

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 06. 014

HK-Ⅱ、TS 和 Ki-67 在青年人结肠癌组织中的表达及其意义

冯青青¹,刘红梅²,彭秋平²,柯传庆²

Expressions of HK-Ⅱ, TS and Ki-67 and Their Significance in Young Colon Cancer Patients

FENG Qing-qing¹, LIU Hong-mei², PENG Qiu-ping², KE Chuan-qing²

1. Department of Gastroenterology, 94th Hospital of PLA, Nanchang 330002, China, 2. Department of Oncology

Abstract: Objective To investigate the expressions of hexokinase type Ⅱ (HK-Ⅱ), thymidylate synthase (TS) protein and Ki-67 nuclear antigen (Ki-67), and to reveal their clinical significance in young patients with colon cancer. **Methods** The protein expressions of HK-Ⅱ, TS and Ki-67 in 78 patients (≤ 40 years) with colon cancer and 75 patients (> 40 years), were detected by immunohistochemical technique with retrospective comparison. **Results** The positive expression rates of HK-Ⅱ and TS were 82.1% (64/78) and 65.3% (49/75), 69.2% (54/78) and 52.0% (39/75), respectively, in young group and older group. Moreover, the Ki-67 proliferation indexes of both groups were (59.1 ± 3.0)% and (48.5 ± 3.2)%, respectively. Compared the young group with the older group, there were significant differences in the three positive expressions (both, $P < 0.01$). Moreover, compared these positive expressions of HK-Ⅱ, TS and Ki-67 with those negative expressions in the young colon cancer patients, there were significant differences in cancer's differentiation and stage (both, $P < 0.01$). The positive expression of HK-Ⅱ was consistent with the positive expressions of TS and Ki-67, respectively, in young patients with colon cancer. **Conclusion** The positive protein expressions of HK-Ⅱ, TS and Ki-67 may be malignant biomarkers.

Key words: Colon neoplasm; hexokinase-Ⅱ; Thymidylate synthase; Ki-67 nuclear antigen; Young patient

摘要:目的 检测己糖激酶-Ⅱ(HK-Ⅱ)、胸苷酸合成酶(TS)和 Ki-67 核抗原(Ki-67)在青年人结肠癌组织中的表达,并探讨其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测 78 例青年人(≤40 岁)结肠癌和 75 例随机抽取的同期收治的中老年人(>40 岁)结肠癌组织中 HK-Ⅱ、TS 及 Ki-67 蛋白的表达。**结果** HK-Ⅱ和 TS 在青年人组和中老年人组结肠癌组织中的阳性表达率分别为 82.1% (64/78)和 65.3% (49/75), 69.2% (54/78)和 52.0% (39/75),而 Ki-67 增殖指数分别为 (59.1 ± 3.0)% 和 (48.5 ± 3.2)%。两组比较,以上三种蛋白的表达水平差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。HK-Ⅱ、TS 及 Ki-67 表达在青年人结肠癌肿瘤分化程度、分期之间的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。青年人结肠癌 HK-Ⅱ表达与 TS、Ki-67 成正相关性。**结论** HK-Ⅱ、TS 和 Ki-67 阳性蛋白表达可作为青年人结肠癌的恶性指标。

关键词: 结肠肿瘤;己糖激酶-Ⅱ;胸苷酸合成酶;Ki-67 核抗原;青年患者

中图分类号:R735.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)06-0663-03

0 引言

结肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,虽为中老年人易患疾病,但青年(≤40 岁)患者呈逐渐增多的趋势,且青年人结肠癌恶性程度高、预后差^[1]。既往研究多针对青年人结肠癌的临床特点和病理类型等

方面进行分析^[1-3]。本文拟通过检测分析青年人结肠癌组织的一些生物学活性指标,如糖酵解关键限速酶(己糖激酶-Ⅱ, HK-Ⅱ)、化疗耐药相关蛋白(胸苷酸合成酶, TS) 以及细胞增殖指数(Ki-67 核抗原, Ki-67),并与同期中老年人结肠癌相比较,探讨青年人结肠癌的生物学特性,旨在为青年人结肠癌治疗决策和预后判断提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 资料

收稿日期:2010-05-19;修回日期:2010-09-06
作者单位:1. 330002 南昌,解放军第 94 医院消化科, 2. 肿瘤科
作者简介:冯青青(1960-),男,学士,主任医师,主要从事消化道肿瘤的临床研究

