

非小细胞肺癌组织中 Ki67、多药耐药基因 GST- π /Topo II / P-gp 的表达及其与临床病理学相关性研究

宋政¹, 陈锡霖^{2①}, 陈宏明³, 李日著³, 唐习强³, 谭荣邦³

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: yifeng0579@126.com;

2. 右江民族医学院附属文山医院, 云南 文山 663000;

3. 右江民族医学院附属医院心胸血管外科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 探讨 Ki67 在非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)组织中的表达及其与多药耐药基因谷胱甘肽-S 转移酶 π (GST- π)、拓扑异构酶 II (Topo II)、P-糖蛋白(P-gp)表达的相关性及其意义。**方法** 采用免疫组化法检测 108 例 NSCLC 患者癌组织中 Ki67、GST- π 、Topo II、P-gp 的表达水平。**结果** Ki67、GST- π 、Topo II、P-gp 在 108 例 NSCLC 患者癌组织中的阳性表达率分别为 95.37%、81.48%、82.40%、38.89%; GST- π 表达与 NSCLC 分化程度有关($\chi^2=6.318, P=0.042$); Ki67 表达与 Topo II 表达有关($\chi^2=6.503, P=0.011$), 共表达率为 80.56%, 但关系不密切($r=0.245, P=0.010$); Ki67 表达与 GST- π 表达有关($\chi^2=4.686, P=0.03$), 共表达率为 76.85%, 但是相关性低($r=0.028, P=0.031$); Ki67 表达与 P-gp 表达无关($P>0.05$)。GST- π 与 Topo II 表达呈正相关($r=0.028, P=0.023$), 共表达率为 70.37%, 但是关系不密切; P-gp 与 GST- π 、Topo II 无相关($P>0.05$)。**结论** Ki67 可能不参与 NSCLC 细胞的多药耐药机制; 三种多药耐药基因可能是通过不同的途径介导 NSCLC 多药耐药。

关键词: 非小细胞肺癌; 多药耐药; Ki67; GST- π ; Topo II; P-gp; 免疫组织化学

中图分类号: R730.26

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)04-0268-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.04.005

Expressions and significances of Ki67, multidrug resistance genes GST- π /Topo II /P-gp in non-small cell lung cancer

Song Zheng¹, Chen Xilin², Chen Hongming³, Li Rizhu³, Tang Xiqiang³, Tan Rongbang³

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: yifeng0579@126.com; 2. Wenshan Hospital Affiliated to Youjiang Medical University for

Nationalities, Wenshan 663000, Yunnan, China; 3. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Ki67 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with expressions of multidrug resistance genes glutathione-S-transferase π (GST- π), topoisomerase II (Topo II) and P-glycoprotein (P-gp) and significance. **Methods** The expression levels of Ki67, GST- π , Topo II and P-gp in tissues of 108 NSCLC cases were detected by immunohistochemistry. **Results** The positive expression rates of Ki67, GST- π , Topo II and P-gp in tissues of 108 patients with NSCLC were 95.37%, 81.48%, 82.40% and 38.89%, respectively. The expression of GST- π was associated with the degree of NSCLC differentiation ($\chi^2=6.318, P=0.042$); Ki67 expression was associated with Topo II expression ($\chi^2=6.503, P=0.011$), the co-expression rate was 80.56%, but the correlation was not significant ($r=0.245, P=0.010$); Ki67 expression was associated with GST- π expression ($\chi^2=4.686, P=0.03$), the co-expression rate was 76.85%, but the correlation was low ($r=0.028, P=0.031$); Ki67 expression was not associated with P-gp expression ($P>0.05$). GST- π was positively correlated with Topo II expression ($r=0.028, P=0.023$), and the co-expression rate was 70.37%, but the relationship was not close; P-gp was not associated with GST- π and Topo II ($P>0.05$). **Conclusion** Ki67 may not participate in the multidrug resistance mech-

① 通信作者, E-mail: 1733562733@qq.com

anism of NSCLC cells; three multidrug resistance genes may mediate NSCLC multidrug resistance by different ways.

