

# 结肠癌中 EZH2 和 Ki-67 表达的临床意义

杨卫东, 张 搏, 张亚冰(重庆市第一人民医院普通外科 400011)

**【摘要】** 目的 探讨果蝇 *zeste* 基因增强子 2(EZH2)、增殖细胞核抗原(Ki-67)在正常结肠黏膜、腺瘤组织与结肠癌组织中的表达及其二者之间的相关性。方法 采用免疫组织化学 SP 法检测 EZH2、Ki-67 在 20 例正常结肠黏膜、25 例腺瘤组织及 64 例结肠癌组织中的表达情况。结果 EZH2 在肠癌组织中阳性表达率为 70.3%, 明显高于正常结肠黏膜和腺瘤组织中的表达, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Ki-67 在肠癌组织中阳性表达率为 81.3%, 明显高于正常结肠黏膜中的表达, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。EZH2 的表达与结肠癌的 Dukes 分期和淋巴结转移有关, 而与性别、年龄、发病部位、分化程度等无关。Ki-67 的表达与结肠癌的 Dukes 分期有关, 与性别、年龄、发病部位、分化程度和淋巴结转移等无关。在结肠癌组织中, EZH2 与 Ki-67 呈正相关,  $r = 0.78$ 。结论 EZH2 和 Ki-67 可能在结肠癌的发生和发展中起协同作用, 可作为判定结肠癌恶性程度及预后的参考指标。

**【关键词】** 结肠癌; 果蝇 *zeste* 基因增强子 2; 增殖细胞核抗原; 免疫组织化学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.22.018 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)22-2820-02

**Expression and correlation of EZH2 and Ki-67 in colon carcinoma** YANG Wei-dong, ZHANG Bo, ZHANG Ya-bing (General Surgery of The First People Hospital of Chongqing, Chongqing 400011, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the expression and correlation of EZH2 and Ki-67 in normal colon mucosa, colon adenoma and colon carcinoma. **Methods** The representations of EZH2 and Ki-67 in the 20 cases of normal colon tissues, 25 cases of colon adenoma and 64 cases of colon carcinoma were detected by immunohistochemical method. **Results** The expression of EZH2 was higher in colon carcinoma than that in normal colon mucosa and colon adenoma ( $P < 0.05$ ). Besides, it was closely related to the Dukes stage of colon carcinoma and lymphatic metastasis ( $P < 0.05$ ), except of gender, age, location and differentiation. While the expression of Ki-67 was higher in colon carcinoma than that in normal colon mucosa ( $P < 0.05$ ). It was closely related to the Dukes stage of colon carcinoma ( $P < 0.05$ ), except of gender, age, location lymphatic metastasis and differentiation. It was significantly correlation between EZH2 and Ki-67 ( $r = 0.78, P < 0.05$ ). **Conclusion** EZH2 and Ki-67 may have synergistic effect on each other, which contribute a lot to the development and the seriousness of colon carcinoma. They could be as a predictor of prognosis.

