

· 论 著 ·

幼年性息肉病不典型增生分子机制研究

薛娟¹, 金宁², 冯振卿³, 陈荣华¹, 张尉泽², 杨菱芳¹

(南京医科大学第二附属医院 1. 儿科; 2. 病理科; 3. 南京医科大学病理教研室, 江苏 南京 210011)

[摘 要] 目的 幼年性息肉病是一种少见疾病。目前认为其息肉局部可发生不典型增生改变, 然而其不典型增生的分子机制尚不清楚。该文旨在探讨幼年性息肉病不典型增生的病变机制。方法 应用免疫组化检测 5 例幼年性息肉病的 24 枚不典型增生息肉和 11 枚无不典型增生息肉标本以及 5 例小儿正常结肠粘膜、32 例单发结、直肠幼年性息肉和 10 例大肠癌标本的增殖细胞核抗原(PCNA)、P53 蛋白(DO-7)和 P21 waf1 蛋白的表达; 应用原位杂交方法检测上述标本 P53 mRNA 的表达。结果 PCNA 标记指数均值、P53 阳性表达率、P53 阳性面积以及 P53 mRNA 阳性表达率在幼年性息肉病不典型增生组均明显高于无不典型增生组; P21 waf1 阳性表达在上述两组间比较差异无显著性; P53 蛋白、P53 mRNA 与 PCNA 表达呈明显正相关。结论 PCNA、P53 基因异常与幼年性息肉病不典型增生的形成有关, P53 基因参与诱导细胞增殖。 [中国当代儿科杂志, 2004, 6(3): 211-215]

[关 键 词] 幼年性息肉病; 不典型增生; P53 PCNA; P21 waf1

[中图分类号] R725.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2004)03-0211-05

Molecular mechanisms of epithelial dysplasia in juvenile polyposis syndrome

Juan XUE, Ning JIN, Zhen-Qing FENG, Rong-Hua CHEN, Wei-Ze ZHANG, Ling-Fang YANG. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

Abstract: Objective Juvenile polyposis syndrome (JPS) may present epithelial dysplasia, while the molecular mechanism of dysplasia has not been explained. This paper aims to study its pathologic mechanisms by detecting the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), P53 protein (DO-7), P21 waf1 and P53 mRNA in JPS cases with dysplasia. **Methods** Thirty-five specimens from 5 cases with JPS (24 specimens with dysplasia and 11 without dysplasia), 5 normal specimens from colonic mucosa, 32 specimens from simple JP and 10 specimens from colorectal cancer were collected. The expressions of PCNA, P53 protein (DO-7) and P21 waf1 were detected by immunohistochemistry. The expression of P53 mRNA was detected using in situ hybridization techniques. **Results** The average PCNA labelling index, the positive expressions of P53 protein and P53 mRNA, and the positive expression areas of P53 in JPS cases with dysplasia were significantly higher than those in JPS cases without dysplasia. There was no significant difference in the positive expression rate of P21 waf1 between them. The expressions of P53 protein and P53 mRNA were positively correlated with PCNA expression in JPS cases with dysplasia. **Conclusions** PCNA and the variation of P53 gene may be involved in the formation of dysplasia. The genetic changes of P53 might play an important role in the induction of cell proliferation. [Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(3): 211-215]

Key words: Juvenile polyposis syndrome; Dysplasia; P53; PCNA; P21 waf1

幼年性息肉病(juvenile polyposis syndrome, JPS)是一种以消化道多发性息肉为特征的少见疾病^[1]。目前认为 JPS 息肉局部可以发生不典型增生或腺瘤样改变, 且这些不典型增生改变可进一步演变为大肠癌^[2], 然而其分子机制尚不清楚。研究显示增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear anti-

gen, PCNA)、P53、P21 waf1 在大肠癌的形成中具重要作用。本研究通过检测 PCNA、P53、P21 waf1 和 P53 mRNA 在 JPS 不典型增生中的表达及相互关系, 探讨幼年性息肉病不典型增生的发生机制。

[收稿日期] 2003-08-26; [修回日期] 2003-12-01

[作者简介] 薛娟(1966-), 女, 硕士, 副主任医师。主攻方向: 小儿消化系统疾病。

[通讯作者] 薛娟, 江苏省南京市姜家园 121 号南京医科大学第二附属医院儿科, 邮编: 210011。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 对象及标本 5例JPS共获结直肠息肉35枚(24枚为结肠息肉,11枚为直肠息肉),其中2例(22枚)为手术标本,3例(13枚)为肠镜摘除标本。息肉大小0.8~2.5 cm,平均1.3 cm。经常规切片HE染色后检测有24枚(68.6%)息肉存在局灶性不典型增生改变,11枚无不典型增生改变^[3]。32例单发结直肠幼年性息肉(juvenile polyp, JP)标本均为我院肠镜摘除标本,22例位于结肠,10例位于直肠,大小0.5~3.0 cm,平均1.4 cm。另取5例手术切除的儿童正常大肠粘膜标本和10例成人大肠癌(均为管状腺癌Ⅱ级)标本做对照。

