容主要包括临床、病理因素,如发病年龄、性别、文化程度、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学分级、大体分型、肿瘤浸润深度、淋巴结转移有无、Dukes' 分期等 10 个因素。

3. 试剂及方法:鼠抗人 p53 蛋白单克隆抗体 DO-7(即用型)、鼠抗人 Ras 蛋白单克隆抗体 F132(即用型)为福州迈新生物技术开发公司产品,鼠抗人 C-erbB-2 单克隆 TAB250(即用型)为北京中山生物技术有限公司产品,鼠抗人 nm23-H₁ 单克隆抗体 nm301(1:50)为美国 Santa Cruz 公司产品;SP 免疫组化染色试剂盒为美国 ZYMED 公司产品,北京中山公司分装。实验操作步骤按 SP 免疫组化试剂盒说明进行,稍加改进。

4. 结果判断:p53 蛋白阳性表达为细胞核呈棕褐色,细胞膜及细胞浆不着色;C-erbB-2 蛋白阳性表达为细胞膜或胞浆着棕色;nm23-H₁ 蛋白阳性表达为细胞膜或胞浆呈棕色;Ras 蛋白阳性表达为胞浆呈棕色。以上蛋白的表达均以计数 10 个高倍视野的阳性细胞数 < 10% 为阴性,≥10% 为阳性,染色深

度以多数细胞的呈色反应为准。

5. 质量控制:①每批标本检测时,均设有阳性对照和阴性对照(多次染色均为阳性和阴性的大肠癌标本),同时还设有空白对照(以 PBS 代替一抗染色已知阳性片);②盲法判断检测结果;③所有标本检测结束后,又随机化抽取 20 例标本重复进行各指标的染色,与前检测结果相比,一致率为 100%。

6. 统计学分析:检查核对原始调查表,将 14 个研究因素量化(表 1)。应用 SPSS 9.0 版软件进行数据分析,包括寿命表法计算生存率、Cox 单因素及多因素回归分析、Kaplan-Meier 曲线绘制和 χ^2 检验等。

表 1 大肠癌可疑预后因素赋值表

变 量	赋 值
性别(X_1)	男=0,女=1
年龄(X_2)	≤40岁=0,>40岁=1
文化程度(X_3)	文盲、半文盲=1,小学、初中=2,高中、中专=3,大专及以上=4
肿瘤大小(cm)(X_4)	≤3×3=0,>3×3=1
大体分型(X_5)	隆起型=1,溃疡型=2,浸润型=3,其他=4
肿瘤部位(X_6)	结肠=0,直肠=1
组织学分级(X_7)	高分化腺癌=1,中分化腺癌=2,低分化腺癌=3
浸润深度(X_8)	粘膜层=1,肌层=2,浆膜层=3,浆膜外=4
淋巴结转移(X_9)	无=0,有=1
Dukes' 分期(X_{10})	A=1,B=2,C=3,D=4
p53 蛋白(X_{11})	阴性=0,阳性=1
C-erbB-2 蛋白(X_{12})	阴性=0,阳性=1
Ras 蛋白(X_{13})	阴性=0,阳性=1
nm23-H ₁ 蛋白(X_{14})	阴性=0,阳性=1
根治术到观察结束(Y)实际天数	
随访结果(D)	生存=0,死亡=1

结 果

1. 根治术大肠癌的生存率:120 例研究对象的 1、3、5 年生存率分别为 62.5%、48.3% 和 44.2%。Dukes' A、B、C、D 各期病例的 5 年生存率分别为 100.0%、63.6%、31.7% 和 6.7%,经 Log-rank 检验, $\chi^2 = 42.71, P = 0.000$ (图 1)。

2. 免疫组织化学检测:120 例大肠癌标本中共检出 p53 蛋白阳性表达者 75 例,阴性表达者 45 例,阳性表达率为 62.5%;C-erbB-2 蛋白阳性表达者 31 例,阴性表达者 89 例,阳性表达率为 25.8%;Ras 蛋白阳性表达者 96 例,阴性表达者 24 例,阳性表达率为 80.0%;nm23-H₁ 蛋白阳性表达者 73 例,阴性表达者 47 例,阳性表达率为 60.8%。

3. 单因素 Cox 模型分析:将 14 个研究因素进行单因素 Cox 模型分析,在 $\alpha = 0.05$ 水平,有显著性意义的预后因素有 8 个,分别是肿瘤大体分型(X_5)、

组织学分级 (X_7)、浸润深度 (X_8)、淋巴结转移 (X_9)、Dukes' 分期 (X_{10})、p53 (X_{11})、Ras (X_{13})、nm23-H₁ (X_{14}), 见表 2。