**【Key words】** colon carcinoma; EZH2; Ki-67; immunohistochemistry

大肠癌是世界第 3 大常见恶性肿瘤, 在欧美国家居恶性肿瘤死因的第 2 位<sup>[1-2]</sup>。随着我国饮食结构、生活习惯和环境的改变, 其发病率逐年上升<sup>[3]</sup>, 和大多数恶性肿瘤一样, 大肠癌的预后因素尚不清楚。核蛋白增殖细胞核抗原(Ki-67)是恶性肿瘤细胞的一个特异性生物学标记物, 只出现在细胞的循环期, 而不出现于细胞静止期, 能直观反映肿瘤细胞增殖活性和判断肿瘤预后, 也是肿瘤恶性转化的一个潜在指标<sup>[4]</sup>。果蝇 *zeste* 基因增强子 2(EZH2) 是近年发现的一种人类癌基因, 为 PCG 基因家族的重要成员之一。近年研究发现, EZH2 参与恶性肿瘤的发生和发展, 基因表达调节及生长控制具有多潜能性<sup>[5-6]</sup>。本研究通过检测 EZH2、Ki-67 在结肠癌、腺瘤及正常结肠黏膜中的表达, 分析与结肠癌生物学行为的关系及二者的关系, 以期临床提供参考指标。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 收集本院 2006 年 1 月至 2010 年 6 月结肠癌手术标本 64 例, 所有组织切片 HE 染色后均经病理学检查证实。肿瘤临床分期参照 2002 年国际抗癌联盟 UICC 公布的恶性肿瘤 TNM 分期标准。所有病例术前均未进行任何抗肿瘤治疗。所有标本均经 10% 中性甲醛固定、石蜡包埋, 4  $\mu\text{m}$  厚连续切片, 常规 HE 染色。64 例患者中男 46 例, 女 18 例, 年龄 36~75 岁, 平均 58 岁。大体形态: 隆起型 19 例, 浸润型 16 例, 溃疡型 29 例; 分化程度: 高分化 12 例, 中分化 39 例, 低分化 13 例; 浸润深度: 浅层 9 例, 深层 55 例; 淋巴结转移: 无淋巴结转移

30 例, 有淋巴结转移 34 例。并另取同期结肠腺瘤组织活检标本 25 例及正常结肠组织(结肠癌远端正常组织)活检标本 20 例作为对照。

**1.2 试剂** 一抗鼠抗人 EZH2 单克隆抗体为即用型(北京中杉生物公司产品), 鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体为即用型(福建迈新生物技术开发有限公司产品)。过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)染色试剂盒, 二甲苯联苯胺试剂盒(晶美生物工程有限公司产品)。

**1.3 方法** 免疫组化 SP 染色主要步骤为: 4  $\mu\text{m}$  石蜡切片经二甲苯脱蜡和乙醇梯度脱水后, 3% 过氧化氢处理 10 min; 抗原修复: EZH2 微波修复(92  $^{\circ}\text{C}$ , 7 min); Ki-67 参照说明书进行高压修复后在室温条件下冷却至室温; 50  $\mu\text{L}$  过氧化酶阻断溶液室温孵育 10 min; 50  $\mu\text{L}$  正常非免疫动物血清室温孵育 10 min; 除去血清, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 遍; 滴加一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 滴加二抗, 室温孵育 10 min; 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液室温孵育 10 min; 加新鲜配制的二氨基联苯胺溶液显色 3~10 min, 显微镜下观察细胞质和(或)胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞; 苏木素复染, 中性树脂封片, 光镜下观察结果。阴性对照采用 0.01 mol/L PBS(pH = 7.4)液体代替一抗, 其他步骤不变。

**1.4 结果判定** 免疫组化结果判定: EZH2 主要表达在细胞核, 光镜下观察到细胞核有棕黄色颗粒沉淀为阳性染色; Ki-67 阳性定位于细胞核中。呈棕黄色颗粒, 不染为阴性。用双盲

法对染色结果进行评估,在 400 倍显微镜下每张载玻片计数 5 个视野,计数每个视野中细胞总数及阳性的细胞数。参照文献按染色强度评分<sup>[7]</sup>:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。再按阳性细胞所占的百分比评分:阴性为 0 分,阳性细胞小于 25% 为 1 分,25%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分,2 个分值的乘积大于 3 为阳性。

**1.5 统计学方法** 所有数据采用 SPSS12.0 统计软件进行分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验,2 项指标间相关性采用 Spearman 相关分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 EZH2 和 Ki-67 在正常结肠黏膜、腺瘤组织和结肠癌组织中的表达** EZH2 主要表达于细胞核,部分胞浆着色。本研究 EZH2 在正常结肠黏膜中无阳性表达,在腺瘤组织中有 3 例(12%)阳性表达,肠癌组织中有 45 例(70.3%)阳性表达,3 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) (表 1)。EZH2 的表达与结肠癌的 Dukes 分期和淋巴结转移有关(表 2),与性别、年龄、发病部位、分化程度等无关。Ki-67 主要表达于细胞核,本研究正常结肠黏膜中 8 例(40%)阳性表达,在腺瘤组织中有 19 例(76%)阳性表达,肠癌组织中有 52 例(81.3%)阳性表达,3 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) (表 1)。Ki-67 的表达与结肠癌的 Dukes 分期有关(表 2),与性别、年龄、发病部位、分化程度和淋巴结转移等无关。

