维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)05－0573－03

细胞增殖抗原 Ki－67 在喉癌中的表达及临床意义

孙余才，胡国华，朱　江

(重庆医科大学临床学院耳鼻喉科，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨细胞增殖抗原 Ki－67 在喉癌组织中的表达及临床意义。方法：采用免疫组织化学 S－P 法检测 41 例喉癌组织中 Ki－67 的表达，并与 12 例癌旁正常组织作对照，进行分析比较。结果：41 例喉癌组织中 Ki－67 的阳性表达率为 53.6%，12 例癌旁正常组织阳性表达率为 16.7%，二者具有显著性差异($P<0.05$)。Ki－67 的阳性表达率与喉癌病人的不同性别、年龄、病程、肿瘤部位和 TNM 分期无关($P>0.05$)，但与吸烟、饮酒、淋巴结有无转移以及喉癌组织的病理分级之间具有显著性差异($P<0.05$，$P<0.01$)。结论：Ki－67 在喉癌的发生发展中起一定的作用，可作为判断喉癌恶性程度和预后的重要参考指标。

【关键词】喉癌；Ki－67；免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R730.231；R739.65　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－11－11

Clinical significance and expression of Ki－67 in laryngeal carcinoma

SUN Yucai, et al

(*Department of Otolaryngology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To determine clinical significance and expression of cellular proliferative antigen Ki－67 in laryngeal carcinoma tissues. *Methods*: Ki－67 expressions in 41 cases of laryngeal carcinoma tissues were detected by immunohistochemical S－P method; 12 cases of pericarcinoma tissues were used as control and comparison. *Results*: The positive expression rate of Ki－67 was 53.6% in 41 cases of laryngeal carcinoma tissues and 16.7% in 12 cases of pericarcinoma tissues, which showed significant difference ($P<0.05$). There was no significant difference in sex, age, course, tumor site and TNM stage. The levels of Ki－67 expression were significantly higher in the groups with smoking, drinking habits and lymph node metastasis than in those without ($P<0.05$). The positive expression rate of Ki－67 showed significant difference among pathological stages of laryngeal carcinoma tissues ($P<0.01$). *Conclusion*: The results suggest that the Ki－67 might play an important role in the development and progression of laryngeal carcinoma and should be used as an important reference marker of malignant degree and prognosis of laryngeal carcinoma.

【Key words】 Laryngeal carcinoma; Ki－67; Immunohistochemistry

肿瘤的发生是由遗传物质的改变导致的多基因、多步骤，逐步累积的结果，而细胞动力学的特点是肿瘤最重要的特征。近年来，一些与细胞增殖有关的抗原被发现并应用于临床研究，证明其对多种肿瘤的预后评估有指导意义。Ki－67 是一种细胞增殖抗原，也是目前较为肯定的细胞增殖的良好指标，在乳腺癌、肾癌、大肠癌和鼻咽癌等[1~6]多有研究，而在喉癌方面尚无文献报道。我们应用免疫组织化学技术检测了 41 例喉癌组织中 Ki－67 的表达情况，旨在探讨它与喉癌的发生发展以及与临床各病理特征的关系。

作者介绍：孙余才(1967－　)，男，主治医师，硕士，主要研究方向：头颈部肿瘤。

1　材料与方法

1.1　材料来源

41 例喉癌组织均随机选自重庆医科大学病理科 1999 年 1 月至 2002 年 3 月手术切除存档的有完整临床资料的石蜡标本。每一标本切片均经两位病理科专家再次诊断，皆为鳞状细胞癌。Ⅰ级 16 例、Ⅱ级 13 例、Ⅲ级 12 例。选取 41 例喉癌组织中的 12 例癌旁组织经病理检查均为喉正常组织，作为正常对照组。

1.2　临床资料

所有入选的喉癌患者临床资料皆从重庆医科大学临床学院获得，均为第一次住院，手术前未接受放射治疗和化学治疗，均为非转移性喉癌。男 36 例，女 5 例，年龄 38～78 岁，平均 60.2 岁。病程 1～25 月，平均 7.3 月。发病前抽烟

维普资讯 http://www.cqvip.com

每日≥10 支×5 年以上者为吸烟组有 28 例,否则为对照组有 13 例。发病前饮酒每日≥150g×5 年以上者为饮酒组有 21 例,否则为对照组有 20 例。有颈淋巴结转移者 14 例,无淋巴结转移者 27 例。声门上型 8 例,声门型 24 例,声门旁型 9 例。按 1987 年 UICC 制定的 TNM 分期标准,Ⅰ－Ⅱ期(T_{1-2})14 例,Ⅲ－Ⅳ期(T_{3-4})27 例。

