

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.011

· 临床研究 ·

## 胃癌组织中烯醇化酶- $\alpha$ 和肿瘤型丙酮酸激酶蛋白的表达及其临床意义

倪田根<sup>1</sup>, 高晨<sup>2</sup>, 周欣<sup>1</sup>, 王娜<sup>1</sup>, 曾峰<sup>3</sup>, 关泉林<sup>1</sup>(1. 兰州大学第一医院 肿瘤外科, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省肿瘤医院, 甘肃 兰州 730050; 3. 兰州大学第一医院 病理科, 甘肃 兰州 730000)

**[摘要]** 目的: 探讨胃癌组织中烯醇化酶- $\alpha$ (enolase- $\alpha$ , ENO1)和肿瘤型丙酮酸激酶(tumor M2 pyruvate kinase, M2-PK)的表达、相互关系及其临床意义。方法: 取兰州大学第一医院2009年6月至2010年10月石蜡包埋胃组织标本78例, 其中胃癌55例, 胃溃疡组织23例。免疫组织化学法检测胃癌组织和胃溃疡组织中ENO1、M2-PK的表达, 分析两者的相互关系及临床意义。结果: 胃癌组织中ENO1阳性表达率为67.3%(37/55), 明显高于胃溃疡组的30.4%(7/23)( $P < 0.01$ ); ENO1表达与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期均相关(均 $P < 0.05$ ); M2-PK在胃癌组织中的阳性表达率为78.2%(43/55), 明显高于胃溃疡组织的39.1%(9/23)( $P < 0.01$ ), M2-PK表达与胃癌分化程度、浸润深度相关(均 $P < 0.05$ )。胃癌组织中ENO1与M2-PK的表达呈正相关( $r = 0.5729, P < 0.05$ )。结论: 胃癌组织ENO1和M2-PK的表达上调与胃癌的发生、发展可能有关, 联合检测该两种蛋白在胃癌组织中的表达对判断预后有一定意义。

**[关键词]** 胃癌; 烯醇化酶- $\alpha$ ; 肿瘤型丙酮酸激酶; 免疫组化

**[中图分类号]** R735.2; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2011)05-0524-04

## Expression of enolase- $\alpha$ and tumor M2 pyruvate kinase in gastric cancer and their clinical significances

NI Tian-gen<sup>1</sup>, GAO Chen<sup>2</sup>, ZHOU Xin<sup>1</sup>, WANG Na<sup>1</sup>, ZENG Feng<sup>3</sup>, GUAN quan-lin<sup>1</sup>(1. Department of Oncology Surgery, First Hospital of Lanzhou Universtiy, Lanzhou 730000, Gansu, China; 2. Department of Pathology, Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu, China; 3. Department of Pathology, First Hospital of Lanzhou Universtiy, Lanzhou 730000, Gansu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression, correlation and clinicopathological significance of enolase- $\alpha$  (ENO1) and tumor M2 pyruvate kinase (M2-PK) in gastric cancer. **Methods:** Seventy-eight paraffin-embedded specimens of gastric tissues (55 gastric cancer and 23 gastric ulcer tissues) from the First Hospital of Lanzhou Universtiy (Jun. 2009 to Oct. 2010) were included in the present study. Expression of ENO1 and M2-PK in gastric cancer and gastric ulcer tissues were detected by S-P immunohistochemistry. Correlation between ENO1 expression and M2-PK expression, and its implication in the clinicopathologic features of gastric cancer were analyzed. **Results:** The positive expression rate of ENO1 in gastric cancer tissues was significantly higher than in gastric ulcer tissues (67.3% vs 30.4%,  $P < 0.01$ ), and positively related to differentiation grade, depth of invasion, lymph node metastasis and TNM staging (all  $P < 0.05$ ). The positive expression rate of M2-PK in gastric cancer tissues was significantly higher than in gastric ulcer (78.2% vs 39.1%,  $P < 0.01$ ), and positively related to differentiation grade ( $P < 0.05$ ), depth of invasion (all  $P < 0.05$ ). Expression of ENO1 was positively correlated to that of M2-PK ( $r = 0.5729, P < 0.05$ ). **Conclusion:** The up-regulated expression of ENO1 and M2-PK may participate in the oncogenesis and progression of gastric cancer. Combined detection of ENO1 and M2-PK in gastric cancer tissues may be helpful in evaluating the prognosis of gastric cancer.

