

本文引文格式:孙端阳,刘王静,王兴枝子,等. PHH3和Ki67蛋白在胃癌中表达的临床病理意义[J].
右江民族医学院学报,2023,45(1):104-108.

【论著与临床报道】

PHH3和Ki67蛋白在胃癌中表达的临床病理意义

孙端阳¹,刘王静¹,王兴枝子²,龙喜带²,黄炳臣²

- (1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院附属医院病理科,广西 百色 533000)

摘要:目的 研究磷酸化组蛋白 H3(phosphorylated histone H3, PHH3)与增殖细胞核蛋白 Ki67 在胃癌中的表达及其与患者预后的关系,寻找影响胃癌增殖和预后判断的标志物。方法 采用石蜡切片免疫组化 EnVision 染色法检测随访资料完整的 70 例胃癌及对应癌旁组织中 PHH3 和 Ki67 蛋白的表达,分析 PHH3 和 Ki67 表达与患者临床病理特征的关系及两者表达的相关性;采用单因素和多因素回归分析影响胃癌患者术后生存率的相关性因素。结果 胃癌组织的 PHH3 和 Ki67 高表达率高于癌旁组织($P < 0.001$),PHH3 和 Ki67 在低分化、浸润深度 T3~T4 和有淋巴结转移的患者中表达高于中高分化、浸润深度 T1~T2 和无淋巴结转移的患者($P < 0.05$)。结论 PHH3 表达上调可能参与了胃癌的发生与发展,并与侵袭、转移等恶性进展有关。

关键词:胃肿瘤;磷酸化组蛋白 H3;增殖细胞核蛋白 Ki67;浸润

中图分类号:R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2023)01-0104-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.01.018

The clinicopathological significance of the expressions of protein PHH3 and Ki67 in gastric cancer

Sun Duanyang¹, Liu Wangjing¹, Wang Xingzhizi², Long Xidai², Huang Bingchen²

- (1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** This study aims to investigate the expression of phosphorylated histone H3(PHH3) and protein Ki67 of the proliferating nuclear in gastric cancer and their relationship with the prognosis of patients, so as to find the markers that affect the proliferation and prognosis of gastric cancer. **Methods** Immunohistochemical EnVision staining of paraffin sections was adopted to detect the the expressions of PHH3 and Ki67 in corresponding adjacent tissues of 70 cases of gastric cancer with complete follow-up data. This study analyzed the relation of the expressions of PHH3 and Ki67 with the clinicopathological features of patients, as well as the correlation between the expressions of of PHH3 and Ki67. Univariate and multivariate regression were used to analyze the relevant factors affecting the postoperative survival rate of patients with gastric cancer. **Results** The high expression rates of PHH3 and Ki67 in gastric cancer tissues were significantly higher than those in paracancer tissues ($P < 0.001$). The expressions of PHH3 and Ki67 were higher in patients with low differentiation, invasion depth of T3~T4 and lymph node metastasis than in those with medium and high differentiation, invasion depth of T1~T2 and no lymph node metastasis ($P < 0.05$). **Conclu-**

基金项目:广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2020KY13010);百色市人才小高地[百人才办(2020)3号]

第一作者简介:孙端阳(1995-),女,在读硕士研究生,研究方向:临床病理学,E-mail:2289156737@qq.com

通讯作者简介:黄炳臣(1966-),男,本科,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:病理学教育与临床病理诊断,E-mail:hbc9928@163.com

sion The up-regulated expression of PHH3 may be involved in the occurrence and development of gastric cancer, and is related to the malignant progression of invasion and metastasis.