收集我院 1990 年 1 月—2008 年 12 月间经手术和病理确诊的 40 岁以下青年人结肠癌 78 例,平均年龄 32.6 岁,其中男 49 例,女 29 例;左半结肠癌 45 例,右半结肠癌 24 例,横结肠癌 9 例;Dukes 分期:Dukes C、D 期 58 例;黏液腺癌、黏液细胞癌等低分化癌共 55 例,高、中分化腺癌 23 例。随机抽取 75 例同期收治的中老年人结肠癌,平均年龄 65.3 岁,其中男 42 例,女 33 例;Dukes 分期:C、D 期 31 例;低分化癌 37 例,高、中分化腺癌 38 例。羊抗人 HK-II 多克隆抗体为美国 Santa Cruze 公司产品,鼠抗人 TS 抗体为美国 Lab vision 公司产品,兔抗人 Ki-67 抗体单克隆抗体工作液购自福建迈新生物技术公司,SP9003 和 SP9000 免疫组织化学试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法 采用 SP 法^[4],具体步骤参照试剂盒说明进行。病理标本经 10%中性福尔马林液固定,石蜡包埋,3~5 μm 厚度连续切片。切片常规脱蜡至水,0.3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶,微波热修复抗原,一抗按说明书稀释后滴加,4℃培养过夜,生物素标记的二抗室温 20 min,PBS 冲洗,链霉素亲和素过氧化物酶溶液室温 20 min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木精复染、脱水、透明、封固。用已知阳性的结肠癌切片作阳性对照,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果判定 每张切片随机选择 10 个高倍视野(×400),每个视野连续计数 100 个细胞。

阳性标准参考文献^[5-7]:HK-II 和 TS 为细胞质呈棕色反应,Ki-67 为细胞核呈棕色反应。HK-II 和 TS 阳性表达根据切片中阳性细胞的百分率判断为阴性(阳性细胞率<10%)和阳性(阳性细胞率≥10%)。Ki-67 增殖指数按平均每 100 个细胞中的 Ki-67 阳性细胞数计算。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,青年人组与中老年人组 HK-II 和 TS 阳性表达率比较采用

χ² 检验,Ki-67 增殖指数比较采用 *t* 检验,而 HK-II 与 TS 相关性检验采用 Spearman 相关分析,HK-II、TS 表达与 Ki-67 增殖指数的相关性分析采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HK-II、TS 和 Ki-67 在青年人和中老年人结肠癌组织中表达的情况

HK-II 和 TS 免疫组织化学阳性产物呈棕色细颗粒状,分布于结肠癌细胞质内。青年人组和中老年人组结肠癌组织 HK-II 阳性表达率分别为 82.1% (64/78)和 65.3% (49/75),而青年人组和中老年人组结肠癌组织 TS 阳性表达率分别为 69.2% (54/78)和 52.0% (39/75)。Ki-67 阳性着色于细胞核,青年人组和中老年人组结肠癌 Ki-67 增殖指数分别为(59.1±3.0)%和(48.5±3.2)%。统计学分析显示,两组 HK-II、TS 阳性表达率和 Ki-67 增殖指数差异均有统计学意义(均 *P*<0.05)。

2.2 青年人结肠癌组织 HK-II、TS 和 Ki-67 与临床病理参数的关系

HK-II、TS 及 Ki-67 表达在青年人结肠癌肿瘤分化程度、分期之间的差异均有统计学意义(均 *P*<0.05),见表 1。青年人结肠癌组织 HK-II、TS 和 Ki-67 表达在患者性别和肿瘤发生部位之间的差异无统计学意义(均 *P*>0.05)。

2.3 青年人结肠癌组织 HK-II、TS 和 Ki-67 的相关性分析

49 例青年人结肠癌 HK-II 和 TS 表达均阳性,14 例 HK-II 表达阳性而 TS 阴性表达,5 例 HK-II 表达阴性 TS 阳性表达,10 例 HK-II 和 TS 表达均阴性,HK-II 和 TS 表达一致的符合率为 88.5%。Spearman 相关分析显示,青年人结肠癌 HK-II 表达和 TS 表达显著相关(*r*=0.380,*P*<0.01)。HK-II 阳性表达的青年人结肠癌 Ki-67 增殖指数为(54.3±6.3)%,而 HK-II 阴性表达者的 Ki-67 增殖指数为(39.1±5.2)%,统计分析显示,两组差异有

表 1 HK-II、TS 和 Ki-67 表达与青年人结肠癌临床病理关系

Table 1 Correlations between expressions of HK-II, TS and Ki-67 and their clinical pathologic factors in young patients with colon cancer

Items	Cases	HK-II + (%)	<i>P</i>	TS + (%)	<i>P</i>	Ki-67 proliferation indexes(%)	<i>P</i>
Differentiation degree							
Poor	55	49 (89.1)		42 (76.4)		58.5±6.2	
Well or moderate	23	15 (65.2)	0.012	12 (52.2)	0.035	41.0±4.3	0.000
Staging							
A,B	20	12 (60.0)		10 (50.0)		43.2±4.5	
C,D	58	52 (89.7)	0.003	44 (75.9)	0.031	53.6±5.1	0.000

统计学意义($P<0.01$),提示 HK-II 表达与 Ki-67 表达(增殖指数)呈正相关。TS 阳性表达的青年人结肠癌 Ki-67 增殖指数为 $(47.2\pm4.8)\%$,TS 阴性表达者的 Ki-67 增殖指数为 $(45.7\pm5.1)\%$,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示 TS 表达与 Ki-67 表达(增殖指数)不相关。