**[Key words]** gastric cancer; enolase- $\alpha$ ; tumor M2 pyruvate kinase; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 524-527]

**[基金项目]** 中央高校基本科研业务费专项基金资助(lzujbky-2010-143)。Project supported by the Basic Scientific Research Foundation of Central University of China (lzujbky-2010-143)

**[作者简介]** 倪田根(1983-),男,甘肃省兰州市人,硕士,主要从事消化道肿瘤方面的研究。E-mail: nitiangen2009@126.com

**[通信作者]** 关泉林(GUAN Quan-lin, corresponding author), E-mail: guanquanlin@126.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110929.1617.002.html>

近年来,“Warburg 效应”<sup>[1]</sup>逐渐受到人们的重新重视。所谓“Warburg 效应”是指恶性肿瘤细胞代谢的改变,即在氧充足的条件下,肿瘤细胞主要通过有氧糖酵解途径利用葡萄糖,同时降低线粒体内的有氧磷酸化,并认为这个不可逆的改变最终导致肿瘤的形成和发展。研究<sup>[2]</sup>证实,恶性肿瘤中糖酵解酶基因普遍存在着过表达,且这种情况似乎仅限于糖酵解,其他的生化途径(例如三羧酸循环)到目前为止未发现类似的情况,从而支持肿瘤中存在经典“Warburg 效应”。因此,肿瘤细胞中糖酵解酶表达的改变是“Warburg 效应”的一个关键因素。糖酵解途径中烯醇化酶- $\alpha$ (enolase- $\alpha$ , ENO1)、肿瘤型丙酮酸激酶(tumor M2 pyruvate kinase, M2-PK)都属于关键酶。尽管 ENO1 和 M2-PK 的表达改变在许多肿瘤细胞中被观察到,然而其表达与临床的关系还有待探索。本课题应用免疫组织化学方法检测 ENO1 和 M2-PK 在胃癌中表达的情况,探讨 ENO1 和 M2-PK 表达的临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

收集兰州大学第一医院 2009 年 6 月至 2010 年 10 月病理科存档石蜡包埋胃组织标本 78 例。其中胃癌 55 例,均为腺癌;男性 39 例、女性 16 例;年龄 27 ~ 79 岁,平均年龄(57.4 ± 14)岁;根据国际 TNM 分期法(2002 版)分期,Ⅰ期及Ⅱ期共 20 例,Ⅲ期及Ⅳ期共 35 例;高分化腺癌 19 例,低分化腺癌 36 例,其中发生淋巴结转移者 37 例;浸润深度 T1 和 T2 共 16 例,T3 和 T4 共 39 例。胃溃疡组织 23 例,男性 19 例,女性 14 例;年龄 22 ~ 68 岁,平均年龄(43 ± 11.5)岁。所有患者术前均未接受化、放疗。

兔抗人 ENO1 多克隆抗体为 Proteintech 公司产品,工作稀释度为 1:100。兔抗人 M2-PK 多克隆抗体为北京博奥森有限公司产品,工作稀释为 1:200。SP 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 免疫组化染色检测胃癌组织中 ENO1 和 M2-PK 的表达

每个病例的切片均分为 3 部分,分别检测 ENO1 和 M2-PK 蛋白的表达。免疫组化按 SP 试剂盒说明书步骤操作,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。在高倍镜下每张切片选择 5 个有代表性的视野,每个视野计数 100 个肿瘤细胞,共计数 500 个细胞。ENO1 定位于细胞质或胞膜,M2-PK 定位于胞质或胞核,出现黄色或棕黄色颗粒为阳性细胞。

免疫组化阳性结果判断:采用半定量计分法判定,按阳性着色程度评分:0 分为无着色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。按阳性细胞的比例评分:0 分为 < 5%,1 分为 5% ~ 10%,2 分为 11% ~ 50%,3 分为 51% ~ 80%,4 分为 > 80%。两者乘积判定阳性结果:0 分为阴性(-),1 ~ 4 分为弱阳性(+),5 ~ 8 分为中度阳性(++),9 ~ 12 分为强阳性(+++ ~ ++++)。