表 1 EZH2、Ki-67 在 3 组中的表达情况[n(%)]

组别	n	EZH2 阳性	Ki-67 阳性
正常结肠黏膜组	20	0(0.0)	8(40.0)
腺瘤组织组	25	3(12.0)	19(76.0)
结肠癌组	64	45(70.3)	52(81.3)

表 2 EZH2、Ki-67 表达与结肠癌临床病理参数的关系

项目	n	EZH2		P	Ki-67		P	
		阳性	阴性		阳性	阴性		
Dukes 分期	A+B	38	23	15	<0.05	35	3	<0.05
	C+D	26	22	4		17	9	
淋巴结转移	有	33	27	6	<0.05	28	5	>0.05
	无	31	18	13		24	7	

**2.2 EZH2、Ki-67 表达的相关性分析** 在结肠癌组织中,二者呈正相关, $r = 0.78, \chi^2 = 4.34, P = 0.006$ (表 3)。

表 3 EZH2、Ki-67 在结肠癌中表达的相关性

EZH2	Ki-67		合计
	+	-	
+	36	9	45
-	16	3	19
合计	52	12	64

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

**3 讨 论**

随着生活水平的提高和饮食习惯的西化,结、直肠癌的发病率在我国呈上升趋势。恶性肿瘤的形成需要包括涉及增殖、浸润、转移及耐药等多个基因参与作用<sup>[8]</sup>。

恶性肿瘤是多基因参与和多步骤演化而产生。恶性肿瘤

形成后,癌细胞经过不断的突变和选择,其生物学行为逐步升级为恶性行为,有多个肿瘤基因参与,包括浸润、转移及耐药,涉及多个癌基因的激活并参与作用<sup>[8]</sup>。

EZH2 是 PCG 基因家族中的重要成员之一,可通过促进细胞  $G_2 \sim M$  期转化而促进细胞增殖,进一步研究证实,EZH2 高水平表达与恶性肿瘤侵袭和转移能力密切相关<sup>[9]</sup>。EZH2 可作为多种恶性肿瘤(如前列腺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌等)预后评估的重要生物学标记物。Athassiadou 等<sup>[10]</sup>通过免疫组化检查乳腺癌中 EZH2、Ki-67 和 p53 的表达,结果表明,EZH2 在 64% 的病例中表达,并与 Ki-67 和 p53 高表达呈正相关,多因素统计分析淋巴结转移是 EZH2 表达的主要预测因子,而且 EZH2 表达与患者生存期密切相关。Li 等<sup>[11]</sup>检测 EZH2 在人卵巢癌细胞株中的表达情况,结果发现 EZH2 呈过表达状态,且其过表达促进了癌细胞的增殖性和侵袭性,推测 EZH2 可能是卵巢癌治疗的潜在靶点。Choi 等<sup>[12]</sup>对胃癌细胞株进行免疫组化检测,结果表明 EZH2 的高表达与肿瘤增殖及远处转移密切相关。本研究发现,EZH2 在结肠癌中表达明显高于正常肠黏膜和腺瘤组织,而且与结肠癌的 Dukes 分期及淋巴结转移有关,与性别、年龄、发病部位、分化程度等无关,由此提示 EZH2 作为一个新的癌基因,可能与结肠癌的发生和发展密切相关。同样当肿瘤组织发生转移时,EZH2 表现为促进肿瘤转移的效应,但其促使淋巴结转移的相关机制尚不清楚,需进一步深入研究。

