

Ki-67 与 COX-2 在结直肠癌中的表达及其在浸润转移中的意义

周伶俐 叶乐驰 郑晨果 金莹 徐永强 陈荣

摘要 目的 探讨 Ki-67 与环氧合酶-2(COX-2)在结直肠癌中的表达特点及在浸润转移中的意义。**方法** 应用免疫组化技术检测 ki-67 与 COX-2 在 104 例结直肠癌组织中的表达率,并分析与患者性别、年龄及肿瘤大小、分化程度、侵犯深度、淋巴结转移之间的关系。**结果** Ki-67 与 COX-2 两者的表达率在结直肠癌有淋巴结转移组或有远处转移组的表达率均分别高于无淋巴结转移组或无远处转移组,在结直肠癌浸润黏膜层及肌层组的表达率也高于浸润至全层及浆膜外组,其中 COX-2 蛋白表达率与肿瘤大小相关。随着癌组织分化程度的增高,ki-67 表达率依次降低,但无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** Ki-67 与 COX-2 在结直肠癌组织中的高表达可能在结直肠癌的浸润转移过程中扮演重要角色。

关键词 结直肠癌 Ki-67 COX-2 浸润转移

Expression of Ki-67 and COX-2 in Colorectal Cancer and Its Correlation with Tumor Invasion and Metastasis. Zhou Lingli, Ye Lechi, Zheng Chenguo, Jin Ying, Xu Yongqiang, Chen Rong. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To explore the expressions of Ki-67 and cyclooxygenase-2 (COX-2) in colorectal cancer and to reveal their correlation with the tumor invasion and metastasis. **Methods** The expression of Ki-67 and COX-2 was detected by immunohistochemistry in 104 specimens of colorectal cancer. The relationship between the level of Ki-67 and COX-2 and the sex or age of patients, tumor size, the degree of cell differentiation, the depth of infiltration, the metastasis of lymph nodes was analyzed. **Results** The expressions of Ki-67 and COX-2 was significantly higher in the cases with lymph node metastasis or distant metastasis than those without metastasis, and also higher in poorly differentiated tumor than in well-differentiated tumor. **Conclusion** The overexpression of Ki-67 and COX-2 in colorectal cancer may play an important part in the progression and metasis of colorectal cancer.

Key words Colorectal cancer; Ki-67; COX-2; Metastasis

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,其浸润转移是患者死亡的主要原因,目前从分子水平研究结直肠癌是近年来的热点。笔者采用免疫组化方法,检测结直肠癌组织中 COX-2 和 Ki-67 蛋白表达水平,并结合临床资料分析其与结直肠癌浸润转移的关系及两者蛋白表达的相关性,为判断结直肠癌的生物学行为和患者预后提供一定参考指标。

资料与方法

1. 一般资料:取笔者医院 2008 年 3 月~2010 年 3 月期间资料完整的根治性结直肠腺癌手术切除标本 104 例为对象(表 1),进行免疫组化染色,其中包括结肠癌 36 例和直肠癌 48 例,患者男性 64 例,女性 40 例,平均年龄 58 岁(40~76 岁)。所有病例术前均未接受化疗及放疗。

表 1 临床病理参数与 Ki-67、COX-2 蛋白表达关系

项目	n	Ki-67 阳性 [n(%)]	COX-2 阳性 [n(%)]
性别			
男性	64	49(76.6)	55(85.9)
女性	40	30(75.0)	33(82.5)
年龄(岁)			
≥60	51	41(80.4)	46(90.2)
<60	53	38(71.7)	42(79.2)
肿瘤大小(cm)			
≥5	37	29(78.4)	35(94.6)*
<5	67	50(74.6)	53(79.1)
分化程度			
高分化	27	19(70.4)	23(85.2)
中分化	42	32(76.2)	34(81.0)
低分化	35	28(80.0)	31(88.6)
浸润深度			
黏膜下及肌层	31	12(38.7)*	18(58.1)*
全层及浆膜外	73	67(91.8)	70(95.9)
淋巴结转移			
有	66	59(89.4)*	64(97.0)*
无	38	20(52.6)	24(63.2)
远处转移			
有	21	18(85.7)*	20(95.2)*
无	83	61(73.5)	68(81.9)

* $P < 0.05$

2. 主要试剂及仪器:医用石蜡块、切片机、烘片机、光学显微镜等由本院病理科提供。免疫组化染色(Elivision 法)所用即用型兔抗人 COX-2、Ki-67 单克隆抗体及 Elivision 试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

3. 免疫组化染色方法:所有组织标本均经 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,PBS 冲洗,对组织 COX-2 和 Ki-67 抗原分别用柠檬酸缓冲液高温高压修复和 EDTA 水浴热修复;0.3% 过氧化氢溶液去除内源性过氧化物酶,PBS 冲洗;加一抗,室温下孵育 60min,PBS 冲洗;加聚合物增强剂(试剂 A),室温下孵育 20min,PBS 冲洗;加酶标抗鼠/兔聚合物(试剂 B),室温下孵育 30min,PBS 冲洗;DAB 染色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,0.1% 盐酸分化,脱水、透明、封片,镜检。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以福州迈新生物技术开发有限公司提供的已知阳性结果的切片作为阳性对照。

