



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.014
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3989.shtml

· 基础研究 ·

PROX-1 与 Ki-67 在胆管癌中的表达及意义

吕品, 蒋波, 王俊, 刘剑鸣, 谭永辉

(湖南省人民医院肝胆外科, 湖南长沙 410005)

摘要

目的: 探讨 PROX-1 及 Ki-67 在胆管癌中表达及意义。

方法: 用免疫组化法检测 46 例肝门部胆管癌患者(伴淋巴结转移 29 例, 无淋巴结转移 17 例)癌组织与 23 例胆管良性病变患者胆管组织中 PROX-1 及 Ki-67 的表达, 分析 PROX-1 及 Ki-67 的表达与胆管癌淋巴转移及其他临床病理因素的关系。

结果: PROX-1 与 Ki-67 两者的阳性表达率在良性病变胆管组织、无淋巴结转移胆管癌组织、伴淋巴结转移胆管组织中依次增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 两者的阳性表达率均与胆管癌的分化程度有关(均 $P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄无关($P > 0.05$); 胆管癌组织中 PROX-1 与 Ki-67 表达正相关($r = 0.831, P < 0.05$)。

结论: PROX-1 与 Ki-67 的高表达与胆管癌的恶性生物学行为密切相关, 且两者表达量之间存在关联性。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(8):1082-1086]

关键词

胆管肿瘤; 同源盒结构域蛋白质类; Ki-67 抗原; 淋巴转移

中图分类号: R735.8

PROX-1 and Ki-67 expressions in cholangiocarcinoma tissues and their significance

LU Pin, JIANG Bo, WANG Jun, LIU Jianming, TAN Yonghui

(Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial Hospital, Changsha 410005, China)

Corresponding author: JIANG Bo, Email: jiangbo@medmail.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the PROX-1 and Ki-67 expressions in cholangiocarcinoma tissues and their significance.

Methods: The PROX-1 and Ki-67 expressions in cancer tissues from 46 patients with hilar cholangiocarcinoma (29 cases with lymph node metastases, and 17 cases without lymph node metastasis) and bile duct tissues from 23 cases with benign biliary disease were determined by immunohistochemical staining. The relations of PROX-1 and Ki-67 expressions with lymph node metastasis and other clinicopathologic factors of cholangiocarcinoma were analyzed.

Results: Positive expression rates of PROX-1 and Ki-67 were both increased in an ascending order in bile duct tissue of benign biliary disease, cholangiocarcinoma tissue without lymph node metastasis and cholangiocarcinoma tissue with lymph node metastases, and all differences had statistical significance (all $P < 0.05$). The positive expression rates of PROX-1 and Ki-67 were both associated with the degree of

基金项目: 湖南省卫生厅资助项目(B2010-070); 湖南省科技厅资助项目(2014FJ3033)。

收稿日期: 2013-11-11; 修订日期: 2014-07-08。

作者简介: 吕品, 湖南省人民医院副主任医师, 主要从事肝胆胰肿瘤疾病基础与临床方面的研究。

通信作者: 蒋波, Email: jiangbo@medmail.com

differentiation of the tumor (both $P < 0.05$), and were not related with sex and age of the patients (all $P > 0.05$). There was a positive correlation between PROX-1 and Ki-67 expression in cholangiocarcinoma tissue ($r = 0.831, P < 0.05$).

Conclusion: PROX-1 and Ki-67 over-expressions are closely related to the malignant biological behavior of cholangiocarcinoma, and furthermore, there is relevance between their expression levels.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(8):1082-1086]

KEYWORDS Bile Duct Neoplasms; Homeodomain Proteins; Ki-67 Antigen; Lymphatic Metastasis

