

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.22.007

甲状腺乳头状癌 p53 基因及蛋白的表达情况及临床意义

段东峰, 贾国战[△]

空军军医大学唐都医院, 陕西西安 710038

摘要:目的 研究甲状腺乳头状癌(PTC)p53 基因及蛋白的表达情况及临床意义。方法 选择 143 例该院住院手术切除的 PTC 石蜡标本, 另外收集同期因甲状腺良性病变切除的正常甲状腺组织标本 68 例。分别采用免疫组化法及 western blot 法检测 PTC 组织和正常甲状腺组织中 p53 蛋白的表达情况; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)测定 PTC 组织和正常甲状腺组织中 p53 mRNA 相对表达量; 探讨 p53 蛋白表达与 PTC 临床病理特征的关系; 采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析, 分析 p53 蛋白表达与 PTC 患者预后的关系。结果 免疫组化结果显示, p53 蛋白在 PTC 组织中呈阳性表达; RT-PCR 结果显示, PTC 组织中的 p53 mRNA 表达高于正常甲状腺组织 ($P < 0.05$); western blot 结果显示, p53 蛋白在 PTC 组织中表达水平明显高于正常甲状腺组织 ($P < 0.05$)。PTC 组织中 p53 蛋白的表达水平与性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤分化程度无关 ($P > 0.05$), 而与 TNM 分期、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 法生存分析显示, p53 蛋白阳性表达组 5 年生存率明显低于 p53 蛋白阴性表达组 ($P < 0.05$)。结论 p53 基因及蛋白在 PTC 中大多表达上调, 参与 PTC 的发生、发展, 影响患者预后, 值得临床重视。

关键词: 甲状腺乳头状癌; p53 基因; p53 蛋白; 免疫组化

中图分类号: R736.1

文章编号: 1672-9455(2019)22-3256-04

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Expression of p53 gene and protein in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance

DUAN Dongfeng, JIA Guozhan[△]

Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China

Abstract: Objective To study the expression of p53 gene and protein in papillary thyroid carcinoma (PTC) and its clinical significance. **Methods** A total of 143 resected PTC paraffin specimens were collected from the hospitalized patients, and other contemporaneous 68 normal thyroid tissue specimens were collected from the resected thyroid benign lesions. The expression levels of p53 protein in PTC tissues and normal thyroid tissues were detected by adopting the immunohistochemistry (IHC) and western blot respectively. The real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the relative expression levels of p53 mRNA in PTC tissues and normal thyroid tissues. The relationship between the expression level of p53 protein and clinicopathological characteristics of PTC was investigated. The Kaplan-meier method was used for conducting the survival analysis. The relationship between the p53 protein expression with prognosis and survival of PTC patients was analyzed. **Results** The IHC results showed that p53 protein was positively expressed in PTC tissues; the RT-PCR results showed that the p53 mRNA expression in the PTC tissue was higher than that in the normal thyroid tissue ($P < 0.05$); the western blot results showed that the p53 protein expression level in the PTC tissue was significantly higher than that in the normal thyroid tissue ($P < 0.05$). The p53 protein level in the PTC tissue had no relationship with the sex, age, tumor diameter and tumor differentiation ($P > 0.05$), while had the relationship with the TNM classification and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The Kaplan-meier survival analysis showed that the 5-year survival rate in the p53 positive expression group was significantly lower than that in the p53 negative expression group ($P < 0.05$). **Conclusion** p53 protein is mostly up-regulated in PTC, which may be involved in the occurrence, development and prognosis of PTC, and is worthy of clinical attention.

Key words: thyroid papillary carcinoma; p53 gene; p53 protein; immunohistochemical