研究肿瘤增殖动力学的一个重要方面是检测肿瘤细胞的增殖活性,细胞增殖活性是判断肿瘤预后的指标之一。Ki-67 的表达与细胞周期密切相关。Oka 等<sup>[13]</sup>研究表明 Ki-67 是预测非小细胞肺癌术后复发有价值的标记物。Li 等<sup>[14]</sup>认为 Ki-67 可作为分子标记物评价结、直肠癌手术切缘状况。Rakovitch 等<sup>[15]</sup>通过对 213 例行保乳手术的乳腺导管原位癌标本进行免疫组化检测,结果表明 HER2 和 Ki-67 的高表达是保乳术后局部复发的高危因素。Ma 等<sup>[16]</sup>对大肠癌组织中 CD34、CK19、CK20 和 Ki-67 的表达进行检测,结果提示 Ki-67 可能是大肠癌重要的预后因子。本研究发现,Ki-67 在结肠癌中的表达明显高于正常结肠黏膜和腺瘤组织,3 组间差异有统计学意义,Ki-67 随结肠癌的 Dukes 分期增加而表达增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与患者的性别、年龄、发病部位、有无淋巴结转移和分化程度等无关。由此提示结肠腺瘤和结肠癌是同一病变的不同阶段,是大肠癌的早期事件。

本文将 EZH2 与 Ki-67 联合检测,探讨二者在结、直肠癌的生长、浸润和转移中的作用,结果表明二者在结肠癌中的表达呈正相关,二者可能存在协同作用。EZH2 高表达的肿瘤具有强的侵袭力、转移力,并与淋巴结转移密切相关,预后不良。有关 EZH2 与 Ki-67 间具体作用机制还有待于进一步的深入研究。

**参考文献**

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59: 225-249.  
 [2] Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006[J]. Ann Oncol, 2007, 18: 581-592.  
 [3] 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(4): 534-536.  
 [4] 柏鉴动, 韩国新, 周玲. 胃癌及癌前病变 p53 蛋白及 Ki-67 抗原检测的临床意义[J]. 山东医药, (下转第 2823 页)

**2.2 甲状腺激素与肝功生化指标相关性分析** 见表 2。由表 2 可见, ALP 与甲状腺激素呈正相关( $P < 0.01$ ), ALB 与 FT4 呈负相关( $P < 0.01$ )。

**表 2 甲状腺激素及血脂各指标相关性分析**

项目	ALT	AST	GGT	ALP	TB	TP	ALB
FT3	<i>r</i> 0.078	0.057	0.017	0.306	0.022	-0.036	-0.199
	<i>P</i> 0.498	0.620	0.883	0.006	0.893	0.757	0.081
FT4	<i>r</i> 0.144	0.035	0.125	0.326	0.131	-0.204	-0.395
	<i>P</i> 0.210	0.760	0.274	0.004	0.467	0.073	0.001

**3 讨 论**

甲亢与肝功能生化指标的改变有密切关系。甲亢本身可导致肝功能损伤即甲亢性肝损害, 甲亢性肝损害多见甲亢病程长、年龄大且病情较重又长期未得到合理治疗的患者。甲亢性肝损害临床症状较轻微, 也可以无肝功能明显异常, 只表现为甲亢症状。甲亢性肝损害严重者可出现肝功能明显异常。多数学者认为甲亢性肝损害的病因及发病机制如下: (1) 甲状腺激素的直接毒性作用<sup>[4]</sup>; (2) 分解代谢亢进, 肝糖原、必需氨基酸、蛋白质和维生素耗损过多, 造成负氮平衡, 营养不良加重肝细胞损害; (3) 自身免疫反应引起肝损害; (4) 甲亢不同程度影响肝内各种酶的活力<sup>[5]</sup>; (5) 甲亢的高代谢导致肝脏相对缺血缺氧和肝脏营养不良, 引起自由基对肝细胞的损害<sup>[6-7]</sup>。Videla 等<sup>[8]</sup>认为甲亢可导致肝脏 Kupfer 细胞增生, 血清 AST 增加, 肝内还原型谷胱甘肽耗竭; 甲亢性肝损害时, 肝脏合成甲状腺结合球蛋白减少, 导致游离型甲状腺激素增加, 加重肝损害; 甲亢并发心力衰竭、感染和休克时, 易引起肝损害; 甲亢是一种自身免疫性疾病, 可合并原发性胆汁性肝硬化。但甲亢性肝损害确切原因目前仍不完全明确。