CLC number: R735.8

肝门部胆管癌(HHC)起源于胆管上皮细胞,是一类原发于左、右肝管至胆总管下端的肝外胆管癌^[1],其发病隐匿,治愈率低,近年来发病率逐渐升高^[2]。淋巴结转移是胆管癌的主要转移途径,淋巴管生成因子PROX-1在多种肿瘤发生、肿瘤血管生成与细胞迁移、肿瘤细胞凋亡等方面起重要作用^[3]。Ki-67是一种存在于增殖细胞核的与细胞增殖密切相关的核蛋白,作为评价增殖细胞的标记物,现在已被广泛地应用肿瘤细胞增殖活性检测^[4],本研究采用免疫组化法对46例不同分期的胆管癌组织中PROX-1蛋白的表达及Ki-67进行检测,并与各临床病理分期中淋巴结转移情况进行对照分析,探讨PROX-1的差异表达与淋巴结转移间的关系,为胆管癌的治疗和预后评估提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集我院自2009年2月—2013年3月46例肝门部胆管癌手术切除的癌组织,制作成石蜡标本用于免疫组化及临床病理统计。采用WHO的最新组织学分级和临床分期标准对所有胆管癌患者进行分析。正常对照组(23例)为胆管良性疾手术切除的正常胆管组织。所有患者术前均未进行过放疗和化疗,无心血管疾病及糖尿病史。46例胆管癌患者中,男25例,女21例;50岁以上26例,50岁以下20例,平均61岁;高分化27例,中低分化19例;有区域淋巴结转移29例,无淋巴结转移17例。

1.2 主要试剂

兔抗人PROX-1多克隆抗体(Santa Cruz公司),抗Ki-67蛋白单克隆抗体(福州迈新),Envision二步法非生物素免疫组化试剂盒和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(美国DAKO公司)。

1.3 实验方法

标本经10%甲醛溶液固定,常规脱水包埋,每例病理标本均作4 μm厚的连续切片,进行HE染色和免疫组化染色。免疫组化Envision法检测PROX-1、Ki-67蛋白在胆管癌组织中的表达。操作均严格按照说明书进行。单克隆抗体PROX-1和Ki-67的工作浓度均为1:150。PBS代替一抗作阴性对照。PROX-1、Ki-67均采用TrisEDTA微波法抗原修复。结果判定:PROX-1蛋白表达为细胞质内淡黄色至棕黄色颗粒;Ki67蛋白表达为细胞核内淡黄色至棕黄色颗粒。PROX-1及Ki-67免疫组化半定量积分标准:染色强度和阳性细胞数所占的百分率两项评分指标相乘。染色强度计分标准:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。阳性细胞数所占的百分率计分标准:低倍镜下观察着色的胆管癌上皮区域;高倍镜下每张切片随机选择10个完整而不重叠的视野,观察阳性细胞数占整格肿瘤细胞的百分数比例(每格高倍视野计数100个肿瘤细胞中的阳性细胞数,计算其平均数)。分为5组:<5%计为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。两项积分相乘,所得乘积分为4个级别,0分记“-”阴性,1~4分记(+)为弱阳性,5~8分记(++)为阳性,9~12分以上记(+++)为强阳性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件包进行统计学处理,率的比较采用 χ^2 检验、等级资料的相关性分析采用Spearman等级相关检验,检验水准为 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PROX-1在胆管癌中的表达

胆管癌组织中PROX-1呈异质性表达,主要定

位于肿瘤的细胞质(图1)。本组 46 例胆管癌组织中,伴淋巴结转移的 29 例胆管癌组织中 PROX-1 阳性表达率为 93.1% (27/29)。无淋巴结转移的胆管癌组织 PROX-1 阳性表达率为 41.2% (7/17), 对照

组胆管组织中 PROX-1 阳性表达率为 13.0% (3/23), 伴淋巴结转移的胆管癌组织 PROX-1 表达率明显高于无淋巴结转移胆管癌组织和对照组胆管组织, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=7.88, P<0.05$) (表 1)。