甲状腺恶性肿瘤中最为常见的是甲状腺癌, 其中 甲状腺乳头状癌(PTC)占甲状腺癌的 70.0%~

85.9%^[1-2],并呈逐年上升的趋势,严重威胁人们的生命健康。迄今为止,PTC 的病因及发病机制尚不明确。近年来,随着分子生物学的迅速发展,PTC 基因水平的研究已成为该领域研究的热点^[3-4]。p53 基因作为一个重要的抑癌基因,有着“基因卫士”之称,在肿瘤细胞的发生、发展中都具有重要作用。有研究发现,经脑动脉注入重组腺病毒 p53 基因治疗剂[Ad-p53(INGN 201)],能有效抑制脑肿瘤的大小^[5]。为明确 p53 基因在 PTC 患者中发挥的作用及对患者预后的影响,本研究对 143 例 PTC 组织标本和 68 例正常甲状腺组织标本进行了 p53 基因和蛋白表达情况的研究,分析 p53 基因、p53 蛋白在 PTC 组织中的表达情况及对预后的影响,旨在为 PTC 患者临床治疗提供一定思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析本院 2017 年 2 月至 2018 年 2 月确诊并行手术切除的 PTC 患者 143 例,其中男 39 例,女 104 例,平均年龄(41.6±5.8)岁。所有患者临床资料完整,术前均未进行放疗、化疗及内分泌治疗。术中留取两块 PTC 组织分别进行免疫组化和实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测。所有标本均采用 4%多聚甲醛溶液固定,于液氮或-80℃冰箱中保存、备用。另外 68 例正常甲状腺组织标本取自同期因甲状腺良性病变就诊的患者,其中男 15 例,女 53 例,平均年龄(40.7±5.4)岁。本研究经过医院伦理委员会审批,所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)免疫组化法 采用 SP 免疫组化法将 PTC 病理组织及正常甲状腺组织以 4 μm 的厚度连续切片,石蜡包埋,常规脱蜡、水化后,取适量枸橼酸盐缓冲液(1:100, pH 6.0,工作液)浸没切片,高温高压下放置 1.5 min,完成抗原修复。室温孵育(3%过氧化氢,10 min),封闭内源性过氧化物酶,PBS 冲洗,滴加 p53 一抗工作液,4℃冰箱过夜后,PBS 冲洗,滴加二抗,室温孵育 10 min,PBS 冲洗。DAB 显色,清水冲洗。复染(苏木素)、分化(盐酸)、返蓝(氨水)、脱水(乙醇)、透明(二甲苯)、封片(中性树脂),以 PBS 代替一抗作阴性对照。所有切片均由经验丰富的病理医生盲法阅片确定,检测 p53 蛋白在 PTC 组织和正常甲状腺组织中的表达情况。

1.2.2 RT-PCR 分别取 PTC 组织和正常甲状腺组织各 50 mg,加入 1 mL Trizol 试剂进行研磨。根据试剂盒要求的方法提取待测组织的总 RNA,用紫外分光光度计检测 RNA 水平,使 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值>1.8~2.0,电泳检测 RNA 的完整度符合要求。分别参照 Trizol 试剂盒说明书、cDNA 试剂说明书、SYBR Green PCR 试剂盒操作步骤进行检测。扩增体系:SYBR mix、cDNA、上游引物、下游引物分别为

12.5、2.0、0.5、0.5 μL,最后加 ddH₂O 至 25.0 μL。反应程序:42℃ 20 min,95℃ 5 min,(95℃ 15 s→55℃ 15 s→72℃ 20 s)40 个循环,95℃ 1 min,55℃ 30 s,95℃ 30 s。重复试验 3 次以减少误差及偏倚,内参选择 β-actin 基因。根据 TP53 引物序列(5'~3':ACCTATGGAACTACTTCCTGAAA;3'~5':CTG-GCATTCTGGGAGCTTCA)进行常规扩增。采用 ABI-7500 检测仪自带软件分析数据,用 2^{-ΔΔCt} 来表示 PTC 组织和正常甲状腺组织中 p53 mRNA 的相对表达量。

