

· 临床研究 ·

原发性肝细胞癌拓扑异构酶 II α 表达及其与 P53 和 AFP 之间的关系*陈漫霞¹, 陈思东¹, 陈漫容², 姚振江¹, 蔡旭玲¹

(1. 广东药学院公共卫生学院, 广州 510310; 2. 广州市中山大学附属第二医院, 广州 510260)

摘要:目的 研究原发性肝细胞癌(PHC)组织中拓扑异构酶 II α (Topo II α)的表达与 P53 和甲胎蛋白(AFP)之间的关系。方法 选择 2008 年 9 月至 2009 年 8 月 PHC 患者 125 例,用免疫组织化学 S-P 法检测 PHC 组织中 Topo II α 和 P53 的表达,分析 Topo II α 与临床特征和 P53 的关系。结果 在 PHC 组织中,Topo II α 和 P53 阳性率分别为 48.00%(60/125)、32.80%(41/125),Topo II α 阳性率高于 P53($P < 0.05$)。血清 AFP 升高患者 Topo II α 阳性率高于 AFP 正常值患者($P < 0.05$)。Topo II α 阳性率与年龄、肿瘤大小、肝癌细胞分化程度、血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、HBV 感染、肝硬化、肝癌家族史等因素无关($P > 0.05$)。P53 阳性组中 Topo II α 阳性率高于 P53 阴性组($P = 0.000$)。结论 Topo II α 在 PHC 组织中有表达,Topo II α 阳性率与患者血清 AFP 水平有关,Topo II α 表达与 P53 表达有相关。

关键词:癌,肝细胞;DNA 拓扑异构酶类;免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.26.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)26-2625-02

Study on the expression of topo II α in primary hepatocellular carcinoma and its relationship with P53 gene and AFP*Chen Manxia¹, Chen Sidong¹, Chen Manrong², Yao Zhenjiang¹, Cai Xuling¹

(1. School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510310, China;

2. Second Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou, 510260, China)

Abstract: Objective To explore the expression of topoisomerase II alpha (Topo II α) in primary hepatocellular carcinoma (PHC) and the relationships among Topo II α , P53 and AFP. **Methods** 125 cases from Sep. 2008 to Aug. 2009 were chosen to analyze. The expression of Topo II α and P53 were detected by means of S-P immunohistochemical technique in these cases. The relationship among Topo II α , clinical characteristics and P53 were analyzed. **Results** The positive rates of Topo II α and P53 were 48.00%(60/125), 32.80%(41/125) respectively. The positive rate of Topo II α was higher than that of P53($P < 0.05$). The positive expression of Topo II α was higher in cases with AFP-elevated than that of AFP-normal($P < 0.05$). The positive expression of Topo II α wasn't related to age, tumor size, tumor differentiation, AST, HBV, cirrhosis, family history of liver cancer($P > 0.05$). The positive expression of Topo II α was higher in cases with positive P53 than that of negative P53($P < 0.05$). **Conclusion** There is the positive expression of Topo II α in PHC. The expression of Topo II α was related to AFP and P53.

Key words: carcinoma, hepatocellular; dna topoisomerases; immunohistochemistry

拓扑异构酶 II α (topoisomerase II alpha, Topo II α)是在 DNA 复制和重组中起重要作用的一种核酶,目前多作为肿瘤多药耐药判断指标及抗肿瘤药物的靶点研究^[1]。Topo II α 所介导的耐药和细胞内药物靶酶活性改变或 DNA 修复机制有关,称非典型多药耐药(atypical MDR, at-MDR)^[2]。有研究发现,Topo II α 表达与 P53 表达异常有关, Sandri 等^[3]研究发现,野生型 P53 能下调 Topo II α 基因的表达,而突变型 P53 能增加 Topo II α 基因的表达,导致肿瘤细胞耐药。本研究采用免疫组织化学 S-P 法检测原发性肝细胞癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)组织中 Topo II α 和 P53 的表达情况,分析 Topo II α 表达与 PHC 患者的临床特征和 P53 表达之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 9 月至 2009 年 8 月在广州市某两家三级甲等医院择期行原发性肝癌手术病例 125 例,其中男性 110 例,女性 15 例;年龄 19~83 岁,平均(49.57 \pm 12.1)岁。病例均经术后病理诊断为肝细胞癌。按肝癌临床病理分级分为:高分化 33 例、中分化 69 例、低分化 23 例。所有病例术前未接受过任何化疗或放疗。