Key words: gastric tumor; phosphorylated histone H3; proliferating nuclear protein Ki67; infiltration

胃癌(gastric cancer,GC)是由黏膜上皮和腺上皮发生的恶性肿瘤,我国每年胃癌的发生率和死亡率均位居第三,占全球患者总数的 40%^[1-2]。胃癌早期临床症状不显著,常与胃炎等疾病难以鉴别,患者在确诊时大多数已是中晚期^[3],肿瘤侵袭转移、复发是患者死亡的重要因素。文献报道^[4],Ki67 增殖指数已成为判断多种肿瘤恶性程度及预后的重要依据,磷酸化组蛋白 H3(phosphorylated histone H3,PHH3)可直接参与细胞转化^[5],是参与细胞癌变和细胞转化的组蛋白标志物。本次研究运用免疫组化的方法检测 PHH3 和 Ki67 蛋白在胃癌组织及癌旁组织的表达,分析两者的表达与胃癌患者临床病理特征及预后的关系,旨在为胃癌患者提供预后新的生物学指标。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究选取 2019 年 1 月至 2020 年 12 月在右江民族医学院附属医院住院并进行手术治疗的胃癌患者标本 70 例及相对应的癌旁组织,其中男 45 例,女 25 例,年龄 29~79 岁,平均(55.27±11.86)岁。患者年龄≥60 岁 24 例、<60 岁 46 例,肿瘤直径≥5 cm 35 例、<5 cm 35 例,高中分化组 23 例、低分化组 47 例,浸润深度 T3+T4 为 39 例、T1+T2 为 31 例,有淋巴结转移 47 例、无淋巴结转移 23 例,有神经侵犯 35 例、无神经侵犯 35 例。所有病例术前均未接受放疗、生物治疗及靶向治疗;患者均未合并其他恶性肿瘤及严重内科基础疾病,研究内容经伦理委员会审查。

1.2 免疫组化检测 标本离体 30 min 内切开,10% 甲醛液固定 24 h 后取材、石蜡包埋,切片厚度 4 μm,梯度酒精脱水,HE 染色,免疫组织化学采用 EnVision 法。免疫组化试剂即用型兔抗人 PHH3 多克隆抗体,即用型鼠抗人 Ki67 单克隆抗体和显色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司,所有操作步骤均严格按照说明书进行。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

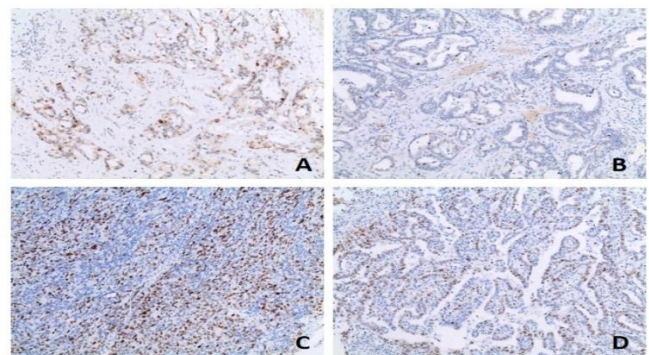
1.3 结果判读 PHH3 和 Ki67 的阳性表达均定位在细胞核。细胞核呈黄色、棕黄色为阳性细胞。由 2 名病理医师双盲进行,取两者平均数。在 40 倍高倍镜下计数 10 个视野中阳性细胞数占总细胞数的百分比,PHH3 阳性率<10%认为是低表达,≥10%认为是高表达;Ki67 阳性率<30%认为是低表达,≥30%认为是高表达。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 25.0 统计分析软件对实验数据进行统计分析,胃癌及癌旁组织中 PHH3 与 Ki67 的表达及其与临床病理参数之间的关系均用 χ^2

检验;PHH3 与 Ki67 表达相关性用 Spearman 相关分析;单因素和多因素 Cox 回归分析影响胃癌患者术后生存率的因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHH3 和 Ki67 在胃癌及癌旁组织中的表达 PHH3 在胃癌组织中的表达定位于细胞核,呈棕黄色颗粒,低分化胃癌组织见图 1A,中-高分化胃癌组织见图 1B,PHH3 在癌组织中的高表达率为 50.00% (35/70),在癌旁组织中的高表达率为 10.00% (7/70);Ki67 在癌组织中的表达定位于细胞核,呈棕黄、棕褐色,低分化胃癌组织见图 1C,中-高分化胃癌组织见图 1D,Ki67 在癌组织中的高表达率为 77.14% (54/70),在癌旁组织中的高表达率为 7.14% (5/70)。胃癌组织中 PHH3 和 Ki67 的高表达率均高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。