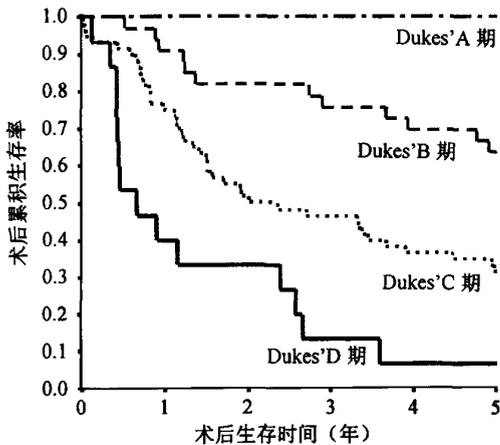


图1 大肠癌患者不同 Dukes' 分期术后生存率曲线

4. 多因素 Cox 模型分析: 将所研究因素全部加入, 用逐步前进法建立大肠癌预后的最终模型, 共选入 3 个因素, 分别是 Dukes' 分期 (X_{10})、p53 (X_{11})、nm23-H₁ (X_{14}), 按其标准回归系数由小到大排列 (表 3)。

由此建立的大肠癌术后生存预测模型为: $h(t, x) = h_0(t) \exp(-0.9269 X_{14} + 1.1197 X_{10} + 1.7948 X_{11})$ 上述模型经全局 χ^2 检验, 在 $\alpha = 0.05$ 水准, $\chi^2 =$

71.31, $P = 0.000$, 可认为该模型有统计学意义。

5. 大肠癌患者预后估计及可靠性分析: 根据已建立的大肠癌患者预后预测模型, 得出预后指数 (prognostic index, PI) 计算式为: $PI = 1.1197 X_{10} + 1.7948 X_{11} - 0.9269 X_{14}$ 。利用 ROC 曲线工作原理, 当 $PI \geq 3.4555$ 时, 患者术后 5 年预后结局较差; 当 $PI < 3.4555$ 时, 患者术后 5 年预后结局较好。预测结果与随访满 5 年的患者实际生存结果相比较见表 4。据表 4 该预后预测模型的灵敏度为 79.1%, 特异度为 83.0%, 符合率为 80.8%, Kappa 值为 0.62, 说明模型预测结果与实际预后结果具有中、高度一致性。

讨 论

大肠癌患者的生存结局受到众多因素的影响, 国内外学者已有不少报道, 但是, 目前结论还存在不小的分歧。本研究通过 Cox 模型最终筛选得出三个因素有显著意义。

Dukes' 分期是影响大肠癌患者预后的一个重要因素, 已在许多研究中得到证实^[1,2]。实质上, Dukes' 分期是反映肿瘤浸润深度和淋巴结转移的综合指标。在单因素 Cox 回归分析中, 肿瘤浸润深度和淋巴结转移为有意义的预后因素 ($P < 0.01$); 多

表2 根治术大肠癌预后因素单因素 Cox 模型分析结果

变 量	β	s_x	Wald χ^2 值	P 值	RR 值(95% CI)
性别 (X_1)	-0.0965	0.2451	0.15	0.694	0.91(0.56~1.47)
年龄 (X_2)	0.0286	0.2810	0.01	0.919	1.03(0.59~1.78)
文化程度 (X_3)	0.0506	0.1728	0.09	0.770	1.05(0.75~1.48)
肿瘤大小 (X_4)	0.1012	0.3091	0.11	0.743	1.11(0.60~2.03)
大体分型 (X_5)	0.3248	0.1208	7.23	0.007	1.38(1.09~1.75)
肿瘤部位 (X_6)	-0.1662	0.2603	0.41	0.523	0.85(0.51~1.41)
组织学分级 (X_7)	0.4852	0.1639	8.77	0.003	1.62(1.18~2.24)
浸润深度 (X_8)	0.6164	0.1906	10.46	0.001	1.85(1.27~2.69)
淋巴结转移 (X_9)	1.3475	0.3027	19.82	0.000	3.85(2.13~6.96)
Dukes' 分期 (X_{10})	1.0868	0.1810	36.05	0.000	2.96(2.08~4.23)
p53 蛋白 (X_{11})	1.6057	0.3322	23.36	0.000	4.98(2.60~9.55)
C-erbB-2 蛋白 (X_{12})	0.0243	0.2714	0.01	0.929	1.02(0.60~1.74)
Ras 蛋白 (X_{13})	0.7520	0.3772	3.97	0.046	2.12(1.01~4.44)
nm23-H ₁ 蛋白 (X_{14})	-0.9064	0.2468	13.50	0.000	0.40(0.25~0.66)

表3 根治术大肠癌预后因素多因素 Cox 模型分析结果

变 量	β	s_x	Wald χ^2 值	P 值	RR 值(95% CI)
年龄 (X_2)	0.0114	0.2865	0.00	0.968	1.01(0.58~1.77)
nm23-H ₁ 蛋白 (X_{14})	-0.9269	0.2544	13.28	0.000	0.40(0.24~0.65)
Dukes' 分期 (X_{10})	1.1197	0.1896	34.87	0.000	3.06(2.11~4.44)
p53 蛋白 (X_{11})	1.7948	0.3470	26.76	0.000	6.02(3.05~11.88)

