

肿瘤型丙酮酸激酶 M2 在胰腺癌中的表达特点及其临床病理联系

李静 黄亮 周飞国 晏建军 刘才峰 严以群

【摘要】 目的 探讨肿瘤型丙酮酸激酶 M2 (M2-PK) 在胰腺癌组织中的表达特点及其临床病理联系。方法 35 例取自 2004 年 1 月至 2007 年 6 月在我院行手术治疗的经病理学证实为胰腺癌的患者手术切除标本,切片用抗肿瘤型 M2-PK 抗体进行免疫组化染色,肿瘤细胞细胞质内出现黄染都被判为阳性,采用半定量法将染色强度分为未染色、弱阳性和强阳性三个等级,阳性细胞所占比例分为 0、<30%、30%~60%、>60% 和 100% 五个等级。结果 35 例标本中染色阳性细胞比例均为 100%,肿瘤细胞呈弱强度染色者 7 例,强染色者 28 例。高中低分化标本中强阳性例数所占比例分别为 72.7%、83.3% 和 83.3%,淋巴结阴性和阳性标本中强阳性例数所占比例均为 80.0%,无远处转移和有远处转移标本中强阳性比例均为 80.0%,临床分期 I、II、III、IV 期标本中强阳性比例分别为 85.7%、76.5%、83.3% 和 80.0%,以上差异均没有统计学意义。结论 肿瘤型 M2-PK 在胰腺癌组织中呈高表达,但其表达强度与临床病理无明显相关性。

【关键词】 胰腺肿瘤; 丙酮酸激酶; 免疫组织化学

Expression of tumour pyruvate kinase type M2 on pancreatic cancer and it's clinicopathologic connection LI Jing, HUANG Liang, ZHOU Fei-guo, YAN Jian-jun, LIU Cai-feng, YAN Yi-qun. Department of Hepatic Surgery I, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

Corresponding author: YAN Yi-qun, Email: ehbhyyq@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of tumour pyruvate kinase type M2 (tumour M2-PK) on pancreatic cancer and the connection between the expression of tumour M2-PK and the clinicopathologic manifestations. **Methods** 35 cases were selected from patients who were conducted operations in our hospital from January 2004 to June 2007 and were pathologically diagnosed pancreatic cancer. Sections were stained immunohistochemically with antibody to tumour M2-PK. Positive stain was defined as yellow stain in the cytoplasm. Intensity of stain was divided into no stain, poor stain and strong stain, and proportion of cells with positive stain was divided into 0, <30%, 30%-60%, >60% and 100% by the semiquantitative method. **Results** All 35 cases showed 100% staining, of which 7 were weakly stained while other 28 were strongly stained. No differences were detected among different pathological classifications, clinical stages, lymph node involvement or distal metastasis. The proportions of cells with strong stain were 72.7%, 83.3% and 83.3% in the well, moderately and poorly differentiated specimen respectively, and were both 80% in the specimen with and without lymph node or distant metastasis, and were 85.7%, 76.5%, 83.3% and 80.0% in the specimen of clinical stage I, II, III and IV respectively. None of the differences was statistical significant. **Conclusions** Tumour M2-PK was highly expressed in pancreatic cancer, but there was no association between the expression of tumour M2-PK and the clinicopathologic manifestations.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; Pyruvate kinase; Immunohistochemistry

胰腺癌是根治性切除机会最少、预后最差的恶性肿瘤之一,其难以早期发现,在最终明确诊断时,90%以上的患者已属中晚期,多数患者失去了根治性手术切除的最佳时机;且对放化疗的敏感性特别差,故被称为21世纪“癌中之王”^[1]。人们在长期的临床实践中深刻地认识到,进一步提高胰腺癌治疗效果的关键并不在于无限制的扩大手术切除范围,而在于加强胰腺癌的基础研究。确切地说,寻求新的早期诊断及治疗手段才是改善胰腺癌患者预后的根本出路^[2]。