1.2 试剂 Topo II α 单克隆抗体、P53 单克隆抗体、免疫组化 SP

试剂盒、DAB 显色剂等试剂(北京中杉生物技术有限公司)。

1.3 方法 组织标本来源于 PHC 患者手术切除的肝癌组织,根据 Topo II α 的表达,将 PHC 患者分为 Topo II α 阳性组和 Topo II α 阴性组。根据 P53 的表达,将 PHC 患者分为 P53 阳性组和 P53 阴性组。肝癌组织经固定、脱水、常规石蜡包埋。将石蜡标本连续切片,进行常规苏木素-伊红(HE)染色和免疫组织化学染色。检测方法为免疫组化 SP 二步法,用柠檬酸盐缓冲液高压抗原修复,操作步骤严格按照 SP 试剂盒说明书进行。用已知阳性片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)代替第 1 抗体作阴性对照。

1.4 判断标准及分组 Topo II α 、P53 阳性表达主要位于肝细胞的细胞核,呈黄色颗粒。判断标准参照 Faggad 的评分方法^[4],阳性细胞百分率:0%为 0 分,>0~10%为 1 分,>10%~50%为 2 分,>50%~80%为 3 分,>80%为 4 分;按阳性细胞着色强度分为:无色为 0 分、浅黄色为 1 分、黄色为 2 分、棕黄色为 3 分;再将阳性细胞百分率和着色强度的得分相乘,得分小于或等于 2 分者为阴性,得分大于 2 分为阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS15.0 软件进行统计学数据分析,资料采用 EpiData3.1 录入,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(07117591)。

2 结 果

2.1 Topo II α 和 P53 在 PHC 组织中的表达 在 125 例 PHC 组织中, Topo II α 和 P53 阳性率分别为 48.00% (60/125)、32.80% (41/125)。Topo II α 阳性率高于 P53 ($\chi^2=8.805, P<0.05$)。

2.2 PHC 组织中 Topo II α 表达与临床特征的关系

表 1 PHC 组织中 Topo II α 表达与临床特征的关系

临床特征	Topo II α 阳性组 [n(%)]	Topo II α 阴性组 [n(%)]	χ^2	P
年龄(岁)				
≤40	12(36.36)	21(63.64)	3.465	0.177
>40~60	35(49.30)	36(50.70)		
>60	13(61.90)	8(38.10)		
肿瘤直径大小(cm)				
≤6	30(47.62)	33(52.38)	0.007	0.932
>6	30(48.39)	32(51.61)		
肝癌分化程度				
高分化	15(45.45)	18(54.55)	0.479	0.787
中分化	35(50.72)	34(49.28)		
低分化	10(43.48)	13(56.52)		
血清 AFP 水平				
升高	49(54.44)	41(45.56)	5.348	0.021
正常	11(31.43)	24(68.57)		
血清 AST 水平				
升高	32(49.23)	33(50.77)	0.082	0.774
正常	28(46.67)	32(53.33)		
HBV 感染				
HBsAg+	57(50.89)	55(49.11)	3.611	0.057
HBsAg-	3(23.08)	10(76.92)		
肝硬化				
有	41(49.40)	42(50.60)	0.193	0.660
无	19(45.24)	23(54.76)		
肝癌家族史				
有	11(50.00)	11(50.00)	0.043	0.836
无	49(47.57)	54(52.43)		

