

PTEN 和 P53 及 P16 在不同形态大肠侧向发育型肿瘤中的表达

陈 健, 张月晓, 张肖丽, 李 萍, 齐月雯, 张 雷

(承德医学院附属医院 消化内科, 河北 承德 067000)

摘要:[目的]观察抑癌基因 PTEN、P53、P16 蛋白在大肠侧向发育型肿瘤(LST)及其三分型中表达变化,探讨 3 者在 LST 发展进程中作用。[方法]选取经内镜下 ESD 治疗切除的 90 例大肠组织为 LST 组,另选取同时期 80 例经内镜下 ESD 治疗切除的大肠隆起型腺瘤(PA)大肠组织为 PA 组,以及 70 例结肠镜检查为全结肠未见器质性病变的患者正常大肠组织为对照组。在内镜下将 90 例 LST 分为颗粒均一型(LST-G-H)27 例、结节混合型(LST-G-M)25 例及非颗粒型(LST-NG)38 例,并比较其临床资料;采用免疫组织化学法(SP 法)检测 PTEN、P53、P16 蛋白水平。[结果]LST 及其三亚型患者病变直径均明显大于 PA 患者($P<0.05$)。LST 病变多分布于直肠,PA 病变多位于远端结肠,2 者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。LST 患者中组织学类型所占比例依次为绒毛状腺瘤、管状绒毛状腺瘤、管状腺瘤、锯齿状腺瘤;PA 病变中管状腺瘤所占比例最高,无锯齿状腺瘤;其中,LST-G-H、LST-G-M 中以绒毛状腺瘤为主,LST-NG 中管状绒毛状腺瘤所占比例最高。LST 癌变率显著高于 PA($P<0.05$)。PTEN、P16 蛋白表达 LST 患者最低、PA 患者次之、对照组最高;P53 蛋白表达 LST 患者最高、PA 患者次之、对照组最低。LST-NG 患者 PTEN 蛋白表达显著低于 LST-G-H 组、LST-G-M 组($P<0.05$),P53、P16 蛋白阳性率明显高于 LST-G-H 组、LST-G-M 组($P<0.05$)。[结论]PTEN、P16 在 LST 患者大肠组织中表达下调,P53 表达上调,可能参与 LST 特别是 LST-NG 发生发展。

关键词:大肠侧向发育型肿瘤;内镜技术;PTEN;P53;P16

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2019.05.11

中图分类号:R735.3

文献标志码:A

Expression of PTEN, P53 and P16 in different forms of laterally spreading tumors

CHEN Jian, ZHANG Yue-xiao, ZHANG Xiao-li, LI Ping, QI Yue-wen, ZHANG Lei

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Hebei, Chengde 067000, China)

Corresponding author: ZHANG Lei, E-mail: 912338879@qq.com

Abstract:[Objective]To observe the expression of PTEN, P53 and P16 proteins in laterally spreading tumor (LST) and their three subtypes, and to explore their roles in the development of LST. [Methods]90 cases of colorectal tissues resected by endoscopic submucosal dissection were selected as group LST, another 80 cases of protruded-type colorectal adenoma (PA) resected by ESD at the same time were selected as PA group, and 70 cases of normal colorectal tissues of patients without organic lesions in the whole colon examined by colonoscopy as control group. 90 cases of LST were divided into 3 groups, 27 cases of granular homogeneous type (LST-G-H), 25 cases of nodular mixed type (LST-G-M) and 38 cases of non-granular type (LST-NG) and their clinical data were compared; the levels of PTEN, P53 and P16 were detected by immunohistochemical method (SP). [Results]The lesion diameter of LST and three subtypes patients was significantly larger than that of PA patients ($P<0.05$). LST lesions are mostly distributed in the rectum, PA lesions mostly located in distal colon and the difference between them is significant ($P<0.05$). The proportion of histological types in LST patients was villous adenoma, tubular villous adenoma, tubular adenoma and serrated adenoma in turn; tubular adenomas accounted for the highest propor-

收稿日期:2018-12-19

基金项目:承德市科技支撑项目(No:201801A042);承德医学院校级人文社科重点课题(No:201837)