特异性强和灵敏度高的肿瘤相关基因和蛋白的检测被公认为筛查肿瘤高危人群、早期发现恶性肿瘤、判断肿瘤预后和是否复发的最佳方法^[3]。丙酮酸激酶 M2 (M2-PK) 是糖酵解途径中的一个关键酶——丙酮酸激酶 (PK) 的同工酶之一,其在肿瘤细胞有氧糖代谢增加过程中发挥着主导作用,它不仅在非肿瘤性增殖细胞中表达,也表达于多种肿瘤细胞中^[4]。在肿瘤发生过程中,组织特异性 PK 的同工酶(如 L-PK 在肝脏和肾脏、M1-PK 在骨骼肌和脑、R-PK 在红细胞中表达^[5])最终发生改变而被 M2-PK 所取代^[6]。正常情况下, M2-PK 以高酶活性四聚体形式存在,但是,四聚体 M2-PK 可以转变成一种几乎没有活性的二聚体形式,后者与磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 亲和力低,且能与多种癌蛋白相互作用^[7]。在肿瘤细胞中,二聚体形式存在的 M2-PK 占大多数,因此其也被称为肿瘤型 M2-PK。肿瘤型 M2-PK 已经在正常结肠黏膜上皮中被检测到,但是在结肠腺癌中却大大增加^[4],并且在肺癌患者中其血浆浓度与肿瘤负荷强相关^[5]。另外,肿瘤型 M2-PK 浓度升高与肿瘤细胞的远处转移能力呈正相关^[8]。

最近,已有报道通过检测患者血浆中肿瘤型 M2-PK 浓度来诊断胰腺癌,具有较好的灵敏度和特异度^[9-11],也有报道称检测血浆中肿瘤型 M2-PK 可以帮助鉴别胰腺癌和慢性胰腺炎^[12]。我们试图通过本研究寻找肿瘤型 M2-PK 在胰腺癌组织中的表达特点及其临床病理联系。

材料和方法

一、组织学标本

35 例标本取自 2004 年 1 月至 2007 年 6 月在我院行手术治疗的胰腺癌患者,均经病理证实为胰腺癌。其中男 22 例,女 13 例;年龄 38~72 岁,中位年龄 58 岁。高分化腺癌 11 例,中分化腺癌 12 例,低分化腺癌 12 例;15 例有局部淋巴结转移 (N1),20 例无淋巴结转移 (N0);有远处转移 5 例。结合患者临床资料、病理学资料和手术中所见,根据 UICC 2002 年分期标准,35 例肿瘤标本的临床分期如下:7 例患者处于 I 期(肿瘤局限于胰腺实质内),17 例患者处于 II 期(胰腺被膜受侵),6 例患者处于 III 期(局部淋巴结受侵),5 例患者处于 IV 期(有远处转移)。

二、免疫组化

组织标本用甲醛固定、石蜡包埋后切成 4 μm 厚切片;简短地脱蜡、水化后在含 1% 过氧化氢的甲醇中浸泡 10 min 以阻滞内源性过氧化物酶;采用微波热介导抗原修复法修复抗原,即将切片放在 95 $^{\circ}\text{C}$ 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中 15 min (高火 3 min、低火 12 min);自然冷却至室温,磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗过后加入用 0.01 mol/L PBS 稀释至 1:100 的一抗——抗 M2-PK 抗体(台湾 Abnova 公司),室温下孵化 60 min;PBS 洗过后采用链霉素亲和素-过氧化酶复合物法 (SP 法) 检测一抗 (SP 免疫组化试剂盒为北京中山生物技术公司产品,实验程序严格按照说明书进行);苏木素复染、稀氨水返蓝、二甲苯脱脂后即可显影。PBS 代替一抗作为阴性对照。

三、组织学判定

肿瘤细胞细胞质内出现黄染都被判为阳性,染色强度采用半定量法分为三个等级,分别以 0、(+)、(++) 代表未染色、弱阳性和强阳性;阳性细胞所占比例也采用半定量法分为五个等级,以显微镜下随机选取 10 个高倍视野范围内阳性细胞所占比例分为 0、< 30%、30%~60%、> 60% 和 100%。

四、统计学分析

本研究中数据采用半定量法标记,均为计数资料,用卡方检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

胰腺癌组织中肿瘤细胞细胞质染色均呈阳性,其中部分肿瘤细胞和炎性细胞胞核亦被染色,而阴性对照组

胰腺癌组织染色均为阴性(图1)。在所有35例标本中,肿瘤细胞呈弱阳性者7例,强阳性者28例;35例标本中阳性细胞比例均为100%(表1)。

表1 M2-PK在不同病理分级、淋巴结受累、远处转移和临床分期病例中的染色情况(例)

