

P53 Codon 72 多态性、P53 表达与宫颈癌放疗敏感性相关性的研究*

眭鸿颖 周萍 江宁 廖革望 史彩霞

(湖南省肿瘤医院妇瘤科 湖南 长沙 410013)

摘要 目的:研究 P53 Codon 72 多态性、P53 的表达与宫颈癌放疗敏感性的相关性。方法:1b2 期宫颈癌患者 274 例,术前 192Ir 腔内后装 4 次 A 点放疗剂量 2400cGy,一周 2 次,共 2 周。治疗后 14d 进行广泛性子官切除。据术后病理放疗反应 HE 染色结果分为放疗敏感与放射抗拒两组。免疫组化 SP 法检测 P53 蛋白在治疗前宫颈癌组织中的表达,分析放疗敏感与放射抗拒两组 P53 蛋白表达差异有无显著性意义;采用 PCR 后测序的方法检测治疗前 P53 第 72 密码子的基因型频率多态性(P53 Codon 72),分析放疗敏感与放射抗拒两组中各 P53Codon72 基因型的差异有无显著性意义。结果:放疗抗拒组与放疗敏感组相比,P53 高表达的比例显著高于 P53 低表达的比例(P=0.00081)。P53 Codon 72 多态性分析,Pro/Pro 与 Arg/Arg、Pro/Pro 与 Arg/Pro 在放疗敏感组与放疗抗拒组的分布差异显著(P 值分别为 P=0.009 和 P=0.032);Arg/Arg 与 Arg/Pro 在放疗敏感组与放疗抗拒组的分布无显著差异(P=0.503)。结论:P53 Codon 72 多态性和 P53 蛋白与宫颈癌放疗敏感性有相关性,可以作为早期宫颈癌放疗敏感性的预测指标。

关键词 P53 Codon 72 多态性;p53 表达;宫颈癌;放疗敏感性

中图分类号:R737.33 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)10-1896-04

To Investigate the Association of Radiotherapy Sensitivity to P53 Codon 72 Polymorphisms and P53 Expression of the Cervical Cancer*

SUI Hong-ying, ZHOU Ping, JIANG Ning, LIAO Ge-wang, SHI Cai-xia

(Department of Gynecology Oncology, Hunan Tumor Hospital, Changsha 410013, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the association of radiotherapy sensitivity to P53 Codon 72 polymorphisms and P53 expression of the cervical cancer. **Methods:** The Ib2 period cervical cancer 274 samples, preoperative after 192Ir lumen loading four times, radiation dose points A 2400cGy, twice a week for 2 weeks. After 14d of treatment the extensive uterine was dissected. These specimens were divided into two groups (radiation resist and radiation sensitive), according to the HE dyeing results of the postoperative pathologic radiotherapy reaction specimen. IHC method of SP to detect the P53 protein expression before the treatment of cervical cancer tissue of expression, analysis with radiation resist radiation sensitive P53 protein expression differences between two groups have significant meaning; By PCR and sequencing method to detect P53 codon72 genotype frequency polymorphism (P53 Codon 72) of the samples before treatment, analysis the difference of P53Codon72 genotypes between radiation resist and radiation sensitive group. **Results:** Compared radiation resist group to radiation sensitive group, the proportion of P53 highly expressed significantly higher than the proportion of P53 lower expression (P = 0.00081). P53 Codon 72 polymorphism analysis, the distribution of Pro/Pro and Arg/Arg, Pro/Pro and Arg/Pro, Arg/Arg and Arg/Pro in radiotherapy sensitive group and radiation resist group were significant differences (P = 0.946 and P = 0.697 respectively); the distribution of Arg/Arg and Arg/Pro in radiotherapy sensitive group and radiation resist group were no significant difference (P=0.503). **Conclusion:** P53 Codon 72 polymorphisms and P53 protein have relativity to cervical cancer radiotherapy sensitivity and can be used as early cervical cancer radiotherapy sensitivity of prediction indexes.