1.1.2 主要试剂 P53(DO-7)、P21 waf1(4D10), PCNA(Pc-10)单克隆抗体为福州迈新生物技术开发公司产品,抗体为即用型。P53寡核苷酸(35 pb)探针原位杂交试剂盒(P53 ISH Detection Kit),购自武汉博士德生物工程有限公司。AP标记羊抗地高辛以及NBT/BCIP显色液为德国宝灵曼公司产品。Buffer I液,Buffer II阻断剂,Buffer III显色平衡液由南京医科大学病理教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 P53、PCNA和P21 waf1蛋白检测方法 采用免疫组化(SP)方法,染色步骤按试剂盒说明书进行。P53和P21 waf1染色前切片行微波抗原修复。阴性对照用PBS液替代一抗。阳性对照用已知阳性标本。上述3种抗原阳性判断标准为上皮细胞或癌细胞胞核染色呈棕黄色或棕褐色颗粒;阴性为细胞核不着色。对P53和P21 waf1阳性切片进行图像分析,每张切片放大200倍,随机选取5个视野,分别测量阳性细胞面积比(Na%)和阳性细胞积分光密度(POD)。PCNA结果判断采用PCNA标记指数(PCNA labelling index, PCNA LI),即每张切片随机选取10个左右的视野,计数1000个上皮细胞或癌细胞中PCNA染色阳性细胞数,即PCNA LI = PCNA阳性细胞数/1000。

1.2.2 P53 mRNA检测 采用原位杂交方法,石蜡切片常规脱蜡至水;胃蛋白酶37℃消化30 min,0.5 mol/L PBS洗涤;滴加40 μ l含地高辛标记的P53原位杂交液,37℃过夜;30℃水温的2×SSC洗3次,0.2×SSC洗3次;Buffer I洗浴10 min,Buffer II室温阻断30 min;滴加AP标记羊抗地高辛40

μ l,37℃孵育60 min,Buffer I 30℃洗15 min×3次;Buffer III平衡2 min后加入NBT/BCIP显色液显色,显微镜下控制显色强度,甘油封片。结果判断以细胞核内出现紫兰色颗粒为阳性。

1.3 统计学分析

用Sigmastat for Window 95建立数据库,各组数据首先进行方差齐性检验,然后进行单因素方差分析及两两比较统计学处理;率的比较用 χ^2 检验;各抗原之间的比较采用 t 检验及四格表 χ^2 检验。

2 结果

2.1 免疫组化结果

在正常粘膜、JP、JPS以及大肠癌各组织中均出现PCNA阳性染色。正常粘膜PCNA阳性细胞主要集中在分布于大肠腺体中下1/3区域,上皮表层几乎无PCNA表达。在JP、JPS和大肠癌组中,阳性细胞分布广泛,往往呈全层分布,在癌组织中阳性颗粒多而密集。PCNA LI均值从正常粘膜 $131.2 \pm 59.6\%$ 、JP $227.3 \pm 93.9\%$ 、JPS无不典型增生 $289.1 \pm 96.3\%$ 、JPS伴不典型增生 $470.0 \pm 161.9\%$ 至大肠癌组 $818.8 \pm 113.2\%$ 呈渐进性递增。JPS不典型增生组PCNA阳性表达强于JPS无不典型增生组,差异有显著性($P < 0.01$),大肠癌组PCNA LI则高于JPS不典型增生组,差异有显著性($P < 0.01$)。

正常大肠粘膜未见P53阳性染色。JP组仅3枚有很弱的局灶性阳性表达,大肠癌组多呈强阳性染色。JPS不典型增生组阳性率(66.7%)高于JPS无不典型增生组(27.3%)及JP组(9.3%),差异有显著性($P < 0.01$)。各组阳性切片经图像分析定量显示其平均光密度及阳性面积百分比在JP→JPS无不典型增生→JPS伴不典型增生→大肠癌组依次递增。JPS不典型增生组阳性反应面积高于JPS无不典型增生组及JP组,差异有显著性($P < 0.01$ 或0.05)。尽管JPS不典型增生组P53阳性率与大肠癌组接近,但平均光密度及阳性面积比在两组之间差异有显著性($P < 0.01$)。见表1。