由表 1 可见,随着 PHC 患者年龄的增长 Topo II α 阳性率有升高的趋势,但不同年龄段患者 Topo II α 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。患者血清 AFP 水平升高, Topo II α 阳性率高于血清 AFP 正常者,差异有统计学意义($P<0.05$)。HBV 感染阳性患者, Topo II α 阳性率高于 HBV 感染阴性者,但差异无统计学意义($P>0.05$)。Topo II α 阳性率与肿瘤大小、肝癌细胞分化程度、血清 AST 水平、肝硬化、肝癌家族史等因素无关($P>0.05$)。

表 2 Topo II α 表达与 P53 基因的关系

指标	Topo II α 表达		合计	χ^2/P	r/P
	阳性(%)	阴性(%)			
P53 阳性	30(73.17)	11(26.83)	41	8.805/0.000	0.352/0.000
P53 阴性	30(35.71)	54(64.29)	84		

2.3 Topo II α 表达与 P53 基因的关系 在 P53 阳性组中 Topo II α 阳性率(73.17%)高于 P53 阴性组(35.71%),差异有统计学意义($\chi^2=8.805, P=0.000$), Topo II α 表达与 P53 表达有相关关系($r=0.352, P=0.000$)。见表 2。

3 讨 论

Topo II α 是在 DNA 复制和重组中起重要作用的一种核酶,目前多作为肿瘤多药耐药判断指标及抗癌药物的靶点研

究^[1]。本研究结果显示,原发性肝癌组织中 Topo II α 阳性率为 48.00%,与张燕等^[5]研究结果中的 Topo II α 阳性率(53.98%)相近。甲胎蛋白(alpha-fetal protein, AFP)是原发性肝癌的相对特异性标志物,其变化对 PHC 的早期诊断、治疗疗效具有重要作用^[6], AFP 值的增高常常提示 PHC 的进展^[7]。有研究发现,肝癌患者可表现出血清 AFP 水平升高,且其水平的高低与肝癌病程具有相关性^[8]。本研究结果发现,血清 AFP 水平升高者的 Topo II α 阳性率高于 AFP 水平正常者,差异有统计学意义,说明血清 AFP 水平与 Topo II α 表达关系密切。有研究发现,PHC 组织中 Topo II α 表达与肿瘤细胞分化程度有关,肿瘤细胞分化程度越低, Topo II α 表达越高^[9-10]。但也有研究认为, Topo II α 表达与其肿瘤细胞分化程度无关^[11]。本研究结果显示, Topo II α 阳性率与肝癌细胞分化程度无关。随着 PHC 患者年龄增加, Topo II α 阳性率有增加的趋势,但不同年龄段 Topo II α 表达差异无统计学意义。Topo II α 表达与肿瘤大小、血清天门冬氨酸转移酶水平等因素无关,与文献^[11-12]报道相似。

P53 是重要的抑癌基因,是目前与化疗敏感性关联最高的基因,不仅与凋亡和 DNA 修复有关,而且在恶性肿瘤中突变率最高^[13]。Sandri 等^[3]研究发现,野生型 P53 能下调 Topo II α 基因的表达,而突变型 P53 能增加 Topo II α 基因的表达。但也有学者研究认为在细胞中野生型 P53 可刺激 MDR1 启动子,而突变型 P53 则无此作用^[14]。本研究结果显示,在 P53 阳性组中 Topo II α 阳性率明显高于 P53 阴性组,表明了 P53 基因表达异常与 Topo II α 阳性表达有关,即携带突变型 P53 基因的 PHC 组织中 Topo II α 阳性率高于野生型 P53 者,由此推测 Topo II α 表达可能与 P53 基因突变的诱导有关。但在 P53 阴性组中仍有部分 PHC 病例 Topo II α 基因阳性表达,这提示除突变型 P53 基因外还有其他机制调控这个多药耐药基因的表达。

