

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0381-03

· 短篇论著 ·

## 非霍奇金淋巴瘤中 Ki-67 和 P53 的表达及其临床意义

### Ki-67 and P53 protein in non-Hodgkin's lymphoma: Expression and clinical significance

刘新, 李颖, 王欣, 徐功立(山东大学山东省立医院血液科, 济南 250021)

**[摘要]** **目的:** 探讨 Ki-67 抗原和 P53 蛋白在非霍奇金淋巴瘤(NHL)的表达及其临床意义。**方法:** 采用免疫组化 SP 方法检测 52 例 NHL 及 12 例淋巴结反应性增生(RH)Ki-67 和 P53 的表达情况, 结合临床及病理资料进行分析。**结果:** Ki-67 和 P53 在 RH 中的阳性表达率非常明显低于 NHL( $P < 0.01$ ), 侵袭性 NHL 表达水平明显高于惰性 NHL( $P < 0.05$ ); 两者在 NHL 中的表达呈正相关。Ki-67 和 P53 在 NHL 的表达与患者性别、年龄、临床分期、有无全身症状、淋巴瘤细胞来源、首发部位无关。LDH  $< 250 \mu\text{g/L}$  的 NHL Ki-67 和 P53 阳性表达率明显低于 LDH  $\geq 250 \mu\text{g/L}$  NHL 中的阳性表达率( $P < 0.01$ )。Ki-67、P53 阳性表达率  $\geq 25\%$  的 NHL 患者与阳性表达率  $< 25\%$  的 NHL 患者相比较, 平均生存期明显缩短( $P < 0.05$ )。**结论:** Ki-67 和 P53 与 NHL 的发生发展有关, 并可为预后判断提供参考依据。

**[关键词]** 非霍奇金淋巴瘤; Ki-67; P53; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R730 **[文献标识码]** A

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)是临床常见的恶性肿瘤之一, 其分子发病机制、临床治疗的特异性靶点以及判断预后的指标等已成为人们普遍关注的问题。Ki-67 是一种核蛋白抗原, 与肿瘤细胞的增殖活性、肿瘤生长方式、复发转移及预后密切相关<sup>[1]</sup>。p53 基因作为肿瘤抑制基因的一种, 在肿瘤形成中的作用已成为肿瘤抑制基因研究的热点。本文通过对 52 例非霍奇金淋巴瘤标本的免疫组化研究, 探讨 Ki-67 和 P53 蛋白在非霍奇金淋巴瘤中的表达及其临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象与试剂

收集山东省立医院 2001 年 1 月至 2002 年 12 月资料完整的住院非霍奇金淋巴瘤患者石蜡标本 52 例(术前均未经任何放疗或化疗), 另取 12 例淋巴结反应性增生(RH)的石蜡包埋组织块作为对照组。所有病例均按照 WHO 分类标准重新分类<sup>[2]</sup>。NHL 患者年龄 6~72 岁, 平均 47.4 岁; 男性 32 例, 女性 20 例。其中惰性淋巴瘤亚组 17 例(滤泡性淋巴瘤 9 例、浆细胞性淋巴瘤 5 例、黏膜相关淋巴组织边缘区 B 细胞淋巴瘤 3 例); 侵袭性淋巴瘤亚组 35 例(弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤 16 例、外周 T 细胞性淋巴瘤 9 例、间变性大 T 细胞性淋巴瘤 5 例、血管免疫母细胞 T 细胞淋巴瘤 2 例、前体 B 淋巴母细胞性淋巴瘤 3 例)。鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体、鼠抗人 P53 单克隆抗体、0.01 mol/L 柠檬酸抗原修复液(pH 6.0)、DAB(3,3-二氨基联苯胺盐酸盐)显色剂及 SP(链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶)试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司。

### 1.2 病理标本的免疫组织化学检测

石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 滴加 3% 过氧化氢溶液室温孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶的活性, PBS 液冲洗; 置微波炉内 95 °C 持续 10 min, 滴加 10% 羊血清室温孵育 15 min; 滴加一抗孵育 2 h, 加生物素标记的二抗室温孵育 15 min, 加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶室温孵育 15 min, 苏木精复染 30 s; 脱水、透明、封片, 光镜观察结果。用已知的阳性片作阳性对照, 用 PBS 取代一抗作阴性对照。

