

· 论 著 ·

## 结直肠癌组织中 PTTG 及 P53 蛋白的表达及其相关性

刘若丹<sup>1\*</sup>, 钟碧玲<sup>2</sup>, 李亦明<sup>2</sup>, 王明贵<sup>2</sup>, 陈艳宇<sup>2</sup>

**摘要:**目的 研究垂体瘤转化基因(Pituitary tumor-transforming gene, PTTG)蛋白及 P53 蛋白在结直肠癌组织中的表达, 探讨它们与结直肠癌发生、侵袭及转移的相关性, 以及它们之间的相互联系。方法 应用免疫组织化学(EnVision 二步法)检测 42 例结直肠癌组织和癌旁正常组织中 PTTG、P53 蛋白的表达。结果 PTTG、P53 蛋白在结直肠癌与正常组织中的表达程度的差异均具有显著性, 结直肠癌组织中 PTTG 蛋白及 P53 蛋白表达阳性率分别为 88.1% 和 97.6%, 显著高于正常结直肠组织中的表达, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。PTTG 蛋白的表达与结直肠癌患者肿瘤分型、肿瘤分化程度、肿瘤的部位无显著相关性( $P > 0.05$ ), 而在结直肠癌组织中伴转移组中显著高于无转移组( $P < 0.05$ )。P53 蛋白的表达与结直肠癌患者肿瘤分型、肿瘤分化程度、有无伴转移、肿瘤的部位无显著相关性( $P > 0.05$ )。结直肠癌组织中 PTTG 蛋白的表达与 P53 蛋白的表达无显著相关性。结论 结直肠癌组织中高表达 PTTG 蛋白可以反映结直肠癌发展程度及转移状态, 与淋巴结转移密切相关, PTTG 蛋白与 P53 蛋白无显著相关性。PTTG 蛋白可作为判断大肠癌潜在淋巴结转移和预测预后的指标之一。

**关键词:** 结直肠癌; 垂体瘤转化基因(PTTG); P53

**中图分类号:** R735.3+5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2012)4-406-04

Expression of pituitary tumor transforming gene and P53 in colorectal cancer. LIU-Ruo-dan<sup>1</sup>, ZHONG-Bi-ling<sup>2</sup>, LI Yi-ming<sup>2</sup> et al. (1. Medical Department of Digestion the Shenzhen Second Municipal Hospital, Shenzhen 518035; Guangdong P. R. China; Corresponding author LIU Ruo-dan E-mail: liuruodan2010@sohu.com)

**Abstract** Objective To investigate the expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) and P53 in colorectal cancer patients and the relationship between levels of PTTG and P53 and progression and metastasis of colorectal cancer. Methods Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of PTTG and P53 in 42 colorectal cancer tissues and 42 normal control tissues. Results The positive rate of PTTG and P53 were 88.1% and 95.2% in colorectal cancer tissues. The positive rate and expression grade in colorectal cancer tissues were significantly higher than that in normal control tissues ( $P < 0.01$ ). No relationship between expression of PTTG and tumor typing or differentiation of colorectal cancer ( $P > 0.05$ ), but the expression of PTTG in metastasis group was much higher than the negative group ( $P < 0.05$ ). No relationship between expression of P53 and tumor typing, metastasis or differentiation of colorectal cancer was observed ( $P > 0.05$ ). Conclusion The expression of PTTG is associated with the progression and metastasis of colorectal cancer and PTTG may be used as molecular markers for judging the metastasis potential and the prognosis of colorectal cancer.

**Key words:** Colorectal cancer; Pituitary tumor transforming gene(PTTG); P53

结直肠癌发生、发展及转移的机制尚未完全阐明。癌基因和抑癌基因复合突变的累积过程被看做是结直肠癌发生过程的分子生物学基础。垂体瘤转化基因(PTTG)是近年发现的一种癌基因, 在多种肿瘤中高表达, 对细胞的增殖、转化、肿瘤的形成有重要作用, 与肿瘤的发生、发展、浸润及转移有密切关系。P53 是一种抑癌基因, 野生型 P53 具有诱导细胞凋亡的功能。P53 如果发生突变, 无正常的生物学功能, 其诱导细胞凋亡的功能被抑制, 导致细胞增殖失控, 从而发生癌变<sup>[1]</sup>。我们用免疫组化方法研究 PTTG 及 P53