作者简介:陈 健,女,硕士,副教授,研究方向:消化系统疾病诊治及消化内镜下治疗

通讯作者:张 雷, E-mail: 912338879@qq.com

tion of PA lesions, and there was no serrated adenoma; villous adenoma was the predominant lesion in LST-G-H and LST-G-M, tubular villous adenoma accounts for the highest proportion in LST-NG. The canceration rate of LST was significantly higher than that of PA ($P < 0.05$). The expression of PTEN and P16 protein in LST patients was the lowest, followed by PA patients and the highest in control group; the expression of P53 protein was highest in LST patients, followed by PA patients and the lowest in control group. The expression of PTEN protein in LST-NG patients was significantly lower than that in LST-G-H and LST-G-M groups ($P < 0.05$), the positive rates of P53 and P16 protein were significantly higher than those of LST-G-H and LST-G-M groups ($P < 0.05$). [Conclusion] The expression of PTEN and P16 were down-regulated in colorectal tissues of LST patients, the expression of P53 is up-regulated, they may participate in the occurrence and development of LST, especially LST-NG.

Key words: laterally spreading tumors of the large intestine; endoscopic technology; PTEN; P53; P16

大肠侧向发育型肿瘤(laterally spreading tumor, LST)病变直径在 10 mm 以上,其形态特征及发生发展具有一定特殊性,不同于大肠隆起型腺瘤(protruded-type colorectal adenoma, PA),病变沿大肠黏膜侧向生长而非垂直生长,因其具有低黏膜浸润的特性,发现较困难而受到临床内镜医师的高度重视^[1]。Okada 等^[2]研究报道,LST 病变能在 3 年内发展为大肠癌,严重威胁人们的生命安全,因此应早期发现、早期治疗,降低死亡率。PTEN 属于抑癌基因,其表达下调可使细胞凋亡和分化发生紊乱,与肿瘤发展进程关系密切^[3]。P53 是重要的肿瘤抑制基因,其表达变化与肿瘤发生、发展及预后等具有一定关系^[4]。P16 基因是参与细胞周期调控的多肿瘤抑制基因(MTSI),其表达与大肠癌组织的淋巴结转移、浸润等有关^[5]。PTEN、P53 及 P16 均是抑癌基因,其表达变化均与大肠癌的发生发展有关,而与 LST 及其三亚型的关系研究较少。鉴于此,本研究通过免疫组织化学法(SP 法)检测所有受试者大肠组织中 PTEN、P53、P16 蛋白表达情况,分析三者关系,为 LST 早期治疗提供依据。结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月~2018 年 6 月在我院经内镜下 ESD 治疗切除的 90 例大肠组织为 LST 组,另选取同时期 80 例经内镜下 ESD 治疗切除的 PA 大肠组织为 PA 组,以及 70 例结肠镜检查为全结肠未见器质性病变的患者正常大肠组织为对照组。本研究经本院伦理委员会批准。纳入标准:①所有受试者均签署知情同意书;②肝、肾功能齐全;③临床资料完整;④年龄 ≥ 30 岁。排除标准:①妊娠期妇女;②家族腺瘤性息肉病;③凝血功能差;④有炎症性肠病。根据内镜下形态学分型标准^[6]将 90 例 LST 分为颗粒均一型(LST-G-H)27 例、结节混合型(LST-

G-M)25 例及非颗粒型(LST-NG)38 例。由于 LST-NG 内镜诊断难度较大,因此未将其进行细分。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 所有受试者大肠组织均经甲醛固定和石蜡包埋,并切取厚度约 4 μm 的切片,用免疫组织化学法(SP 法)检测 PTEN、P53、P16 蛋白的表达,按说明书进行具体操作,微波抗原修复、DAB 显色和镜下观察等。PTEN 鼠抗人(浓缩型)、小鼠抗人 P53 单克隆抗体、一抗 P16 均由西安臻品生物科技有限公司提供,阴性对照为 0.01 mol/L PBS,阳性对照为已知阳性切片。

