

P53 与 II 型拓扑异构酶及多重耐药相关蛋白在合并慢性血吸虫病结直肠癌组织中的表达

陈寅波 刘卓 钱俊 冯海洋 范永田 李德川

【摘要】 目的 探讨 P53 蛋白、II 型拓扑异构酶(Topo II)及多重耐药相关蛋白(MRP)在合并慢性血吸虫病与非血吸虫病结直肠癌患者中的表达。**方法** 采用回顾性病例对照研究方法。收集 2008 年 1 月至 2010 年 12 月浙江省肿瘤医院收治的 338 例结直肠癌患者的临床病理资料。收集患者手术切除的结直肠癌组织。338 例患者中,80 例合并慢性血吸虫病,258 例不合并慢性血吸虫病。采用免疫组织化学染色检测结直肠癌组织中 P53、Topo II、MRP 蛋白表达。等级资料以百分比表示,采用非参数检验。**结果** P53 蛋白阴性、弱阳性、阳性、强阳性表达率在合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织中分别为 5.00% (4/80)、87.50% (70/80)、3.75% (3/80)、3.75% (3/80),在不合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织中分别为 28.68% (74/258)、19.38% (50/258)、16.67% (43/258)、35.27% (91/258),两者比较,差异有统计学意义($Z = -2.962, P < 0.05$)。Topo II 蛋白阴性、弱阳性、阳性、强阳性表达率在合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织中分别为 8.75% (7/80)、51.25% (41/80)、22.50% (18/80)、17.50% (14/80),在不合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织中分别为 12.01% (31/258)、55.43% (143/258)、22.48% (58/258)、10.08% (26/258),两者比较,差异无统计学意义($Z = -1.551, P > 0.05$)。MRP 蛋白阴性、弱阳性、阳性、强阳性表达率在合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织中分别为 7.50% (6/80)、40.00% (32/80)、28.75% (23/80)、23.75% (19/80),在不合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织中分别为 24.42% (63/258)、38.37% (99/258)、24.03% (62/258)、13.18% (34/258),两者比较,差异有统计学意义($Z = -3.408, P < 0.05$)。**结论** P53 蛋白和 MRP 蛋白在合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织中均呈异常表达,提示其可能参与慢性血吸虫病诱导结直肠癌的分子机制。

【关键词】 结直肠肿瘤; 血吸虫病,慢性; P53; II 型拓扑异构酶; 多重耐药相关蛋白

基金项目:浙江省自然科学基金(Y15H160027)

Expressions of P53, topoisomerase II and multi-drug resistance associated protein in tissues of colorectal cancer of patients combined with chronic schistosomiasis Chen Yinbo, Liu Zhuo, Qian Jun, Feng Haiyang, Fan Yongtian, Li Dechuan. Department of Colorectal Cancer Surgery, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China

Corresponding author: Li Dechuan, Email: dechuanli_zjch@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of P53, topoisomerase II (Topo II) and multi-drug resistance associated protein (MRP) in tissues of colorectal cancer of patients combined with chronic schistosomiasis. **Method** The retrospective case-control study was adopted. The clinicopathological data of 338 colorectal cancer patients who were admitted to the Zhejiang Cancer Hospital between January 2008 and December 2010 were collected. Cancer tissue specimens from surgical resection were collected. Among 338 patients, 80 were combined with chronic schistosomiasis and 258 were combined with non-chronic schistosomiasis. The expressions of P53, Topo II and MRP were detected using immunohistochemistry (IHC). Ranked data were presented as percentage and analyzed using the non-parametric test. **Results** The negative, weak positive, positive and strong positive expressions of P53 were respectively 5.00% (4/80), 87.50% (70/80), 3.75% (3/80), 3.75% (3/80) in tissues of colorectal cancer of patients combined with chronic schistosomiasis and 28.68% (74/258), 19.38% (50/258), 16.67% (43/258), 35.27% (91/258) in tissues of colorectal cancer of patients combined with non-chronic schistosomiasis, with a statistically significant difference ($Z = -2.962, P < 0.05$). The negative,