蛋白在结直肠癌组织、癌旁正常组织的表达, 探讨 PTTG 及 P53 与结直肠癌的恶性程度、浸润转移、肿瘤类型、肿瘤部位的相关性以及 PTTG 与 P53 之间的内在联系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集广东省第二人民医院病理科保存的 2009 年 1~12 月手术切除的结直肠癌标本蜡块 42 例, 以癌组织中心组织为癌组, 取距癌组织 10cm 处为正常对照组。42 例结直肠癌, 其中男性 27

作者单位: 1. 深圳市第二人民医院消化内科, 广东 深圳 518035; 2. 广东省第二人民医院病理科, 广东 广州 510317

作者简介: 刘若丹(1971~), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 胃肠病学。

\* 通讯作者 E-mail: liuruodan2010@sohu.com

例(年龄 33~82 岁,平均 56.11 岁),女 15 例(年龄 41~77 岁,平均 57.1 岁)。所有病例术前均未进行放疗和化疗。并按照国际癌症协会所定的标准行分化程度分级和 Dukes 分期,所有癌组织均经病理检查确诊,所有作为正常对照组织的断端组织均经病理证实无癌细胞。标本均经过 4%中性甲醛溶液固定后常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋  $4\mu\text{m}$  连续切片备用。

1.1.2 实验试剂 检测试剂为 DAKO 公司 EnVision 试剂盒(Cat NO.5007, KRP/DAB, 鼠兔通用), PTTG1 (垂体肿瘤转化基因 1) 北京中衫金桥生物技术公司工作液, 兔抗人多克隆抗体, 高压热修复抗原(1Mm EDTA, PH 8.0) P53 :丹麦 DAKO 公司产品,鼠抗人单克隆抗体,克隆号 :DO-7, 稀释度 1 :100, 高压热修复抗原(枸橼酸盐缓冲液, PH6.0)。

1.2 方法 免疫组织化学染色方法 (EnVision 二步法)检测 PTTG、P53 蛋白 3 的表达。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 以随试剂所附已知阳性对照片作阳性对照。具体操作步骤参照试剂盒说明书进行。

1.3 染色结果判断 PTTG 阳性结果为细胞核 / 胞浆棕黄色颗粒, P53 均为细胞核阳性 (棕黄色颗粒), 根据 Beesley<sup>[1]</sup> 分级方法, 按阳性细胞所占百分比并参考着色强度确定分级如下: 每张片随机选 10 个高倍视野, 阳性细胞率  $\leq 10\%$  为 (-), 阳性细胞率  $11\% \sim 25\%$  为弱阳性 (+), 阳性细胞率  $26\% \sim 50\%$  为中度阳性 (++) , 阳性细胞率  $>50\%$  为强阳性 (+++)。仅将强阳性 (+++) 组列为高表达。由两位病理科医生独立观片后统一所得。

1.4 统计学处理 应用 SAS8.2 统计软件进行统计学处理, 采用  $\chi^2$  检验和 spearman 等级相关分析。以  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PTTG 及 P53 蛋白的表达和分布 PTTG 蛋白在绝大部分癌组织标本 (37/42, 88.1%) 中可见着色, 呈棕黄色 / 棕褐色颗粒, 分布于细胞浆, 阳性细胞呈弥漫分布, 以细胞浆染色为主, 部分正常组织标本也可见着色, 分布于细胞核, 染色强度低于癌组织, 基本都是棕黄色, 均为低表达 (+), 在癌组织的表达阳性率及表达程度均显著高于正常组织 ( $P < 0.01$ )。P53 蛋白在大部分癌组织 (95.2%) 中可见着色, 表达于细胞核, 均为棕黄色或棕褐色, 在正常组织中仅一例阳性, 且为弱阳性 (+), 在癌组织的表达的阳性率及表达程度均显著高于正常组织 ( $P < 0.01$ ) , 具体见表 1、表 2。