1.2.2 结果判定 采用染色强度评分和阳性肿瘤细胞比例共同对染色结果进行判定,在 400 倍显微镜下随机选取 5 个区域分别计数,每个区域选 100 个细胞,取平均值。阳性肿瘤细胞 $< 20\%$ 记为 0 分; $\geq 20\%$ 且 $\leq 50\%$ 记为 1 分; $> 50\%$ 且 $< 75\%$ 记为 2 分; $\geq 75\%$ 记为 3 分。染色强度评分:0 分即阴性染色,记为“-”; ≥ 1 分且 ≤ 3 分即弱阳性染色(浅黄色),记为“+”; > 3 分且 < 7 分即中阳性染色(黄褐色),记为“++”; ≥ 7 分即强阳性染色(棕褐色),记为“+++”。

1.3 统计学处理

用 SPSS 16.0 处理数据,计数资料、计量资料分别使用 $\bar{x} \pm s$ 描述,分别行 χ^2 和 t 检验;利用 Pearson 进行 LST 患者大肠组织中 PTEN、P53、P16 蛋白表达的相关性分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组受试者临床资料比较

在年龄、性别方面,3 组受试者两两比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);在上皮内瘤变级别方面,LST 与 PA 患者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。LST 患者病变直径明显大于 PA 患者($P < 0.05$)。LST 患者病变多分布于直肠,PA 患者病变多位于远端结肠,两者比较差异有统计学意义($P <$

0.05)。LST患者中组织学类型所占比例依次为绒毛状腺瘤、管状绒毛状腺瘤、管状腺瘤、锯齿状腺瘤；PA病变中管状腺瘤所占比例最高，无锯齿状腺瘤。LST患者中癌变率达到17.77%，PA患者未检测到癌变。见表1。

2.2 LST内镜下分型及表现

A为LST-G-H，内镜下表面颗粒均匀；B为LST-G-M，内镜下表面呈颗粒状，但形状大小不一；C为LST-NG，表面无颗粒，周边向四周突出。见图1。

2.3 LST3种分型与临床特征关系

LST-G-M病变直径明显大于LST-G-H、LST-NG($P<0.05$)。LST-G-H、LST-G-M及LST-NG

主要分布于直肠。LST-G-H、LST-G-M中以绒毛状腺瘤为主，LST-NG中管状绒毛状腺瘤所占比例最高。LST-G-M患者中癌变率达到28.00%，LST-NG患者中癌变率为7.89%，LST-G-H患者无癌变发生。见表2。

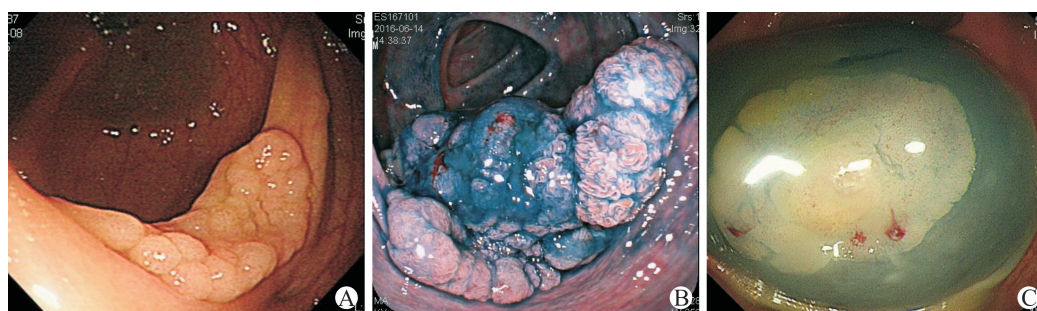
2.4 3组受试者大肠组织中PTEN、P53、P16蛋白表达

LST组、PA组患者大肠组织中PTEN、P16蛋白阳性率明显低于对照组($P<0.05$)，P53蛋白阳性率显著高于对照组($P<0.05$)。LST组大肠组织中PTEN、P16蛋白阳性率显著低于PA组($P<0.05$)，2组患者中P53蛋白阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3、图2。