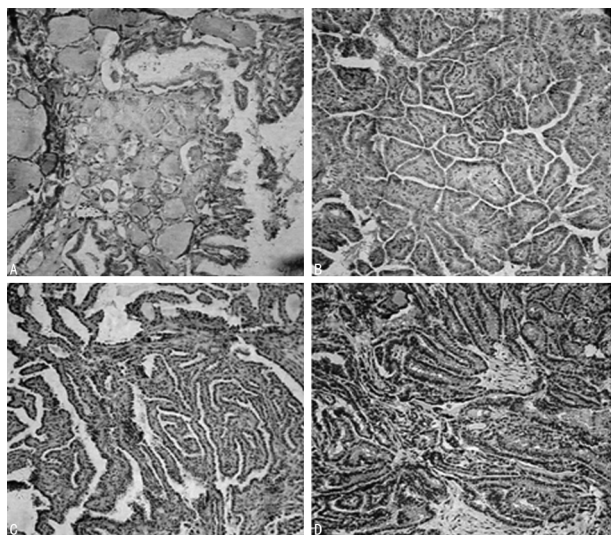
1.2.3 western blotting 检测 分别取出 PTC 组织和正常甲状腺组织约 50 mg,用 RIPA 裂解缓冲液制备蛋白裂解物,加入 5 倍体积的裂解液,于冰上充分研磨。4℃,12 000 r/min 离心 20 min,取上清液重复上述步骤再次离心,取上清液。上清液经蛋白定量后,取 60 μg 蛋白经 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)上。用 10%脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗(1:1 000)孵育,4℃过夜。用 TTBS 充分洗膜后,加入二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,TTBS 清洗、显色液显色后照相,采用 Gel-Pro6.0 分析软件进行图像分析。

1.3 免疫组化结果判定 p53 蛋白主要位于细胞质内,阳性表达者呈棕黄色颗粒样物质。高倍镜下随机选取 5 个视野(每个视野可观察细胞数≥200 个)。首先,依据切片中细胞着色的深浅进行评分:棕褐色为 3 分;棕黄色为 2 分;浅黄色为 1 分;细胞无显色为 0 分。其次,根据阳性细胞所占百分比进行评分:阳性细胞数>70%为 3 分;>30%~70%为 2 分;≤30%为 1 分。将两项标准评分的乘积作为总积分,0~1 分为阴性记作(-),2~3 分为弱阳性记作(+),≥4 分为阳性记作(++)。所有的患者进行 5 年的随访(期间若患者死亡则终止随访),随访的方式包括预约患者到门诊就诊、电话追踪、微信访视等。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理和分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,采用 Log-Rank 法进行检验,评估 p53 蛋白表达与患者预后的关系。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果 PTC 组织存在 p53 蛋白表达,定位于细胞质,呈弥漫性分布。p53 蛋白在 PTC 组织中表达强弱不等,阳性表达率为 91.60%(131/143),正常甲状腺组织的 p53 蛋白表达多为阴性,仅有 6 例表达为弱阳性 8.82%(6/68)。见图 1。



注：A 为正常甲状腺组织；B 为 PTC 组织弱阳性(+)；C、D 为 PTC 组织阳性表达(++)

图 1 PTC 组织和正常甲状腺组织的 p53 免疫组化染色结果(×400)

2.2 RT-PCR 结果 RT-PCR 检测结果显示, PTC 组织中的 p53 mRNA 和正常甲状腺组织中的 p53 mRNA 分别为 6.30 ± 1.54 和 1.21 ± 0.22 , 差异有统计学意义($t = 18.354, P < 0.05$)。

2.3 PTC 组织和正常甲状腺组织中 p53 蛋白的表达情况 western blotting 检测结果显示, PTC 组织、正常甲状腺组织中 p53 蛋白水平分别为 123.56 ± 20.12 、 7.83 ± 2.17 , PTC 组织的 p53 蛋白水平明显高于正常甲状腺组织, 差异有统计学意义($t = 21.238, P < 0.05$)。见图 2。

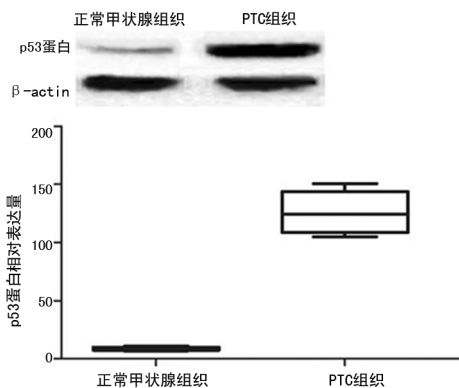


图 2 p53 蛋白在 PTC 组织和正常甲状腺组织中的表达情况

2.4 PTC 组织中 p53 蛋白的表达与临床病理特征的关系 143 例 PTC 患者中, 131 例 p53 蛋白表达为阳性。p53 蛋白的表达水平与性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤分化程度无关($P > 0.05$), 而与 TNM 分期、是否发生淋巴结转移有关($P < 0.05$)。见表 1。