表4 根治术大肠癌患者5年生存预测与实际预后结果分析

模型预测生存时间(年)	实际预后生存时间(年)		合计
	<5	≥5	
<5	53	9	62
≥5	14	44	58
合计	67	53	120

因素 Cox 回归分析中, Dukes' 分期进入了最终模型 ($P=0.000$), 其 RR 值为 3.06, 表明 Dukes' 分期每增加一期, 其死亡风险即为上一期的 3.06 倍。可见, 临床 Dukes' 分期作为影响大肠癌患者术后的预后因素已基本成为定论, 可以为临床医师选择治疗方案, 估测患者生存情况提供一定的依据。

正常人体中 p53 基因是一种抑癌基因(野生型), 突变后成为癌基因。p53 蛋白是 p53 基因功能的执行者。野生型 p53 蛋白具有抑癌作用, 突变型 p53 蛋白则丧失抑癌活性, 而具有促进细胞恶性转化及增殖活性。野生型 p53 蛋白在细胞中易水解, 半衰期为 6~30 min, 不能被标准的免疫组化染色所检测, 而突变型 p53 蛋白由于构象发生改变, 易出现积聚, 半衰期延长, 能被常用的免疫组化方法检测出来, 所以用免疫组化检测出的 p53 蛋白基本表示突变的 p53 蛋白^[3]。国外不少资料报道^[4,5], p53 蛋白细胞核高表达与大肠癌患者预后有关。本研究结果显示, p53 蛋白阳性表达率为 62.5%, 与国内外文献报道的阳性率 50%~70% 结果一致。经多因素 Cox 模型回归分析, p53 作为独立的预后指标进入最终回归模型 ($P=0.000$), 其 RR 值为 6.02, 表明 p53 蛋白阳性表达者的死亡风险是阴性表达者的 6.02 倍。可见, p53 在大肠癌预后评估中有着重要意义, 它可作为一个独立的预后指标初步用于临床。

nm23 基因是一种能抑制癌细胞转移的基因。现已鉴定出两种人类 nm23 基因亚型 (nm23-H₁ 和 nm23-H₂)。有文献报道^[6], nm23 低表达与大肠癌浸润和淋巴结转移具有相关性。本研究结果显示, nm23-H₁ 阳性表达率为 60.8%。经多因素 Cox 回归分析, nm23-H₁ 作为独立预后指标进入最终回归模型 ($P=0.000$), 其 RR 值为 0.40, 表明 nm23-H₁ 是大肠癌预后的一个保护性指标, nm23-H₁ 蛋白阳性表达者的死亡风险是阴性表达者的 0.40 倍。可见, nm23-H₁ 蛋白的检测可用于临床预测大肠癌患者的转移和预后, 极有可能成为一个非常有用的预后指标。

有关 c-erbB-2 基因和 ras 基因表达与大肠癌预后的研究, 目前结论尚无较为一致的看法。本组 C-erbB-2 蛋白阳性表达率为 25.8%, 经单因素及多因素 Cox 回归分析, 均未进入模型 ($P>0.05$), 与 McKay 等^[7]的研究结果相似。ras 基因是一个经典的癌基因, 有文献报道^[8], Ras 蛋白在大肠癌组织中表达率为 70.1% 且与预后有关, 本组检测结果, Ras 蛋白阳性表达率为 80.0%。经多因素 Cox 回归分析, Ras 蛋白未进入最终模型 ($P>0.05$)。有关该二基因表达与大肠癌预后的关系, 还需进一步探讨。目前, 有关其他基因与大肠癌预后的研究也有报道, 如 VEGF、CD44 等, 尚需进一步的研究。另外, 也许结肠癌与直肠癌的预后因素有一定的差异, 本次研究由于病例数较少, 不便分开进行分析, 因此需增加样本做进一步研究。

综上所述, Dukes' 分期、p53、nm23-H₁ 为较为可靠的根治术大肠癌预后因子, 由此建立的大肠癌预后预测模型, 在预测大肠癌患者的 5 年预后结局中灵敏度为 79.1%, 特异度为 83.0%, 符合率为 80.8%, Kappa 值为 0.62, 表明这一模型具有较高的信度和效度, 可为临床医师对大肠癌患者个体预后结局估计提供有力的工具。

参 考 文 献

- Nan KJ, Qin HX, Yang G. Prognostic factors in 165 elderly colorectal cancer patients. World J Gastroenterol, 2003, 9: 2207-2210.
- 郭雅, 卢全书, 王文光, 等. Cox 模型在影响大肠癌术后预后因素分析中的应用. 中国肛肠病杂志, 1997, 2: 9-12.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature, 1992, 358: 15-16.
- Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. Clin Cancer Res, 2004, 10: 3490-3499.
- Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF, et al. p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. J Clin Oncol, 1994, 12: 2043-2050.
- 薛立娟, 王维忠, 张文岚, 等. p53 和 nm23 蛋白表达与大肠癌浸润转移的关系. 中国免疫学杂志, 2001, 17: 30-32.
- McKay JA, Loane JF, Ross VG, et al. c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer. Br J Cancer, 2002, 86: 568-573.
- 孙哲, 高鹤立. p21^{ras}、p16 在大肠癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志, 2001, 9: 1399-1403.

(收稿日期: 2004-07-29)

(本文编辑: 张林东)