表1 3组受试者临床资料比较

例(%), $\bar{x} \pm s$

临床资料	LST组($n=90$)	PA组($n=80$)	对照组($n=70$)
年龄/岁	52.73±12.49	50.16±10.03	49.78±11.59
男/女	46/44	42/38	39/31
肿瘤大小/mm	21.68±10.20	12.47±2.03	—
肿瘤定位			
直肠	69(76.67)	23(28.75)	—
远端结肠	13(14.44)	37(46.25)	—
近端结肠	8(8.89)	20(25.00)	—
组织学类型			
管状腺瘤	22(24.44)	45(56.25)	—
绒毛状腺瘤	35(38.89)	18(22.50)	—
管状绒毛状腺瘤	28(31.11)	17(21.25)	—
锯齿状腺瘤	5(5.56)	0(0.00)	—
上皮内瘤变级别			
低级别	56(62.22)	58(72.50)	—
高级别	34(37.78)	22(27.50)	—
组织癌变			
黏膜内癌	13(14.44)	0(0.00)	—
浸润癌	3(3.33)	0(0.00)	—



A: LST-G-H; B: LST-G-M; C: LST-NG。

图1 LST内镜下分型及表现

表 2 LST3 种分型与临床特征关系

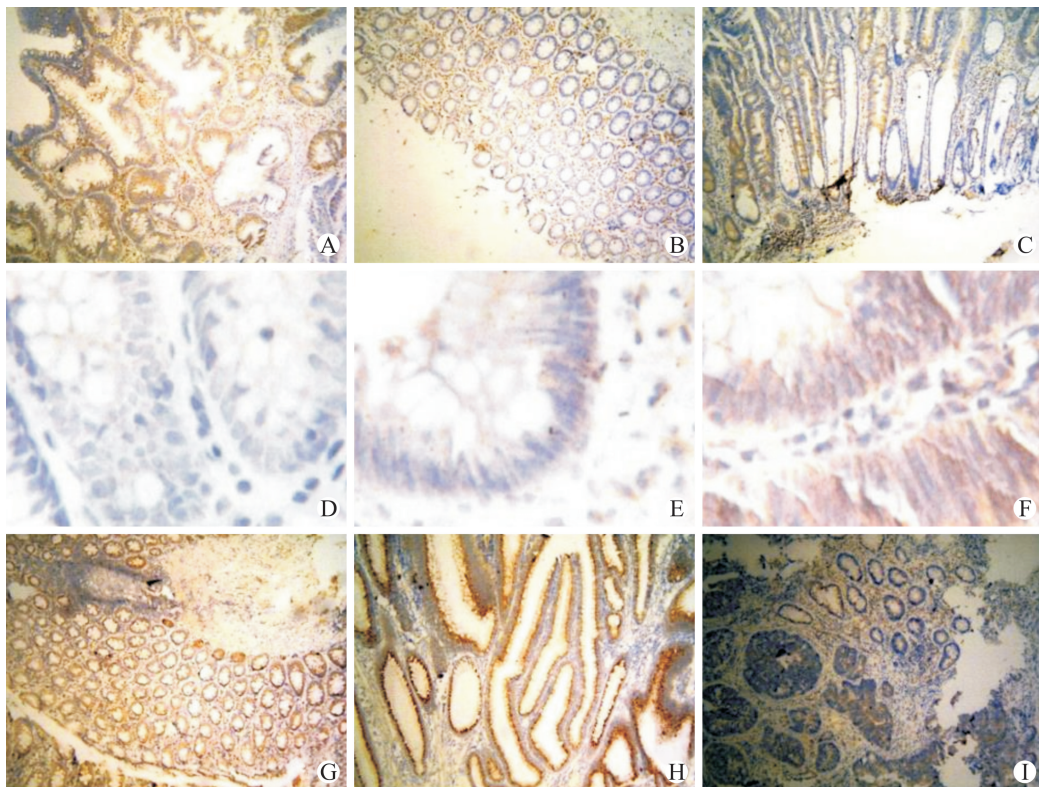
例(%), $\bar{x} \pm s$

临床资料	LST-G-H($n=27$)	LST-G-M($n=25$)	LST-NG($n=38$)
肿瘤大小/mm	20.15 $\pm$ 5.98	41.25 $\pm$ 12.65	22.46 $\pm$ 7.01
肿瘤定位			
直肠	24(88.89)	20(80.00)	25(65.79)
远端结肠	2(7.41)	3(12.00)	8(21.05)
近端结肠	1(3.70)	2(8.00)	5(13.16)
组织学类型			
管状腺瘤	4(14.81)	5(20.00)	13(34.21)
绒毛状腺瘤	15(55.56)	14(56.00)	6(15.79)
管状绒毛状腺瘤	7(25.93)	5(20.00)	16(42.11)
锯齿状腺瘤	1(3.70)	1(4.00)	3(7.89)
组织癌变			
黏膜内癌	0	6(24.00)	2(5.26)
浸润癌	0	1(4.00)	1(2.63)

表 3 3 组受试者大肠组织中 PTEN、P53、P16 蛋白表达

例

组别	例数	PTEN					P53					P16				
		—	+	++	+++	阳性率/%	—	+	++	+++	阳性率/%	—	+	++	+++	阳性率/%
对照组	70	4	12	31	23	94.29	64	1	3	2	8.57	21	11	24	14	70.00
PA 组	80	31	8	24	17	61.25 ¹⁾	58	4	11	7	27.50 ¹⁾	39	8	18	15	51.25 ¹⁾
