

Smac 和 Ki67 在甲状腺癌中的表达和意义

邓万凯,陈 健,郑红梅

Expression of Smac and Ki67 in Thyroid Carcinoma and Its Clinical Significance

DENG Wan-kai, CHEN Jian, ZHEN G Hong-mei

Department of Head and Neck Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China

Corresponding Author: CHEN Jian, E-mail: chenjian2003@yahoo.com.cn

Abstract :Objective To investigate the expression of Smac and Ki67 in thyroid carcinoma and the correlation of Smac and Ki67, the clinical significance as well. **Methods** Immunohistochemical staining of Smac and Ki67 expression was performed by the standard streptavidin-peroxidase(SP) technique for the paraffin sections of 87 thyroid carcinoma. The relationship between the Smac expression and the clinicopathological parameters or Ki67 proliferation index was analyzed. **Results** The positive rate of Smac in thyroid carcinoma was 71.3% (62/87), all of the normal thyroid tissues expressed Smac (20/20). Ki67 proliferation index in thyroid carcinoma was 42.74 ± 14.52 . Smac expression was significantly lower in patients of male, over 45 years old, medullary and anaplastic thyroid carcinoma, stage I, II, III, and in those with invasions over capsular ($P < 0.05$). The Ki67 proliferation index in negative expression of Smac was significantly higher than that in positive expression of Smac [(40.70 ± 14.68) vs (47.78 ± 13.06), $P < 0.05$]. **Conclusion** Smac and Ki67 expression in thyroid carcinoma were significantly different from those in normal tissues, and they had significant correlation, which suggest that they may play an important role or even have synergic action in carcinogenesis and development of thyroid carcinoma.

Key words: Thyroid carcinoma; Smac; Ki67 proliferation index; Apoptosis; Cell proliferation

摘要: 目的 观察 Smac 和 Ki67 在甲状腺癌中的表达,并探讨 Smac 表达与 Ki67 的关系及其临床意义。**方法** 应用免疫组织化学法检测 87 例甲状腺癌组织中 Smac 和 Ki67 的表达,分析 Smac 表达与临床病理因素和 Ki67 的关系。**结果** Smac 在甲状腺癌组织中的阳性表达率为 71.3% (62/87),在所有的腺瘤旁组织中均见表达(20/20);Ki67 增殖指数为 42.74 ± 14.52 。Smac 在男性、年龄 45 岁、髓样癌和未分化癌、原发病灶超出包膜、以及 I、II、III 期甲状腺癌患者中的表达明显降低($P < 0.05$)。Smac 阳性表达患者的 Ki67 增殖指数较 Smac 阴性表达者低[(40.70 ± 14.68) vs (47.78 ± 13.06), $P < 0.05$]。**结论** Smac 和 Ki67 在甲状腺癌中的表达发生改变具有相关性,提示其可能在甲状腺癌的发生发展中发挥重要作用且两者可能具协同作用。

关键词: 甲状腺癌; Smac; Ki67 增殖指数; 凋亡; 增殖

中图分类号:R736.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)11-0800-03

0 引言

甲状腺癌是头颈部常见的恶性肿瘤,但在全身恶性肿瘤中的比例不到 1%,好发于女性和青少年患者,有统计显示其在美国的发病率呈上升趋势^[1]。Smac 是王晓东等 2000 年在线粒体中发现的一种蛋白,可释放到胞浆中促进凋亡的发生^[2]。Ki67 是一种与增殖细胞相关的核抗原,与肿瘤的增殖、浸润、转移潜能和预后密切相关^[3]。本文应用免疫组化 SP 法检测 Smac 和 Ki67 在甲状腺癌和腺瘤旁正常组织中的表达,探讨其在甲状腺癌发生发展中的作

用及两者的相关性。

1 资料和方法

1.1 资料

随机收集我院 2004 ~ 2006 年病理科存档的甲状腺癌标本 87 例,每例均有详细的临床病理资料,所有病例术前未进行放疗、化疗和免疫治疗。其中男 23 例,女 64 例,年龄 11 ~ 73 岁,平均年龄 49.4 岁。按病理类型分为:甲状腺乳头状癌 71 例,滤泡癌 3 例,髓样癌 7 例,未分化癌 6 例;根据淋巴结情况分为:有淋巴结转移者 48 例,无淋巴结转移者 39 例;按 2002 年 UICC 第六版的 TNM 分期标准分为:Ⅰ期 51 例,Ⅱ期 12 例,Ⅲ期 13 例,Ⅳ期 11 例。另随机选取同期甲状腺腺瘤腺叶切除术后瘤旁至少 0.5cm 甲状腺组织标本 20 例作为对照。