### 1.3 统计学处理

计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。Pearson 相关检验分析 Ki-67 与 P53 之间的相关性。生存期分析采用 Kaplan-Meier 生存曲线。

## 2 结果与讨论

Ki-67 抗原是存在于增殖细胞核的一种非组蛋白性核内蛋白, 与细胞增殖密切相关。1993 年 Schluter 等<sup>[3]</sup>由 Ki-67 cDNA 序列分析出其氨基酸序列, 发现其包含 200 多个磷酸化部位, 羧基端有 ATP-GTP 结合区。Verheijen 等<sup>[4]</sup>研究发现, Ki-67 有丝分裂中期呈网状包绕染色体, 分裂间期散布于核仁的周围, 推测其与细胞有丝分裂有关。它在 G<sub>1</sub> 后期开始出现, 在 S 期和 G<sub>2</sub> 期逐渐升高, M 期达到高峰, 有丝分裂后迅速降解消失, 半衰期仅为 1 h 或更短。p53 基因位于 17 号染色体,

[作者简介] 刘新(1973-), 男, 山东新泰人, 博士研究生, 主要从事血液学的研究

[通讯作者] 徐功立, E-mail: XH@sph.com.cn

由 11 个外显子和 10 个内含子组成。p53 是肿瘤抑制基因,它的主要生物学功能为维持细胞基因组的完整性及细胞周期的正常运行,诱导凋亡和促进分化<sup>[5]</sup>。p53 基因突变是人类肿瘤中最普遍的改变,突变会引起 P53 蛋白的构象改变和半衰期的延长,突变产生 P53 蛋白能抑制野生型 p53 基因的活性或使之失活而引起肿瘤细胞的恶性转化。研究表明 Ki-67 和 P53 与许多成人肿瘤的发生发展密切相关,包括肺癌、消化道肿瘤、乳腺癌、泌尿系肿瘤等<sup>[6-8]</sup>。

Ki-67 和 P53 抗原反应以胞核染成黄色或棕黄色者为阳性细胞。在反应性增生淋巴组织中,Ki-67 和 P53 阳性细胞主要集中于生发中心内,生发中心以外的区域只有极少数散在分布的淋巴细胞呈现阳性信号。光镜下每张切片选取 5 个有代表性的高倍视野(×400),每个视野计数 200 个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分数,以百分数表示标记指数(LI)。Ki-67 和 P53 在 RH 中的阳性表达率非常明显低于侵袭性 NHL 患者(P<0.01),惰性 NHL 的阳性表达率明显低于侵袭性 NHL(P<0.05),详见表 1。

表 1 Ki-67 和 P53 在 RH、惰性 NHL 和侵袭性 NHL 中的阳性表达率(%)

组别	n	Ki-67 阳性率	P53 阳性率
RH	12	10.11 ± 4.86	2.21 ± 0.79
惰性 NHL	17	18.40 ± 10.67	20.53 ± 6.25
侵袭性 NHL	35	46.14 ± 13.72 <sup>**△</sup>	55.17 ± 18.62 <sup>**△</sup>

\*\* P<0.01 与 RH 比较;△ P<0.05 与惰性 NHL 比较

Ki-67 和 P53 在非霍奇金淋巴瘤的表达与临床病理特征的关系见表 2。结果显示,Ki-67 和 P53 在非霍奇金淋巴瘤的表达与性别、年龄、患者临床分期、有无全身症状、患者淋巴瘤细胞来源、首发部位无关。Ki-67 和 P53 在侵袭性 NHL 中的表达明显高于惰性 NHL 及淋巴结反应性增生,提示在淋巴瘤的侵袭浸润及发展中起重要作用,可作为判断淋巴瘤恶性程度高低的参考指标之一。李红玲等<sup>[9]</sup>研究发现, Ki-67 与肿瘤恶性程度成正相关,提示 Ki-67 促进肿瘤细胞增殖,与 NHL 侵袭有关,Ki-67 对 NHL 临床分型、组织分级均具有一定的参考价值,Ki-67 检测有利于指导临床治疗及预后估计。本组 52 例 NHL 中,侵袭性淋巴瘤 P53 表达率为 55.17%,明显高于惰性淋巴瘤。Soini 等<sup>[10]</sup>研究 P53 在恶性淋巴瘤的表达时也得出相似的结论。