2.2 PTTG 及 P53 蛋白的表达与临床病理因素的关

系 PTTG 蛋白的表达程度仅与结直肠癌的淋巴结转移具有相关性 ( $P < 0.05$ ) , 与肿瘤的分型、部位、分化程度未见相关 ( $P > 0.05$ ) , 而 P53 蛋白的表达程度与结直肠癌的淋巴结转移、以及肿瘤的分型、部位、分化程度均未见相关 ( $P > 0.05$ )。见表 3、表 4。

表 1 PTTG 蛋白在结直肠癌组织、癌旁正常组织中的表达

Table 1 Expression of PTTG protein in colorectal cancer tissues and normal tissues

分组 Group	例数 No.case	-	+	++	+++	阳性率 (%) Positive rate (%)
癌组织 Cancer tissue	42	5	17	10	10	88.1
正常组织 Normal tissue	42	22	20	0	0	47.6

注: 癌组织和正常组织中表达阳性率相比  $\chi^2=15$   $P < 0.01$  , 表达程度相比  $\chi^2=30.6$   $P < 0.01$

Note :Comaprison of positive rates of cancer tissues with normal

tissues  $\chi^2=15$   $P < 0.01$ ; comparison of expression extent  $\chi^2=30.6$   $P < 0.01$

表 2 P53 在结直肠癌组织、癌旁正常组织中的表达

Table 2 Expression of P53 in cancer tissues and normal tissues

分组 Group	例数 No.case	-	+	++	+++	阳性率 (%) Positive rate (%)
癌组织 Cancer tissue	42	2	3	8	29	95.2
正常组织 Normal tissue	42	41	1	0	0	2.4

注: 癌组织和正常组织中表达阳性率相比  $\chi^2=46.6$   $P < 0.01$  , 表达程度相比  $\chi^2=67.78$   $P < 0.01$

Note :Comaprison of positive rates of cancer tissues with normal tissues  $\chi^2=46.6$   $P < 0.01$ ; comparison of expression extent  $\chi^2=67.78$   $P < 0.01$

2.3 PTTG 与 P53 之间的相关性 用 Spearman 等级分析检测 42 例结直肠癌患者组织中 PTTG 和 P53 的表达程度相关性  $r=-0.07971$   $P > 0.05$  , 二者不相关。

## 3 讨论

恶性肿瘤的发生与发展是一个多因素参与的多个阶段复杂过程, 癌基因和抑癌基因复合突变的累积过程可能是结直肠癌发生过程的分子生物学基础, 涉及到多种原癌基因的激活及抑癌基因的突变或失活。垂体肿瘤转化基因 (PTTG) 是 Pei 等人 1997 年在垂体腺瘤中发现并分离出来的一种强有力的细胞转化基因, 在细胞增殖活性高的正常组织如睾丸、胸腺、胎肝中高表达, 在正常的脾脏、结肠、小肠、脑、肺等组织器官弱表达<sup>[3]</sup>。PTTG 以细胞周期依赖方式表达, 在有丝分裂期表达水平最高, 在细胞内主要定位于细胞质, 也有部分定位于细胞核<sup>[3, 4]</sup>。Pei 等人发现, PTTG1 过度表达  $\rho$ -myc 原癌基因升高, 细胞增殖和集落形成增加<sup>[5]</sup>。Kakar 等人的研究认为 PTTG1 通过调节基质金属蛋白酶 (MMP)-2 的活性及表达, 激活蛋白水解和增加入侵发生, 积极参与肿瘤血管生成和转移<sup>[6]</sup>。

表 3 PTTG 的表达与临床病理因素的关系

Table 3 Relationship between expression of PTTG and clinical pathology

分组	例数	PTTG 高表达(+++)	PTTG 低表达(++、+、-)	P 值
Group	No.case	High expression(+++)	Low expression of PTTG(++、+、-)	P value
肿瘤分型 Typing				
溃疡型 Ulcer type	15	6	9	P>0.05
肿块型 Lump	18	8	10	
浸润型 Infiltrated	9	6	3	
肿瘤分化程度 Differentiation				
高、中分化 High/moderate	30	13	17	P>0.05
低分化 Low differentiation	12	7	5	
Dukes 分期 Duked Phasing				
A+B(无转移) No metastaslis	27	9	18	P<0.05
C+D(有转移) With metastasis	15	11	4	
部位 Site				
直肠 Rectal	19	8	11	P>0.05
结肠 Colon	23	12	11	