注:A. PHH3 蛋白在低分化胃癌组织中表达;B. PHH3 蛋白在中-高分化胃癌组织中表达;C. Ki67 蛋白在低分化胃癌组织中表达;D. Ki67 蛋白在中-高分化胃癌组织中表达。

图 1 低分化胃癌及中-高分化胃癌中 PHH3 与 Ki67 的表达情况(免疫组化,×200)

表 1 胃癌及癌旁组织 PHH3 及 Ki67 的表达差异比较

组别	n	PHH3 高表达	Ki67 高表达
胃癌组织	70	35(50.00)	54(77.14)
癌旁组织	70	7(10.00)	5(7.14)
χ^2		26.667	70.337
P		<0.001	<0.001

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

2.2 PHH3、Ki67 表达与胃癌患者临床病理参数的关系及两者之间的相关性 PHH3 在胃癌组织中的高表达与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和神经侵犯有关,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Ki67

在胃癌组织中的高表达与肿瘤的分化程度、浸润深度和淋巴结转移有关,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。经 Spearman 等级相关分析显示,

PHH3 和 Ki67 在胃癌组织中的表达呈正相关($r = 0.272, P = 0.023$),见表 3。

表 2 胃癌组织中 PHH3 及 Ki67 蛋白的表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	n	PHH3			Ki67		
		高表达	χ^2	P	高表达	χ^2	P
性别			0.062	0.803		0.583	0.445
男	45	22(48.89)			36(80.00)		
女	25	13(52.00)			18(72.00)		
年龄/岁			1.014	0.314		2.222	0.136
≥ 60	24	14(58.33)			21(87.50)		
< 60	46	21(45.65)			33(71.74)		
肿瘤大小/cm			0.514	0.473		1.296	0.255
≥ 5	35	19(54.29)			29(82.86)		
< 5	35	16(45.71)			25(71.43)		
分化程度			7.835	0.005		8.261	0.004
中分化	23	6(26.09)			13(56.52)		
低分化	47	29(61.70)			41(87.23)		
浸润深度			4.690	0.030		5.031	0.025
T3~T4	39	24(61.54)			34(87.18)		
T1~T2	31	11(35.48)			20(64.52)		
淋巴结转移			5.245	0.022		5.145	0.023
有	47	28(59.57)			40(85.11)		
无	23	7(30.43)			14(60.87)		
脉管癌栓			3.660	0.056		2.491	0.114
有	34	21(61.76)			29(85.29)		
无	36	14(38.89)			25(69.44)		
神经侵犯			4.629	0.031		2.917	0.088
有	35	22(62.86)			30(85.71)		
无	35	13(37.14)			24(68.57)		

注:表内计数资料数据用[$n(\%)$]表示。

表 3 PHH3 及 Ki67 蛋白在胃癌中表达的相关性

Ki67 表达	PHH3 表达			r	P
	高表达	低表达	合计		
高表达	31	23	54	0.272	0.023
低表达	4	12	16		
合计	35	35	70		

2.3 胃癌患者术后生存率单因素和多因素 Cox 回归分析及 PHH3、Ki67 蛋白与患者预后关系 单因素 Cox 回归分析发现患者术后总生存率与性别($HR = 4.767, P = 0.041$)、肿瘤大小($HR = 3.162, P = 0.049$)、浸润深度($HR = 14.612, P = 0.010$)、淋巴结转移($HR = 9.249, P = 0.032$)、神经侵犯($HR =$

$3.747, P = 0.025$)之间差异具有统计学意义。多因素 Cox 回归分析结果显示,患者术后生存率与性别($HR = 6.617, P = 0.018$)、浸润深度($HR = 9.599, P = 0.039$)之间差异具有统计学意义(见表 4);Kaplane-Meier 生存分析显示,PHH3 蛋白高表达者随访期间平均生存时间为 32.73 个月,而低表达者随访期间平均生存时间为 33.84 个月,高表达与低表达组间生存率比较差异无统计学意义($P = 0.724$)(见图 2A);Kaplane-Meier 生存分析显示,Ki67 蛋白高表达者随访期间平均生存时间为 31.88 个月,而低表达者随访期间平均生存时间为 37.94 个月,Ki67 蛋白高表达与低表达组间生存率比较差异无统计学意义($P = 0.112$)(见图 2B)。