4. 阳性染色判定标准:免疫组化结果判定以出现棕黄色颗粒为阳性。COX-2 抗原阳性产物定位于肿瘤细胞的细胞质或细胞膜。每张切片选择 5 个以上高倍视野,计数不少于 500 个细胞进行阳性计数及评分。根据染色程度及染色细胞百分率进行评分:基本不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,着色适中者为 2 分,着色深者为 3 分;着色细胞占计数细胞的百分率 <5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分,25% ~ 50% 为 2 分,>50% 为 3 分。将每张切片的染色程度与染色细胞百分率得分相乘,其乘积为最后得分:<3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。Ki-67 抗原阳性产物定位于肿瘤细胞的细胞核内,细胞质一般不着色,部分细胞核分裂时显示出整个细胞的阳性反应。Ki-67 计数其阳性指数,取 50 个高倍视野肿瘤细胞阳性率的平均数, $\geq 5\%$ 即为阳性。

5. 统计学方法:统计学处理应用 SPSS 17.0 软件完成,计数资料用例数进行描述,比较方法采用 χ^2 检验或 Fisher's Exact Test,相关分析方法采用 Spear 秩相关。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. Ki-67 和 COX-2 蛋白表达(表 1): 104 例结直肠癌组织中 Ki-67 和 COX-2 阳性表达率分别为 76.0% (79/104) 和 84.6% (88/104)。Ki-67 和 COX-2 蛋白表达率与结直肠癌患者性别、年龄无关 ($P > 0.05$)。Ki-67 或 COX-2 蛋白在结直肠癌有淋巴结转移组或有远处转移组的表达率均分别高于无淋巴结转移组或无远处转移组 ($P < 0.05$),并且在结直肠癌浸润黏膜层及肌层组的表达率也高于浸润至全层及浆膜外组 ($P < 0.05$)。COX-2 蛋白表达率在肿瘤最大径 ≥ 5 cm 组较肿瘤最大径 < 5 cm 组偏高 ($P < 0.05$),而 Ki-67 蛋白在肿瘤最大径 ≥ 5 cm 组的表达率与肿瘤最大径 < 5 cm 组的表达率相比较,无统计学差别。随着癌组织分化程度的增高,Ki-67 表达

率依次降低,但无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2. 结直肠癌组织中 Ki-67 和 COX-2 蛋白表达的相互关系:在 Ki-67 阳性表达的 79 例肠癌组织中,COX-2 阳性表达者 69 例;在 Ki-67 阴性表达的 25 例肠癌中,COX-2 阴性表达者 6 例。结直肠癌 Ki-67 表达与 COX-2 表达之间未存在明显相关性(表 2)。

表 2 Ki-67 表达与 COX-2 表达之间的关系

Ki-67	COX-2		合计
	+	-	
+	69	10	79
-	19	6	25
合计	88	16	104

$$\chi^2 = 1.8765, P = 0.1707$$

讨 论

近年,结直肠癌发病率呈明显上升趋势。WHO 资料表明,结直肠癌已成为西方各种恶性肿瘤中发病率最高的,并居恶性肿瘤死亡原因的第 2 位,在我国发病率已占到常见肿瘤的第 4 位,其发生侵袭转移是患者死亡的主要原因^[1,2]。已知结直肠癌的浸润转移是多步骤、多因素参与的复杂过程,多种相关基因的激活是导致肿瘤细胞发生浸润转移的重要因素,因此了解结直肠癌侵袭转移机制将有助于提高我们对它的诊断和治疗水平。

Ki-67 即细胞增生相关核抗原,为 Gerdes 等^[3]首先发现,其表达范围覆盖除 G₀ 期以外的各增殖周期细胞,是调节细胞周期必不可少的组成部分,故可作为评价细胞生长分数的指标。Ki-67 在多种肿瘤及癌前病变中均有异常表达,通过对其抗原的检测,可以相对反映肿瘤细胞的增殖状态或增殖活性,因此,Ki-67 被广泛地用于做判断肿瘤细胞增殖活性的指标^[4,5]。目前有关肠癌细胞 Ki-67 表达程度与结直肠癌预后的关系等方面的研究甚多,但存在诸多争论,文献报道也存在诸多分歧,其原因可能与统计方法、试剂、病例数、实验方案、病例筛选条件、结果判断标准等存在差异有关。

Terzi 等^[6]发现 Ki-67 蛋白在结直肠癌患者的不同 Dukes 分期、血管浸润、分化程度等组表达差异有统计学意义。另外研究发现^[7],Ki-67 阳性表达与结直肠癌的生存率呈显著负相关,阳性表达程度高者,术后生存期短,预后差。本研究发现,低分化肠癌 Ki-67 阳性表达率较高分化者高,但无统计学意义