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2016.08.011

作者单位:310022 杭州,浙江省肿瘤医院结直肠肿瘤外科

通信作者:李德川,Email:dechuanli_zjch@126.com

weak positive, positive and strong positive expressions of Topo II were respectively 8.75% (7/80), 51.25% (41/80), 22.50% (18/80), 17.50% (14/80) in tissues of colorectal cancer of patients combined with chronic schistosomiasis and 12.01% (31/258), 55.43% (143/258), 22.48% (58/258), 10.08% (26/258) in tissues of colorectal cancer of patients combined with non-chronic schistosomiasis, with no statistically significant difference ($Z = -1.551, P > 0.05$). The negative, weak positive, positive and strong positive expressions of MRP were respectively 7.50% (6/80), 40.00% (32/80), 28.75% (23/80), 23.75% (19/80) in tissues of colorectal cancer of patients combined with chronic schistosomiasis and 24.42% (63/258), 38.37% (99/258), 24.03% (62/258), 13.18% (34/258) in tissues of colorectal cancer of patients combined with non-chronic schistosomiasis, with a statistically significant difference ($Z = -3.408, P < 0.05$). **Conclusion** There are abnormal expressions of P53 and MRP in tissues of colorectal cancer of patients combined with chronic schistosomiasis, which may be involved in the hypothetical mechanism of chronic schistosomiasis inducing carcinogenesis of colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal neoplasms; Schistosomiasis, chronic; P53; Topoisomerase II; Multi-drug resistance associated protein

Fund program: National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y15H160027)

结直肠癌是我国常见实体肿瘤,其发病率随着我国经济发展日益上升^[1]。在长江流域地区,结直肠癌的发病常与慢性血吸虫病相关。多项研究结果显示:血吸虫感染所致的肠道慢性炎症是结直肠黏膜恶变的分子基础之一,但其具体机制尚未完全明确^[2-4]。既往研究结果显示:多种分子蛋白与结直肠癌发生、发展密切相关^[5-6];其中 P53、II 型拓扑异构酶(topoisomerase II, Topo II)、多重耐药相关蛋白(multi-drug resistance associated protein, MRP)是肠黏膜细胞恶变的关键分子,其表达的变化诱导肿瘤发生、发展与耐药,但其与肠道慢性血吸虫病的关系少有报道^[7-10]。本研究回顾性分析 2008 年 1 月至 2010 年 12 月我科收治的 338 例结直肠癌患者的临床病理资料,收集患者行手术切除的结直肠癌组织标本进行研究,检测 P53、Topo II、MRP 蛋白在结直肠癌组织中的表达,探讨其在合并慢性血吸虫病与非血吸虫病结直肠癌患者中的表达差异。

1 资料与方法

1.1 标本来源

采用回顾性病例对照研究方法。收集 338 例行手术切除的结直肠癌组织,其中男 201 例,女 137 例;年龄 28~85 岁,平均年龄 58 岁。338 例患者中,结肠癌 110 例,直肠癌 228 例;80 例患者合并慢性血吸虫病,258 例不合并慢性血吸虫病。本研究通过我院伦理委员会审批。患者及家属术前均签署手术知情同意书。

1.2 纳入标准和排除标准

纳入标准:(1)行结直肠癌根治术。(2)经术后病理学检查确诊为结直肠癌。(3)术前未行新辅助治疗。(4)临床病理资料完整。

排除标准:(1)术前行新辅助治疗。(2)临床病理资料缺失。

1.3 主要试剂

枸橼酸盐溶液、PBS 缓冲液、二甲苯、30% 过氧化氢溶液、5% BSA 封闭液、DAB 显色液、辣根过氧化物酶标记的多克隆二抗(山羊抗鼠或兔)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。鼠抗人 P53 抗体、兔抗人 Topo II 抗体、鼠抗人 MRP 抗体均购自美国 Abcam 公司。