表 4 单因素和多因素回归分析影响胃癌患者术后生存率的相关性因子

因素	单因素分析			多因素分析		
	<i>P</i>	HR	95% CI	<i>P</i>	HR	95% CI
性别(男性 vs. 女性)	0.041	4.767	1.068~21.266	0.018	6.617	1.379~31.746
年龄(<60 岁 vs. ≥60 岁)	0.075	2.510	0.910~6.926			
肿瘤大小(<5 cm vs. ≥5 cm)	0.049	3.162	1.004~9.955	0.343	1.773	0.543~5.786
分化级别(低分化 vs. 高中分化)	0.213	0.447	0.126~1.587			
浸润深度(T1~T2 vs. T3~T4)	0.010	14.612	1.917~111.353	0.039	9.599	1.125~81.908
淋巴结转移(N0 vs. N1~N4)	0.032	9.249	1.211~70.265	0.201	3.993	0.487~33.354
脉管癌栓(NO vs. YES)	0.064	2.787	0.943~8.234			
神经侵犯(NO vs. YES)	0.025	3.747	1.179~11.909	0.830	1.140	0.345~3.766
Ki67 表达水平(<10% vs. ≥10%)	0.149	4.458	0.586~33.906			
PHH3 表达水平(<30% vs. ≥30%)	0.725	1.200	0.434~3.322			

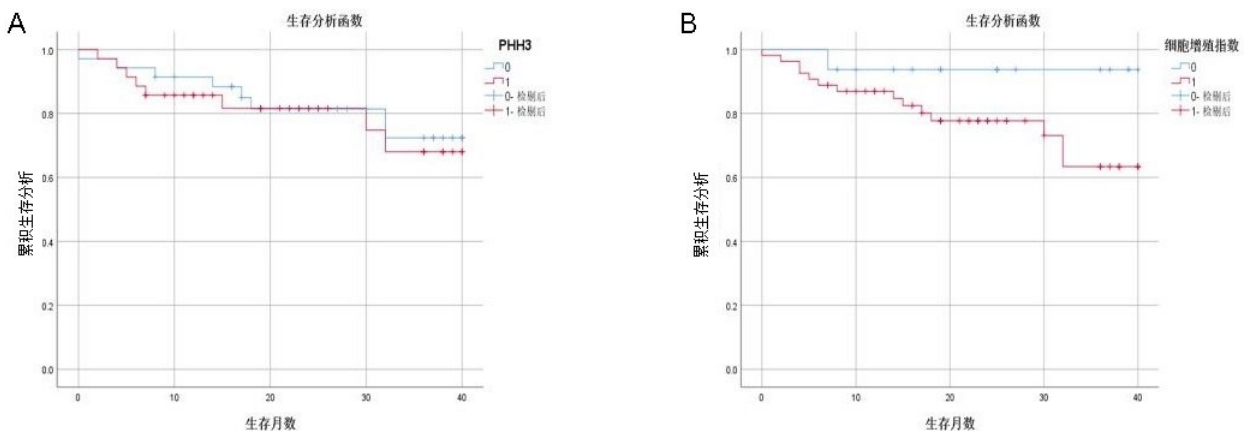
注:A. PHH3 表达与患者术后生存率的关系($P=0.724$);B. Ki67 表达与患者术后生存率的关系($P=0.112$)。