### 1.3 统计学处理

采用统计软件 SPSS 17.0 进行 chi-square 检验、Spearman 相关分析进行统计学处理, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃癌组织中 ENO1 和 M2-PK 的表达

ENO1 在胃癌组织中表达呈胞质、胞膜分布,阳性信号为棕黄色颗粒(图 1)。本研究发现,在 23 例胃溃疡病变组织中 ENO1 阳性表达 7 例,阳性率为 30.4%;在胃癌组织中阳性表达 37 例,阳性率为 67.3%(37/55),显著高于胃溃疡病变组织( $P = 0.003$ )。

M2-PK 在胃癌组织中的表达呈胞质、胞核分布,阳性信号为棕黄色颗粒(图 1)。在 23 例胃溃疡病变组织中 M2-PK 阳性表达 9 例,阳性率为 39.1%;在胃癌组织中阳性表达 43 例,阳性率为 78.2%(43/55),显著高于胃溃疡病变组( $P = 0.001$ )。

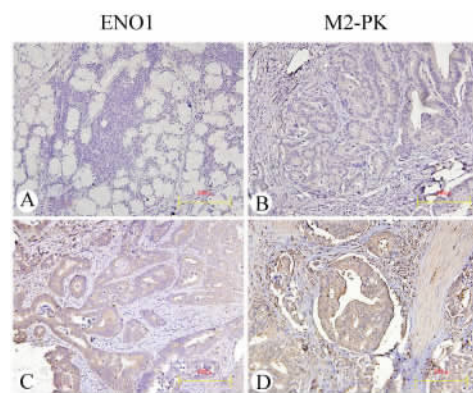


图 1 ENO1、M2-PK 在胃癌和胃溃疡组织中的表达(×200)

Fig.1 Expression of ENO1 and M2-PK in gastric cancer and gastric ulcer tissues(×200)

A, B: Gastric ulcer tissues; C, D: Gastric cancer tissues

### 2.2 胃癌组织中 ENO1 和 M2-PK 的表达与胃癌临

床病理特征的关系

胃癌组织中 ENO1 的表达与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期均相关, 与患者的

年龄、性别无显著相关。胃癌组织中的 M2-PK 表达与胃癌分化程度、浸润深度相关, 与患者的年龄、性别、临床分期及有无淋巴结转移无关, 见表 1。

表 1 ENO1 和 M2-PK 表达与胃癌临床病理特征的关系[ *n* ( % ) ]

Tab. 1 Correlation between ENO1 and PK-M2 expression and clinicopathologic features of gastric cancer[ *n* / ( % ) ]

Clinicopathologic feature	<i>N</i>	ENO1		M2-PK	
		Positive	<i>P</i>	Positive	<i>P</i>
Age					
≥55	30	22( 73.3% )	0.294	23( 76.7% )	0.766
<55	25	15( 60.0% )		20( 80.0% )	
Gender					
Male	39	26( 70.3% )	0.881	31( 79.5% )	0.995
Female	16	11( 68.8% )		12( 75% )	
Differentiation grade					
Low	36	28( 77.8% )	0.022	32( 88.9% )	0.021
High	19	9( 47.4% )		11( 57.9% )	
Depth of invasion					
T1 + T2	16	7( 43.8% )	0.017	9( 56.3% )	0.031
T3 + T4	39	30( 76.9% )		23( 87.2% )	
Lymph node metastasis					
Yes	37	31( 83.8% )	<0.01	31( 83.8% )	0.274
No	18	6( 33.3% )		12( 66.7% )	
TNM stage					
I + II	20	8( 40.0% )	0.001	13( 65.0% )	0.147
III + IV	35	29( 82.9% )		30( 85.7% )	

2.3 胃癌组织中 ENO1、M2-PK 表达的相关性

55 例胃癌组织中 33 例 ENO1 与 M2-PK 共同阳性表达, 8 例 ENO1 和 M2-PK 共同阴性表达, 仅 ENO1 阳性 4 例, 仅 M2-PK 阳性 10 例。相关性分析表明, ENO1、M2-PK 表达呈正相关(  $r = 0.5729, P < 0.05$  )。

