

ki-67 与 survivin 的表达与大肠腺瘤癌变的相关性分析

常 圆¹, 关景明^{2△}

(1. 哈尔滨医科大学附属第四医院消化内科, 哈尔滨 150000;

2. 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科, 哈尔滨 150086)

摘要:目的 检测正常大肠黏膜、大肠腺瘤、伴鸡皮样黏膜(CSM)改变的大肠腺瘤和腺瘤癌变组织中代表细胞增殖的标志物 ki-67 和凋亡相关因子 survivin 的表达情况,探讨其与大肠腺瘤癌变的关系。方法 采用免疫组织化学法检测正常大肠黏膜、伴 CSM 改变的大肠腺瘤、无 CSM 改变的大肠腺瘤和大肠腺瘤癌变标本中代表细胞增殖的标志物 ki-67 和细胞凋亡相关因子 survivin 的表达,每种标本各 18 例。结果 免疫组织化学结果提示,ki-67 阳性反应产物位于细胞核内,呈棕褐色,细胞质一般不着色。survivin 主要表达于细胞质,其蛋白阳性反应为淡黄到棕黄色颗粒,在正常黏膜中不表达。在大肠腺瘤癌变组织、伴 CSM 改变的大肠腺瘤、大肠腺瘤及正常大肠黏膜中 ki-67 的阳性表达率分别是 77.8%、83.3%、33.3%、5.6%。在大肠腺瘤癌变组织、伴 CSM 改变的大肠腺瘤、大肠腺瘤及正常大肠黏膜中 survivin 的阳性表达率分别是 72.2%、77.8%、33.3%、0.0%。与正常大肠黏膜组织相比,其他 3 中黏膜组织的 ki-67 和 survivin 阳性率均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);伴 CSM 改变的大肠腺瘤及腺瘤癌变组织 ki-67 和 survivin 阳性率高于大肠腺瘤,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 伴 CSM 改变的大肠腺瘤 ki-67 与 survivin 的表达升高,存在活跃的细胞增殖,同时细胞凋亡受抑制,这种生物学特性的改变使伴 CSM 改变的大肠腺瘤癌变的概率增加。

关键词:大肠腺瘤; 鸡皮样黏膜; 细胞增殖

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.15.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)15-2222-03

Correlation of expression of ki-67 and survivin with the canceration of colorectal adenoma

CHANG Yuan¹, GUAN Jingming^{2△}

(1. Department of Gastroenterology and Hepatology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150000, China; 2. Department of Gastroenterology and Hepatology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Objective To examine the expression of ki-67 and survivin in the normal colorectal mucosa, colorectal adenoma, adenoma surrounding with chicken skin mucosa(CSM) and colorectal adenoma canceration. And to explore the relationship between the expression of ki-67 and survivin and canceration of colorectal adenoma. **Methods** Immunohistochemical staining was used to examine the expression ki-67 and survivin in the normal colorectal mucosa, colorectal adenoma, adenoma surrounding with CSM and canceration of colorectal adenoma. Every type of tissue had 18 cases. **Results** The browned positive products of ki-67 was located in the nucleus, and the cytoplasm was not staining. Survivin was mainly expressed in cytoplasm, and its positive products were yellowish to brownish yellow granules, and it was not expressed in normal mucosa. The positive expression rates of ki-67 in the canceration of colorectal adenoma, adenoma surrounding with CSM, colorectal adenoma and normal colorectal mucosa were 77.8%, 83.3%, 33.3% and 5.6%, respectively. And the positive expression rates of ki-67 in the canceration of colorectal adenoma, adenoma surrounding with CSM, colorectal adenoma and normal colorectal mucosa were 72.2%, 77.8%, 33.3% and 0.0%. The positive expression rates of ki-67 and survivin in the other three types of tissues were significantly higher than that in the normal colorectal mucosa ($P < 0.05$). And the positive expression rates of ki-67 and survivin in canceration of colorectal adenoma and adenoma were significantly higher than that in the colorectal adenoma ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of ki-67 and survivin in the colorectal adenoma with CSM has increased, as well as the presence of active cell proliferation and inhibition of cell apoptosis. These changes of the biological characteristics make the probability of colorectal adenoma with CSM increased.