	例数	细胞质内染色强度			阳性细胞比例				
		0	(+)	(++)	0	<30%	30%~60%	>60%	100%
病理分级									
高分化	11	0	3	8	0	0	0	0	11
中分化	12	0	2	10	0	0	0	0	12
低分化	12	0	2	10	0	0	0	0	12
淋巴结受累									
N0	20	0	4	16	0	0	0	0	20
N1	15	0	3	12	0	0	0	0	15
远处转移									
M0	30	0	6	24	0	0	0	0	30
M1	5	0	1	4	0	0	0	0	5
临床分期									
I期	7	0	1	6	0	0	0	0	7
II期	17	0	4	13	0	0	0	0	17
III期	6	0	1	5	0	0	0	0	6
IV期	5	0	1	4	0	0	0	0	5

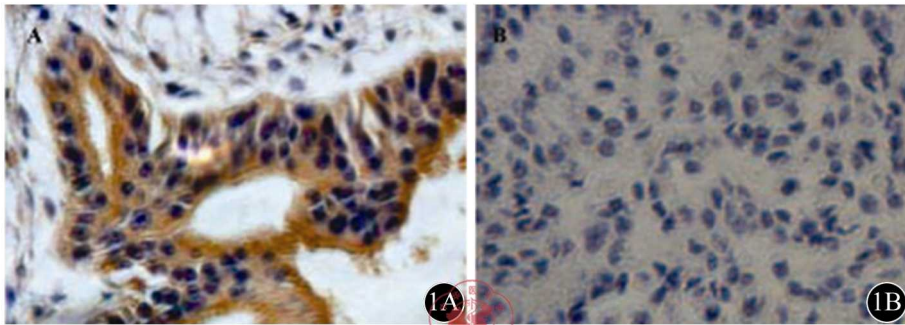


图1 肿瘤型M2-PK在胰腺癌中的表达(SP×200) 1A: 阳性染色; 1B: 阴性染色

11例高分化标本中,3例肿瘤细胞呈弱阳性,8例呈强阳性;12例中分化标本中,2例呈弱阳性,10例呈强阳性;12例低分化标本中,2例呈弱阳性,10例呈强阳性。高中低分化标本中强阳性例数所占比例分别为72.7%、83.3%和83.3%,卡方检验三者没有统计学差异($P>0.05$)。

20例淋巴结阴性病例标本中,4例呈弱阳性,16例呈强阳性;15例有局部淋巴结受累病例标本,3例呈弱阳性,12例呈强阳性。淋巴结阴性和阳性标本中强阳性例数所占比例均为80.0%。

30例无远处转移病例标本中,6例呈弱阳性,24例呈强阳性;5例有远处转移病例标本,1例呈弱阳性,4例呈强阳性。无远处转移和有远处转移标本中强阳性比例均为80.0%。

7例临床分期为I期的病例标本,1例呈弱阳性,6例呈强阳性;17例II期病例标本中,4例呈弱阳性,13例呈强阳性;6例III期病例标本,1例呈弱阳性,5例呈强阳性;5例IV期病例标本,1例呈弱阳性,4例呈强阳性。临床分期I、II、III、IV期标本中强阳性比例分别为85.7%、76.5%、83.3%和80.0%;临床分期为I、II期标本与临床分期为III、IV期标本中强阳性比例分别为79.2%和81.8%,卡方检验没有统计学差异($P>0.05$)。

讨 论

胰腺癌作为一种恶性程度很高的消化道肿瘤,其早期确诊率不高,而中晚期手术切除率低,预后很差。尽管近年来分子生物学和诊断技术有了很大的进展,胰腺癌目前仍然是困扰临床工作者尤其是外科医师的恶性疾病之一。在西方国家,胰腺癌排在恶性肿瘤死亡原因的第四位,其5年生存率不到10%^[13],寻找一种具有临床早期诊断价值的肿瘤标志物是改善胰腺癌患者预后的根本出路,肿瘤型 M2-PK 作为一种新的肿瘤标志物逐渐引起科学工作者的重视。