表 4 P53 的表达与临床病理因素的关系

Table 4 Relationship between the expression of p53and clipathological factors

分组	例数	P53 高表达(+++)	P53 低表达(++、+、-)	P 值
Group	No.case	High expression of P53(+++)	Low expression of P53(++、+、-)	P value
肿瘤分型 Typing				
溃疡型 Ulcer	15	12	3	P>0.05
肿块型 Lump	18	11	7	
浸润型 Infiltrated	9	6	3	
肿瘤分化程度 Differentiation				
高、中分化 High/moderate	30	20	10	P>0.05
低分化 Low	12	9	3	
Dukes 分期 Duked Phasing				
A+B(无转移) No metastasis	27	17	10	P>0.05
C+D(有转移) With metastasis	15	12	3	
部位 Site				
直肠 Rectal	19	14	5	P>0.05
结肠 Colon	23	15	8	

国内外一系列关于 PTTG 与肿瘤关系的研究表明,PTTG 过表达与肿瘤的浸润、淋巴结转移及复发相关<sup>[7-9]</sup>。本实验结果显示 PTTG 在癌组织中的阳性表达率及表达程度均显著高于癌旁正常对照组织。hPTTG1 位于细胞质及细胞核,比例仍有争议。Chien 等的研究显示 PTTG1 与 PTTG1 结合因子(PBF)同时存在,PBF 是 PTTG 向细胞核移动的重要因素,两者同时表达可使 PTTG1 从细胞质移向细胞核,提示 PTTG1 的核移位需要 PBF 的核定位信号序列(NLS),PBF 因发生突变而缺乏 NLS 从而不能结合 PTTG1,致使不能促进 PTTG1 在细胞核的积聚<sup>[10]</sup>。本实验发现 PTTG 在正常组织中着色以细胞核为主,但在癌组织中基本仅表达于细胞浆,PTTG 的表达在正常组织与癌组织相比,存在由细胞核向细胞浆转移的现象,提

示大肠组织癌变后,PBF 可能发生突变。本研究采用卡方检验显示,PTTG 的高表达与肿瘤分型、病理分化程度、肿瘤部位均无显著相关,仅与大肠癌 Dukes 分期显著相关,C+D(有转移)组显著高于 A+B(无转移)组。说明 PTTG 的高表达可能与结直肠癌的浸润侵袭相关,可作为判断结直肠癌预后的参考指标之一。

P53 是一种抑癌基因,P53 基因编码的产物为野生型 P53 蛋白,调控细胞的正常生长,将 DNA 受损的细胞阻滞在 G1 期,使细胞在进入 S 期前修复受损的 DNA,阻止突变的发生<sup>[11]</sup>。近年来的研究表明,抑癌基因失活在肿瘤的发生过程中所起的作用比癌基因激活更重要。P53 如果发生突变,无正常的生物学功能,其诱导细胞凋亡的功能被抑制,导致细胞增殖失控,从而发生癌变<sup>[1]</sup>。野生型 P53 蛋白半衰期短,存积量

少,免疫组化难以检测,Finlay 等发现突变型 P53 蛋白能与热休克蛋白 70 (Hsc70)P53 蛋白形成复合物,该复合物使 P53 蛋白的半衰期延长,用免疫组织化学方法可检出<sup>[12]</sup>。当组织中出现 P53 蛋白高表达,表明有 P53 基因发生突变<sup>[13]</sup>。侯慧等人的研究结论为 P53 的表达与结直肠癌的发生发展有关,表达强度与癌组织的分化程度、浸润深度、转移及预后有关<sup>[14]</sup>。本实验结果显示 P53 在癌组织中的表达显著高于癌旁正常对照组织,然而 P53 的表达强度与结直肠癌的肿瘤分型、肿瘤部位、分化程度以及 Dukes 分期均无显著相关,因此认为 P53 可看作判断恶性肿瘤的一个指标,但对大肠癌预后的判断价值有限。

