

p53 免疫组化判定肾母细胞瘤预后的研究



何 军¹ 肖海波² 王淑华² 贺晓辉² 吴 震²

【摘要】 目的 探讨 p53 免疫组化的表达与肾母细胞瘤侵袭性的关系,及对术前化疗的评估。**方法** 收集 2007 年—2009 年本院收治的 44 例肾母细胞瘤患儿,25 例患儿未接受化疗而直接手术,19 例术前化疗后再做手术。患儿术后病理组织学检查均证实为肾母细胞瘤,年龄 0.4~10 岁,平均年龄 (2.7 ± 2.0) 岁。所有病理切片做 p53 免疫组化。根据 p53 染色密度和强度进行计分。**结果** p53 高强度、综合得分在术后和术前化疗患儿之间有统计学意义 ($P=0.003$; $P=0.006$),综合得分为 1 的术后化疗患儿死亡、复发及组织结构分型有统计学意义 (P 值分别为 0.034、0.035、0.02)。综合得分为 1 的术前化疗患儿死亡、复发及组织结构分型无统计学意义 ($P=0.271$)。**结论** 本研究初步表明,肾母细胞瘤术后化疗的肿瘤侵袭性较术前化疗肾母细胞瘤强,p53 免疫组化的表达与肾母细胞瘤分期和预后相关,可能成为肾母细胞瘤肿瘤组织病理学分析的补充。

【关键词】 肾母细胞瘤; p53; 免疫组化

p53 Immunohistochemistry in Wilms' Tumor prognosis. HE Jun, XIAO Hai-bo, WANG Shu-hua, et al. 1, The Hunan Children's Hospital, Hunan Changsha, 410007, China, 2, The First People's Hospital of Huaihua, Hunan, Huaihua, 418000, China.

【Abstract】 Objective To test whether immunohistochemical expression of p53 in Wilms' tumors correlates with tumor aggressiveness and evaluate any alteration of p53 expression by preoperative chemotherapy. **Methods** 19 patients received preoperative chemotherapy and 25 patients underwent immediate surgery. All children had a histologically confirmed Wilms' tumor and were less than 10 years of age. All pathology slides were uniformly stained for p53 protein. Both p53 staining density and intensity were scored. The p53 scoring was then compared to the clinical behavior of the Wilms' tumor: unfavorable tumor staging, survival and recurrence rates. **Results** Both in the direct surgery and the preoperatively treated group, p53 positivity correlated with unfavorable Wilms' tumor staging ($P=0.003$). Combined score in children with postoperative and preoperative chemotherapy had statistical significance ($P=0.006$), the combined score of 1 postoperative chemotherapy with death, recurrence and parting was statistically significant ($P=0.034$; $P=0.035$; $P=0.02$). Combined score for 1 preoperative chemotherapy, recurrence and death in children with parting no statistical significance ($P=0.271$). **Conclusions** This study provides preliminary evidence that a higher score of immunohistochemical p53 expression correlates with unfavorable Wilms' tumor staging and predicts poorer survival. It could become a useful addition to current histopathological analysis of Wilms' tumor.

【Key words】 Wilms Tumor; Tumor Suppressor Protein p53; Immunohistochemistry

肾母细胞瘤是儿童常见肾脏恶性肿瘤,早期肾母细胞瘤病死率很高,但随着放疗和化疗的应用,存活率明显上升^[1]。美国国家肾母细胞瘤研究小组 (the National Wilms' Tumor Study Group NWTSG) 建议术后化疗,国际儿童肿瘤协会 (International Socie-

ty of Paediatric Oncology SIOP) 提倡先术前化疗^[2-4]。虽然治疗方案不同,各具优缺点,但 5 年存活率均达到 90%^[2-5]。判定预后的金标准是肿瘤组织学分型和临床病理分期,并以此确定术后化疗方案^[5,6]。肿瘤分期高,组织分化程度低,年龄超过 3 岁,淋巴结转移和术前化疗反应差都是预后不良的指标。但一些判定预后差的肾母细胞瘤,化疗反应良好,能长期存活。这表明需要新的指标来判定肾母细胞瘤预后,p53 为肿瘤抑制蛋白属于最早发现的肿瘤抑癌基因之一,p53 蛋白能调节细胞周期