在正常粘膜和JP组P21 waf1阳性率分别为60.0%和62.5%,显著高于JPS的36.4%,29.2%和大肠癌组30.0%。JPS不典型增生组P21 waf1阳性表达较JPS无不典型增生组低,但两组相比差异无显著性($P > 0.05$)。各组间平均光密度无明显差异,但JPS和大肠癌组的阳性面积百分比比较JP组和正常组明显减少($P < 0.01$)。见表1。

表 1 P53和 P21 waf1 在各组中的表达
Table 1 Expressions of P53 mRNA and P21 waf1 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	P53		P21 waf1	
		平均光密度	阳性面积百分比(Na%)	平均光密度	阳性面积百分比(Na%)
正常大肠粘膜	5	0	0	0.175±0.0047	6.00±1.86
JP	32	0.143±1.0109	0.25±1.5	0.175±0.0045	6.24±1.54
JPS无不典型增生	11	0.163±0.0178	6.4±3.8	0.175±0.0012	3.29±1.88 ^{a,d}
JPS不典型增生	24	0.218±0.0312 ^a	13.0±3.7 ^{a,b}	0.175±0.0012	2.47±1.30 ^{a,d}
大肠癌	10	0.260±0.0075 ^{a,c}	26.3±6.8 ^{a,c}	0.175±0.0014	2.55±1.48 ^{a,d}

注: a 与 JP 组比 $P < 0.01$; b 与无不典型增生组比 $P < 0.05$; c 与 JPS 不典型增生组比 $P < 0.01$; d 与正常组比 $P < 0.01$

2.2 P53 寡核苷酸探针原位杂交结果

除正常粘膜外,其余各组均见不同程度 P53 mRNA 阳性表达。JP 组 P53 mRNA 表达阳性率为 12.5%。JPS 无不典型增生和 JPS 不典型增生组阳性率分别为 54.5% 和 75.0%,两组相比,差异有显著性,且均高于 JP 组 ($P < 0.01$)。大肠癌组 P53 mRNA 表达阳性率为 80.0%,与不典型增生组间差异无显著性 ($P > 0.05$),但高于 JP 组和 JPS 无不典型增生组 ($P < 0.01$)。

2.3 各抗原表达之间的相关性

2.3.1 P53 mRNA 与 P53 蛋白表达的关系 两者在正常大肠粘膜表达均阴性,其余各组中 P53 mRNA 阳性表达率略高于 P53 蛋白阳性表达率。JPS 不典型增生组中 P53 mRNA 与 P53 蛋白阳性表达呈很高的一致性 ($P < 0.01$)。

2.3.2 P53、P21 waf1 与 PCNA 表达的关系 在 JPS 不典型增生组中,P53、P21 waf1 与 PCNA 阳性表达关系见表 2。P53 阳性表达组 PCNA LI 均值显著高于 P53 阴性组 ($P < 0.01$)。P21 waf1 阳性表达组 PCNA LI 均值较 P21 waf1 阴性组低,但两组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.3.3 P53 与 P21 waf1 表达的关系 两者间表达差异无显著性 ($\chi^2 = 0.108, P > 0.05$)。

表 2 JPS 不典型增生 P53 和 P21 waf1 与 PCNA 表达的关系

Table 2 Correlation of PCNA expression with P53 and P21 waf1 expressions in JPS cases with dysplasia

	P53		P21 waf1	
	+	-	+	-
PCNA LI (%)	521.3±34.4	418.6±31.6	446.2±33.4	493.5±35.7
t	3.201		1.382	
P	<0.01		>0.05	

3 讨论

随着分子生物学的进展,业已证实肿瘤的发生与细胞增殖失控有关,多种癌基因和抑癌基因参与调控细胞增殖和癌变,P53 和 P21 waf1 是目前研究较多的肿瘤抑制基因,它们的结构或表达异常,可导致细胞增殖失控以及癌变的发生。