Key words: colorectal adenomas; chicken skin mucosa; cell proliferation

恶性肿瘤发生与发展的过程是细胞过度增殖和细胞凋亡受抑制的过程。结直肠癌的发生也不例外,正常肠黏膜上皮细胞存在程序性死亡,即细胞凋亡,籍以清除衰老的细胞,维持黏膜细胞生理平衡。各种因素引起肠黏膜上皮细胞过度累积时,就有可能引起结直肠癌的发生。因此,细胞凋亡的异常和细胞的过度增殖导致增殖/凋亡比值加大是结直肠癌发生的重要因

素之一。ki-67 作为标记细胞增殖状态的抗原,近年已广泛应用于评价细胞的增殖状态,判断肿瘤的危害性,是最有研究价值的细胞增殖标记物。ki-67 是一种与细胞增殖密切相关的核内蛋白,它的表达与细胞周期密切相关,因其只表达于增殖细胞的各期中,静止期细胞阴性,而被作为评价细胞生长分数的有效指标,是反映细胞增殖的良好指标^[1-3]。ki-67 的研究多用

于判断肿瘤的良、恶性程度,也用于探讨细胞增殖特性,细胞周期与肿瘤的生长方式、浸润方式、复发、转移等生物学行为与预后的关系^[4]。survivin 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子^[5-6], survivin 的高表达可抑制多种因素诱导的细胞凋亡。本文通过对细胞增殖和凋亡相关基因与大肠腺瘤癌变关系进行研究,探讨大肠癌发病机制,旨在为大肠癌的早期诊断及大肠腺瘤早期合理治疗提供一些借鉴。

1 材料与与方法

1.1 材料来源 标本收集于哈尔滨医科大学附属第二医院行结肠镜检查及结肠镜下治疗的黏膜组织。正常大肠黏膜为结肠镜检查未见异常的大肠黏膜活体检查组织,共 18 例;腺瘤 18 例;癌变组织来源于接受肠镜检查,经病理及临床诊断 Duke's A 及 B 期活检的标本,共 18 例;伴鸡皮样黏膜(CSM)的大肠腺瘤,直径为 0.5~2.0 cm、山田 I~III 型,经结肠镜下腺瘤整块电凝电切除,共 18 例。每种组织标本中,男女各 9 例;年龄 25~72 岁,中位年龄 55.4 岁。

1.2 方法 标本均经过 4% 多聚甲醛溶液固定后常规石蜡包埋,4 mm 连续切片备用。ki-67 一抗为鼠抗人单克隆抗体、survivin 一抗为鼠抗人多克隆抗体;二抗为山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体,二氨基联苯胺(DAB)显色剂。试剂均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。采用免疫组织化学染色对 ki-67 与 survivin 进行染色。实验步骤严格按试剂盒说明书操作:石蜡切片脱蜡,高压进行抗原修复,DAB 显色,苏木精复染,常规脱水、透明,中性树脂封片,显微镜下观察。用已知阳性切片作阳性对照,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)代替一抗作阴性对照。阳性结果判定:ki-67,以细胞核染色呈棕褐色为免疫组织化学阳性切片,随机观察 5 个高倍视野($\times 400$),每个视野计数 100 个肿瘤细胞;当阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性, $< 10\%$ 为阴性;survivin 以细胞质染为棕黄色为阳性细胞,计数 5 个随机高倍视野($\times 400$)的阳性细胞数,取平均值,当阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性, $< 10\%$ 为阴性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.0 软件包进行统计学处理,计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