和避免细胞癌变的发生^[7,8]。本研究运用 p53 免疫组化在肾母细胞瘤的表达和肿瘤分期,生存率和复发率的关系,确定其在判定肾母细胞瘤预后的价值,为临床预后提供新的依据。

材料与方法

一、临床资料

收集本院 2007—2009 年诊断为肾母细胞瘤的患儿 44 例,其中 25 例未接受化疗而直接手术(图 1),19 例接受术前化疗再做手术(图 2,图 3)。所有患儿术后病理组织学证实为肾母细胞瘤,年龄 0.4 ~ 10 岁。排除双侧肾母细胞瘤或有合并症的肾母细胞瘤患儿。回顾性分析所有患儿的性别、年龄、肿瘤位置、术前术后化疗、组织分型、复发时间、死亡时间。患儿均给予至少 6 个月的化疗。

二、方法

患儿肿瘤组织常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。脱蜡和水化后,采用 SP 法免疫染色(大鼠 p53

免疫组化试剂盒,上海雅吉生物科技有限公司,50T/100T),由两名病理科医生采用双盲法阅片,结合北航图像分析系统软件进行结果判断,采用密度和强度染色得分对 p53 的表达进行评估。密度评判:“0”, $<5\%$ 肿瘤细胞 p53 表达阳性;“1”, $5\% \sim 50\%$ 肿瘤细胞 p53 表达阳性;“2”,超过 50% 的肿瘤细胞 p53 染色阳性。强度评判:“0”,染色弱或缺乏;“1”,中等强度,“2”,高强度(图 4 ~ 7,图 4 为 HE 染色),密度和强度分数相加为最后得分,强度和密度得分高于“0”,得分数为“1”,余得分数为“0”^[9]。

三、统计学处理

以 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计数资料以百分比或百分率表示,计量数据以均数 \pm 标准差表示,两样本之间采用 Independent Samples Test,多样本之间采用 one-Way ANOVA 检验,连续变量分析采用 Mann-Whitney U-test,计数资料采用 Test, Fisher's Exact Test。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