本研究发现, 甲亢患者 ALT、AST、GGT、ALP、TB 明显高

于健康对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); TP、ALB 明显低于健康对照组, 差异也有统计学意义( $P < 0.01$ )。ALP 与 FT3 和 FT4 呈正相关, ALB 与 FT4 呈负相关, 由此提示无论是甲亢治疗后或初诊者都应监测其肝功能生化指标的变化, 这对了解代谢紊乱程度、估计病情、判定肝损害原因、指导抗甲亢药物的应用有重要意义。

**参考文献**

- [1] 陈珊, 陈文旭. 108 例甲状腺功能亢进患者肝功能指标分析及意义[J]. 福建医药杂志, 2009, 31(5): 87.
- [2] 司玮, 王长江. 甲状腺功能亢进症伴肝功能损害的临床分析[J]. 安徽医学, 2010, 31(4): 332.
- [3] 郝建华. 甲亢及甲减患者血清生化指标的改变及临床意义[J]. 邯郸医学高等专科学校学报, 2001, 14(6): 495.
- [4] Woeber KA. Methimazole induced hepatotoxicity[J]. Endocr Pract, 2002, 8(3): 222-241.
- [5] Brenner B, Fandrey J, Jelkman W. Serum immunoreactive erythropoietin in hyper and hypothyroidism: Clinical observations related to cell culture studies [J]. Eur J Haematol, 1994, 53(1): 6-10.
- [6] 王思宏, 葛文松. 44 例甲亢性肝损害的临床分析[J]. 中国实用医药杂志, 2007, 2(15): 77-78.
- [7] 周颖, 曾林波, 李喆. 甲状腺功能亢进症患者肝功能生化指标的测定及其临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 17(2): 115-116.
- [8] Videla LA, Smok G, Troneaso P, et al. Influence of hyperthyroidism Oil lindane2 induced hepatotoxicity in the rat [J]. Biochem Pharmacol, 1995, 50(10): 1557-1565.

(收稿日期: 2012-06-26)

(上接第 2821 页)

2007, 47(22): 46-47.

- [5] Brugant RJ, Cross NA, Eaton CL, et al. EZH2 promotes proliferation and invasiveness of prostate cancer cells[J]. Prostate, 2007, 67(5): 547-556.
- [6] Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroup in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate and breast[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(2): 268-273.
- [7] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229-231.
- [8] Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma [J]. Nature, 2008, 455(7216): 1069-1075.
- [9] Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression[J]. Br J Cancer, 2012, 106(2): 243-247.
- [10] Athanassiadou AM, Tsipis A, Patsouris E, et al. Enhancer of zeste homologue 2 expressions in breast carcinoma smears in relationship with p53, Ki-67 and other prognostic parameters[J]. Acta Cytol, 2011, 55(2): 180-186.
- [11] Li H, Cai Q, Godwin AK, et al. Enhancer of zeste homologue 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells [J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(12):

1610-1618.

- [12] Choi JH, Song YS, Yoon JS, et al. Enhancer of zeste homologue 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer [J]. APMIS, 2010, 118(3): 196-202.
- [13] Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, et al. The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung [J]. Anticancer Res, 2011, 31(12): 4277-4282.
- [14] Li N, Wang J, Shen S, et al. Expression of p53, Ki-67 and c-Myc proteins is predictive of the surgical molecular margin in colorectal carcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(3): 479-487.
- [15] Rakovitch E, Nofech-Mozes S, Hanna W, et al. HER2/neu and Ki-67 expression predict non-invasive recurrence following breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ [J]. Br J Cancer, 2012, 106(6): 1160-1165.
- [16] Ma YL, Peng JY, Zhang P, et al. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer [J]. Med Oncol, 2010, 27(2): 304-309.

(收稿日期: 2012-06-23)