LST 组	90	49	10	19	12	45.56 ¹⁾²⁾	64	6	11	9	28.89 ¹⁾	58	9	13	10	35.56 ¹⁾²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与 PA 组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

A:对照组 PTEN 表达;B:PA 中 PTEN 表达;C:LST 中 PTEN 表达;D:对照组 P53 表达;E:PA 中 P53 表达;F:LST 中 P53 表达;G:对照组 P16 表达;H:PA 中 P16 表达;I:LST 中 P16 表达。

图 2 免疫组化染色情况(×400)

2.5 LST3种分型大肠组织中PTEN、P53、P16蛋白表达

LST-G-H和LST-G-M大肠组织中PTEN、P53、P16蛋白阳性率均不存在统计学差异($P >$

0.05)。LST-NG患者大肠组织中PTEN蛋白阳性率显著低于LST-G-H组、LST-G-M组($P < 0.05$), P53、P16蛋白阳性率明显高于LST-G-H组、LST-G-M组($P < 0.05$)。见表4。

表4 LST3种分型大肠组织中PTEN、P53、P16蛋白表达

例

组别	例数	PTEN					P53					P16				
		—	+	++	+++	阳性率/%	—	+	++	+++	阳性率/%	—	+	++	+++	阳性率/%
LST-G-H组	27	11	4	6	6	59.26	24	0	0	3	11.11	21	1	1	4	22.22
LST-G-M组	25	9	4	8	4	64.00	23	1	0	1	8.00	18	2	4	1	28.00
LST-NG组	38	29	2	5	2	23.68 ¹⁾²⁾	17	5	11	5	55.26 ¹⁾²⁾	19	6	8	5	50.00 ¹⁾

与LST-G-H组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与LST-G-M组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

由于LST癌变率较高,在3年内即可发展为大肠癌,其病死率高,因此应引起临床医生的高度重视^[7]。随着内镜技术的快速发展,LST能早发现、早治疗,从而明显降低死亡率,改善人们生活质量。LST病变发生是由多基因参与调控的复杂过程,与大肠隆起型腺瘤(PA)不同,可能具有独特的分子发生机制。许多研究结果证明^[8-10],抑癌基因缺失或失活是肿瘤发生侵袭生长及转移的重要原因,其中抑癌基因PTEN、P53、P16蛋白表达在大肠癌发展进程中起重要作用。因此,本文通过内镜分型及分析PTEN、P53、P16基因表达与LST关系,证明LST病变发生是多基因协同作用的结果。