3 讨论

ENO1 是一个高度保守的胞质糖酵解酶, 在大多数的肿瘤中呈高表达状态, 如头颈部鳞状细胞癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌、小细胞型肺癌、子宫内膜癌等<sup>[3-7]</sup>。同时有研究<sup>[8]</sup>证实, 在低分化和静脉血管浸润的肝癌中 ENO1 表达更高; 在非小细胞肺癌中 ENO1 的高表达与临床预后相关, 肿瘤分期越晚, 表达越高。Kim 等<sup>[9]</sup>研究表明, ENO1 是一个多功能蛋白, 除了在胞质中发挥糖酵解的作用外, 还在细胞膜表面起着纤溶酶原受体的作用, 参与结合、活化、稳定纤溶酶原以及肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[10-11]</sup>。

此外, ENO1 的高表达可以增强单核巨噬细胞的浸润能力, 提高穿透基质的能力<sup>[12]</sup>, 还可能通过 Notch 信号通路控制 c-Myc 癌蛋白的表达, 参与肿瘤的形成<sup>[13]</sup>。

M2-PK 是糖酵解限速酶丙酮酸激酶的一种同工酶。在正常细胞中主要以四聚体形式存在, 而在肿瘤中主要以二聚体形式存在且大量表达, 例如在肺癌、乳腺癌、胃肠道肿瘤、肾癌等肿瘤细胞中的含量远高于正常组织<sup>[14-15]</sup>。最近一项研究<sup>[16]</sup>利用小发夹结构的 RNA 抑制 M2-PK 的表达, 同时用 M1-PK 代替, 结果表明乳酸产物减少, 氧消耗增加; 在裸鼠异体移植中的肿瘤形成能力降低, 证实肿瘤中 M2-PK 的表达对肿瘤细胞的增殖是必需的, 其代谢类型的改变为肿瘤生长提供了必要的条件。M2-PK 受变构激活剂 1,6-二磷酸果糖( fructose-1,6-bisphosphate, FBP )调节, 当后者水平达到一定高浓度时, 无活性的二聚 M2-PK 重新转化为高活性的四聚体 M2-PK, 而低水平则相反<sup>[14]</sup>。M2-PK 同时又是一种

磷酸酪氨酸结合蛋白,它选择性地与磷酸酪氨酸肽特异性结合。当磷酸酪氨酸肽与 M2-PK 结合后,可促使与 M2-PK 相结合的 FBP 释放,转化为二聚体的 M2-PK 活性被抑制,这种调节也是 M2-PK 特有的<sup>[17]</sup>。此外, M2-PK 还受其他一些小分子物质调节,如 L-丝氨酸通过变构效应增加 M2-PK 对磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的亲合力和降低 FBP 浓度,而另一方面 L-丙氨酸则降低 M2-PK 对 PEP 的亲合力,增加 FBP 的浓度。其他氨基酸,如 L-半胱氨酸、L-蛋氨酸等则抑制 M2-PK 的活性<sup>[14]</sup>。

实体肿瘤中,肿瘤细胞适应低氧微环境对肿瘤细胞增殖、浸润、转移是至关重要的一步。缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  能激活编码葡萄糖转运蛋白、糖酵解酶、VEGF 的基因转录。研究<sup>[18-21]</sup>显示, *ENO1*、*M2-PK* 基因同为 HIF-1 $\alpha$  作用的靶基因;在缺氧的情况下, HIF-1 $\alpha$  通过不同的途径启动 *ENO1*、*M2-PK* 基因表达。*ENO1* 的高表达,产生更多的 PEP;而表达低活性的肿瘤型 M2-PK 糖酵解酶,导致 PEP 的积聚,两者共同作用导致磷酸烯醇类物质的积累,代谢转变为合成过程,有利于肿瘤细胞向核酸合成的方向进行。因此, *ENO1*、*M2-PK* 对调控恶性肿瘤的发生、发展可能起着重要作用。