Key words: P53 Codon 72 polymorphisms; p53 expression; Cervical cancer; Radiotherapy sensitivity

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)10-1896-04

前言

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,宫颈癌的发病率、死亡率占妇科恶性肿瘤第一位,严重威胁着广大妇女的健康^[1]。放射治疗在宫颈癌的治疗中占有重要地位。据统计,大约有 80% 的宫颈癌患者需要放射治疗作为单独治疗或综合治疗的手段之一。

P53 在肿瘤的发生演变过程中倍受研究者的关注^[2],P53 一直是医学分子生物学研究的热点分子之一。P53 的生物学功能是抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,促进 DNA 损伤的修复和诱导细胞的分化发育。在多数肿瘤中发现 P53 突变,P53 基因突变可致肿瘤细胞凋亡减少,从而削弱放射损伤的作用,P53 过度表达可致肿瘤细胞放射抗拒。P53 蛋白位于细胞核内,与 DNA 特殊位点结合。正常野生型 P53 蛋白半衰期短,仅

* 基金项目:长沙市科技计划(K0802052-31)

作者简介:眭鸿颖(1976-)女,硕士,主治医师,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:13574848976, E-mail: hongyingsui@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-02-12 接受日期:2011-03-08)

20min,而突变型 P53 蛋白半衰期则明显延长,达 6h。通过免疫组化染色法可以检测到突变蛋白过度表达的情况^[3],也就是说,一旦检测到 P53 蛋白聚集,常意味着存在基因突变。

目前,国内外有很多关于 P53codon72 与癌症放疗敏感性相关性、P53 表达与癌症放疗敏感性相关性的研究,但是就 P53codon72、P53 表达与宫颈癌放疗敏感性的相关性研究很少。本文旨在对湖南省 Ib2 期宫颈癌患 P53codon72、P53 表达与宫颈癌放疗敏感性的相关性进行研究,为湖南省早期宫颈癌的放射性治疗提供一些参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及试剂盒 P53 鼠抗人单克隆抗体、HRP-兔抗鼠二抗为 Santa 公司产品,DAB 显色试剂盒购自博奥森生物科技有限公司;蛋白酶 K 购自 promega 公司,DNA Marker、Taq 酶(含 dNTPs 和 buffer)、PCR 产物纯化回收试剂盒购自长沙爱科博生物科技有限公司,琼脂糖为西班牙进口,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 标本 选取 2005~2010 年间湖南省肿瘤医院病理科 Ib2 期宫颈鳞癌放疗前活检钳取组织 274 例,及其对应的放疗后切除宫颈鳞癌组织 274 例。临床分期病理分级由妇瘤科及影像科主任医师根据 FIGO 标准^[4]判定,经病理科主任医师复核确定。

1.2 方法

1.2.1 组织标本的来源 检测标本取自宫颈癌放疗前活检钳取组织及放疗休息 2 周后根治性的手术切除组织。

1.2.2 术前放疗、手术及切除组织的 HE 染色和放疗分级 美国产核通高剂量率近距离后装治疗机,术前 192Ir 腔内后装 4 次,A 点放疗剂量 2400cGy,一周 2 次,共 2 周。治疗后 14d 行广泛性子官切除加盆腔淋巴结清扫术治疗。并对切除组织进行 HE 染色,放疗分级依据参考文献^[5]。

1.2.3 放疗前钳取组织的免疫组化

采用免疫组化 S-P 染色法检测 P53 在宫颈癌组织中的表达。采用盲法评估(免疫组化阅片者事先不知患者临床资料及分组情况),评估结果均经病理科主任医师核实。免疫组化 S-P 染色法:分别加 PBS 液作为阴性对照,1:100 的 P53 鼠单克隆抗体工作液作为一抗,室温孵育 60min,其他步骤参见产品说明书。