1.3 主要试剂

Ki－67 检测试剂(鼠抗人单克隆抗体),链霉菌抗生物素蛋白—过氧化酶(SP)免疫组化染色超敏试剂盒,均购自福建迈新生物技术开发公司。柠檬酸缓冲液(0.01MM,pH6.0),磷酸盐缓冲液(PBS)和 3.3′－二氨基联苯胺(DAB)显色液均为自己配制。

1.4 方法

采用 S－P 法免疫组化染色技术。操作步骤如下:1、将每一石蜡组织块,做成 4μm 厚的连续组织切片,贴附于经防脱片胶(赖氨酸)处理的载玻片上,60℃ 烘烤 3～4 天。2、常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化。3、将切片放入柠檬酸缓冲液,行高压锅水浴抗原修复。4、用 1% H_2O_2 抑制内源性过氧化酶 12min。5、加正常非免疫动物血清,阻断非特异抗体的着色 15min。6、加 Ki－67—抗室温孵育 1h,加生物素标记的第二抗体 15min,最后加入链霉菌抗生物素蛋白—过氧化酶 15min。7、DAB 镜下控制显色 2～5min,苏木素(HE)复染,中性树胶封固。实验过程中,以 PBS 代替一抗作阴性对照,用购买的阳性对照片作为阳性对照,以保证实验的可靠性。

1.5 判定标准

Ki－67 表达产物主要位于细胞核,呈棕黄色或黄褐色均匀颗粒。参考文献[3,7]作为本实验的判定依据。在高倍镜(×400)下,计数 4 个阳性区视野,计算阳性细胞所占的百分比。－:阳性细胞数＜5%,＋:5%≤阳性细胞数＜25%,＋＋:25%≤阳性细胞数＜50%,＋＋＋:阳性细胞数≥50%。

1.6 统计学处理

用四格表 χ^2 检验,当 1＜T＜5 时,χ^2 进行校正,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 Ki－67 在喉癌和癌旁正常组织中的表达

41 例喉癌组织中有 22 例表达阳性(包括＋、＋＋、＋＋＋),表达产物主要位于细胞核,少部分位于细胞浆。阳性细胞散在或局灶分布于癌组织中,在癌巢及浸润的组织深处阳性反应细胞较多,着色较深。12 例癌旁正常组织中有 2 例表达阳性,阳性细胞散在于复层鳞状上皮处。Ki－67 在喉癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常组织,二者具有显著性差异($P<0.05$),见表 1。

表 1 Ki－67 在喉癌和癌旁正常组织中的表达

组织类型	例数	－	＋	＋＋	＋＋＋	阳性率(%)
正常组织	12	10	1	1	0	16.7
喉癌组织	41	19	10	5	7	53.6

$\chi^2=5.1, P<0.05$

2.3 Ki－67 表达与喉癌临床病理特征的关系

表 2 Ki－67 阳性表达与喉癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	Ki－67 －	Ki－67 ＋～＋＋＋	阳性表达率(%)	P 值
性别					
男	36	17	19	52.8	
女	5	2	3	60.0	>0.05
年龄(岁)					
＜60	19	10	9	47.4	
≥60	22	9	13	59.1	>0.05
病程(年)					
＜1	27	15	12	44.4	
≥1	14	4	10	71.4	>0.05
吸烟组	28	10	18	64.3	
对照组	13	9	4	30.8	<0.05
饮酒组	21	4	17	80.9	
对照组	20	15	5	25.0	<0.01
临床分型					
声门上型	8	3	5	62.5	
声门型	24	12	12	50.0	
声门旁型	9	4	5	55.6	>0.05
TNM 分期					
Ⅰ－Ⅱ期	14	7	7	50.0	
Ⅲ－Ⅳ期	27	12	15	55.6	>0.05
淋巴结转移					
有	14	3	11	75.0	
无	27	16	11	40.7	<0.05
病理分级					
Ⅰ	16	13	3	18.8	
Ⅱ	13	4	9	69.2	
Ⅲ	12	2	10	83.3	<0.01

Ki－67 的阳性表达率在不同性别、年龄、病程、肿瘤部位以及 TNM 分期之间均无显著性差异($P>0.05$)。在吸烟和饮酒组以及有淋巴结转移组 Ki－67 的阳性表达率明显高于各自的对照组,并具有显著性差异($P<0.05, P<0.01$)。在喉癌组织的病理分级上,高分化、中分化、低分化 Ki－67 的阳性表达率总的具有差异性($P<0.01$),即随着肿瘤恶性程度的提高,其阳性表达率具有上升的趋势,并且高分化阳性表达率明显低于中＋低分化阳性表达率($P<0.01$),见表 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