体液中之所以能检测到肿瘤型 M2-PK,很可能是肿瘤坏死或者转化、增殖过程中肿瘤细胞释放分泌出来的,而肿瘤型 M2-PK 检测试剂盒研制成功使得体外检测肿瘤型 M2-PK 成为可能,并开始广泛应用于各种研究和临床应用之中。与传统的肿瘤标志物(CA19-9、CEA 等)相比,肿瘤型 M2-PK 作为肿瘤标志物的好处在于,它是以肿瘤细胞代谢产物而被检测到的,因此不会受到胆汁淤积的影响,这使得其用于胰腺癌诊断的前景更加乐观。

较多资料证实,肿瘤型 M2-PK 的检测对消化系统肿瘤的诊断具有较好价值。如 Schneider 等^[14]发现消化道肿瘤患者其血浆中肿瘤型 M2-PK 水平与消化道非肿瘤患者相比明显增高,其诊断的特异度为 89%,而诊断的敏感度则取决于肿瘤的类型(结直肠癌、胃癌、食管癌和胰腺癌),波动于 48%~73%。显然这样的灵敏度和特异度其临床诊断价值有限。在胰腺癌患者中,肿瘤型 M2-PK 与 CA19-9 联合应用时具有明显的诊断价值。

肿瘤细胞增殖是一个大量消耗能量的过程,如果细胞增殖不加以调控、限制的话,肿瘤细胞会因营养供应减少、ATP 耗竭而死亡。由于 M2-PK 可在活性相对较弱的二聚体形式(调控机体处于碳水化合物合成过程),以及活性相对较高的四聚体形式(调控机体处于糖酵解能量的产生阶段)之间相互转化,因此,它在阻止细胞死亡的调节中发挥了关键作用。在我们的研究中,肿瘤型 M2-PK 在胰腺癌组织中呈高表达,所有 35 例病例标本中,肿瘤细胞 100% 表达肿瘤型 M2-PK。这反映了胰腺癌作为一种高侵袭性肿瘤在生长、进展过程中对能量的需求大,胰腺癌细胞内糖酵解过程十分活跃。研究表明肿瘤型 M2-PK 的检测与胃肠道肿瘤的不同分期及是否转移也有一定相关性,随着临床分期的进展以及淋巴结的浸润,肿瘤型 M2-PK 测定值逐渐增加^[15]。也有研究发现,胰腺癌患者血浆中肿瘤型 M2-PK 水平与淋巴结转移和肿瘤分期有很好的相关性^[16],与肿瘤发生远处转移与否亦有明显差异^[11,17]。但在我们的研究中,随着临床分期的进展、淋巴结的浸润和远处转移,肿瘤细胞细胞质中肿瘤型 M2-PK 染色强度并没有随之增强,染色阳性细胞比例亦没有任何变化(均为 100%),这可能是由于:随着病程进展,(1)肿瘤细胞转化、增殖过程更加活跃,细胞内糖代谢过程亦更加活跃,肿瘤型 M2-PK 的合成和分泌增加,进入体液中的肿瘤型 M2-PK 也相应增多,而在组织水平上这种变化难以显示出来;(2)越来越多的肿瘤细胞发生坏死,坏死的肿瘤细胞释放出的肿瘤型 M2-PK 也越来越多,而组织水平上检测的是未发生坏死的细胞内的肿瘤型 M2-PK 含量,所以不会有明显变化。因此在组织细胞水平通过检测肿瘤型 M2-PK 表达来评估胰腺癌病程进展没有意义,也不能作为一种指标反映胰腺癌患者的预后以及作为治疗手段选择的标准。

在我们的研究中,不同病理分化水平的胰腺癌组织中肿瘤型 M2-PK 表达强度没有明显差异,我们推断:肿瘤型 M2-PK 作为一种代谢标志物,在肿瘤发生过程中随着组织化生——重度不典型增生——腺癌的进展,其表达水平随之上升,但是一旦细胞发生癌变后其在肿瘤细胞内的表达就开始处于一个动态平衡中。因此肿瘤型 M2-PK 在肿瘤发生过程中可能是个重要的标志物。之前一项研究发现,在组织水平上,食管肠上皮化生、重度不典型增生、腺癌组织中肿瘤型 M2-PK 表达水平逐渐上升,而肿瘤型 M2-PK 在腺癌细胞中 100% 表达^[18]。很多良性胃肠道疾病患者血浆中肿瘤型 M2-PK 水平也有不同程度的升高^[11],虽然这些良性疾病病理类型各不相同,但是它们都有一个共同的炎症过程,因此有学者推测炎症可以促进糖酵解,从而使肿瘤型 M2-PK 表达上调^[19]。最近一项大样本量研究发现,血浆中肿瘤型 M2-PK 水平与内分泌肿瘤具有很好的相关性^[20]。这些结论都是通过检测患者血浆中肿瘤型 M2-PK 浓度得出的,至于在组织细胞水平是否能得出相似的结论有待进一步的研究。