($P > 0.05$), 说明尚不能通过检测肠癌 Ki-67 表达程度来判断肿瘤的恶性程度。淋巴结是否有转移或远处脏器是否有转移是临床评估病人预后的重要指标, 本研究发现淋巴结有转移者较淋巴结无转移者以及有远处转移者较无远处转移者的 Ki-67 阳性表达率均存在统计学差异, 表明增殖活性高的肠癌更易向周围淋巴结及远处脏器转移。

COX-2 是催化花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶, 至少有 COX-1、COX-2 两个亚型, 其中 COX-2 是一种诱导酶, 静息时不表达, 由细胞因子、有丝分裂原和癌基因等刺激产生。COX-2 在正常组织中一般无表达, 但在某些消化道肿瘤中表达增加, 如食管癌、胃癌。大量实验表明 COX-2 可能在结直肠癌发生、发展过程中起到一定作用, 但与结直肠癌肿瘤生物学行为间相关性的研究尚未达成一致观点^[8]。Bouzourene 等^[9]报道结直肠癌 COX-2 表达水平与肿瘤大小密切相关, 其中肿瘤直径 $> 3\text{cm}$ 者 COX-2 表达水平显著高于直径 $< 3\text{cm}$ 的病变, 且认为 COX-2 阳性表达程度与结直肠癌的局部复发存在一定关联, 但与患者生存率未存在显著相关性。

我们的研究结果显示, COX-2 在大多数结直肠癌中表达, 提示 COX-2 不同程度地参与大部分肠癌的发生发展。本研究表明较大癌灶 ($> 5\text{cm}$) 结直肠癌组织内 COX-2 表达水平显著高于较小肿瘤 ($< 5\text{cm}$) 的表 ($P < 0.05$), 这提示较大结直肠癌灶可产生较多量的 COX-2 维持结直肠癌的生长。另外发现伴有淋巴结转移结直肠癌 COX-2 表达率 (97.0%) 显著高于无淋巴结转移病例 (63.2%, $P < 0.05$), 浸润深度达肠壁全层或浆膜外的结直肠癌 COX-2 表达率 (95.9%) 亦高于浸润至肌层以内的病例 (58.1%, $P < 0.05$), 与文献报道相似。我们分析其原因, 认为 COX-2 一方面可能产生丙二醇而导致致癌基因的活化和 p53 等抑癌基因的失活, 另一方面 COX-2 可抑制凋亡发生, 促进细胞黏附以及在使肿瘤浸润转移能力增强的同时使机体免疫下降。可见 COX-2 过度表达对结直肠癌的发展、转移有促进作用, 抑制 COX-2 活性及表达对 COX-2 高表达结直肠癌的防治具有积极意义。

恶性肿瘤的浸润和转移的发生是一个多因素作用的结果。COX-2 与 Ki-67 在结直肠癌中表达的相关性研究至今未见正式报道。本研究发现, 他们在淋巴结转移、癌浸润深度及远处转移之间的差别显著, 但两者间表达未具有明显相关性 ($P > 0.05$), 一定程度上表明在肠癌临床进展、浸润转移的生物学过程中, COX-2 和 Ki-67 可能各自起着重要作用。

总之, 本实验结果表明 Ki-67、COX-2 与结直肠癌的发生、发展有关, 特别是与其浸润转移的关系更为密切, 提示检测此两者表达程度一定程度上可作为结直肠癌预后参考指标及指导制定临床治疗方案, 可为揭示结直肠癌的发生、发展和转移机制提供了新线索。

参考文献

- 1 孙燕, 沈琳, 叶颖江. 大肠癌靶向治疗进入个体化时代[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(6): 1-2
- 2 Walsh JM, Salazar R, Nguyen TT, et al. Healthy colon, healthy life: a novel colorectal cancer screening intervention[J]. Am J Prev Med, 2010, 39(1): 11-14
- 3 Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation[J]. Int J Cancer, 1983, 31(1): 13-20
- 4 Hardiman G. Development of a bioassay to monitor circulating plasma Ki-67[J]. Leuk Res, 2010, 34(7): 848-849
- 5 Radovanovic-Dinic B, Nagorni A, Katic V, et al. An immunohistochemical study of Ki-67 in colorectal adenoma[J]. Med Arh, 2009, 63(1): 16-18
- 6 Terzi C, Canda AE, Sagol O, et al. Survivin, p53, and Ki-67 as predictors of histopathologic response in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy[J]. Int J Colorectal Dis, 2008, 23(1): 37-45
- 7 Salminen E, Palmu S, Vahlberg T, et al. Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki-67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(21): 3245-3249
- 8 Wang D, Dubois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(6): 781-788
- 9 Bouzourene H, Yan P, Sandmeier D, et al. The role of COX-2 in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy[J]. Virchows Arch, 2008, 452(5): 499-505

(收稿: 2010-07-13)