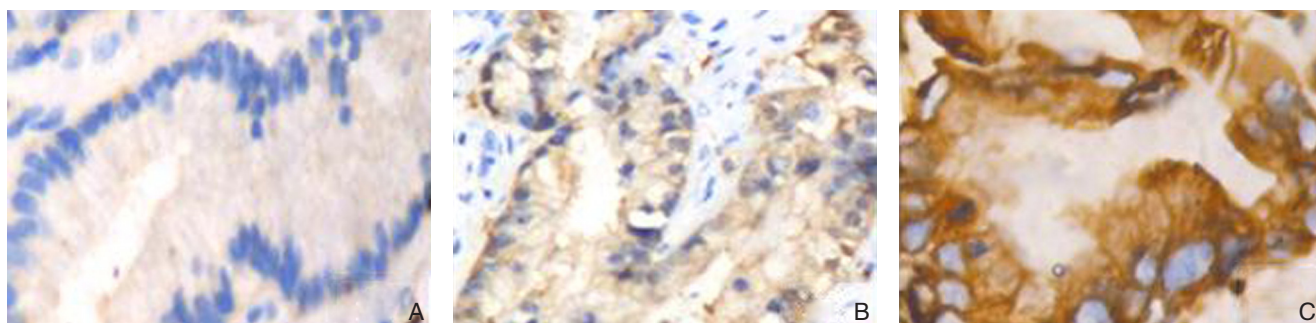


图 1 免疫组化检测 PROX-1 的表达 ($\times 400$) A: 良性病变胆管组织; B: 无淋巴结转移胆管癌组织; C: 淋巴结转移胆管癌组织

Figure 1 Immunohistochemical staining for PROX-1 expression ($\times 400$) A: Bile duct tissue from benign biliary disease; B: Cholangiocarcinoma tissue without lymph node metastasis; C: Cholangiocarcinoma tissue with lymph node metastases

表 1 不同组织中 PROX-1 的表达 [n (%)]

组织	n	PROX-1	
		(+)	(-)
良性病变胆管组织	23	3 (13.0)	20 (87.0)
无淋巴结转移胆管癌组织	17	7 (41.2)	10 (58.8)
淋巴结转移胆管癌组织	29	27 (93.1)	2 (6.9)

2.2 Ki-67 在胆管癌中的表达

胆管癌组织中 Ki-67 主要表达于细胞核内

(图 2)。伴淋巴结转移的 29 例胆管癌组织中 Ki-67 阳性表达率为 89.7% (26/29); 无淋巴结转移的胆管癌组织 Ki-67 阳性表达率为 52.9% (9/17); 对照组胆管组织中 Ki-67 阳性表达率为 8.7% (2/23); 伴淋巴结转移的胆管癌组织 Ki-67 表达率显著高于无淋巴结转移胆管癌组织和对照组胆管组织, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=6.9, P<0.05$) (表 2)。

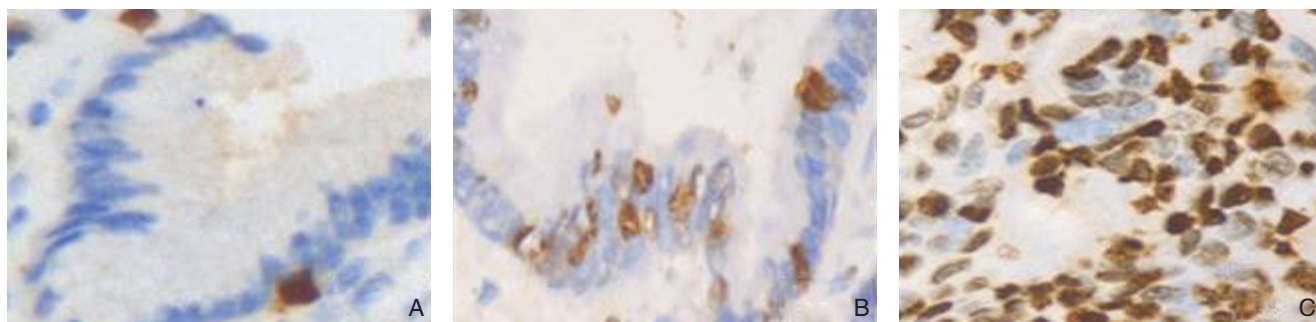


图 2 免疫组化检测 Ki-67 的表达 ($\times 400$) A: 良性病变胆管组织; B: 无淋巴结转移胆管癌组织; C: 淋巴结转移胆管癌组织

Figure 2 Immunohistochemical staining for Ki-67 expression ($\times 400$) A: Bile duct tissue from benign biliary disease; B: Cholangiocarcinoma tissue without lymph node metastasis; C: Cholangiocarcinoma tissue with lymph node metastases

表 2 Ki-67 在胆管癌中的表达 [n (%)]

组织	n	Ki-67	
		(+)	(-)
良性病变胆管组织	23	2 (8.7)	21 (91.3)
无淋巴结转移胆管癌组织	17	9 (52.9)	8 (47.1)
淋巴结转移胆管癌组织	29	26 (89.7)	3 (10.3)

2.3 PROX-1 及 Ki-67 表达与胆管癌临床病理因素关系

PROX-1 及 Ki-67 的阳性表达率均与分化程度有关; 上述指标分组间差异有统计学意义 (均 $P<0.05$), 而均与性别、年龄无关 (均 $P>0.05$) (表 3)。

表 3 PROX-1 及 Ki-67 表达与胆管癌患者临床病理因素关系
Table 3 Relations of PROX-1 and Ki-67 expressions with the clinicopathological features of cholangiocarcinoma patients