Ki-67 是一种细胞增殖抗原,为目前较为肯定的增殖标志基因,属非组蛋白,近核仁区。Ki-67 是出现在 G_1、S、G_2、M 期的细胞核中,开始表达于 G_1 期,在 S 期及 G_2 期表达逐渐增加,至 M 期达高峰,在细胞分裂的晚期,很快消失,在 G_0 期无表达。Ki-67 半衰期短,其代表细胞增殖的可靠性,明显优于半衰期 K 的增殖细胞核抗原(PCNA)[8]。所以近年来已广泛应用于研究肿瘤的增殖能力,判断与预后的关系等。

本组实验显示:41 例喉癌组织中 Ki-67 阳性表达率明显高于癌旁正常组织,说明喉癌组织中存在 Ki-67 抗原,并与喉癌的发生有着密切的关系。Ki-67 的表达产物主要定位于细胞核,但也有部分产物定位于细胞浆,可能原因是由于高温抗原修复时,抗原的细胞内定位发生改变,抗原暴露所致。

Zheng[6]等在对鼻咽癌的研究中发现 Ki-67 的阳性表达率与临床分期有关,并随分期的增加 Ki-67 阳性表达率增高,并认为这有助于鼻咽癌的临床分期和预测高危鼻咽癌患者的临床经过和改进治疗。Suzuki[4]等在对人肠癌的研究中,也发现 Ki-67 的阳性表达与临床分期有关。我们的实验结果显示 Ki-67 刚性表达与病人的不同性别、年龄、病程、肿瘤部位和 TNM 分期(临床分期)之间均未发现差异性($P>0.05$),这和上述研究不一致,其原因可能与肿瘤组织以及实验方法的不同有关,但与董频[7]对下咽癌的研究相同。在颈淋巴结转移方面,有颈淋巴结转移组 Ki-67 阳性表达率明显高于对照组,说明 Ki-67 阳性表达对喉癌的转移和预后评估具有重要意义,有可能成为影响喉癌预后的一个独立因子,这与文献对人肠癌的报道是相似的[3,5]。

有实验表明[1]:Ki-67 阳性表达与肿瘤细胞的分化程度有关。本实验发现喉癌组织中高分化、中分化、低分化组 Ki-67 的阳性表达率随分化程度的降低,具有上升的趋势,并且中+低分化组明显高于高分化组($P<0.01$),表明 Ki-67 阳性表达与喉癌的恶性程度呈正相关,对于喉癌细胞的分化增殖起着非常重要的作用,可作为判断喉癌恶性程度的一个重要指标。

PCNA 是评估细胞增殖的另一个重要癌基因。有研究表明[9,10]:PCNA 在喉癌组织中的表达与病人的不同性别、年龄、临床分期、肿瘤部位、淋巴结转移和病理分级之间均无关,并认为 PCNA 的阳性表达在喉癌和喉粘膜不典型增生的诊断和鉴别诊断上具有一定的辅助价值,重度不典型增生若 PCNA 强表达,可按早期癌(原位癌)处理。但也有研究发现[11]:PCNA 的阳性表达与肿瘤分级、淋巴结转移、淋巴管浸润、肿瘤边界和局部复发等均有关,并认为 PCNA 对预测肿瘤增殖、淋巴结转移和病人预后方面较肿瘤分级更敏感,可用于喉癌治疗和预后的评估。作为与细胞增殖有关的两个重要癌基因 Ki-67 和 PCNA 在喉正常粘膜组织、不典型增生以及喉癌各临床病理特征之间的关系,其阳性表达结果的一致性如何,目前尚未见有报道,还有待于进一步探讨。

喉癌的确切病因尚不清楚,本组实验发现 Ki-67 的阳性表达率在吸烟和饮酒组均高于对照组,并具有差异性,从而提示我们,吸烟、饮酒不仅是喉癌的病因,还有可能与喉癌的转移及预后有关,原因可能在于其提高了喉粘膜组织中 Ki-67 的表达水平,这为吸烟与饮酒是喉癌的病因提供了一个有力的生物学依据。

本组实验在喉癌的细胞增殖方面作了初步探讨,仅为癌变的复杂过程提供了一个新的理论依据。Ki-67 在喉癌中表达的确切意义,目前尚无统一的定论,仍需进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] WangCC, ChanKC, LeeKC, et al. Differential expression of P16/P21/P27 and CyclinD1/D3 and their relationships to cell proliferation, apoptosis and tumor progression in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. J Pathol, 2001;194(1):35-42.

[2] 姜福金,孙晓青,郑骏年,等. 细胞增殖核抗原 Ki-67 在肾癌组织中的表达及意义[J]. 徐州医学院学报,2001;21(5):361-362.