Key words: non-small cell lung cancer; multidrug resistance; Ki67; GST- π ; Topo II; P-gp; immunohistochemistry

肺癌是严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤之一,最常见的类型是非小细胞肺癌(NSCLC),约占肺癌的80%。化疗在肺癌治疗中占有重要地位,目前多采用联合化疗方案,但疗效不理想。多药耐药是肺癌化疗失败的根本原因,其耐药的产生往往是多基因、多途径的共同作用。研究证实^[1],GST- π 、Topo II、P-gp等是恶性肿瘤产生多药耐药的物质基础,是目前研究比较多的耐药基因。Ki67抗原是一种与增殖细胞相关的核抗原,与细胞的有丝分裂有关,其表达能反映肿瘤的增殖活性,是公认的细胞增殖活性标志物^[2-3]。目前对Ki67与GST- π 、Topo II、P-gp的关系已有学者报道过,但结果仍存在争议。现就108例NSCLC患者组织中GST- π 、Topo II、P-gp、Ki67表达情况及其与临床病理特征关系,以及他们之间共同表达的相关性报道如下:

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集右江民族医学院附属医院心胸外科2012年5月—2017年2月完整临床资料及术前未经过放化疗的肺癌根治术病例108例。其中男80例,女28例;年龄24~77岁,平均年龄(55.40±9.60)岁;壮族67例,汉族41例;有吸烟史49例,无吸烟史59例;组织学类型:腺癌76例,鳞癌32例;病理学分级:低分化41例,中分化53例,高分化14例;按2009年第7版肺癌国际标准分期^[4]:I期34例,II期49例,III期25例。所有标本均经10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μ m厚切片。

1.2 检测方法 采用免疫组化SP法分别进行检测,Ki67、GST- π 、Topo II、P-gp试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司。严格按照试剂盒说明书步骤进行操作,最后用苏木精复染、脱水、封固。每批染色均设置阴性空白对照组和阳性对照组。

1.3 结果判定 Ki67阳性物质定位于细胞核,P-gp阳性物质定位于癌细胞质上,GST- π 阳性物质定位于癌细胞核或细胞质,Topo II阳性物质定位于细胞核内。胞核或胞质染成棕黄色为阳性,按Volm等^[5]的判断标准,将结果分为阴性(-),弱阳性(+),强阳性(++)。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验法分析Ki67、GST- π 、Topo II、P-gp表达及其与临床病理特征之间的关系;应用Spearman等级相关分析Ki67、GST- π 、Topo II、P-gp各因子表达的相关性;以 $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 Ki67、Topo II、GST- π 、P-gp在NSCLC组织中表达及其与临床病理特征的相关性 NSCLC组织中Ki67、GST- π 、Topo II、P-gp阳性表达率分别为95.37%、81.48%、82.40%、38.89%。GST- π 阳性表达在肿瘤分化程度上差异有统计学意义($\chi^2 = 6.318$, $P = 0.042$);低中分化组(85.36%,84.91%)高于高分化组(57.14%)($\chi^2 = 5.164$, $P = 0.023$; $\chi^2 = 4.873$, $P = 0.027$);Ki67、Topo II、P-gp阳性表达与患者的民族、性别、年龄、有无吸烟、肿瘤大小、有无淋巴结转移、病理类型、分化程度、分期等因素无关($P > 0.05$),见表1。

2.2 NSCLC组织中Ki67、Topo II、GST- π 、P-gp共表达及相关性 Ki67表达与Topo II表达有关($\chi^2 = 6.503$, $P = 0.011$),共表达率为80.56%,Spearman等级相关分析也显示Ki67与Topo II表达呈正相关($r = 0.245$, $P = 0.010$),但是关系不密切;Ki67表达与GST- π 表达有关($\chi^2 = 4.686$, $P = 0.030$),共表达率为76.85%,Spearman等级相关分析显示Ki67与GST- π 表达正相关($r = 0.028$, $P = 0.031$),但是相关性低;Ki67与P-gp表达无相关($P > 0.05$)。GST- π 与Topo II表达正相关($r = 0.028$, $P = 0.023$),共表达率为70.37%,但是关系不密切,P-gp与GST- π 、Topo II无相关($P > 0.05$),见表2、表3。

3 讨论

Ki67表达增加与肿瘤的增殖和侵袭密切相关^[6],是目前检测肿瘤细胞增殖活性最可靠的指标之一^[7],张彩兰等^[8]报道的肺癌Ki67的阳性表达率为100%。本组结果中Ki67在NSCLC的阳性表达率为95.37%,与性别、年龄、民族、肿瘤大小、有无淋巴结转移、肿瘤类型、分化程度、临床分期均无关。

GST- π 作为一种药物代谢酶,能降低化疗药物的细胞毒作用,其阳性表达与肿瘤耐药相关^[9]。本文结果显示,中低分化组GST- π 表达高于高分化组,与李海峰等^[10](126例)研究相同,但与傅兴宁等^[11](63例)、王霞等^[12](57例)、赵琦峰等^[13](58例)不同,可能因为纳入的病例数不同而产生偏倚。Topo II是真核细胞生存必不可少的核酶,直接参与DNA修复、转录及分离,一方面可作为细胞的增殖指数;另一方面可作为抗癌药物的作用靶点,化疗药物主要通过与