1.4 免疫组织化学染色检测

将结直肠癌手术切除标本蜡块,在典型肿瘤细胞区域(图 1)获取 2 个点,制作成免疫组织化学芯片(厚度为 5 μm)。常规二甲苯脱蜡,柠檬酸钠溶液水化。采用 0.3% 过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶。漂洗后采用 5% BSA 封闭液进行封闭。滴加抗体(P53 抗体滴度为 1:5 000,Topo II 抗体为 1:250,MRP 抗体为 1:200)。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。漂洗后滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠或抗兔的多克隆二抗。DAB 显色,苏木素复染。

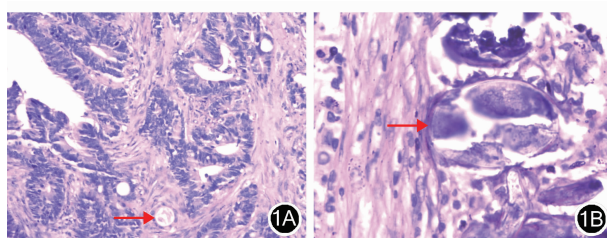


图 1 合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织虫卵($\rightarrow$) HE 染色
1A:低倍放大;1B:高倍放大

1.5 结果判定

由两名以上有经验的病理科医师判定结果。P53、Topo II、MRP 蛋白表达为细胞质内出现黄色或

棕色颗粒。100 倍镜下选取 5 个具有代表性的肿瘤组织区域。平均阳性细胞百分率为 0 计 0 分, 1%~25% 计 1 分, 26%~50% 计 2 分, 51%~75% 计 3 分, >75% 计 4 分。染色强度: 不染色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕色为 3 分。将每张切片平均阳性细胞百分率分值与平均染色强度分值相乘为其染色分数: 0 分为阴性, 1~3 分为弱阳性, 4~8 分为阳性, 9~12 分为强阳性。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。等级资料以百分比表示, 采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

P53、Topo II、MRP 蛋白的阴性、弱阳性、阳性、强阳性表达见图 2~4。P53、MRP 蛋白表达率在合并与不合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Topo II 蛋白表达率在合并与不合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

3 讨论

慢性血吸虫病是我国血吸虫病流行地区结直肠

癌高发的影响因素之一, 血吸虫病在肠壁微环境中所导致的免疫调节紊乱、氧化应激、内源性致癌源对结直肠癌的发生、发展至关重要^[4]。TNF- α 、一氧化氮合酶在炎症过程中不断诱发细胞 DNA 损坏与修复, 从而导致恶变发生^[11-12]。这些机制均是基于肠道血吸虫感染所产生的慢性炎症环境。关于肠上皮细胞在炎症影响下发生恶变的分子机制尚未完全明确。

P53 是许多肿瘤如结直肠癌、胃癌、乳腺癌发生的重要因素, 在调节细胞周期、诱导凋亡、化疗耐药中起重要作用。既往研究结果表明: P53 蛋白的高表达与肠息肉恶变、结直肠癌进展和不良预后密切相关^[13-14]。另一部分研究结果显示: 慢性血吸虫病感染可能与 P53 突变参与细胞恶变有关^[15-17]。本研究结果显示: 合并慢性血吸虫病结直肠癌组织中, P53 蛋白阳性表达率高于不合并慢性血吸虫病结直肠癌组织。这提示慢性血吸虫病可能对 P53 基因突变有一定影响。

Topo II 是一种在多种实体肿瘤中参与 DNA 复制、染色体分离的蛋白, 其表达水平的异常和功能失调与结直肠癌、肺癌、膀胱癌的发病密切相关, 是肿瘤细胞恶性增殖的特异性标志之一^[10,18]。既往研究结果显示: Topo II 蛋白高表达与结直肠癌组织浸润、淋巴结转移相关。然而也有研究结果提示相反