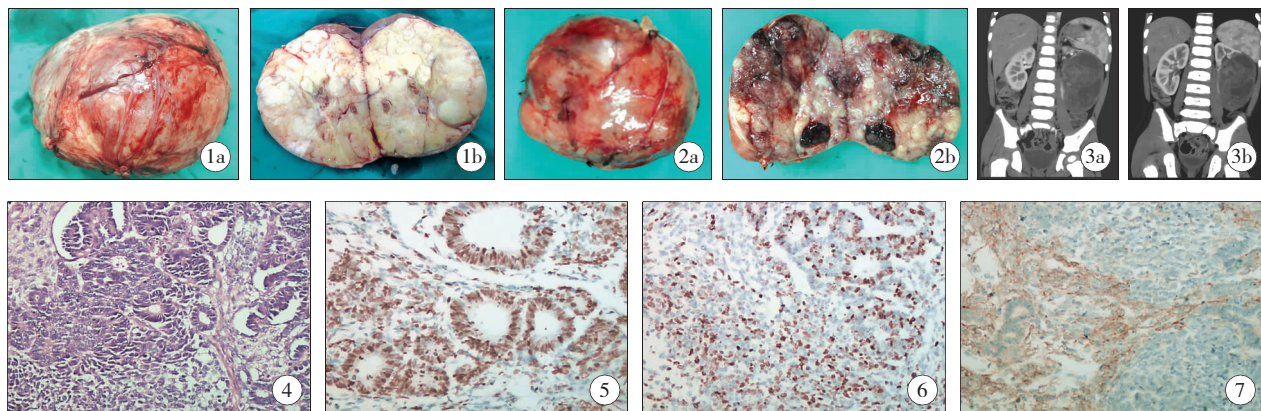


图 1 未做化疗直接手术切除的肾母细胞瘤的大体观和剖面观。直接手术切除的肾母细胞瘤,肿瘤组织体积较大,剖面观瘤体灰白,有明显结节状改变,1a,大体观及剖面观;图 2 术前化疗后手术的肾母细胞瘤的大体观和剖面观。术前化疗后手术的肾母细胞瘤,可见肿瘤组织比前明显缩小,剖面内有多处缺血坏死组织,2a 大体观;2b 剖面观;图 3 化疗前后肿瘤组织比较(CT)。化疗后可见肿瘤组织比前明显缩小,正常肾脏组织显影较前增多,3a 化疗前;3b 化疗后;图 4 HE 染色。图 5 密度评判:“2”超过 50% p53 染色阳性的肿瘤细胞;强度评判:“2”高强度。图 6 密度评判:“1” $5\% \sim 50\%$ p53 染色阳性的肿瘤细胞,强度评判:“1”中等强度。图 7 密度评判:“0” $<5\%$ p53 表达阳性的肿瘤细胞,强度评判:“0”代表染色弱或缺乏。

结果

44 例肾母细胞瘤患儿中,男性 26 例,女性 18 例,男:女为 1.44 : 1。肾母细胞瘤患儿年龄最小 4 个月,最大年龄 10 岁,平均年龄 (2.7 ± 2.0) 岁。小于 1 岁 7 例(15.90%),小于 3 岁 22 例(50.00%),大于 3 岁 15 例(34.09%)。死亡 9 例(20.5%)。其中术前化疗的患儿死亡 2 例(10.5%),术后化疗的患儿死亡 4 例(16.0%)。平均随访时间 $(4.5 \pm$

0.9) 年,肿瘤分期: I 期 22 例(50%), II 期 10 例(22.7%) III 期 7 例(15.9%) IV 期 5 例(11.4%)。组织结构分型: FH 35 例(79.5%), UH 9 例(20.5%),见表 1。p53 密度:术后化疗“0”15 例(60%),“1”2 例(8%),“2”8 例(32%);术前化疗“0”8 例(42.1%),“1”8 例(42.1%) “2”3 例(15.8%);p53 强度:术后化疗“0”12 例(48%),“1”3 例(12%),“2”10 例(40%);术前化疗“0”10 例(52.6%),“1”8 例(42.1%),“2”1 例(5.3%);综合得分:术后化疗“0”1 例(4%),“1”24 例

(96%) ;术前化疗“0”8 例 (42. 1%) ,“1”11 例 (57. 9%) ,见表 2。

表 1 术前化疗和术后化疗患儿临床资料比较

项目	总计	术前是否化疗		P 值
		是	否	
患儿例数	44	19	25	
男/女	26/18	9/10	17/8	0. 168◆
平均年龄	2. 7 ± 2. 0	2. 5 ± 2. 2	2. 9 ± 1. 9	0. 953▲
平均随访时间	4. 5 ± 0. 9	4. 8 ± 0. 5	4. 6 ± 1. 1	0. 312▲
肿瘤位置(左/右)	23/21	12/23	7/21	0. 425◆
肿瘤分期				
I	22	9	13	
II	10	4	6	0. 882★
III	7	3	4	
IV	5	3	2	
组织结构分型				
FH	35	14	21	0. 401*
UH	9	5	4	
复发	10	3/19	7/25	0. 501*
死亡	6	2/19	4/25	0. 684*

注:◆χ² Test,▲Independent Samples Test,★Mann-Whitney U-test,*Fisher’s Exact Test,术前化疗和术后化疗的患儿在性别、年龄、肿瘤的位置、肿瘤的分期、组织结构分型、死亡、复发、随访时间上比较,差异没有统计学意义。