1.2.4 P53codon72 多态性分析

(1)放疗前钳取组织 DNA 提取 采用 TES 水浴脱蜡-酚氯仿抽提方法进行 DNA 提取,提取好后放置在 -20℃ 备用。

(2)PCR 引物与扩增 特异扩增 p53 基因多态性引物由上海生工生物制品有限公司合成。引物序列如下:P53F:5'-CTCCCAGAATGCCAGAGG-3';P53R:5'-AGAAGCCCAACGGAAAC-3'。扩增产物序列为:CTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCTGGCCCCTGTCACTCTGTGCCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCT。扩增长度 153bp,序列中的 CCC 为多态性位点,用下游引物测序。PCR 反应总体积 50μL,其中 10×PCR buffer (Mg²⁺ Included) 5.0μL, 2.5 mM dNTPs 1μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5μL, 20 pmol/L Primer 上下游各

1μL,DNA 200 ng,去离子水补充到 50μL,石蜡封顶,进行 PCR 扩增。扩增条件为:94℃ 预变性 5 min,变性 94℃ 50 s,退火 56℃ 50 s,延伸 72℃ 40s,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

(3)PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳和胶回收 PCR 产物经过 2%的琼脂糖凝胶电泳后,切胶并用试剂盒回收 PCR 产物(详见产品说明书)。回收后送 invitrogen 公司测序,对结果进行分析。

1.2.5 统计学方法采用 X² 检验。

采用 SPSS 10.0 统计学软件包,使用 X² 检验下列各组中的关系(P≤0.05 为差异有统计学意义) P53 的表达(高表达、低表达)与宫颈癌病理放疗反应分级(抗拒和敏感)之间的关系;各 P53codon72 基因型频率与宫颈癌病理放疗反应分级(抗拒和敏感)之间的关系。

2 结果

2.1 病理放疗分组结果

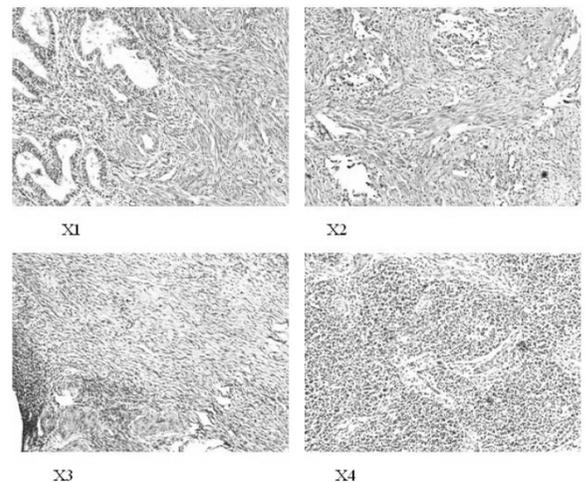


图 1 宫颈癌术后病理放疗反应 HE 染色结果
放射抗拒:X1,X2,放射敏感:X3,X4

Figure 1 Cervical cancer postoperative pathologic radiotherapy reaction
HE dyeing results
Radiation resist: X1, X2, Radiation sensitive: X3, X4

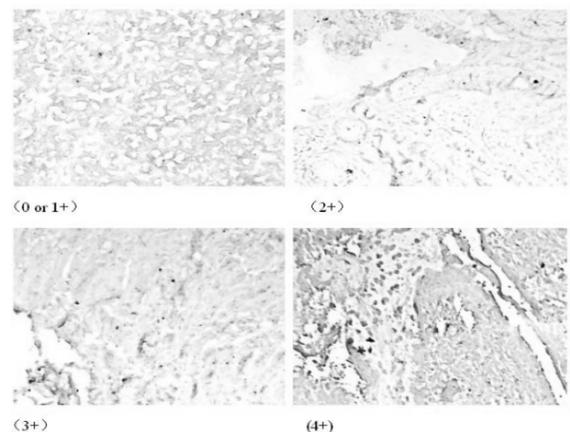


图 2 宫颈癌术前 P53 免疫组化结果

P53 低表达:(1)和(2) P53 高表达:(3)和(4)

Figure 2 P53 immunohistochemical results of preoperative cervical cancer specimens