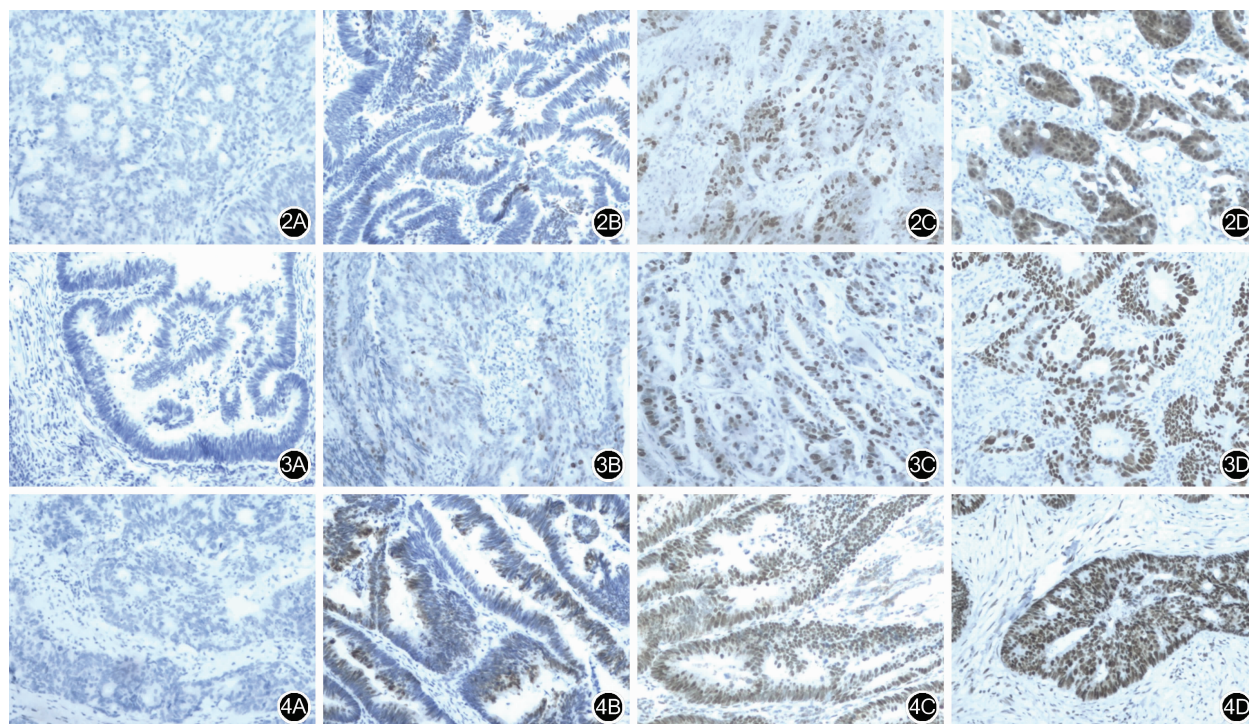


图 2 结直肠癌组织中 P53 蛋白表达 免疫组织化学染色 低倍放大 2A: 呈阴性表达; 2B: 呈弱阳性表达; 2C: 呈阳性表达; 2D: 呈强阳性表达 图 3 结直肠癌组织中 II 型拓扑异构酶蛋白表达 免疫组织化学染色 低倍放大 3A: 呈阴性表达; 3B: 呈弱阳性表达; 3C: 呈阳性表达; 3D: 呈强阳性表达 图 4 结直肠癌组织中多重耐药相关蛋白表达 免疫组织化学染色 低倍放大 4A: 呈阴性表达; 4B: 呈弱阳性表达; 4C: 呈阳性表达; 4D: 呈强阳性表达

表 1 合并与不合并慢性血吸虫病结直肠癌组织中 P53、Topo II、MRP 蛋白的表达率比较[例(%)]