乳酸脱氢酶(LDH)是糖酵解途径中一种重要的酶,广泛存在于人体组织中。1993 年 Shipp<sup>[11]</sup>等提出

了淋巴瘤预后指标( IPI ),其中 LDH 值被认为是独立的重要预后因素之一。LDH 水平高低可提示 NHL 患者肿瘤负荷大小,而且与肿瘤组织学的分类密切相关。本研究发现,LDH < 250 μg/L 非霍奇金淋巴瘤的 Ki-67 和 P53 表达率明显低于 LDH ≥ 250 μg/L 非霍奇金淋巴瘤的 Ki-67 和 P53 表达率(P < 0.01),提示 Ki-67 和 P53 的表达与非霍奇金淋巴瘤患者 LDH 水平相关。

表 2 Ki-67 和 P53 在非霍奇金淋巴瘤的表达与临床病理特征的关系

病理特征	n	Ki-67 阳性率(%)	P53 阳性率(%)	
性别	男	32	35.35 ± 18.75	42.18 ± 18.25
	女	20	39.82 ± 18.27	46.51 ± 19.07
年龄	≤ 50 岁	24	36.20 ± 17.90	42.15 ± 19.69
	> 50 岁	28	37.81 ± 18.91	45.30 ± 20.02
分组	A 组	26	35.68 ± 17.93	41.96 ± 15.82
	B 组	26	38.46 ± 18.85	45.74 ± 17.65
分期	I、II 期	28	35.99 ± 21.68	45.26 ± 20.22
	III、IV 期	24	38.33 ± 22.44	42.20 ± 21.03
免疫型	T 细胞	19	39.24 ± 18.27	41.87 ± 17.86
	B 细胞	33	35.82 ± 19.30	44.98 ± 19.51
部位	结内	30	37.60 ± 18.99	42.98 ± 18.46
	结外	22	36.35 ± 17.65	45.02 ± 18.25
LDH < 250 μg/L	23	27.19 ± 16.34	28.04 ± 17.21	
	≥ 250 μg/L	29	44.90 ± 15.96 <sup>**</sup>	56.37 ± 22.19 <sup>**</sup>

\*\* P<0.01 与 LDH < 250 μg/L 比较; A 组为无全身症状组, B 组为有全身症状组

本研究还发现,Ki-67 表达率 < 25% 与 Ki-67 表达率 ≥ 25% 的患者平均生存期分别为 28.8 个月和 18.4 个月。P53 表达率 < 25% 与 P53 表达率 ≥ 25% 的患者平均生存期分别为 29.7 个月和 17.9 个月。Ki-67 和 P53 表达率 ≥ 25% 非霍奇金淋巴瘤患者与表达率 < 25% 非霍奇金淋巴瘤患者相比较,平均生存期明显缩短(P < 0.05)。Kaplan-Meier 生存曲线见图 1、图 2。根据免疫组化的染色结果,本研究发现 Ki-67 与 P53 的表达存在同步变化趋势,Pearson 相关检验分析显示两者在非霍奇金淋巴瘤的表达呈正相关(r = 0.7886)。Mochen<sup>[12]</sup>等发现 Ki-67 指数是预测生存期的重要指标。多变量分析得出:指数 Ki-67、FCM-S 期分数仍是独立于组织学的重要预后因素。Korkolopoulou 等<sup>[13]</sup>发现,P53 蛋白与 PCNA 在 NHL 中进行联合表达分析将是判断 NHL 预后的一组具有重要意义的指标。研究两者在淋巴瘤发生发展中的作用机制及其在细胞增殖

及疾病发展中的相互作用等,对淋巴瘤的治疗及预后判断有着重要的意义。Ki-67 和 P53 抗原的检测,可以作为预测肿瘤临床行为的早期指标和判断肿瘤预后的重要参数。