18 例正常大肠黏膜组织中有 1 例(5.6%)ki-67 呈阳性染色;18 例大肠腺瘤组织中 6 例(33.3%)ki-67 呈阳性染色;18 例伴 CSM 的大肠腺瘤组织中 15 例(83.3%)ki-67 呈阳性染色;18 例腺瘤癌变组织中 14 例(77.8%)ki-67 呈阳性染色。与正常大肠黏膜组织相比,其他 3 种黏膜组织的 ki-67 阳性率均升高,差异有统计意义($P < 0.05$);伴 CSM 的大肠腺瘤及腺瘤癌变组织 ki-67 阳性率高于大肠腺瘤,差异有统计意义($P < 0.05$)。18 例正常大肠黏膜组织中有 0 例(0.0%)survivin 呈阳性染色,18 例大肠腺瘤组织中 6 例(33.3%)survivin 呈阳性染色,18 例伴 CSM 的大肠腺瘤组织中 14 例(77.8%)survivin 呈阳性染色;18 例腺瘤癌变组织中 13 例(72.2%)survivin 呈阳性染色,与正常大肠黏膜组织相比,其他 3 种黏膜组织的 survivin 阳性率均升高,差异有统计意义($P < 0.05$);伴 CSM 的大肠腺瘤及腺瘤癌变组织 survivin 阳性率高于大肠腺瘤,差异有统计意义($P < 0.05$)。

3 讨论

大肠癌在我国是常见恶性肿瘤且发病率明显上升^[7],是威

胁人类生命的疾病之一。大肠癌的发病是一个多因素多步骤的过程,这些因素包括内因和多种外因(如生物、物理、化学等因素),并且各种因素间相互作用^[8]。1980 年至今,在大肠癌高发地区的病例对照研究发现,大肠癌的高危因素包括肠息肉史、慢性腹泻、慢性便秘、黏液血便、不良生活事件史(如离婚、近亲属死亡等)、饮不洁水史、阑尾手术史和家族肿瘤史等^[9]。

目前大多数的文献资料均认为腺瘤癌变率的高低与腺瘤的大小、病理类型、有无蒂及不典型增生程度等因素有关^[10]。此外,值得一提的是近些年来临床上发现的扁平腺瘤、凹陷型腺瘤和锯齿状腺瘤的癌变和以往的腺瘤有不同之处需要引起重视。另外,对于腺瘤表面形状如糜烂、溃疡、充血及周围伴随的一些改变(如 CSM 改变)与腺瘤癌变率的关系需要进一步深入研究^[11]。

1998 年,Shatz 等^[12]对腺瘤周围出现一种特殊的黏膜形态改变进行了报道,这种特殊的形态改变常伴发于大肠癌或直径大于 1.0 cm 的腺瘤,被命名为 CSM。在组织学上,CSM 是由于结肠黏膜中充满脂质的巨噬细胞大量聚集所引起。本研究结果提示,伴 CSM 的结直肠腺瘤,存在细胞增殖及细胞凋亡的有关改变,与不伴 CSM 改变的结直肠腺瘤在生物学特性上有一定的差异。

肿瘤的发生是细胞增殖与细胞凋亡平衡失调的结果^[13],结直肠癌的发生发展与细胞增殖及细胞凋亡有密切关系。ki-67 作为标记细胞增殖状态的抗原,近年来已广泛应用于评价细胞的增殖状态,判断肿瘤的危重性,是最有前途的细胞增殖标记物^[14]。

在腺瘤癌变过程中,凋亡相关因子 survivin 蛋白的表达逐渐升高,survivin 表达可抑制结直肠癌细胞凋亡^[15],癌细胞得以继续分裂,造成肿瘤邻近和远隔部位转移灶的形成,故 survivin 蛋白的测定可作为临床判断大肠癌预后的指标之一。在细胞凋亡过程中,其关键步骤是由 caspase 系列酶诱发的细胞凋亡级联反应(cascade),其中 caspase-3 是 caspase 家族中最重要的成员,是凋亡途径中的关键效应分子。大多数触发细胞凋亡的因素,最终均需要通过 caspase-3 介导的信号传导途径导致细胞凋亡^[16],其中就包括 survivin 的凋亡抑制效应^[17]。