表 1 NSCLC 组织中 Ki67、Topo II、GST-π、P-gp 的表达与临床病理特征的关系

临床资料	n	Ki67		χ^2	P	Topo II		χ^2	P	GST-π		χ^2	P	P-gp		χ^2	P
		+	-			+	-			+	-			+	-		
年龄(岁)																	
<60	74	71	3	0.176	0.675	60	14	0.285	0.593	62	12	0.826	0.364	26	48	1.394	0.238
≥60	34	32	2			29	5			26	8			16	18		
性别																	
男	80	77	3	0.541	0.462	66	14	0.020	0.966	62	18	3.242	0.072	33	47	0.724	0.395
女	28	26	2			23	5			26	2			9	19		
吸烟史																	
有	48	46	2	0.042	0.838	38	10	0.626	0.429	39	9	0.003	0.956	17	31	0.438	0.508
无	60	57	3			51	9			49	11			25	35		
民族																	
壮族	67	65	2	1.081	0.298	55	12	0.012	0.912	56	11	0.516	0.473	25	42	0.184	0.668
汉族	41	38	3			34	7			32	9			17	24		
肿瘤直径(cm)																	
<3	45	44	1	1.013	0.314	34	11	2.498	0.114	36	9	0.112	0.738	17	28	0.040	0.841
≥3	63	59	4			55	8			52	11			25	38		
病理类型																	
鳞癌	76	72	4	0.233	0.629	65	11	1.721	0.190	62	14	0.002	0.968	30	46	0.037	0.848
腺癌	32	31	1			24	8			26	6			12	20		
淋巴结转移																	
有	64	61	3	0.001	0.972	52	12	0.145	0.703	54	10	0.872	0.351	25	39	0.002	0.964
无	44	42	2			37	7			34	10			17	27		
NSCLC 分期																	
I	34	33	1			26	8			27	7			14	20		
II	49	46	3	0.489	0.783	40	9	2.434	0.296	40	9	0.202	0.904	18	31	0.184	0.912
III	25	24	1			23	2			21	4			10	15		
NSCLC 分化程度																	
低分化	41	38	3			32	9			35	6			14	27		
中分化	53	52	1	1.774	0.412	45	8	0.871	0.647	45	8	6.318	0.042	21	32	1.127	0.569
高分化	14	13	1			12	2			8	6			7	7		

表 2 NSCLC 组织中 Ki67 与 Topo II、GST-π、P-gp 的关系

Ki67	Topo II		GST-π		P-gp	
	+	-	+	-	+	-
+	87	2	83	2	40	3
-	16	3	20	3	63	2
χ^2	6.503		4.686		0.891	
P	0.011		0.030		0.345	

表 3 NSCLC 组织中 Ki67、Topo II、GST-π、P-gp 共表达的等级相关性分析

项目	Topo II + GST-π	Topo II + P-gp	GST-π + P-gp	Ki67 + Topo II	Ki67 + GST-π	Ki67 + P-gp
r	0.028	0.169	0.152	0.245	0.028	-0.091
P	0.023	0.080	0.116	0.010	0.031	0.350
共表达率	70.37%(76/108)	35.19%(38/108)	34.26%(37/108)	80.56%(87/108)	76.85%(83/108)	37.04%(40/108)

Topo II 结合而造成 DNA 复制和转录异常,是肿瘤化疗的重要靶酶,所以 Topo II 可作为化疗敏感性的标记物^[14]。本文结果显示,Topo II 与性别、年龄、民族、肿瘤大小、有无淋巴结转移、病理类型、分化程度、分期均无关。P-gp 是多药耐药基因 mdr1 基因编码的蛋白产物,它可将进入癌细胞内的抗癌药物泵出癌细胞,从而

使癌细胞内药物浓度降低,可使药物在细胞内再分布,出现耐药现象^[15]。P-gp 的表达水平与耐药程度呈正相关,P-gp 在非小细胞肺癌组织中的阳性表达率为腺癌高于鳞癌^[11],但本文结果显示,P-gp 的表达与性别、年龄、民族、肿瘤大小、有无淋巴结转移、病理类型、分化程度、分期均无关。

研究表明^[16],非小细胞肺癌存在多种耐药基因共同表达的现象。本文结果显示,GST- π 与Topo II表达呈正相关($r = 0.028, P = 0.023$),共表达率为70.37%,但关系不密切。P-gp与Topo II及GST- π 共表达率分别为35.19%、34.26%,无明显的相关性。所以,P-gp、Topo II及GST- π 三种耐药基因间无明显相关性,可能是通过不同的途径调控肿瘤细胞的多药耐药。