图 2 PHH3 及 Ki67 蛋白的表达与患者预后关系

3 讨论

组蛋白是由核心组蛋白(H2A、H2B、H3 和 H4)的八聚体构成核小体,主要存在于真核细胞核中,而 PHH3 是核心组蛋白的其中之一。组蛋白特定氨基酸残基的生化修饰如磷酸化、甲基化和乙酰化在细胞有丝分裂周期中至关重要,并且参与细胞的恶性转化过程,PHH3 在细胞凋亡过程中不发生磷酸化,因此,PHH3 可以作为细胞分裂的特异性标记,在一定程度上能反映细胞的增殖活性。据 DOROTA K 等^[5]报道,组蛋白 H3 上丝氨酸 10 的磷酸化(H3S10ph)是组蛋白翻译后修饰,可以参与增殖和转录激活,是重要的表观遗传事件,这种表观遗传标记作为癌症发生和播散的重要参与者。在许多癌症类型中观察到 H3S10ph 的增加,并且其丰度与预后不良有关, H3S10ph 的失调似乎对细胞增殖、转化过程有着重要的影响,而催化 H3S10 磷酸化和去磷酸化的许多酶长期以来被认为是癌症治疗的靶点。目前发现 PHH3 在乳腺癌、神经内分泌肿瘤、脑膜瘤、黑色素瘤等高表达并与肿瘤的高增殖指数相关^[6-8]。KOSHINO A 等^[9]

研究影响结直肠癌细胞增殖实验中发现,上调 PHH3 表达后可促进 CRC 细胞的增殖,下调 PHH3 和诱导细胞凋亡则可抑制 CRC 细胞增殖。UCHIDA E 等^[10]对 19 例松果体肿瘤,其中松果体瘤 3 例、中分化松果体瘤 10 例、松果体母细胞瘤 6 例免疫组化检测 Ki67 和 PHH3 表达,结果三组中 PHH3 和 Ki67 指数存在显著差异,提示 PHH3 可用于判断肿瘤细胞增殖状态。肿瘤增殖能力是患者预后判断最可靠的指标之一, Ki67 和 PHH3 联合应用于子宫平滑肌瘤和子宫平滑肌瘤鉴别以及脑膜瘤 WHO 分级上具有良好应用价值,高表达的 PHH3 预示着肿瘤的高级别或潜在恶性的生物学特征^[11-12]。本研究应用免疫组化染色方法检测胃癌及癌旁黏膜中 PHH3 蛋白表达发现,PHH3 在癌旁组织极少表达,而在胃癌组织中表达明显高于癌旁组织,随着癌组织分级的增高而增强,并与神经侵犯、TNM 分期、淋巴结转移明显相关,提示 PHH3 蛋白异常高表达参与胃癌的发生和侵袭转移,这可能与胃黏膜癌变过程中,STAT3 通过异常激活应激激活蛋白激酶 1(MSK1),促使 PHH3 和 STAT3 自身磷酸化

从而诱导胃癌的发生及演进^[13]。

Ki67 是一种细胞增殖核抗原,广泛表达于细胞周期的所有阶段(G1、S、G2、有丝分裂),并且在静息期(G0)中不存在^[14],反映恶性肿瘤增殖活性以及侵袭、转移潜能的预后标志^[11]。任刚等^[15]对接受高剂量少分次胰腺癌患者放疗后的生存差异研究结果显示,Ki67 低表达或阴性的患者生存期明显长于阳性或高表达组患者,Ki67 是胰腺癌患者接受高剂量少分次放疗生存时间的独立预后因素。目前,规范化的方法检测肿瘤细胞的增殖指数,已作为乳腺癌、神经内分泌肿瘤等的分级和治疗的决策、辅助化疗及预测预后的依据^[16]。细胞的异常增殖是恶性肿瘤侵袭转移的生物学基础,在本研究中,胃癌组织中 Ki67 蛋白高表达率显著高于癌旁组织,并与肿瘤分化分级、浸润深度和淋巴结转移等恶性进展因素有关,Ki67 蛋白异常高表达是胃癌患者预后不良的指标。

Spearmen 等级相关分析发现,PHH3 与 Ki67 在胃癌组织中表达呈正相关,提示 PHH3 可能参与驱动胃癌细胞的增殖,这可能与 PHH3 基因具有调节 EGF、TPA 等因子并诱导细胞的癌变和增殖有关^[17-18],生存分析未发现 PHH3 是胃癌患者的预后指标,可能与本组观察例数过少和随访时间短有关,其在胃癌中的作用仍需深入研究。

参考文献:

- [1] 王居平,赵静,周青宏,等.下调肿瘤源性免疫球蛋白 G 表达对胃癌细胞增殖的影响及其机制研究[J].右江民族医学院学报,2021,43(1):1-5,16.
- [2] 刘宗超,李哲轩,张阳,等.2020 全球癌症统计报告解读[J].肿瘤综合治疗电子杂志,2021(2):1-3,I0001.
- [3] 李忠堂,张立平.非小细胞肺癌组织中 PHH3 和 cyclinD1 的表达及临床意义[J].牡丹江医学院学报,2017,38(5):9-13.
- [4] TU Y,JIANG P,ZHANG J N,et al. The positive threshold of the immunohistochemical parameter Ki67 for predicting the recurrence of cervical cancer[J]. Int J Gynaecol Obstet,2022,158(2):330-337.
- [5] DOROTA K,PRZEMYSŁAW J. Rebelled epigenome: histone H3S10 phosphorylation and H3S10 kinases in cancer biology and therapy[J]. Clin Epigenetics, 2020, 12(1): 147.
- [6] TRACHT J,ZHANG K,PEKER D. Grading and prognostication of neuroendocrine tumors of the pancreas: a comparison study of Ki67 and PHH3[J]. J Histochem Cytochemi,2017,65(7):399-405.
- [7] BOSCH D E,KILGORE M R,SCHMIDT R A,et al.

- Comparison of proliferation markers ki67 and phosphohistone-H3 (pHH3) in breast ductal carcinoma in situ[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol,2017,25(8):543-547.
- [8] TIMME S,SILLEM M,BRONCERT P,et al. Anti-phosphohistone H3-positive mitoses are linked to pathological response in neoadjuvantly treated breast cancer[J]. Breast Care(Basel),2017,12(4):244-250.
- [9] KOSHINO A,NAGANO A,OTA A,et al. PBK enhances cellular proliferation with histone H3 phosphorylation and suppresses migration and invasion with CDH1 stabilization in colorectal cancer[J]. Front Pharmacol,2021,12:772926.
- [10] UCHIDA E,SASAKI A,SHIRAHATA M,et al. Role of proliferative marker index and KBTBD4 mutation in the pathological diagnosis of pineal parenchymal tumors[J]. Brain Tumor Pathol,2022,39(3):130-138.
- [11] SAFFAR H,OKHOVAT H,ARBABSOLEYMANI S,et al. The utility of phosphohistone H3 in inter-observer variability of mitotic count in meningioma, is there any benefit? [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2021, 22(7): 2049-2052.
- [12] CAO C D,RICO-CASTILLO J,DE COTIIS D,et al. Digital quantification of Ki-67 and PHH3 in the classification of uterine smooth muscle tumors[J]. Int J Gynecol Pathol,2021,40(6):549-555.
- [13] QI H Y,YANG Z Y,DAI C J,et al. STAT3 activates MSK1-mediated histone H3 phosphorylation to promote NFAT signaling in gastric carcinogenesis[J]. Oncogenesis,2020,9(2):15.
- [14] 韦俊宏,韦雨琪,黄与实,等.莱菔硫烷对 AlCl₃ 诱导 SH-SY5Y 细胞周期和细胞凋亡抑制作用研究[J].右江民族医学院学报,2020,42(6):679-684.
- [15] 任刚,郑吉春,张恒恒,等.胰腺癌组织中 Ki67、p53 的表达及其与高剂量少分次放疗生存时间的关系[J].现代肿瘤医学,2022,30(17):3156-3159.
- [16] ALLISON K H,HAMMOND M E H,DOWSETT M,et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer:ASCO/CAP guideline update[J]. J Clin Oncol, 2020,38(12):1346-1366.
- [17] KIM H G,LEE K W,CHO Y Y,et al. Mitogen- and stress-activated kinase 1-mediated histone H3 phosphorylation is crucial for cell transformation [J]. Cancer Res,2008,68(7):2538-2547.
- [18] ZHOU Y L,LI Y D,ZHENG J Y,et al. Detecting of gastric cancer by Bcl-2 and Ki67[J]. Int J Exp Pathol,2015,8(6):7287-7290.

收稿日期:2022-10-08;修回日期:2022-10-28