本研究结果发现,ki-67 在腺瘤癌变、伴 CSM 的大肠腺瘤及不伴 CSM 的大肠腺瘤中的阳性率比正常肠黏膜高,伴 CSM 的大肠腺瘤与癌变组织阳性率水平差异无统计学意义($P > 0.05$),说明伴 CSM 的大肠腺瘤具有较高的增殖活性,组织增殖能力强,接近癌变组织,异常细胞可无限增殖。说明 CSM 的大肠腺瘤在一定程度上已偏离了正常的细胞生长,比不伴有 CSM 的大肠腺瘤更易癌变。本研究结果同时显示,survivin 在大肠腺瘤癌变组织中和伴 CSM 的大肠腺瘤组织中阳性率较其他组织高,但前两者阳性率相当,且伴 CSM 的大肠腺瘤与不伴 CSM 的大肠腺瘤中 survivin 阳性率水平差异有统计学意义($P < 0.05$),说明伴 CSM 的大肠腺瘤,其细胞凋亡受到抑制,延长了异常细胞的生存期,增加了这些细胞其他基因改变机会,如癌基因 ras 的突变和抑癌基因 Dcc、p53 的突变或缺失,并且可使肿瘤细胞逃避细胞周期 G2/M 期检测点的监控^[18],导致肿瘤细胞异常分裂增殖。

成人大肠腺瘤伴 CSM 改变后其生物学特点与无此种变化的大肠腺瘤有所不同,前者存在着活跃的细胞增殖,同时细胞的凋亡受到抑制,可能是比其他大肠腺瘤更易癌变的原因。

大肠腺瘤癌变组织与大肠腺瘤伴 CSM 中 ki-67 和 survivin 的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), ki-67 和 survivin 的这种变化可能参与了伴 CSM 改变的大肠腺瘤癌变过程, 在大肠癌的发生发展中起重要作用。

在一定程度上伴 CSM 的大肠腺瘤更易于癌变, 对这类腺瘤要警惕, 临床上遇到伴有 CSM 的大肠腺瘤时, 应早期切除, 无论息肉的大小如何, 都应尽量切除, 并且要切除完全, 同时对这样的患者应该加强随访。

综上所述, 通过对伴 CSM 的大肠腺瘤组织细胞增殖及细胞凋亡相关因素的检测, 提示伴 CSM 的大肠腺瘤中一方面存在活跃的细胞增殖, 另一方面细胞凋亡受抑制, 两方面失衡会导致腺瘤恶变的发生。在一定程度上, 伴 CSM 的大肠腺瘤比不伴 CSM 的大肠腺瘤易癌变, 应给予重视, 尽量早期切除, 并加强随访。

参考文献

[1] 李建国, 马国章, 杨志伟, 等. CD31 和 Ki-67 在大肠癌组织中的表达和相关性研究[J]. 中国误诊学杂志, 2004, 4(1): 22-24.

[2] Lumachi F, Orlando R, Marino F, et al. Expression of p53 and Ki-67 as prognostic factors for survival of men with colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9): 3965-3967.

[3] Yamaguchi T, Iijima T, Wakaume R, et al. Underexpression of miR-126 and miR-20b in hereditary and nonhereditary colorectal tumors[J]. *Oncology*, 2014, 87(1): 58-66.

[4] Lee KW, Park SK, Yang HJ, et al. Microsatellite Instability Status of Interval Colorectal Cancers in a Korean Population[J]. *Gut Liver*, 2016, 10(5): 781-785.

[5] Vaksman Z, Garner HR. Somatic microsatellite variability as a predictive marker for colorectal cancer and liver cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 5760-5771.