P53 Lower expression: (1) and (2); P53 High expression: (3) and (4)

2.2 P53 免疫组化结果

结果评估:普通光学显微镜下判定结果,方法参照文献^[6]:阳性对照片选入扁桃腺组织,PBS 代替一抗作阴性对照,形态学正常的细胞作为内部对照。细胞核出现棕黄色颗粒即为阳性,根据着色深浅分微染、淡染、浓染三级。光学显微镜下每例标本数 5 个有代表性的视野,每个视野数 100 个肿瘤细胞,记录 5 个视野中阳性细胞数,取均值用于统计中位数并分级:不

着色为 0,核着色但阳性率小于或等于中位数为 1+,大于中位数为 2+。细胞核染色浓度分级:不着色或浅黄色为微染,分级 0,棕黄色为淡染,分级 1+,棕褐色为浓染,分级 2+。阳性率分级加染色浓度分级为 3+ 或 4+,定为高表达,0 或 1+ 或 2+ 定为低表达(图 2)。组织标本放疗抗拒组和敏感组的 P53 免疫组化结果(低表达与高表达)的统计结果见表 1。

表 1 放疗抗拒组和敏感组的 P53 免疫组化结果

Table 1 P53 immunohistochemical results of radiation resist group and radiation sensitive group

Group	P53 Low Expression	P53 High Expression
Radiation Resist Group(96)	45	51
Radiation Sensitive Group(168)	114	54

以上结果表明,在放疗抗拒组中,P53 高表达率为 53.125%;在放疗敏感组中,P53 高表达率为 46.875%;放疗抗拒组与放疗敏感组相比,P53 高表达的比例显著高于 P53 低表达的比例(P=0.00081)

2.3 P53 基因第 72 位密码子 PCR 扩增产物测序可能出现的结果

根据 P53 基因的碱基序列特点,第 72 位密码子处测序结果可能出现三种基因型:一、第 72 位密码子第二个碱基出现 G

和 C 两个峰,CGC 翻译后为 Arg,CCC 翻译后为 Pro,即 Arg/Pro 基因型;二、第 72 位密码子第二个碱基出现单个 C 峰,CCC 翻译后为 Pro,即 Pro/Pro 基因型,即出现双峰;三、第 72 位密码子第二个碱基出现单个 G 峰,CGC 翻译后为 Arg,即 Arg/Arg 基因型。

各种基因型的测序峰图如图 3 所示:

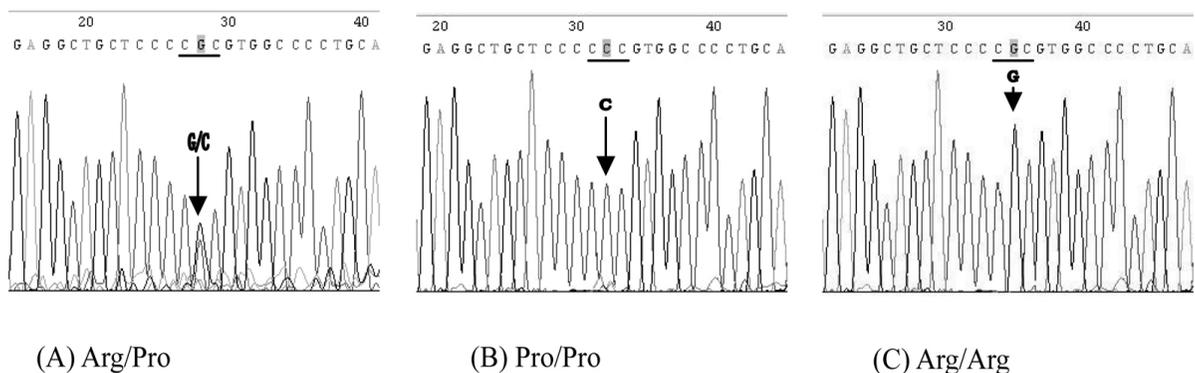


图 3 三种基因型测序峰图结果

Fig.3 Three genotype sequencing peak figure results

2.4 P53codon72 多态性在各组宫颈组织中的分布

回收 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳的特异性条带,送测

序公司进行测序。测序结果与上面的峰型进行对比,进行样本的基因型确定,结果如表 2:

表 2 放疗抗拒组和敏感组的 P53 基因型(Arg72Pro)结果

Table2 P53codon72 genotype results of radiation resist group and radiation sensitive group

Group	P53 (Arg72Pro) Genotype		
	Arg/Arg	Pro/Pro	Arg/Pro
Radiation Resist Group(96)	28	27	41
Radiation Sensitive Group(168)	65	25	78

本研究通过对放疗敏感组与放疗抗拒组 P53 基因第 72 位密码子的多态性进行分析发现,Pro/Pro 的比例与 Arg/Arg 相比,在放疗敏感组与放疗抗拒组的分布差异极显著(P=0.009),

放疗抗拒组的 Pro/Pro 比例显著高于放疗敏感组,Pro/Pro 的比例与 Arg/Pro 相比,在放疗敏感组与放疗抗拒组的分布差异显著(P=0.032);Arg/Arg 的比例与 Arg/Pro 相比,在放疗敏感组与

放疗抗拒组的分布无显著差异 ($P=0.503$), 放疗抗拒组的 Arg/Arg 比例显著低于放疗敏感组。

3 讨论

野生型 p53 基因在细胞增殖周期中起重要的调控作用, 参与细胞生长、分化和程序性死亡, 调节基因稳定性和细胞对 DNA 损伤的反应, 使 DNA 受损伤的细胞增殖周期停滞于 G1 期, 以进行 DNA 的修复或启动细胞凋亡程序令其死亡, 从而防止受损伤的细胞失控, 增殖过度成为肿瘤。在恶性肿瘤中, p53 蛋白过度表达是一种普遍现象, 且在深浸润、高转移、低分化肿瘤中较明显。本研究结果显示宫颈鳞癌 P53 蛋白高表达为 34.67%, 其放疗抗拒组与放疗敏感组之间, p53 蛋白高表达差异有显著性 ($P<0.05$)。国外有报道 p53 高表达与宫颈癌放射抗拒有关^[7], 本实验的结果与之相符。本结论可为早期宫颈癌的治疗以及预后评价提供参考: p53 低表达的宫颈癌患者, 放疗敏感, 预后较好; 高表达者, 因放疗抗拒, 因此在放射治疗时可加用放射增敏剂或提高放疗敏感性的药物以提高疗效。而且, 通过钳取病理组织用免疫组化法检测 p53 蛋白在宫颈癌组织中的表达来预测宫颈癌放疗敏感性, 操作简便易行, 费用不高, 实用价值大。

已有的研究表明, p53codon72Pro/Pro 基因型多态性是发生宫颈癌的易感因素之一^[8], p53 基因第 72 位密码子的 Pro/Pro 多态性还是引起其他疾病的易感因素^[9]。本研究通过对放疗敏感组与放疗抗拒组 p53 基因第 72 位密码子的多态性进行分析发现: Pro/Pro 的比例与 Arg/Arg 相比, 在放疗敏感组与放疗抗拒组的分布差异极显著 ($P=0.009$), 放疗抗拒组的 Pro/Pro 比例显著高于放疗敏感组; Pro/Pro 的比例与 Arg/Pro 相比, 在放疗敏感组与放疗抗拒组的分布差异显著 ($P=0.032$); Arg/Arg 的比例与 Arg/Pro 相比, 在放疗敏感组与放疗抗拒组的分布无显著差异 ($P=0.503$), 放疗抗拒组的 Arg/Arg 比例显著低于放疗敏感组。研究表明, 在早期宫颈癌患者中, Arg/Arg 基因型对放射性治疗敏感性高, 治疗效果好; 相反, Pro/Pro 基因型容易产生放疗抗拒, 治疗效果差。因此, p53codon72 可以作为早期宫颈癌放疗敏感性的重要预测指标之一, 为早期宫颈癌的放射治疗提供重要参考依据。