表 2 p53 的密度和强度评判及综合得分表

项目	术后化疗	术前化疗	P 值
P53 密度			
“0”〈5%	15	8	0. 506◆
“1”5% ~ 50%	2	8	0. 076*
“2” > 50%	8	3	0. 495*
P53 强度			
“0”	12	10	0. 861◆
“1”	3	8	0. 101*
“2”	10	1	0. 003*
综合得分			
“0”	1	8	0. 006*
“1”	24	11	
死亡	3(综合得分 = 1)	1(综合得分 = 1)	0. 034* ; 0. 271*
复发	6(综合得分 = 1)	1(综合得分 = 1)	0. 035* ; 0. 271*
分型			
FH	1	1	
UH	3(综合得分 = 1)	1(综合得分 = 1)	0. 02* ; 0. 271*

注:◆χ² Test,*Fisher’s Exact Test,术后化疗患儿组 p53 高强度比术前化疗有统计学意义,P = 0. 003,综合得分术后化疗比术前化疗有统计学意义,P = 0. 006,说明术后化疗肾母细胞瘤的肿瘤的侵袭性较术前化疗强。术后化疗 p53 综合得分和死亡有统计学意义,P = 0. 034。术后化疗 UH 的 p53 综合得分和死亡有统计学意义,P = 0. 02。

讨论

本组患儿发病年龄 4 个月至 10 岁(2. 7 ± 2. 0 岁),3 岁以下发病者 65. 90%,男女比例为 1. 44 : 1,这和黄澄如报道基本一致^[10]。术后化疗和术前化疗患儿在性别、年龄、肿瘤位置、分期、组织结构分型、死亡、随访时间上比较,无统计学意义(P > 0. 05),这和 Franken J 等研究结果一致^[7]。但患儿个体间的生存还是截然不同,本研究引人 p53 免疫组化的密度、强度及综合得分对肾母细胞瘤的侵袭性、复发率和生存率进行比较。术后化疗较术前化疗 p53 高强度和综合得分比较,差异有统计学意义(P = 0. 003, P = 0. 006),说明 p53 免疫组化阳性与肿瘤侵袭性相关,但其表达有可能被术前化疗改变。p53 免疫组化的表达可能是肿瘤侵袭性的指标^[11]。

恶性程度高的肿瘤采用强化化疗方案,而恶性程度底的肿瘤可采用短期化疗方案^[10]。强化化疗方案降低恶性程度高的肿瘤复发率和死亡率。强化化疗可以彻底治愈一些所谓恶性程度高的肿瘤,而所谓恶性程度底的肿瘤却因为忽视了肿瘤的侵袭性而导致复发和死亡,所以,追踪肿瘤侵袭性非常关键^[11]。如果判定为恶性程度低的肿瘤而实际上是恶性程度高的肿瘤,那么它就有复发的潜在危险,反

之,如果判定为高度恶性的肿瘤而实际上是低度恶性的肿瘤,那么进行强化化疗对患儿的身心是巨大的摧残^[12]。通过 p53 免疫组化的检查,我们发现术后化疗 p53 高强度比术前化疗高 ($P=0.003$),综合得分术后化疗比术前化疗高 ($P=0.006$),这说明术后化疗的肿瘤组织侵袭性强,恶性程度高,p53 阳性是生存率差的危险因素 ($P=0.034$)。石磊等研究也表明:肾母细胞瘤 p53 基因突变时,p53 蛋白过表达,凋亡减弱,肿瘤细胞间变程度增高,肿瘤细胞增殖明显,预后不良^[13]。虽然术前化疗肿瘤组织的侵袭性减弱,但并不能对肿瘤的复发和死亡有所改善 ($P=0.501, P=0.684$)。术后化疗患儿分型上 UH 的 p53 综合得分和死亡有相关性 ($P=0.02$)。这可能意味着,无论采取何种治疗方式,p53 阳性的肿瘤有更大死亡风险,这和 Franken J 等的研究结果相一致^[7,11,12]。

p53 综合得分高的肾母细胞瘤肿瘤侵袭性高,复发率高和生存率降低。反之肿瘤侵袭性低,复发率低和生存率增高,但是化疗后 p53 综合得分高低并不能有效反映其肿瘤的真实性,这可能导致 p53 阴性的肿瘤,认为是低度恶性的,实际上并不是^[7]。本研究样本量较小,研究时间跨度较长,对不同患儿治疗方法也不同,随访时间长短也有差异,如果 p53 免疫组化的结果用于临床,需足够大的样本量来对术前化疗和直接手术的患儿 p53 免疫组化染色的强度和密度进行评估。