结直肠癌组织类型	例数	P53 蛋白			
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性
合并慢性血吸虫病	80	4 (5.00)	70 (87.50)	3 (3.75)	3 (3.75)
不合并慢性血吸虫病	258	74 (28.68)	50 (19.38)	43 (16.67)	91 (35.27)
Z 值		-2.962			
P 值		<0.05			
结直肠癌组织类型	例数	Topo II 蛋白			
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性
合并慢性血吸虫病	80	7 (8.75)	41 (51.25)	18 (22.50)	14 (17.50)
不合并慢性血吸虫病	258	31 (12.01)	143 (55.43)	58 (22.48)	26 (10.08)
Z 值		-1.551			
P 值		>0.05			
结直肠癌组织类型	例数	MRP			
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性
合并慢性血吸虫病	80	6 (7.50)	32 (40.00)	23 (28.75)	19 (23.75)
不合并慢性血吸虫病	258	63 (24.42)	99 (38.37)	62 (24.03)	34 (13.18)
Z 值		-3.408			
P 值		<0.05			

注:Topo II:Ⅱ型拓扑异构酶;MRP:多重耐药相关蛋白

的结论:Topo II 高表达与结直肠癌患者良好分期和预后相关。本研究结果显示:合并与不合并慢性血吸虫病结直肠癌组织中 Topo II 蛋白阳性表达率差异无统计学意义。这提示慢性血吸虫病对肠上皮细胞 Topo II 蛋白的表达并不造成影响。

MRP 是主要位于肿瘤细胞膜表面介导化疗耐药的糖蛋白,其通过多种转运机制将化疗药物反输出细胞外^[19]。本研究结果显示:合并慢性血吸虫病结直肠癌组织中,MRP 蛋白阳性表达率低于不合并慢性血吸虫病结直肠癌组织。这提示血吸虫感染可能参与结直肠癌化疗耐药的分子机制。此外,有研究结果显示:结直肠癌组织中 MRP 蛋白的表达与 P53 突变密切相关^[20]。本研究结果也显示这两者的表达均与慢性血吸虫病相关。这在一定程度上可提示 P53 与 MRP 蛋白可能是慢性血吸虫病诱导结直肠癌的机制之一,但还需进一步分子研究证实。

综上,P53 蛋白和 MRP 蛋白在合并慢性血吸虫病的结直肠癌组织中分别呈异常高表达和低表达,提示其可能参与慢性血吸虫病诱导结直肠癌的分子机制。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010[J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(1):48-58. DOI:10.3978/j.issn.1000-9604.2014.01.08.
- [2] Rosin MP, Anwar WA, Ward AJ. Inflammation, chromosomal instability, and cancer: the schistosomiasis model[J]. Cancer Res, 1994, 54(7 Suppl):1929s-1933s.
- [3] Chieffi PP. Interrelationship between schistosomiasis and concomitant diseases[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992, 87(Suppl 4):291-296. DOI:10.1590/S0074-02761992000800045.
- [4] Soliman NA, Keshk WA, Shoheib ZS, et al. Inflammation, oxidative stress and L-fucose as indispensable participants in schistosomiasis-associated colonic dysplasia[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(3):1125-1131.
- [5] 陈文平,施海,周毅,等.结直肠癌组织中 Formin2 蛋白的表达及意义[J].中华消化外科杂志,2015,14(4):335-338. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2015.04.015.
- [6] 张伟杰,陈小伍,朱达坚,等.结直肠癌组织中 Twist 蛋白的表达及意义[J].中华消化外科杂志,2015,14(5):410-414. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2015.05.013.
- [7] Ines C, Donia O, Rahma B, et al. Implication of K-ras and p53 in colorectal cancer carcinogenesis in Tunisian population cohort[J]. Tumour Biol, 2014, 35(7):7163-7175. DOI:10.1007/s13277-014-1874-4.
- [8] Kim HR, Kim HC, Yun HR, et al. An alternative pathway in colorectal carcinogenesis based on the mismatch repair system and p53 expression in Korean patients with sporadic colorectal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(12):4031-4040. DOI:10.1245/s10434-012-2455-7.
- [9] Mohn C, Hcker HG, Hilger RA, et al. Defining the role of MRP-mediated efflux and glutathione in detoxification of oxaliplatin[J]. Pharmazie, 2013, 68(7):622-627.
- [10] Pommier Y, Leo E, Zhang H, et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs[J]. Chem Biol, 2010, 17(5):421-433. DOI:10.1016/j.chembiol.2010.04.012.
- [11] Mantawy MM, Ali HF, Rizk MZ. Therapeutic effects of Allium sativum and Allium cepa in Schistosoma mansoni experimental infection[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2011, 53(3):155-163. DOI:10.1590/S0036-46652011000300007.
- [12] Salim EI, Morimura K, Menesi A, et al. Elevated oxidative stress