2.5 p53 蛋白与 PTC 患者预后的关系 经 5 年随访, 7 例患者失访, 随访率为 95.10%。Kaplan-Meier 法生存分析显示, p53 蛋白阳性表达组患者 5 年总生存率 (85.50%) 明显低于 p53 蛋白阴性表达组 (100.00%),

差异有统计学意义 ($\text{Log-Rank}\chi^2 = 8.654, P = 0.009$), 说明 p53 蛋白阳性表达是 PTC 患者术后死亡的主要危险因素。见图 3。

表 1 PTC 组织中 p53 蛋白的表达与临床病理特征的关系[n(%)]

病理特征	n	p53 蛋白阳性	χ^2	P
性别			1.615	0.423
男	39	36(92.31)		
女	104	95(91.35)		
年龄(岁)			1.921	0.296
<40	51	46(90.20)		
≥40	92	85(92.39)		
肿瘤直径(cm)			1.704	0.416
<2	48	43(89.58)		
≥2	95	88(92.63)		
分化程度			1.815	0.347
高分化	81	74(91.36)		
中分化	41	37(90.24)		
低分化	21	20(95.23)		
TNM 分期(期)			15.024	0.000
I	82	72(87.80)		
II	49	47(95.92)		
III	12	12(100.00)		
淋巴结转移			17.812	0.000
有	51	50(98.04)		
无	92	81(88.04)		

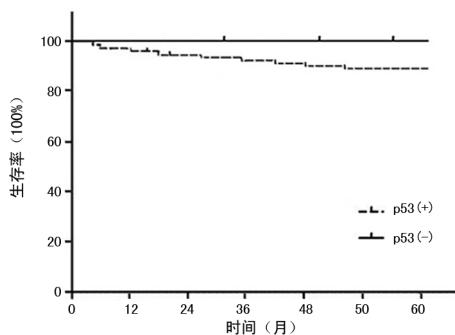


图 3 p53 蛋白与 PTC 患者预后的关系

3 讨 论

PTC 是甲状腺癌中最常见、恶性程度最低的恶性肿瘤, 可于任何年龄阶段发病^[6]。PTC 的发病率逐年升高, 占每年新增癌症的 1.0%~1.5%, 越来越多地累及中青年^[7-8]。近年来, 随着全民健康意识的普及, 进行健康体检人数逐年增多, 而体检时意外发现的甲状腺癌病例也相应增多, 此时大部分该病患者处于较好的治疗时机, 患者的 10 年生存率能够达到 90% 以上^[9-11]。但 PTC 具有较高的侵袭性, 这也是导致患者病死率增加的主要原因。因此, 需要在 PTC 发生初期进行早期筛查和治疗, 在 PTC 发生后进行有效治疗和预防复发。而寻找到 PTC 特异性相关基因可有

效地解决这一问题,为 PTC 的诊断和治疗提供新的理论依据。上皮细胞在某些因素作用下丧失极性、黏附性下降,通过细胞骨架重塑,转化为具有活动能力的间质细胞,这个过程被称为上皮间质转化。PTC 患者的癌细胞通过上皮间质转化获得迁移和侵袭能力,加速了病灶转移与复发。

p53 基因定位于人类染色体 17p13.1,包括野生型和突变型两种,正常时以野生型存在,由 11 个外显子和间隔的 10 个内含子组成,全长 16~20 kb,编码蛋白为 p53 蛋白。p53 蛋白属于核内磷酸化蛋白,由 393 个氨基酸构成。目前已经证实 p53 蛋白的异常表达与某些类型肿瘤的进展和预后不良有关^[12]。p53 基因是一种抑癌基因,在所有恶性肿瘤中,50% 以上的患者会出现该基因的突变。野生型 p53 基因是人体内重要的抑癌基因,参与细胞周期变化、细胞凋亡、细胞增殖、DNA 损伤修复等调控^[13]。p53 基因突变多集中在 5~8 外显子^[14],编码一种蛋白质转录因子,该蛋白调控着细胞周期的启动,决定着是否开始细胞分裂。突变型 p53 基因能通过抑制野生型 p53 基因活性,引起上皮间质转化,促进细胞癌变^[15],发挥癌基因作用。目前有报道指出,PTC 发生侵袭与上皮间质转化有关,而 p53 基因可诱导上皮间质转化的发生,因此有理由怀疑 p53 基因与 PTC 具有密切关联。