收稿日期:2008-04-07;修回日期:2008-07-11

作者单位:430079 武汉,湖北省肿瘤医院头颈外科

通信作者:陈健,E-mail:chenjian2003@yahoo.com.cn

作者简介:邓万凯(1967-),男,博士在读,副主任医师,主要从事头颈肿瘤的基础和临床研究

1.2 试剂

鼠抗人 Smac/Diablo 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology, 美国), 兔抗人 Ki67 单克隆抗体 (Lab Vision 公司, 美国), 即用型 SP 试剂盒 (北京中杉生物公司), DAB 染色试剂盒 (北京博奥森生物公司) 等。

1.3 方法

87 例患者手术切除标本存档的石蜡组织块, 4 μm 连续切片, 苏木精-伊红染色。SP 法检测甲状腺癌组织和瘤旁甲状腺组织 Smac、Ki67 的表达。方法简述如下: 石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化; 柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 95 °C 修复 10 min; 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗后滴加非免疫性动物血清室温孵育 15 min, 加一抗 (抗 Smac 抗体 1:200, 抗 Ki67 抗体 1:100), 4 °C 孵育过夜; PBS 冲洗后滴加生物素标记二抗 37 °C 孵育 10 min, 辣根过氧化物酶标记抗生物素三抗 37 °C 孵育 15 min, PBS 冲洗后 DAB 显色, 冲洗, 苏木精复染, 封片, 显微镜观察并拍照。已知阳性切片作阳性对照, PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定

(1) Smac 染色的判断标准^[4]: 以胞浆染为淡黄至棕黄色定义为阳性细胞, 随机选择 5~10 个高倍镜视野 (×400), 每个视野计数 500 个细胞, 阳性细胞数超过 30% 的组织切片视为阳性标本。(2) Ki67 增殖指数^[3]: 以胞核染为淡黄至棕黄色定义为阳性细胞, 随机选择 5~10 个高倍镜 (×400) 视野进行计数, 每个视野计数 500 个细胞, 计算 Ki67 阳性细胞数占总细胞数的百分数, 即为 Ki67 增殖指数。

1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料行 t 检验, 计数资料行 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Smac 和 Ki67 在甲状腺癌组织中的表达

Smac 表达于细胞浆内, 呈淡黄色至棕黄色分布, 见图 1a。87 例甲状腺癌组织中阳性表达者 62 例, 阳性率为 71.3%, 20 例瘤旁正常组织均为阳性表达。两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 即 Smac 在甲状腺癌中的表达较正常组织低。

Ki67 表达于细胞核, 呈淡黄色至棕黄色分布, 见图 1b。87 例甲状腺癌组织中 Ki67 增殖指数为 (42.74 ± 14.52), 20 例瘤旁正常组织少见 Ki67 表达。

2.2 Smac 表达与临床病理指标的关系

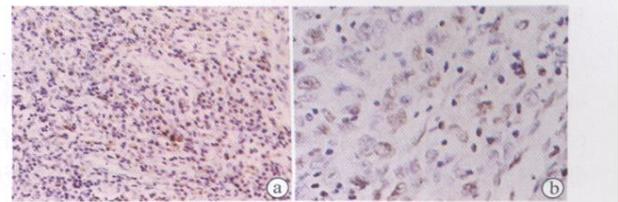


图 1 甲状腺癌组织中 Smac(a, ×200) 和 Ki67(b, ×400) 表达

Fig 1 The expression of Smac(a, ×200) and Ki67 (b, ×400) in thyroid carcinoma

从表 1 可以看出, Smc 表达与性别、年龄、病理类型、原发病灶和临床分期明显相关 ($P < 0.05$), 即 Smac 在男性、45 岁、乳头状癌和滤泡癌、原发病灶超出包膜以及 I、II 期甲状腺癌患者中的表达明显降低。

表 1 Smac 表达与临床病理指标的关系

Tab 1 The relationship between Smac expression and clinicopathological factor in thyroid carcinoma

Clinical	n (all)	n (positive)	χ^2	P
Gender				
male	23	12		
female	64	50	5.56	< 0.05
Age (years old)				
< 45	52	42		
45	35	20	5.70	< 0.05
Pathological type				
papillary + follicular	74	57		
medullary + anaplastic	13	5	6.26	< 0.05
Invasive degree				
in capsular	46	37		
over capsular	41	25	4.01	< 0.05
Lymphnode metastasis				
negative	39	31		
positive	48	31	2.33	> 0.05
TNM stage				
	51	43		
+	+	36	19	10.25 < 0.01

2.3 Smac 和 Ki67 表达的关系

Smac 阳性表达组 Ki67 增殖指数为 (40.70 ± 14.68), Smac 阴性表达组为 (47.78 ± 13.06), 两组经 t 检验差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 即 Ki67 表达在 Smac 阳性表达组低。

3 讨论

细胞凋亡和增殖的平衡是生物个体正常生长发育的基础, 细胞增殖过度和(或)细胞凋亡受阻是肿瘤形成过程中的重要机制。Smac 是近期发现的一

种促凋亡蛋白,在凋亡信号刺激下与细胞色素 C (cyt c)一同从线粒体中释放,可通过结合并活化 apaf-1 以及结合并解除凋亡抑制蛋白 (IAPs) 对 caspase-3、7、9 的抑制作用而发挥作用^[2,4]。当前有研究利用 Smac 的促凋亡活性,构建载体过表达 Smac 增敏免疫制剂或化疗药物诱导的多种癌细胞的凋亡^[4-5]。