- and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis[J]. Int J Cancer, 2008, 123 (3): 601-608. DOI:10.1002/ijc.23547.
- [13] Horvath B, Liu G, Wu X, et al. Overexpression of p53 predicts colorectal neoplasia risk in patients with inflammatory bowel disease and mucosa changes indefinite for dysplasia[J]. Gastroenterol Rep (Oxf), 2015, 3(4):344-349. DOI:10.1093/gastro/gov022.
- [14] Liu BW, Liu Y, Liu JR, et al. Prognostic effect of p53 expression in patients with completely resected colorectal cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35 (10): 9893-9896. DOI: 10.1007/s13277-014-2219-z.
- [15] Habib SL, Said B, Awad AT, et al. Novel adenine adducts, N7-guanine-AFB1 adducts, and p53 mutations in patients with schistosomiasis and aflatoxin exposure[J]. Cancer Detect Prev, 2006, 30(6):491-498. DOI:10.1016/j.cdp.2006.10.006.
- [16] Helal Tel A, Fadel MT, El-Sayed NK. Human papilloma virus and p53 expression in bladder cancer in Egypt: relationship to schistosomiasis and clinicopathologic factors [J]. Pathol Oncol Res, 2006, 12(3):173-178. DOI:PAOR.2006.12.3.0173.
- [17] Zalata KR, Nasif WA, Ming SC, et al. p53, Bcl-2 and C-Myc expressions in colorectal carcinoma associated with schistosomiasis in Egypt[J]. Cell Oncol, 2005, 27(4):245-253. DOI:10.1155/2005/547010.
- [18] Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism[J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70:369-413. DOI:10.1146/annurev.biochem.70.1.369.
- [19] Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs[J]. Eur J Pharm Sci, 2000, 11(4):265-283. DOI:10.1016/S0928-0987(00)00114-7.
- [20] Fukushima Y, Oshika Y, Tokunaga T, et al. Multidrug resistance-associated protein (MRP) expression is correlated with expression of aberrant p53 protein in colorectal cancer[J]. Eur J Cancer, 1999, 35(6):935-938. DOI:10.1016/S0959-8049(99)00035-0.
- (收稿日期: 2016-06-02)
(本文编辑: 王雪梅)

《中华消化外科杂志》微信公众平台正式上线

《中华消化外科杂志》微信公众平台将本着高效、便捷、低耗服务消化外科同道为宗旨,及时发布《中华消化外科杂志》每期刊发文稿,第一时间更新消化外科领域学术动态。

《中华消化外科杂志》微信公众平台主要包括以下栏目和内容:

微 官 网:本刊概览:每期快报 过往期刊 指南共识

学术动态:编委风采 最新资讯 精华转载

投稿指南:关于本刊 稿约通则

每期快报:介绍本刊最新内容提要,引领读者快速了解当期重点

过往期刊:提供本刊 2007-2015 年每期目次及 PDF 全文免费阅读

指南共识:提供本刊近年来刊登的指南与共识(含解读)PDF 全文免费阅读

编委风采:介绍本刊编委基本情况及研究方向,搭建与专家沟通交流的桥梁

最新资讯:及时提供本刊最新消息,反映本刊发展动态

精华转载:转载各大医学网站的精华信息

关于本刊:介绍本刊概况

稿约通则:介绍本刊稿件要求



微信公众平台



官方网站