本研究通过对 143 例 PTC 组织及 68 例正常甲状腺组织进行免疫组化染色,发现在正常甲状腺组织中 p53 蛋白多为阴性表达。PTC 组织存在 p53 蛋白表达,定位于细胞质,呈弥漫性分布,PTC 组织 p53 蛋白阳性表达率达 91.60%。同时采用 RT-PCR、western blotting 方法测定 PTC 组织和正常甲状腺组织中 p53 mRNA、p53 蛋白的表达水平,结果显示,与正常甲状腺组织相比,p53 mRNA、p53 蛋白在 PTC 组织中高表达($P < 0.05$)。进一步证实了免疫组化结果的准确性。通过对 PTC 组织 p53 蛋白的表达与临床病理特征的关系进行分析,发现 p53 蛋白阳性表达与 TNM 分期、淋巴结转移密切相关($P < 0.05$)。说明 p53 蛋白可能参与 PTC 的侵袭与转移,在疾病进展中扮演了重要角色。采用 Kaplan-Meier 法对 PTC 患者生存资料进行多因素分析,结果显示,p53 蛋白阳性表达组 5 年生存期明显低于阴性表达组($P < 0.05$),也说明 p53 蛋白阳性表达是 PTC 患者术后复发的主要危险因素。

综上所述,p53 基因和蛋白在 PTC 中表达上调,参与 PTC 的发生、发展,影响患者预后,需要临床重视。然而,本研究并未对其具体机制进行研究,这将作为后续研究的重点。

参考文献

[1] 陈泓西,冯铁诚,李新营,等.低分化甲状腺癌的研究进展

[J]. 中南大学学报(医学版),2014,39(10):1083-1087.

[2] SIEGEL R L, FEDEWA S A, MILLER K D, et al. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 65(6): 457-480.

[3] 赵会丽,贾贺堂.乳头状甲状腺癌相关的分子生物学研究进展[J]. *标记免疫分析与临床*, 2013, 20(5): 340-343.

[4] PATHAK K A, LESLIE W D, KLONISCH T C, et al. The changing face of thyroid cancer in a population-based cohort[J]. *Cancer Med*, 2013, 2(4): 537-544.

[5] MANZELLA L, STELLA S, PENNISI M S, et al. New Insights in thyroid cancer and p53 family proteins[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1325.

[6] 曾林文,卢江昆,孔祥东,等.甲状腺乳头状癌分子生物学研究进展[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2018, 25(12): 1530-1533.

[7] 毕铁强.甲状腺微小乳头状癌的诊治现状与思考[J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2018, 10(6): 341-346.

[8] PERDAS E, STAWSKI R, NOWAK D, et al. Potential of liquid biopsy in papillary thyroid carcinoma in context of miRNA, BRAF and p53 mutation[J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19(12): 16-27.

[9] TAKAMURA N. Re; Thyroid cancer among young people in Fukushima[J]. *Epidemiology*, 2016, 27(3): 19-23.

[10] BLACKBURN B E, GANZ P A, ROWE K, et al. Aging-related disease risks among young thyroid cancer survivors[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017, 26(12): 1695-1704.

[11] SINGH O N, MARAKA S, ESPINOSA DE A E, et al. Physical exam in asymptomatic people drivers the detection of thyroid nodules undergoing ultrasound guided fine needle aspiration biopsy[J]. *Endocrine*, 2016, 54(2): 433-439.

[12] HU Y J, YANG B H. The clinical significance of ultrasound diagnosis in physical examination for Thyroid Disease[J]. *Chin Forei Med Res*, 2016, 5(2): 1603-1610.

[13] TSUCHIDA N, IKEDA M A, ISHINO Y, et al. FUCAI is induced by wild-type p53 and expressed at different levels in thyroid cancers depending on p53 status[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(6): 2043-2048.

[14] STULPINAS A, IMBRASAITA A, KRESTNIKOVA N, et al. Study of bioreductive anticancer agent RH-1-induced signals leading the wild-type p53-bearing lung cancer A549 cells to apoptosis[J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(1): 26-39.

[15] LIU L, ZHANG P, GUO H, et al. Co-expression of murine double minute 2 siRNA and wild-type p53 induces G1 cell cycle arrest in H1299 cells. [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 52-59.

(收稿日期:2019-02-26 修回日期:2019-06-17)