PCNA 为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,其在增殖细胞中的含量变化有明显的周期性,检测其在细胞中的表达,可作为评价细胞增殖状态的一个指标^[4]。本研究显示,在正常大肠粘膜以及各病变组织均有 PCNA 阳性细胞出现,这是因为大肠粘膜是短寿命的不稳定细胞群,正常大肠粘膜也处于不断增殖状态,进入 G_1 后期或 S 期的正常增殖细胞或转化细胞均可出现高水平的 PCNA 表达。因此 PCNA 阳性表达与否并不反映细胞本质上的差异。但是 PCNA 在大肠粘膜不同病变中的表达程度却有差别。在正常粘膜中,阳性细胞少,分布于粘膜的深层,在 JP、JPS 以及大肠癌组,PCNA 表达均增高,提示上述各病变时肠粘膜细胞增殖活跃,PCNA LI 均值从正常粘膜→JP→JPS 无不典型增生→JPS 伴不典型增生→大肠癌组呈顺序性递增,表明不同病变时大肠粘膜增殖活性不同。但 JP 组与正常组相比,JPS 无不典型增生组与正常组和 JP 组相比,PCNA LI 均值差异均无显著性,而 JPS 不典型增生组 PCNA LI 均值高于 JPS 无不典型增生组 ($P < 0.01$),提示发生不典型增生时,DNA 复制活跃。JPS 不典型增生的发生可能正是由于在某种或几种致 DNA 损伤的致病因子的持续作用下,导致大肠粘膜不断增殖,当增殖与分化不相协调时,细胞在形态结构和功能上即可发生改变,导致不典型增生的发生。推测随着不典型增生的进一步发展,粘膜增殖活性逐步增高,一旦这种细胞增殖失去控制,可能导致癌变

的发生。

P53是目前研究最广的肿瘤抑制基因之一。研究表明P53分为野生型和突变型。野生型的P53基因在细胞的增殖调控中起重要作用,是G期DNA损伤的检测点。突变型P53具有致癌作用。多数情况下免疫组化检测P53蛋白过度表达可反映P53基因突变的存在。这是因为野生型P53基因产物很不稳定,半衰期短,在细胞核内很快被降解,而突变后的P53蛋白半衰期长(约为正常P53蛋白的4~20倍),可以在核内堆积,因而容易通过免疫组化检测出来^[5]。研究显示免疫组化检测P53蛋白与直接基因检测,如单链构象多态性分析(SSCP)、DNA测序等结果具有很高的一致性^[6,7]。因此可作为判断P53基因突变的一个重要指标。

本研究采用SP免疫组化技术和原位杂交技术在小儿正常结肠粘膜、JP、JPS以及大肠癌组织的连续石蜡切片上检测P53蛋白(DO-7)和P53 mRNA表达,结果两者表达具有很高的一致性。在正常粘膜中,P53 mRNA和P53蛋白表达均阴性,在JP组两者均有少许弱阳性表达,在JPS无不典型增生组P53 mRNA和P53蛋白阳性表达率分别为54.5%和27.3%,在JPS不典型增生组P53 mRNA和P53蛋白阳性率分别达75.0%和66.7%,与大肠癌组接近。既往文献多认为P53基因异常主要发生在良性腺瘤恶变这一阶段,即在大肠癌形成的较晚期阶段。然而,本研究从基因转录和蛋白表达两个水平显示P53基因异常可能在JPS不典型增生时已经存在,甚至在形态学出现不典型增生以前已经存在P53基因变异。

关于P53基因与JP以及JPS关系,报道很少。Wu-TT^[8]等采用与本实验相同的抗体(DO-7)检测P53蛋白在JP及JPS中表达,结果在JPS不典型增生中有8%呈弥漫性阳性染色,50%局灶性染色阳性,在JPS无不典型增生组和JP组中仅有少数局灶性阳性表达。本研究显示P53 mRNA和P53蛋白阳性表达率在JPS不典型增生组均显著高于JPS无不典型增生组($P < 0.01$),JPS不典型增生组P53阳性反应面积亦显著高于JPS无不典型增生组($P < 0.05$)。根据本研究结果及Wu-TT等实验结果可以推测P53基因异常可能是JPS不典型增生的主要分子事件之一。Sameshima等^[9]认为P53的不同表达形式(弥漫性或局灶性表达)可能系P53在癌变形成过程中通过两种不同的途径起作用。我们认为P53基因变异可能有一个由量变到质变的过程。当局灶性P53基因突变逐渐增多影响到整

个靶细胞群体时,可导致癌变的发生。

抑癌基因P21 waf1是1993年发现的一种新基因,其产物为分子量21 KD的蛋白质。该蛋白可结合并抑制两种细胞周期因子,一是CDK,二是PCNA,因而在细胞周期中发挥重要的调控作用^[10]。本研究显示P21 waf1在正常大肠粘膜、JP组阳性表达率分别为60%和65%。在JPS无不典型增生、JPS不典型增生以及大肠癌组阳性表达率显著低于JP和正常粘膜组,提示在JPS和大肠癌病变时存在P21 waf1表达减少或缺失。JPS不典型增生组P21 waf1阳性表达率及阳性面积百分比均低于JPS无不典型增生组,但两组相比差异无显著性,表明P21 waf1异常不是JPS不典型增生发生的主要机制,而是在JPS发生不典型增生之前可能已存在P21表达减弱。