本研究证实, *ENO1* 和 *M2-PK* 的高表达与胃癌的分化程度及浸润深度有关,两者在胃癌的发生、发展中可能发挥着协同作用。同时本研究也证实了肿瘤细胞中存在“Warburg 效应”的理论,为胃癌预后判断及治疗监测提供了新的潜在的肿瘤标志物。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Warburg O. On the origin of cancer cells [ J ]. Science, 1956, 123( 3191 ): 309-314.
- [ 2 ] Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes [ J ]. Genomics, 2004, 84( 6 ): 1014-1020.
- [ 3 ] Byrjalsen I, Mose LP, Fey SJ, et al. Two-dimensional gel analysis of human endometrial proteins: Characterization of proteins with increased expression in hyperplasia and adenocarcinoma [ J ]. Mol Hum Reprod, 1999, 5( 8 ): 748-756.
- [ 4 ] Lee KA, Shim JH, Kho CW, et al. Protein profiling and identification of modulators regulated by the E7 oncogene in the C33A cell line by proteomics and genomics [ J ]. Proteomics, 2004, 4( 3 ): 839-848.
- [ 5 ] Lo Presti M, Ferro A, Contino F, et al. Myc promoter-binding protein-1 ( mbp-1 ) is a novel potential prognostic marker in invasive ductal breast carcinoma [ J ]. PLoS One, 2010, 5( 9 ): e12961.
- [ 6 ] Wu WG, Tang XM, Hu W, et al. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry [ J ]. Clin Exp Metastasis, 2002, 19( 4 ): 319-326.
- [ 7 ] Zhang L, Cilley RE, Chinoy MR. Suppression subtractive hybridization to identify gene expressions in variant and classic small cell lung cancer cell lines [ J ]. J Surg Res, 2000, 93( 1 ): 108-119.
- [ 8 ] Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, et al. Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: Association with tumor progression as determined by proteomic analysis [ J ]. Proteomics, 2005, 5( 6 ): 1686-1692.
- [ 9 ] Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes [ J ]. Trends Biochem Sci, 2005, 30( 3 ): 142-150.
- [ 10 ] Liu KJ, Shih NY. The role of enolase in tissue invasion and metastasis of pathogens and tumor cells [ J ]. J Cancer Mol, 2007, 3( 2 ): 45-48.
- [ 11 ] Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: Its role in diseases [ J ]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58( 7 ): 902-920.
- [ 12 ] Wygrecka M, Marsh LM, Morty RE, et al. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung [ J ]. Blood, 2009, 113( 22 ): 5588-5598.
- [ 13 ] Hsu KW, Hsieh RH, Lee YH, et al. The activated Notch1 receptor cooperates with alpha-enolase and MBP-1 in modulating c-myc activity [ J ]. Mol Cell Biol, 2008, 28( 15 ): 4829-4842.
- [ 14 ] Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, et al. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading [ J ]. Semin Cancer Biol, 2005, 15( 4 ): 300-308.
- [ 15 ] Oremek GM, Teigelkamp S, Kramer W, et al. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 ( Tu M2-PK ) as a tumor marker for renal carcinoma [ J ]. Anticancer Res, 1999, 19( 4A ): 2599-2601.
- [ 16 ] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The m2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [ J ]. Nature, 2008, 425( 7184 ): 230-233.
- [ 17 ] Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, et al. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein [ J ]. Nature, 2008, 452( 7184 ): 181-186.
- [ 18 ] Discher DJ, Bishopric NH, Wu X, et al. Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element [ J ]. J Biol Chem, 1998, 273( 40 ): 26087-26093.
- [ 19 ] Hamaguchi T, Iizuka N, Tsunedomi R, et al. Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1alpha is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma [ J ]. Int J Oncol, 2008, 33( 4 ): 725-731.
- [ 20 ] Kress S, Stein A, Maurer P, et al. Expression of hypoxia-inducible genes in tumor cells [ J ]. J Cancer Res Clin Oncol, 1998, 124( 6 ): 315-320.
- [ 21 ] Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Ralph SJ, et al. Hif-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms [ J ]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9( 9 ): 1084-1101.

[ 收稿日期 ] 2011 - 07 - 12

[ 修回日期 ] 2011 - 08 - 29

[ 本文编辑 ] 韩 丹