Smac 在癌组织中表达相关的文献已有报道,但鲜见其在甲状腺癌组织中的表达及其表达与各种临床病理特征的关系方面的文章。Yoo 等^[6]研究发现 Smac 在不同的癌或肉瘤组织中的表达各异,在多种癌和肉瘤组织中的表达下降甚至不表达。Bao 等^[7]采用 RT-PCR 和 SP 法检测发现肝癌中 Smac mRNA 和 Smac 蛋白表达明显降低(约 40%)。Mizutani 等^[5]证实 Smac 在肾细胞癌中的表达下降,且与分期相关,无 Smac 表达的患者预后更差;通过转染 Smac cDNA 至肾细胞癌细胞增强了 TRAIL 和顺铂介导的细胞毒作用。Arellano-Llamas 等^[8]研究发现 Smac 在宫颈腺癌的表达较宫颈鳞癌多,进一步分析发现 Smac 在局部复发的宫颈鳞癌患者中的表达较高,可作为预后指标。本研究证实 71.3% (62/87) 的甲状腺癌组织中 Smac 阳性表达,进一步分析表明 Smac 表达与性别、年龄、病理类型、原发病灶和临床分期明显相关,提示 Smac 表达可能在甲状腺癌的发生发展中发挥重要作用。Tirrò 等^[9]在进行甲状腺癌细胞对化疗药耐药机制的研究中发现,泰素作用 48 h 后仍存活的甲状腺癌细胞中 Smac 表达下降,且仅有极少量的 Smac 从线粒体中释放出来,而过表达 Smac 可促进泰素的细胞毒作用,该项研究既证实了 Smac 的促凋亡作用,也对某些甲状腺癌患者的治疗提供了新的思路。

Ki67 是当前研究较广泛的细胞增殖指标之一,参与肿瘤的发生发展,可表达于除 G₀ 期外的所有细胞周期时相中。Ki67 表达与甲状腺癌组织关系的研究已有报道,但其意义尚未肯定。成继民等^[10]研究发现 Ki67 在甲状腺癌组织中表达升高,与病理类型相关。Tisell 等^[3]研究发现 Ki67 在甲状腺髓样癌中表达升高,与患者有无转移、复发、年龄和预后密切相关。Mar 等^[11]认为 Ki67 在甲状腺滤泡状腺癌和滤泡状腺癌表达并无差异,不足以帮助区分出有轻度包膜或血管侵犯的滤泡状腺癌。本研究发现

Ki67 在甲状腺癌组织中的增殖指数增高,且与 Smac 表达呈负相关,提示两者可能在甲状腺癌发生发展中可能具有协同作用。

综上所述,Smac 在甲状腺癌组织中的表达下降,可能通过抑制 IAPs 的活性降低甲状腺癌细胞的凋亡,其与 Ki67 增殖指数增高可能具有协同作用,促进肿瘤的发生发展;且 Smac 表达下降与性别、年龄、病理类型、原发病灶和临床分期明显相关,检测其表达有助于判断其临床病理特征。

参考文献:

- [1] Mitchell I, Livingston EH, Chang A Y, et al. Trends in thyroid cancer demographics and surgical therapy in the United States [J]. Surgery, 2007, 142(6): 823-828.
- [2] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition [J]. Cell, 2000, 102(1): 33-42.
- [3] Tisell L E, Oden A, Muth A, et al. The Ki67 index a prognostic marker in medullary thyroid carcinoma [J]. Br J Cancer, 2003, 89(11): 2093-2097.
- [4] Hasenjager A, Gillissen B, Muller A, et al. Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-xL in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells [J]. Oncogene, 2004, 23(26): 4523-4535.
- [5] Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K, et al. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(3): 448-454.
- [6] Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, et al. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas [J]. APMIS, 2003, 111(3): 382-388.
- [7] Bao ST, Gui SQ, Lin MS. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006, 5(4): 580-583.
- [8] Arellano-Llamas A, Garcia F J, Perez D, et al. High Smac/DIABLO expression is associated with early local recurrence of cervical cancer [J]. BMC Cancer, 2006, 6: 256.
- [9] Tirrò E, Consoli ML, Massimino M, et al. Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells [J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 4263-4272.
- [10] 成继民,贺占国,刘艳丽. C-erbB-2 和 Ki-67 在甲状腺肿瘤中的表达及临床意义 [J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(2): 142-143.
- [11] Mar CK, Eimoto T, Nagaya S, et al. Cell proliferation marker MCM2, but not Ki67, is helpful for distinguishing between minimally invasive follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid [J]. Histopathology, 2006, 48(7): 801-807.

[编辑:贺文;校对:周永红]