3 讨论

结肠癌是临床常见的恶性肿瘤,在西方发达国家属第二位高发恶性肿瘤,多见于 40 岁以上成年人。随着我国生活水平提高,进食脂肪成分增加,纤维素减少,结肠癌发病率逐渐增多,且发病年龄有下降趋势^[1]。

青年人结肠癌年龄上限至今国内外尚无统一标准。有采用 25、30、35 和 40 岁等不同标准^[2]。本研究采用≤40 岁的青年人结肠癌为观察对象。与中老年患者相比,青年人结肠癌具有易误诊(从症状出现到确诊常常超过 3 月)、确诊时进展期病例(Dukes C、D 期)比例较高、分化程度差(低分化腺癌、黏液细胞癌和未分化癌)、治疗效果不理想(手术根治机会小、化疗敏感度差)、生存率低等临床特点^[1-3]。进一步了解青年人结肠癌生物学特性有利于为青年人结肠癌治疗决策和预后判断提供参考依据。

糖酵解增强是恶性肿瘤细胞区别于正常组织细胞的显著生化特性,恶性肿瘤细胞在很大程度上依赖糖酵解提供能量和维持其恶性表型^[8-9]。糖酵解酶表达或活性的增强是恶性肿瘤细胞生化代谢异常的基础。HK 是细胞糖酵解第一个限速酶。HK-II 亚型与恶性肿瘤相关性最密切,在生长迅速、分化程度差的恶性肿瘤细胞中明显高表达^[10]。本研究观察到,青年人结肠癌 HK-II 阳性表达率明显高于中老年人结肠癌。HK-II 高表达可促进青年人结肠癌细胞葡萄糖分解,有利于肿瘤细胞在其特殊条件,仍能保证足够的能量 ATP 供给,有助于青年人结肠癌细胞恶性增殖。靶向糖酵解途径特异性抑制恶性肿瘤是当前肿瘤治疗研究的一个热点^[8-10]。青年人结肠癌 HK-II 的高表达提示抑制糖酵解的策略可成为青年人结肠癌治疗方法。

化疗是结肠癌的重要治疗手段。5-Fu 是最常用的化疗药物。TS 是 5-Fu 作用的主要细胞内靶酶,5-Fu 在体内被活化成氟尿嘧啶脱氧核苷酸,使 TS 失活,影响 DNA 生物合成,从而发挥抗肿瘤效应。TS 表达水平与 5-Fu 的疗效及临床预后关系

密切,TS 蛋白水平升高可导致 5-Fu 化疗耐药^[6, 11]。本研究显示,青年人结肠癌 TS 表达明显高,这可能与青年人结肠癌临床化疗效果差有关。

增殖细胞核因子 Ki-67 是除 G₀ 期外在细胞周期中所有时相均表达的细胞核抗原,是细胞跨越细胞周期进行分裂所必需的,优越于 3H 胸苷、5-溴脱氧尿苷(5-BrU)和增殖细胞核抗原(PCNA),Ki-67 高表达是细胞增殖活跃的重要标志,Ki-67 在肿瘤细胞中高表达常提示预后较差^[7]。本研究显示,青年人结肠癌 Ki-67 增殖指数明显高,Ki-67 与 HK-II 之间存在显著相关。这提示衡量肿瘤增殖活性的 Ki-67 可作为判断青年人结肠癌患者预后的指标。

研究还显示,青年人结肠癌组织 HK-II、TS 及 Ki-67 表达在肿瘤分化程度、分期之间有显著性差异,提示 HK-II、TS 及 Ki-67 可能是青年人结肠癌恶性程度高的基础。

参考文献:

[1] 梁寒,郝希山,王晓娜,等. 40 岁以下青年人结肠癌的预后因素分析[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(15):853-857.

[2] Lin JT, Wang WS, Yen CC, et al. Outcome of colorectal carcinoma in patients under 40 years of age[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20(6): 900-905.

[3] 殷艳天, 于皆平. 青年人结肠癌的临床特点及误诊原因分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(2):181-182.

[4] 李林海,高青,王永占,等. 结肠癌组织 HIF-1 α 和 VEGF-C 的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36 (8):677-678.

[5] Yasuda S, Arii S, Mori A, et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance[J]. J Hepatol, 2004, 40 (1): 117-123.

[6] 董秋美,何友兼,郑伟华,等. 结直肠癌组织胸苷酸酶的表达及临床意义[J]. 肿瘤, 2007, 27 (11): 907-909.

[7] Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, et al. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2):174-183.

[8] Garber K. Energy deregulation: licensing tumors to grow [J]. Science, 2006, 312(5777): 1158-1159.

[9] Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond [J]. Cell, 2008, 134(6): 703-707.

[10] Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy[J]. Semin Cancer Biol, 2009,19(1):17-24.

[11] Kim SH, Kwon HC, Oh SY, et al. Prognostic value of ER-CC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase pi for 5-FU/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer[J]. Am J Clin Oncol, 2009, 32(1):38-43.

[编辑:安 凤;校对:刘红武]