[6] Eveno C, Nemeth J, Soloman H, et al. Association between a high number of isolated lymph nodes in T1 to T4 N0M0 colorectal cancer and the microsatellite instability phenotype[J]. *Arch Surg*, 2010, 145(1): 12-17.

[7] 何丹丹, 赵立昀, 周洁, 等. 1993—2007 年上海市闵行区恶性肿瘤发病死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2011, 20(12): 897-902.

[8] Zeng FF, Xie HL, Fan F, et al. Association of dietary fat intake with the risk of hip fractures in an elderly Chinese population: A matched case-control study[J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2015, 15(10): 1171-1178.

[9] 秦雪玲. 结直肠癌膳食及相关危险因素的病例对照研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2012.

[10] 陈坤, 裘炯良, 张扬. 大肠癌危险因素的 Meta 分析[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2002, 31(4): 254-258.

[14] 郭杰, 王辉, 王彦. 结直肠腺瘤癌变指标的病理分析[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2000, 14(4): 196-295.

[12] Shatz A, Weenstock B, Thyssen P, et al. Colonic chicken skin mucosa: an endoscopic and histological abnormality adjacent to colonic neoplasms[J]. *Am J Gastroenterol*, 1998, 93(4): 623-627.

[16] 刘舒颖, 王菊岩. 大肠息肉癌变的内镜诊断及病理分析[J]. *广东医学院学报*, 2003, 21(1): 33-35.

[17] Cho YA, Lee J, Oh JH, et al. Dietary Inflammatory Index and Risk of Colorectal Cancer: A Case-Control Study in Korea[J]. *Nutrients*, 2016, 8(8): E469.

[18] Chung EJ, Lee JY, Choe J. Colonic Chicken Skin Mucosa is an Independent Endoscopic Predictor of Advanced Colorectal Adenoma [J]. *Intest Res*, 2015, 13(4): 318-325.

(收稿日期: 2017-01-03 修回日期: 2017-03-09)

(上接第 2221 页)

[4] Lee YH, Hu PJ, Cheng TH, et al. A preclustering-based ensemble learning technique for acute appendicitis diagnoses[J]. *Artif Intell Med*, 2013, 58(2): 115-124.

[5] 陈备, 阮鹤瑞, 徐静, 等. 急性阑尾炎的超声诊断价值[J]. *中国急救医学*, 2015, 23(s1): 89-89.

[6] Chiu YH, Chen JD, Wang SH, et al. Whether Intravenous Contrast is Necessary for CT Diagnosis of Acute Appendicitis in Adult ED Patients? [J]. *Acad Radiol*, 2013, 20(1): 73-78.

[7] 张培培, 颜伟, 曾智, 等. 急性阑尾炎患者白细胞分类计数诊断价值及验证[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(2): 306-308.

[8] 卢宗耀, 冯力. 小儿急性阑尾炎的腹腔镜手术治疗研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2014, 23(2): 153-155.

[9] 董其勇, 徐中良, 刘沙, 等. 106 株急性阑尾炎病原菌耐药性分析及抗菌药物的合理使用[J]. *重庆医学*, 2015, 44

(22): 3058-3059.

[10] 谭子方, 吴文利, 王健, 等. 奥曲肽联合复合辅酶对化脓性阑尾炎患者 Th17/CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(7): 95-97.

[11] 尚妍, 葛春林. Schloffer 瘤研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2013, 28(1): 105-108.

[12] 梁承友, 罗毅, 刘顺顺, 等. 复杂阑尾炎的腹腔镜手术及术后处理[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2013, 16(3): 281-282.

[13] 任莹坤, 韩广森, 赵玉洲, 等. 右半结肠切除治疗阑尾炎术后肠痿疗效分析[J]. *临床外科杂志*, 2015, 23(4): 278-279.

[14] 莫晓乡. 对 1 例阑尾切除术后合并全身炎症反应综合征患者的药学监护[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2013, 13(4): 378-380.

(收稿日期: 2017-03-06 修回日期: 2017-05-14)