因素	n	PROX-1		P	Ki-67		P
		(+)	(-)		(+)	(-)	
性别							
男	25	19	6	0.725	18	7	0.478
女	21	15	6		17	4	
年龄 (岁)							
≥ 50	26	18	8	0.410	19	6	0.988
< 50	20	16	4		16	5	
分化程度							
高	15	8	7	0.027	8	7	0.027
中	16	13	3		12	4	
低	15	13	2		14	1	

3 讨 论

淋巴管生成是肿瘤发生淋巴结转移过程中的重要事件, 肿瘤诱发淋巴管生成的分子机制和以淋巴管生成作为抗肿瘤转移靶点的研究是当前的研究热点^[5], 淋巴转移作为胆管癌转移的主要途径, 影响肝门胆管癌手术切除患者预后, 无淋巴结转移的胆管癌患者生存率明显高于有淋巴结转移者^[6-8]。早期胆管癌可有淋巴结转移, 进展期胆管癌的淋巴结转移率高达 70% 左右。一些淋巴管生成因子如 podoplanin、肿瘤内皮标记 8 (tumor endothelial marker, TEM-8)、PROX-1 和淋巴管透明质酸受体 (LYVE-1), 是肿瘤的发生及转移的特异性标志^[2, 9-10]。同源转录因子 PROX-1 是胚胎发育中最早出现的淋巴标志, 参与淋巴管内皮的生长及淋巴管内皮细胞的表型改变^[11], 是血管淋巴表型的关键基因程序^[12]。其表达于胚胎淋巴管内皮细胞及晶状体、肝上皮的血管窦、胰腺和神经系统^[13-14]。敲除 PROX-1 基因, 静脉内皮细胞向淋巴内皮细胞定向分化失败; 胚胎发育时静脉内皮细胞生成淋巴管的过程受阻; 所有内皮细胞均不表达淋巴管内皮细胞标志物, 但血管形成正常; 转染 PROX-1 的血管内皮细胞可定向分化为淋巴管内皮细胞, 在鼠体内敲除该基因会导致淋巴系统的完全缺失, 然而杂合子却发展成乳糜性腹水, 在出生后的 1 周内死亡^[11]。本研究中 PROX-1 在人肝外胆管癌组织中的表达显著增高, 并与分化程度相关。发生淋巴结转移的胆管癌组织 PROX-1 表达显著高于未发现淋巴结转移者, 但与年龄和性别无关。这些研究提示在人胆管癌, PROX-1 表达增高参与

肿瘤淋巴结转移。以往的研究发现^[3, 15-16]: 肝癌组织中 PROX-1 蛋白表达显著增高, 敲除 PROX-1 基因的肝癌细胞侵袭和增殖能力显著下降, PROX-1 通过上调或增加缺氧诱导因子的稳定性促进肝癌细胞转移, 肝内胆管癌癌细胞中 PROX-1 表达显著增高, 乳腺癌高表达 PROX-1 已发生淋巴结转移。

诱导人脐静脉内皮细胞表达 PROX-1 后发现, PROX-1 可促进细胞增殖, 其机制与上调细胞周期素蛋白 E1 和 E2、增殖细胞核抗原 PCNA 及 VEGFR3 的表达有关^[11]。核蛋白 Ki-67, 表达于肿瘤细胞胞核, 在细胞周期的 S, G₂ 和 M 期 Ki-67 均有表达, 而在 G₀ 期缺如^[4]。Ki-67 表达的高低对评价细胞的增殖状态、研究肿瘤的生物行为、判断其危害性具有重要意义^[4]。本研究中, 胆管癌患者病变胆管组织 PROX-1 和 Ki-67 的阳性表达率显著高于对照组, 且表达强度与淋巴结转移有关。胆管癌患者 PROX-1 蛋白表达与 Ki-67 蛋白表达呈正相关, 研究表明 PROX-1 和 Ki-67 参与了胆管癌的发生、发展, 对胆管癌的预后评估具有意义。PROX-1 可能通过调节 Ki-67 表达促进胆管癌细胞增殖和转移, 然而具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吴孟超, 吴在德. 黄家驹外科学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008:1820-1824.
- [2] Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system[J]. Cell, 1999, 98(6):769-778.
- [3] Liu Y, Zhang JB, Qin Y, et al. PROX1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by way of up-regulating hypoxia-inducible factor 1 α expression and protein stability[J]. Hepatology, 2013, 58(2):692-705.
- [4] Duchrow M, Schlüter C, Key G, et al. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1995, 43(2):117-121.
- [5] Cimpean AM, Mazuru V, Saptelari L, et al. Prox 1, VEGF-C and VEGFR3 expression during cervical neoplasia progression as evidence of an early lymphangiogenic switch[J]. Histol Histopathol, 2012, 27(12):1543-1550.
- [6] Miyazaki M, Ito H, Nakagawa K, et al. Parenchyma-preserving hepatectomy in the surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma[J]. J Am Coll Surg, 1999, 189(6):575-583.
- [7] Kitagawa Y, Nagino M, Kamiya J, et al. Lymph node metastasis from hilar cholangiocarcinoma: audit of 110 patients who underwent regional and paraaortic node dissection[J]. Ann Surg, 2001,