本组10例大肠癌组织中有3例P21表达阳性,其中2例P53表达阴性,在JPS不典型增生组中,P53和P21两者表达亦无明显相关性($P > 0.05$)。这种P21阳性表达不但出现在P53阴性表达的病例里,而且出现在P53阳性表达的病例里,提示P21蛋白可通过P53依赖及非依赖性机制产生。体内外实验显示多种生化因子(PDGF、FGF、EGF等)、细胞粘附分子、TGF- β 等均可诱导表达P21^[11]。

本研究显示P53异常表达与PCNA LI均值呈现显著一致性,提示突变后的P53基因在体内异常积聚与肠粘膜的增殖活性密切相关。尽管在生理条件下,野生型P53主要通过P21 waf1对细胞增殖发挥负调控作用,然而,一旦P53发生突变,含突变P53蛋白的细胞具有快速增殖功能,因而具有潜在的癌变倾向。

总之,JPS存在PCNA高表达、P53表达阳性以及P21 waf1表达减少或缺失,表明上述三种肿瘤抗原参与了幼年性息肉病的发病过程。尽管JPS的病因尚不清楚,我们推测由于炎症、遗传基因缺陷或某种环境因素作用,可导致DNA受损,在生理条件下将启动野生型P53基因表达,进而调节其下游的靶基因P21 waf1,P21再分别通过抑制Cyclin-CDK复合物的活性或PCNA负向调节细胞周期,为DNA修复赢得时间。一旦P53发生突变或者P21 waf1表达缺失,可能导致正常细胞周期控制能力丧失,细胞增殖过度活跃,导致不典型增生的发生。我们认为,细胞在从良性表型向恶性表型的转化过程中,某些基因表达水平的量变可能是在基因结构质变之前导致细胞无限增殖,进而发生癌变的一个重要过程。当基因表达异常达到一定的程度可导致细胞无限增

殖,进而发生癌变。

[参 考 文 献]

- [1] 薛娟,陈家田,吴中匡. 小儿肠息肉的病理研究及处理 [J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(1): 124-126.
- [2] 薛娟,吴中匡. 幼年性息肉病当代进展 [J]. 实用儿科临床杂志, 2001, 16(5): 345-346.
- [3] 薛娟,金宁,张尉泽. 幼年性息肉和幼年性息肉病回顾性病理分析 [J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(6): 599-601.
- [4] Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H, Yanai A, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kobayashi K, et al. Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver diseases fixed in formaldehyde [J]. Am J Pathol, 1992, 140(2): 513-520.
- [5] Grewal H, Guillem JG, Klimstra DS, Cohen AM. P53 nuclear overexpression may not be an independent prognostic marker in early colorectal cancer [J]. Dis Colon Rectum, 1995, 38(11): 1176-1181.
- [6] Hurlimann J, Chaubert P, Benhattar J. P53 gene alternations and

P53 protein accumulation in infiltrating ductal breast carcinomas: correlation between immunohistochemical and molecular biology techniques [J]. Mod Pathol, 1994, 7(4): 423-428.

- [7] Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the P53 tumor-suppressor gene [J]. N Engl J M, 1993, 329(18): 1318-1327.
- [8] Wu TT, Rezai B, Rashid A, Luce MC, Cayouette MC, Kim C, et al. Genetic alterations and epithelial dysplasia in juvenile polyposis syndrome and sporadic juvenile polyps [J]. Am J Pathol, 1997, 150(3): 939-947.
- [9] Sameshima S, Kubota Y, Sawada T, Watanabe T, Kuroda T, Tsuno N, et al. Overexpression of P53 protein and histologic grades of dysplasia in colorectal adenomas [J]. Dis Colon Rectum, 1996, 39(5): 562-567.
- [10] 栗厚仪,梁立治,梅卓贤. 细胞周期调控基因 P21 waf1/CIP1 与肿瘤 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 1998, 25(6): 323-326.
- [11] Liu Y, Martindale JL, Gorospe M, Holbrook NJ. Regulation of P21 waf1/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. Cancer Res, 1996, 56(1): 31-35.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

中国当代儿科杂志网站开通消息

中国当代儿科杂志网站将于2004年6月15日起试行开通,网址:www.cjcp.org。该网站为中英文双语版面,主要栏目有现刊、过刊检索;重要会议通知;书讯;重要医学网站链接;儿科专家寻访和论坛等。该网站为免费网站,注册后可下载PDF格式的全文。欢迎使用,并提宝贵意见。

中国当代儿科杂志编辑部