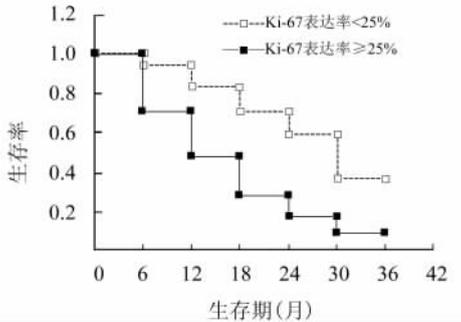


图1 NHL 患者不同 Ki-67 表达率的生存期

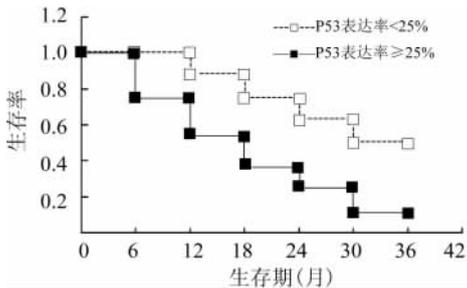


图2 NHL 患者不同 P53 表达率的生存期

#### [参考文献]

- [1] Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein: From the known and the unknown [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3): 311-322.
- [2] 张彦宁, 张长淮, 周小鸽. 2001 年 WHO 淋巴瘤分类与非霍奇金 B 细胞淋巴瘤 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2004, 3(2): 104-110.
- [3] Schluter C, Duchrow M, Woblenberg C, et al. The cell proliferation

associated antigen of antibody ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins [J]. *J Cell Biol*, 1993, 123(3): 513-522.

- [4] Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann R, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix associated antigen antigen1. Intracellular localization during interphase [J]. *J Cell Sci*, 1989, 92(2): 123-130.
- [5] Gottlieb TM, Oren M. P53 in growth control and neoplasia [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1996, 1287(2-3): 77-102.
- [6] Hinds P, Finlay C, Levine AJ, et al. Mutation in required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation [J]. *J Virol*, 1989, 63(2): 739-746.
- [7] 许昱. Ki-67 及其在中耳胆脂瘤研究中的应用 [J]. *国外医学: 耳鼻咽喉科学分册*, 1999, 23(3): 146-150.
- [8] Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Cues to cancer etiology and molecular pathogenesis [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(18): 4855-4878.
- [9] 李红玲, 孙秉中, 马福成, 等. 非霍奇金淋巴瘤组织 Caspase3 和 ki-67 的表达 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2004, 11(3): 286-288.
- [10] Soini Y, Raunio H, Paakko P. High-grade malignant non-hodgkin's lymphomas differ from low-grade lymphomas in the extent of apoptosis and their expression of bcl-2, mcl-1, bax and p53 [J]. *Tumor Biology*, 1998, 19(3): 176-185.
- [11] Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR, et al. The international non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma [J]. *New Eng J Med*, 1993, 329(14): 987-994.
- [12] Mochon C, Giardinir, Costa A, et al. MIB-1 and S-phase cell fraction predict survival in non-Hodgkin's lymphomas [J]. *Cell Prolif*, 1997, 30(1): 37-47.
- [13] Korkolopoulou P, Angelopoulou MK, Kontopidou F, et al. Prognostic implications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), AgNORs and P53 in non-Hodgkin's lymphomas [J]. *Leuk Lymphoma*, 1998, 30(5-6): 625-636.

[收稿日期] 2006-07-15

[修回日期] 2006-09-29

[本文编辑] 王莹

#### · 简讯 ·

## 《实用肿瘤杂志》征订启事

《实用肿瘤杂志》是由中华人民共和国教育部主管,浙江大学主办的肿瘤专业学术性期刊。本刊为中国抗癌协会系列期刊、中国科技核心期刊、中国生物医学核心期刊、中国肿瘤学核心期刊,并被列为医学院校研究生教育 A 类期刊。本刊已入选中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并被《中国科学引文数据库》、《中国期刊全文数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库 - CMCC》、《中国生物医学期刊引文数据库 - CMCI》、《中文科技期刊数据库》等多家数据库收录。本刊突出实用性,主要栏目有专家论坛、专题讨论、基础与临床研究、技术与经验、药物与临床、流行病学调查、综述与讲座、误诊分析、短篇报道与个案等,适合于广大中、高级医务人员及从事肿瘤科研与动物学工作者阅读、参考。

《实用肿瘤杂志》为双月刊,大 16 开,92 页,每逢双月 10 日出版。每期定价 8.00 元,全年 48.00 元。本刊刊号 ISSN1001-1692/CN33-1074/R,邮发代号 32-87,国外发行代号 4816BM,全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误,可汇款至浙江省杭州市解放路 88 号,浙江大学医学院附属第二医院《实用肿瘤杂志》编辑部补订。

电话(传真): (0571) 87783654; 邮编: 310009; E-mail: shyzhl@zju.edu.cn