- 233(3):385-392.
- [8] 肖科, 汤恢煥. 血管内皮生长因子 C 和微淋巴管密度与胆管癌淋巴结转移及预后的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(8):946-951.
- [9] Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 199-205.
- [10] Schmid K, Birner P, Gravenhorst V, et al. Prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in neuroendocrine tumors of the lung[J]. Am J Surg Pathol, 2005, 29(3):324-328.
- [11] Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype[J]. EMBO J, 2002, 21(7):1505-1513.
- [12] Zinovieva RD, Duncan MK, Johnson TR, et al. Structure and chromosomal localization of the human homeobox gene Prox1[J]. Genomics, 1996, 35(3):517-522.
- [13] Sotiropoulou N, Bravou V, Kounelis S, et al. Tumour expression of lymphangiogenic growth factors but not lymphatic vessel density is implicated in human cervical cancer progression[J]. Pathology, 2010, 42(7):629-636.
- [14] Wei L, Liu Y, Chen G, et al. Differentiation of lymphatic endothelial cells from bone marrow mesenchymal stem cells with VEGFs[J]. Lymphology, 2012, 45(4):177-187.
- [15] Shimoda M, Takahashi M, Yoshimoto T, et al. A homeobox protein, prox1, is involved in the differentiation, proliferation, and prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1):6005-6011.
- [16] Dudas J, Mansuroglu T, Moriconi F, et al. Altered regulation of Prox1-gene-expression in liver tumors[J]. BMC Cancer, 2008, 8:92. doi: 10.1186/1471-2407-8-92.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 吕品, 蒋波, 王俊, 等. PROX-1 与 Ki-67 在胆管癌中的表达及意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(8):1082-1086. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.014

Cite this article as: LU P, JIANG B, WANG J, et al. PROX-1 and Ki-67 expressions in cholangiocarcinoma tissues and their significance[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(8):1082-1086. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.014

欢迎订阅《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊 (ISSN1005-6947/CN43-1213/R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外及相关领域工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新进展、新观点、新技术、新成果、实用性临床研究及临床经验, 是国内普外学科的权威刊物之一。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

本刊由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编吕新生教授, 王志明教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、汪忠镐、郑树森、黄洁夫、黄志强、黎介寿、赵玉沛、夏家辉、夏穗生等多位国内外著名普通外科专家担任, 编委会成员由国内外普通外科资深专家学者组成。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态, 病案报告。本刊已被多个国内外重要检索系统和大型数据库收录, 如: 美国化学文摘 (CA), 俄罗斯文摘 (AJ), 中国科学引文数据库 (CSCD), 中文核心期刊 (中文核心期刊要目总览 2008, 2011 年版), 中国科技论文与引文数据库 (中国科技论文统计源期刊), 中国核心学术期刊 (RCCSE), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库 (CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊全文数据库 (CMCC), 万方数据 - 数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 影响因子已居同类期刊前列, 并在科技期刊评优评奖活动中多次获奖。

本刊已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期短, 时效性强。欢迎订阅、赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本 (A4 幅面), 每期 120 页, 每月 15 日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷, 封面美观大方。定价 25.0 元 / 册, 全年 300 元。国内邮发代号: 42-121; 国际代码: M-6436。编辑部可办理邮购。

本刊编辑部全体人员, 向长期以来关心、支持、订阅本刊的广大作者、读者致以诚挚的谢意!

编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号 (湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话 (传真): 0731-84327400 网址: <http://www.zpwz.net> Email: pw4327400@126.com

中国普通外科杂志编辑部