总之,肿瘤型 M2-PK 在胰腺癌组织细胞中呈高表达,其表达强度与临床病理无明显相关性,但是,胰腺癌组织高表达肿瘤型 M2-PK 的特性可以为病理医师快速发现肿瘤所在的具体部位提供一定的帮助。

参 考 文 献

- [1] Hruban RH, Maitra A, Kern SE, et al. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 2007, 36:831-849.
- [2] Riess H. Antiangiogenic strategies in pancreatic cancer. *Recent Result Cancer Res*, 2008, 177:123-129.
- [3] Tonini G, Pantano F, Vincenzi B, et al. Molecular prognostic factors in patients with pancreatic cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11:1553-1569.
- [4] Eigenbrodt E, Basenau D, Holthusen S, et al. Quantification of tumour type M2 pyruvate kinase (Tu M2-PK) in human carcinomas. *Anticancer Res*, 1997, 17:3153-3156.
- [5] Schneider J, Morr H, Velcovsky HG, et al. Quantitative detection of tumour M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. *Cancer Detect Prev*, 2000, 24:531-535.
- [6] Eigenbrodt E, Kalinowski F, Ott M, et al. Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumours. *Anticancer Res*, 1998, 18:3267-3274.
- [7] Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, et al. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation; interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene*, 2001, 20:6891-6898.
- [8] Brinck U, Eigenbrodt E, Oehmke M, et al. L-and M2-pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases. *Virchows Arch*, 1994, 424:177-185.
- [9] Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, et al. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer. *Anticancer Res*, 2000, 20:4965-4968.
- [10] Oremek GM, Eigenbrodt E, Radle J, et al. Value of the serum levels of the tumor marker TU M2-PK in pancreatic cancer. *Anticancer Res*, 1997, 17:3031-3033.
- [11] Ventrucci M, Cipolla A, Racchini C, et al. Tumor M2-pyruvate kinase, a new metabolic marker for pancreatic cancer. *Dig Dis Sci*, 2004, 49:1149-1155.
- [12] Novotný I, Dítě P, Dastych M, et al. Tumor marker M2-pyruvate-kinase in differential diagnosis of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology*, 2008, 55:1475-1477.
- [13] Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93:824-842.
- [14] Schneider J, Bitterlich N, Schulze G. Improved sensitivity in the diagnosis of gastro intestinal tumors by fuzzy logic-based tumor marker profiles including the tumor M2 PK. *Anticancer Res*, 2005, 25:1507-1515.
- [15] Zhang B, Chen JY, Chen DD, et al. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls. *World J Gastroenterol*, 2004, 10:1643-1646.
- [16] Cerwenka H, Aigner R, Bacher H, et al. TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2), CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions. *Anticancer Res*, 1999, 19:849-851.
- [17] Paganuzzi M, Onetto M, Marroni P, et al. CA 19-9 and CA 50 in benign and malignant pancreatic and biliary diseases. *Cancer*, 1988, 61:2100-2108.
- [18] Koss K, Harrison RF, Gregory J, et al. The metabolic marker tumour pyruvate kinase type M2 (tumour M2-PK) shows increased expression along the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol*, 2004, 57:1156-1159.
- [19] Goldstein SA, Elwyn DH. The effects of injury and sepsis on fuel utilization. *Annu Rev Nutr*, 1989, 9:445-473.
- [20] Pezzilli R, Migliori M, Morselli-Labate AM, et al. Diagnostic value of tumor M2-pyruvate kinase in neuroendocrine tumors. A comparative study with chromogranin A. *Anticancer Res*, 2003, 23:2969-2972.

(收稿日期:2011-07-04)

(本文编辑:马超)

李静,黄亮,周飞国,等.肿瘤型丙酮酸激酶 M2 在胰腺癌中的表达特点及其临床病理联系[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(19):5630-5634.