本研究首次提出使用 p53 染色和评分系统区分术前化疗和术后化疗的肾母细胞瘤侵袭性。p53 免疫组化的表达可能是测试评估肿瘤侵袭性的指标。其表达强度会因术前化疗而改变。因此,用 p53 免疫组化评估肾母细胞瘤的侵袭性应该对术前化疗和术后化疗的患儿分开。术后化疗的肾母细胞瘤 p53 阳性意味着肿瘤侵袭性加强。p53 阳性可能是生存率低的危险因素。p53 免疫组化的表达可能成为一个肾母细胞瘤肿瘤组织病理学分析的补充,或能成为新的预后标记物。

参考文献

- Metzger ML, Dome JS. Current therapy for Wilms tumor [J]. *Oncologist*, 2005, 10: 815-826.
- Davidoff AM. Wilms' tumor [J]. *Curr. Opin. Pediatr*, 2009, 21: 357-364.
- Graf N, Semler O, Reinhard H. [Prognosis of Wilms' tumor in the course of the SIOP trials and studies] [J]. *Urologe A*, 2004, 43: 421-428.
- Mitchell C, Pritchard-Jones K, Shannon R, et al. Immediate nephrectomy versus preoperative chemotherapy in the management of non-metastatic Wilms' tumour: results of a randomised trial (UKW3) by the UK Children's Cancer Study Group [J]. *Eur. J. Cancer*, 2006, 42: 2554-2562.
- Vujanović GM, Sandstedt B, Harms D, et al. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood [J]. *Med. Pediatr. Oncol*, 2002, 38: 79-82.
- Vujanović GM, Sandstedt B. The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach [J]. *J. Clin. Pathol*, 2010, 63: 102-109.
- Franken J, Lerut E, Van Poppel H, et al. p53 Immunohistochemistry expression in Wilms tumor: a prognostic tool in the detection of tumor aggressiveness [J]. *J. Urol*, 2013, 189 (2): 664-670.
- Agarwal S, Iyer VK, Agarwala S, et al. Apoptotic protein expression in favorable histology Wilms tumor correlates with tumor recurrence [J]. *Pediatr Surg Int*, 2011, 27: 303-308.
- Jouret-Mourin A, Sempoux C, Duc KHM, et al. Usefulness of histopathological markers in diagnosing Barrett's intraepithelial neoplasia (dysplasia) [J]. *Acta Gastroenterol. Belg*, 2009, 72: 425-432.
- 黄澄如. 实用小儿泌尿外科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- D'Angelo MF, Kausik SJ, Sebo TJ, et al. p53 immunopositivity in histologically favorable Wilms tumor is not related to stage at presentation or to biological aggression [J]. *J. Urol*, 2003, 169: 1815-1817.
- Djuricic S, Djokic D, Vujić D, et al. Immunohistochemical expression of p53 oncoprotein in Wilms tumour in relation to histological components, histological types and preoperative chemotherapy [J]. *Srp Arh Celok Lek*, 2008, 136 (4): 298-306.
- 石磊, 裴素丽, 杨险峰, 等. 肾母细胞瘤中 p53、Bcl-2 基因调控和细胞凋亡研究 [J]. *河南肿瘤学杂志*, 2002, 15 (1): 4-6.
- (收稿日期: 2016-01-12)
- (上接第 149 页)
- syndrome [J]. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008, 46 (2): 178-183.
- Chongsrisawat V, Vejapipat P, Siripon N, et al. Transient elastography for predicting esophageal/gastric varices in children with biliary atresia [J]. *BMCGastroenterol*, 2011, 11 (15): 2061-2062.
- Mark Davenport. Biliary atresia: clinical aspects. *Seminars in Pediatric Surgery* [J]. 2012, 21 (3): 175-184.
- (收稿日期: 2016-02-21)