参考文献:

- [1] Zorzos HS, Lazaris AC, Korkolopoulou PA, et al. Multi-drug resistance proteins and topoisomerase II alpha expression in colon cancer: association with metastatic potential[J]. Pathology, 2003, 35(4): 315-318.
- [2] Kreisholt J, Sorensen M, Jensen PB, et al. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase II alpha, P-glycoprotein and multidrug resistance protein in small-cell and non-small-cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 1998, 77(9): 1469-1473.
- [3] Sandri MI, Isaacs RJ, Ongkeko WM, et al. P53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase II alpha gene[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(22): 4464.
- [4] Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in invasive ovarian carcinoma: implication for prognosis[J]. Histopathology, 2009, 54(6): 657-666.
- [5] 张燕, 金先庆, 赵珍珍, 等. 5 种耐药基因在成人常见恶性肿瘤中的表达特点[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(10): 1023-1026.
- [6] 林永财, 林永志, 叶辉铭. 多种肿瘤标志物对原发性肝癌的诊断价值[J]. 四川医学, 2005, 26(9): 1021-1023.
- [7] 李孟森, 周升. 甲胎蛋白维持肝细胞恶性增生的作用机制[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2003, 30(6): (下转第 2628 页)

3 讨 论

腹股沟直疝是外科常见疾病之一,由于其发病率和复发率较高,了解腹股沟直疝的发病机制以及如何使其得到有效治疗已成为当今外科医师所面临的问题。近年来国内、外学者从间质结缔组织方面进行了大量研究,以探讨腹股沟直疝发生和复发的生化因素,为减少其发病、与复发率奠定了理论基础。

腹横筋膜是抵抗腹内压力,维持腹股沟区腹壁张力的最重要的成分之一。胶原是其主要结缔组织成分,对维持腹横筋膜的抗张力强度起决定性作用。有研究发现,腹股沟直疝腹横筋膜胶原含量明显低于斜疝及正常人^[1,3],同时胶原构成比例(I/III型胶原)也明显改变^[4-5]。有研究表明,腹股沟直疝是系统性细胞外结缔组织改变引起的局部表现,弹性纤维赋予结缔组织弹性,与胶原的韧性互补^[6-8]。有研究发现,弹性纤维的重要组分弹性蛋白和 Fibrillin-1 的含量在直疝患者腹横筋膜明显低于斜疝,且分布异常^[9],表明腹横筋膜弹性的下降和直疝的发生密切相关。MMPs 在细胞外基质的动态重建过程中扮演重要角色。MMP-2 是其成员之一,主要由成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞合成。是降解 IV 型胶原、明胶、弹性蛋白、纤维结合素和其他基质成分的酶类^[10-11]。本研究结果显示,直疝患者腹横筋膜 MMP-2 含量明显高于斜疝患者。此结果和国外 Bellón 等^[12]报道相一致,表明直疝患者腹横筋膜 MMP-2 的高表达导致结缔组织基质成分分解的增加,可能是腹股沟直疝发病原因之一。TIMP-2 的主要功能是抑制 MMPs 的活性,它是 MMP-2 的主要抑制酶,可以与激活 MMP-2 结合使其失活,又可以与 MMP-2 共价结合,阻止其与细胞表面接触而抑制其活性^[10-11]。本研究显示,直疝患者腹横筋膜 TIMP-2 含量明显低于斜疝患者。MMP-2 抑制酶 TIMP-2 在直疝患者腹横筋膜的低表达可能是 MMP-2 水平升高的原因之一。TIMP-2 也参与了腹股沟直疝的发生。

本研究表明,MMP-2 和 TIMP-2 参与了直疝患者腹横筋膜的基质重构,由此所致的结缔组织成分改变可能是其发病原因之一。

参考文献:

- [1] 陈双,朱亮民,傅玉如.成人腹股沟区腹横筋膜胶原含量变化与腹股沟疝发病及复发的关系[J].外科理论与实践,2002,7(6):423-425.
- [2] Rodrigues Junior AJ,Rodrigues CJ,da Cunha AC,et al. Quantitative analysis of collagen and elastic fibers in the transversalis fascia in direct and indirect inguinal hernia

[J]. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo,2002,57(6):265-270.