放大内镜和染色内镜的应用,能使临床医生早期发现LST病变。放大内镜检查能区分早期凹陷型癌和其他病变,而染色内镜不仅能将病变表面形态及其范围显示出来,而且可大致判断病变浸润程度。染色、放大内镜下能仔细观察大肠黏膜凹凸面积有无颗粒状,当亚甲蓝或靛胭脂等滴到大肠黏膜上后,病变形态清晰可见,为早期诊断LST提供依据^[11]。有研究发现^[12],LST病变多位于直肠,而隆起型腺瘤病变在降结肠和乙状结肠部位较多。高志强等^[13]研究结果显示,LST-G-H、LST-G-M以绒毛状腺瘤为主,均未发现锯齿状腺瘤。Imai等^[14]研究发现,LST的癌变率为10%~50%,明显高于PA癌变率。本研究结果显示LST及其三型患者病变直径均显著大于PA;LST-G-H、LST-G-M及LST-NG主要分布于直肠,PA多存在于远端结肠;且LST-G-H、LST-G-M中以绒毛状腺瘤为主,PA患者中管状腺瘤所占比例最高,与上述研究结果相似^[12-13],说明LST与PA病理特征具有一定区别。本研究还发现,LST中癌变率达到17.77%,多发生

在LST-G-M患者中,而PA中无癌变发生,与Imai等^[14]研究结果相似,提示LST可能更易癌变。

PTEN基因具有磷酸酶活性,通过蛋白磷酸酶或脂质磷酸酶参与瘤浸润、血管生成和细胞生长调节,对肿瘤形成、转移有重要作用,是肿瘤预后的关键指标。该基因作用于细胞核和细胞膜,可调控ECM和肿瘤细胞相互作用,促进肿瘤细胞生成^[15]。研究表明^[16],PTEN蛋白缺失表达对大肠癌发生具有重要作用。另有研究显示^[17],PTEN蛋白表达在大肠癌组织中最低、大肠腺瘤次之、正常组织中最高。P53基因有突变型和野生型两种,野生型P53不仅能使基因组稳定,还能抑制肿瘤血管生成,对肿瘤发生发展起到关键作用。突变型P53多存在于人类肿瘤中,部分P53基因突变则可导致化疗抵抗和肿瘤发生。有研究表明^[18],P53基因多发生于大肠腺瘤向大肠癌发展的阶段。Yamaguchi等^[19]研究发现,P53蛋白在大肠癌中表达阳性率明显高于正常大肠组织。P16基因负调节细胞分裂、增殖,是一种比P53更重要的抑癌基因,一旦发生缺失、突变,将导致恶性肿瘤发生。P16基因通过抑制CDK4活性,阻止细胞从G₁期进入S期,从而减少病变发生。Veganzones等^[20]研究发现,P16在大肠癌组中的阳性率低于腺瘤组和正常组织。本研究显示PTEN、P16蛋白在对照组、PA患者、LST患者中的阳性表达率逐级降低,P53蛋白在对照组、PA患者、LST患者中的阳性表达率逐级升高,与上述研究结果相似^[16-20],提示PTEN、P16及P53蛋白表达与LST的发生关系密切,对判断其恶性程度有一定意义。LST-NG患者大肠组织中PTEN蛋白表达明显低于LST-G-H、LST-G-M,P53、P16蛋白阳性率明显高于LST-G-H组、LST-G-M组,说明PTEN、P16及P53蛋白表达情况可能与LST内镜

下分型有关,应重视 LST 的形态分型。

综上所述,PTEN、P16 在 LST 患者大肠组织中表达下调,P53 表达上调,三者异常表达对 LST 病变程度评估有一定意义。关于 PTEN、P53 及 P16 基因在 LST-G-H、LST-G-M 及 LST-NG 中的作用应进一步进行验证。