目前已有涉及 PTTG 与 P53 相互作用的研究。Zhou 等<sup>[15]</sup>发现功能性 P53 可以抑制 PTTG 的表达。Yu<sup>[16]</sup>等发现 PTTG 过表达可引起 P53 依赖性和 P53 非依赖性细胞凋亡,在 P53 缺乏的情况下,PTTG 可导致细胞非整倍体形成,这表明 P53 对 PTTG 诱导的非整倍体形成有一定的抑制作用。本实验中 PTTG、P53 蛋白在结直肠癌中均存在高表达,但两者的表达不存在相关性( $P>0.05$ ),可能是 P53 发生突变后,不再具有野生型 P53 所具有的诱导凋亡的功能,从而其表达与 PTTG 的表达不存在相关性。

总之,PTTG、P53 与结直肠癌的发生发展有一定程度的关系。PTTG 与肿瘤的淋巴结转移存在相关性,可作为判断结直肠癌发展程度及转移状态的一个检测指标,以 PTTG 可作为靶目标,下调 PTTG 的表达可能是治疗结直肠癌的一种有效方式。P53 与肿瘤临床病理因素无显著相关性,对预测结直肠癌患者预后价值有限。PTTG 与 P53 蛋白在结直肠癌中的表达无显著相关性。

#### 参考文献:

- [1] Schumacher U, Adam E, Fedhaus S et al. Cell differentiation and chemotherapeutic influence p53 and MMP2 immunoreactivity in human HT29 colon cancer cells grown in scid mice [J]. Cancer Lett, 2001, 166(2): 215-221.
- [2] Beesley MF, McLaren KM. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules[J]. Histopathology, 2002, 41(2): 236-243.
- [3] Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG) [J]. Mol Endocrinol, 1997, 11(4): 433-441.
- [4] Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR et al. Structure, expression and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG)[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(1): 155-156.
- [5] Pei L. Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 848-849.
- [6] Kakar SS, Malik MT. Suppression of lung cancer with siRNA targeting PTTG[J]. Int J Oncol, 2006, 29: 387-395.
- [7] Shibata Y, Haruki H, Kuwabara Y et al. Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2002, 32(7): 233-237.
- [8] Solbach C, Roller M, Fellbaum C et al. PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence[J]. Breast, 2004, 13(1): 80-81.
- [9] Wang XL, Mo WG. Expression of PTTG and its significance in colorectal cancer [J]. Shandong Med J, 2008, 48(5): 27-28. (In Chinese)  
(王先丽, 莫维光. PTTG 在结直肠癌组织中的表达及意义[J]. 山东医药, 2008, 48(5): 27-28.)
- [10] Chien W, Pei L. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product [J]. Biol Chem, 2000, 275(25): 19422-19427.
- [11] Mazar GH, Jeanteur P. Nucleotide sequence polymorphism in a hotspot mutation region of the P53 gene [J]. Oncogene, 1992(4): 781-782.
- [12] Finlay CA, Hinds PW, Tan TH. Activating mutations for transformation by P53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half life[J]. Mol Cell Biol, 1988(8): 531-539.
- [13] Somasundaram K. Tumor suppressor P53 regulation and function [J]. Front Biosci, 2000, 5: 424-437.
- [14] Hou H, Xiao MM, Ren QH et al. Expression and clinical significance of P53 and Ki67 in colorectal cancer [J]. J Practical Oncology, 2008, 22(5): 424-426. (In Chinese)  
(侯慧, 肖明明, 任秋华, 等. 结直肠癌中 p53 蛋白和 Ki67 的表达及临床意义[J]. 实用肿瘤学杂志, 2008, 22(5): 424-426.)
- [15] Zhou Y, Mehta KR, Choi AP et al. DNA damage-induced inhibition of securin expression is mediated by p53 [J]. J Biol Chem, 2003, 278(1): 462-470.
- [16] Yu R, Heaney AP, Lu W et al. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis [J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36502-36506.

收稿日期: 2011-11-30 编辑: 吴中菲