- [3] Pans A,Pierard GE,Albert A,et al. Adult groin hernias: new insight into their biomechanical characteristics[J]. Eur J Clin Invest,1997,27(10):863-868.
- [4] Klinge U,klosterhalfen B,Muller M,et al. Altered collagen synthesis in fascia transversalis of patients with inguinal hernia[J]. Hernia,1999,3(4):181-87.
- [5] Friedman DW,Boyd CD,Norton P,et al. Increases in type III collagen gene expression and protein synthesis in patients with inguinal hernias[J]. Ann Surg,1993,218(6):754-60.
- [6] Rosch R,Klinge U,Si Z,et al. A role for the collagen I/III and MMP-1/-13 genes in primary inguinal hernia[J]. BMC Med Genet,2002(3):2.
- [7] Klinge U,Zheng H,Si ZY,et al. Synthesis of type I and III collagen,expression of fibronectin and matrix metalloproteinases-1 and -13 in hernial sac of patients with inguinal hernia[J]. Int J Surg Investig,1999,1(3):219-27.
- [8] Klinge U,Zheng H,Si Z,et al. Expression of the extracellular matrix proteins collagen I,collagen III and fibronectin and matrix metalloproteinase-1 and -13 in the skin of patients with inguinal hernia[J]. Eur Surg Res,1999,31(6):480-490.
- [9] 李剑,蔡建辉,张学军.弹性蛋白与原纤维蛋白-1在腹股沟直疝及斜疝患者腹横筋膜的表达[J].重庆医学,2011,40(4):370-371
- [10] Maskos K,Bode W. Mol Biotechnol. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases[J]. Mol Biotechnol,2003,25(3):241-266.
- [11] Bode W,Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors,the tissue inhibitors of metalloproteinases[J]. Biol Chem,2003,384(6):863-872.
- [12] Bellón JM,Bajo A,Ga-Honduvilla N,et al. Fibroblasts from the transversalis fascia of young patients with direct inguinal hernias show constitutive MMP-2 overexpression[J]. Ann Surg,2001,233(2):287-291.

(收稿日期:2011-04-26 修回日期:2011-06-10)

(上接第 2626 页)

456-458.

- [8] Johnson PJ. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Liver Dis,2001,(1):145-159.
- [9] 丁磊,陈孝平,张志伟,等.原发性肝癌拓扑异构酶 II α 的表达及其与 P53 基因突变之间的关系[J].肝胆外科杂志,2006,14(3):222-225.
- [10] 陆震,熊茂明,孟翔凌.多药耐药基因相关蛋白在原发性肝癌中的表达及意义[J].中国临床保健杂志,2006,9(6):556-559.
- [11] 闵婕,冯英明,张贺龙,等.多药耐药相关蛋白 Topo II 在原发性肝癌的表达及意义[J].陕西医学杂志,2005,

34(7):787-789.

- [12] 欧盛秋,马亦龙,崔英,等. P53 表达与肝细胞癌临床病理学特征及 AFP、HBV 感染之间的关系研究[J]. 广西医科大学学报,2007,24(1):14-16.
- [13] Fridman JS,Lowe SW. Control of apoptosis by P53[J]. Oncogene,2003,22(56):9030-9040.
- [14] Goldsmith M,Gudas JM,Schneider E,et al. Wild type P53 stimulates expression from the human multidrug resistance promoter in a P53-negative cell line[J]. J Biol Chem,1995,270(4):1894-1898.

(收稿日期:2011-04-21 修回日期:2011-05-23)