以上结果表明 p53 蛋白和 p53codon72 多态性可以作为预测宫颈癌放疗敏感性的指标^[10], p53 蛋白和 p53codon72 多态性还可以作为预测其他癌症放疗敏感性的指标^[11]。随着人类基因组计划的完成和基因工程技术的发展, 人体辐射损伤与修复机制的最终诠释, 使得通过基因及蛋白预测诊断疾病并指导个体化治疗成为可能。在今后的研究中, 我们应该加强辐射敏感性相关基因及蛋白——p53 基因和 p53 蛋白——研究, 将 p53 基因 Codon72 多态性和 p53 蛋白研究结合起来, 寻找能够准确

预测宫颈癌特别是早期宫颈癌放疗敏感性更为有效的方法, 实现针对不同患者采取个体化放射治疗的模式, 进而提高早期宫颈癌患者放疗的治愈率以及晚期宫颈癌的生存时间。

参考文献(References)

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics[J]. 2002. CA Cancer J Clin. 2005;55: 74-108
- [2] Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53[J]. Cell. 2009;137: 413-431
- [3] 孙建华,陶秀娟,陈立群. DNA--PKcs、P53 的表达与宫颈癌放疗敏感性及预后的关系[J]. 大连医科大学学报. 2008,8,30(4):321-324
Sun Jian-Hua, Tao Xiu-Juan, Chen Li-Qun. Correlation of DNA-PKcs/P53 with radio sensitivity and prognoses of cervical cancer [J]. Journal of Dalian Medical University. 2008, 30(4): 321-324
- [4] Benedet JL, Bender H, Jones H et al. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers [J]. FIGO Committee on Gynecologic Oncology [J]. Int J Gynaecol Obstet. 2000;70:209-262
- [5] 杨丽华,王晶,隋丽华等. 宫颈癌术前放疗及增敏的病理学研究及预后分析[J]. 河南诊断与治疗杂志. 2003, 17(2):91-95
Yang Li-Hua, Wang Jing, Sui Li-Hua et al. Preoperative cervical cancer radiotherapy and radiosensitizing pathology study and prognosis analysis[J]. Henan diagnosis and treatment magazine, 2003, 17(2):91-95
- [6] Harima Y, Sawada S, Miyazaki Y, et al. Expression of Ku80 in cervical cancer correlates with response to radio therapy and survival [J]. Am J Clin Oncol, 2003, 26(4):80-85
- [7] Han SS, Cho EY, Lee TS, et al. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphisms and the risk of cervical cancer in Korean women [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008, 140(1):71-75
- [8] Ohnuma Y, Toda M, Fujita M, et al. Blockade of an angiotensin type I receptor enhance effects of radiation on tumor growth and tumor associated angiogenesis by reducing vascular endothelial growth factor expression[J]. Int J Biomedicine & Pharmacotherapy, 2009, 63:136-145
- [9] Beskow C, Kanter L, Holgersson A, et al. Expression of DNA damage response proteins and complete remission after radiotherapy of stage IB—IIA of cervical cancer[J]. Br J Cancer, 2006, 94(11):1683-1689
- [10] 陈长春,丁晓华,蔡红兵,等. 湖北地区汉族人群 p53 基因第 72 位密码子多态性与宫颈鳞癌相关性[J]. 肿瘤学杂志. 2009, 15(11): 961-964
Chen Chang-Chun, Ding Xiao-Hua, Cai Hong-Bin et al. Correlation between p53 Codon72 Polymorphism and Cervical Squamous Cell Carcinoma in Chinese Han Population in Hubei Area [J]. Journal of Oncology, 2009, 15(11): 961-964. (In Chinese)
- [11] Damin AP, Frazzon AP, Damin DC, et al. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk [J]. Cancer Detect Prev, 2006, 30(6):523