傅兴宁等^[11]报道提示,Ki67与Topo II的表达呈明显正相关($r = 0.380, P < 0.01$),Ki67与P-gp、GST- π 的阳性表达之间无显著相关性,说明Topo II可作为一种研究肿瘤细胞增殖活性的特异性指标,同时检测Ki67和Topo II可以更好地判断肿瘤细胞的增殖状态^[17]。本文结果显示, χ^2 检验示:Ki67表达与Topo II、GST- π 表达有关($\chi^2 = 6.503, P = 0.011; \chi^2 = 4.686, P = 0.030$),但Spearman等级分析示:Ki67表达与Topo II、GST- π 表达关系不密切($r = 0.245, P = 0.01; r = 0.028, P = 0.031$);Ki67表达与P-gp无相关性,与彭乐等^[18]报道相同,说明肿瘤细胞的增殖程度与多药耐药无关。造成学者间结果不同的原因可能与病例的纳入数量、病理医师对结果判断的差异、试剂敏感性不同及对统计学相关系数理解程度不同等因素有关。

综上所述,NSCLC组织中Topo II、GST- π 及P-gp间无明显相关性,说明他们可能分别通过不同的途径介导肿瘤细胞的多药耐药。Ki67的表达与这三种多药耐药基因的表达无关。所以,Ki67可能不参与NSCLC癌细胞的多药耐药机制。认识他们之间的关系,有利于进一步揭示肺癌耐药的原因,对估计化疗疗效,判断预后,以及指导合理选择化疗药物,制定化疗方案有着重大的意义。

参考文献:

- [1] Szabó D, Keyzer H, Kaiser HE, et al. Reversal of multi-drug resistance of tumor cells[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(6B):4261-4274.
- [2] Gong P, Wang Y, Liu G, et al. New insight into Ki67 expression at the invasive front in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54912.
- [3] 赵时梅, 严龙, 林海兰. Ki-67和BRCA1在散发性乳腺癌中的表达及意义[J]. *右江民族医学院学报*, 2004, 26(1): 10-13.
- [4] 陈孝平, 汪建平. 外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013:285-286.
- [5] Volm M, Mattern J, Samsel B. Overexpression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in resistant non-small cell lung carcinomas of smokers [J]. *Br J Cancer*, 1991, 64(4):700-704.
- [6] Antonarakis ES, Keizman D, Zhang Z, et al. An immunohistochemical signature comprising PTEN, MYC, and Ki67 predicts progression in prostate cancer patients receiving adjuvant docetaxel after prostatectomy[J]. *Cancer*, 2012, 118(24): 6063-6071.
- [7] Zheng JN, Ma TX, Cao JY, et al. Knockdown of Ki-67 by small interfering RNA leads to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells[J]. *Life Sciences*, 2006, 78(7):724-729.
- [8] 张彩兰, 刘斌, 杨艳丽, 等. 多药耐药基因PgP、Topo-II、GST- π 与Ki-67在肺癌中的表达及其临床病理学意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(1):81-84.
- [9] 石晶, 崔中光, 汪洪毅. 多发性骨髓瘤病人血清游离轻链检测的临床意义[J]. *齐鲁医学杂志*, 2011, 26(3): 192-194.
- [10] 李海峰, 竺王玉, 黄燕燕, 等. Gelsolin、P-gp、Topo-II、GST- π 检测在非小细胞肺癌预后中的价值[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2012, 18(1):9-14.
- [11] 傅兴宁, 孔庆暖, 黄维清, 等. 肺癌组织P-gp、GST-II和TOPO-II表达及与Ki-67相关性[J]. *齐鲁医学杂志*, 2013, 28(1):11-13, 16.
- [12] 王霞, 王培源, 吴淑华, 等. LRP、TOPO II及GST- π 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. *滨州医学院学报*, 2009, 32(3):174-176, 180.
- [13] 赵琦峰, 王胜利, 胡型锦, 等. LRP、P-gp、GST- π 、Topo-II在肺癌中的表达及其临床意义[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2003, 10(3):191-195.
- [14] Zhang X, Yu H, Lou JR, et al. MicroRNA-19(miR-19) regulates tissue factor expression in breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(2):1429-1435.
- [15] ARANCIA G, MOLINARI A, CALCABRINI A, et al. Intracellular P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells[J]. *Ital J Anat Embryol*, 2001, 106(2 Suppl 1):59-68.
- [16] 刘欣燕, 张书敏, 邢秋月, 等. 非小细胞肺癌P-gp、LRP、MRP和GST- π 表达及其临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(8):1444-1447.
- [17] 孙冰生, 吴焕明. 非小细胞肺癌拓扑异构酶 II α 的表达及其与Ki67、p53的关系[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2004, 33(2):118-121, 244.
- [18] 彭乐, 江跃全. 耐药表型P-gp、GST- π 及TOPO II的表达与Ki67在肺癌中的表达及其临床意义[J]. *重庆医科大学学报*, 2006, 31(3):384-387.

收稿日期:2017-07-11;修回日期:2017-08-15