[3] 刘坤平,冯伟勋,谢芝香. 大肠癌 CDK4,Ki-67 表达与 CyclinD1,P16 蛋白表达的相关性及临床意义[J]. 中国肿瘤临床与康复,2001;8(4):9-11.

[4] Suzuk H, Matsumoto K, Terabe M. Ki-67 antibody labeling index in colorectalcarcinoma[J]. J Clin Castroenterol, 1992;15(3):317-320.

[5] Kyzer S, Gordon PH. Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki-67

(下转第 579 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

动脉粥样硬化泡沫细胞形成中发挥作用。尽管各种氧化型脂蛋白效能不同,但均可产生相似的效应,因为它们的脂质过氧化成分都是 NFκB 活化的重要因素。本实验室既往一些研究表明 oxHDL 可以抑制 HUVEC 细胞 NOS 的合成,可以促进 ICAM－1 和 MCP－1 的表达,也可降低单核细胞膜脂的流动性,促进其表面 LFA－1 和 MCP－1 的释放,从而促进单核细胞的趋化以及与内皮的粘附。这些作用与本文 oxHDL 对 NFκB 的活化作用是密切相关的。

PPARs 是配体活化型的转录因子,属于核受体超家族。有 3 种基因型:α、β/δ 和 γ。其中 PPARα 与 PPARγ 研究较多。它们可以在转录水平上直接调节目标基因的表达,也可以通过与 AP－1, STATs, NFκB 信号通路相互作用而抑制目标基因的转录[4]。贝特类调脂药及噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂均是 PPARs 的人工合成配体,由 PPARs 介导的生物学效应与它们的临床药理作用具有直接的相关性。NFκB 在机体免疫和炎性分子表达中发挥广泛而显著的正性调控作用。

本文显示,在相同氧化脂蛋白作用条件下,PPARs 和 NFκB 的活化强度不一致。促炎性因子分泌性转录因子 NFκB 活化大于抑炎性因子分泌性转录因子 PPARs,从而整体上对氧化型脂蛋白的反应仍表现为炎性因子表达增加,呈现"炎性反应"。这为临床应用调脂药物的剂量及时间具有一定的提示作用。PPARs 与 NFκB 间的关系及干预后的变化是我们进一步讨论的课题。

我们观察到正常内皮细胞和单核细胞中 PPARα、PPARγ、NFκB 均有表达,主要定位于细胞浆内,在相应的活化物作用下,就可出现一个在形态学上显著的特点:从细胞浆到细胞核的"核移位"过程。细胞免疫化学染色可见细胞核黄染,这个特征可以间接地反应转录因子的活化。与流式细胞仪的定量指标联合应用可以较好地反映核转录因子的活化强度。在一定范围内是可行的。

参 考 文 献

[1] Su JL, Kilpatrick KE, Champion BR, et al. Fluorescent microtiter screening assay for immunocytochemically reactive antibodies[J]. Bio Techniques, 1997;22(2):320－324.

[2] 史泓浏,陈 琪,蔡海江. 三种血浆脂蛋白氧化繁感度的比较[J]. 南京医科大学学报,1996(1);16:24－27.

[3] Hobbs HH, White AL. Lipoprotein(a): intrigues and insights[J]. Curr Opin Lipidol, 1999;10(2):225－236.

[4] Torra IP, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator－activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging[J]. Curr Opin Lipidol, 1999;10(2):151－159.

(上接第 575 页)

[J]. Dis Colon Rectum, 1997:40(3):322－325.

[6] Zheng X, Hu L, Chen F, et al. Expression of Ki－67 antigen, epidermal growth factor recept Epstein－Barr virus－encoded latent membrane protein(Lmpl) nasopharyngeal carcinoma[J]. Eur J Cancer Boral Oncol, 1994;30B(5):290－295.

[7] 董 频. P53 基因表达,细胞增殖抗原 Ki－67 与下咽癌关系的探讨[J]. 山东医科大学基础医学院学报,2000;14(6):324－326.

[8] Holt PR. Is Ki－67 a better proliferative marker in colon than proliferating cell nuclear antigen[J]? Cancer Epider moil Biomarkers Prev, 1997;6(2):131.

[9] 向明亮,吴韵芳,王纾宜. 喉非典型增生和鳞癌的 PCNA、P21 表达及其意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,1998;4(3):148－150.

[10] 张欣欣,徐洪君,郭永清,等. 增殖细胞核抗原在喉粘膜不典型增生及喉癌组织中表达的意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,1998;4(4):243－245.

[11] Sarac S, Ayhan A, Hosal S, et al. Prognostic significance of PCNA expression in laryngeal cancer[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1998;124(2):1321－1324.