参考文献

- [1] Abdelaziz M, Sayed M. Colonic Laterally Spreading Tumor Diagnosed as an Early Cancer and Treated with Endoscopic Mucosal Resection: A Case Report and Review of Literature[J]. Middle East J Dig Dis, 2017, 9(1): 49—54.
- [2] Okada M, Sakamoto H, Takezawa T, et al. Laterally Spreading Tumor of the Rectum Delineated with Linked Color Imaging Technology[J]. Clin Endosc, 2016, 49(2): 207—208.
- [3] Ahearn TU, Pettersson A, Ebot EM, et al. A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2016, 108(2): 939—939.
- [4] 赵喜连, 郝彦凤, 白文启, 等. 错配修复蛋白和 p53 蛋白表达与结直肠癌的临床病理关系及其相关性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(4): 370—374.
- [5] Zafereo ME, Xu L, Dahlstrom KR, et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity often overexpresses p16 but is rarely driven by human papillomavirus[J]. Oral Oncol, 2016, 56(1): 47—53.
- [6] 余强, 张金坤, 袁健, 等. 大肠侧向发育型肿瘤的内镜下不同治疗方法探讨[J]. 中华消化内镜杂志, 2016, 33(6): 403—404.
- [7] Sakai E, Fukuyo M, Matsusaka K, et al. TP53 mutation at early stage of colorectal cancer progression from two types of laterally spreading tumors[J]. Cancer Sci, 2016, 107(6): 820—827.
- [8] Qi H, Lou M, Chen Y, et al. Non-enzymatic action of RRM1 protein upregulates PTEN leading to inhibition of colorectal cancer metastasis[J]. Tumor Biol, 2015, 36(6): 4833—4842.
- [9] Li H, Jiang X, Niu X. Long Non-Coding RNA Reprogramming(ROR) Promotes Cell Proliferation in Colorectal Cancer via Affecting P53[J]. Med Sci Monit, 2017, 23(1): 919—928.
- [10] 谢丹阳, 吴斌文, 李东风, 等. 衰老标志物在大肠腺瘤和大肠癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2017, 38(24): 3803—3808.
- [11] 吴杰, 霍继荣, 王东, 等. Wnt 及整合素信号通路在大肠侧向发育型肿瘤中的表达及与其内镜内形态学之间的关系[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(9): 1234—1241.
- [12] Hayashi Y, Shinozaki S, Sunada K, et al. Efficacy and safety of endoscopic submucosal dissection for superficial colorectal tumors more than 50 mm in diameter[J]. Gastrointest Endosc, 2016, 83(3): 602—607.
- [13] 高志强, 张学松, 宋毓飞, 等. 结直肠侧向发育型肿瘤的诊治分析(附 17 例报告)[J]. 中国内镜杂志, 2017, 23(9): 103—107.
- [14] Imai K, Hotta K, Yamaguchi Y, et al. Preoperative indicators of failure of en bloc resection or perforation in colorectal endoscopic submucosal dissection: implications for lesion stratification by technical difficulties during stepwise training[J]. Gastrointest Endosc, 2016, 83(5): 954—962.
- [15] 严晓丽, 苏永志, 杜梦楠, 等. 大肠癌组织 PTEN 表达变化及意义[J]. 山东医药, 2017, 57(8): 61—63.
- [16] 王哲, 秦宝丽, 孙玉秀, 等. 复发转移大肠癌患者血清 PTEN、COX2 蛋白表达的研究[J]. 癌症进展, 2017, 15(3): 283—286.
- [17] Ke TW, Wei PL, Yeh KT, et al. MiR-92 a Promotes Cell Metastasis of Colorectal Cancer Through PTEN-Mediated PI3 K/AKT Pathway[J]. Ann Surg Oncol, 2015, 22(8): 2649—2655.
- [18] 姜忠敏, 郑末, 张立东, 等. 大肠癌中 B 细胞异位基因-2 的异常表达及其抑癌机制[J]. 广东医学, 2016, 37(14): 2169—2172.
- [19] Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis[J]. Cancer, 2015, 70(12): 2778—2784.
- [20] Veganzones S, Maestro ML, Rafael S, et al. Combined methylation of p16 and hMLH1 (CMETH2) discriminates a subpopulation with better prognosis in colorectal cancer patients with microsatellite instability tumors[J]. Tumor Biol, 2015, 36(5): 1—9.