

DNA 拓扑异构酶 II α 、Ki-67、PCNA 在人脑胶质瘤中的表达及与生存状况的相关性研究

赵宏宇¹, 蔡炜嵩², 王成林¹, 陈铎¹, 关俊宏¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院神经外科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 卫生部先天畸形重点实验室)

[摘要] 目的: 研究 DNA 拓扑异构酶 II α (Topo- II α)、Ki-67、增殖细胞核抗原(PCNA)在人脑胶质瘤中的表达, 探讨其与肿瘤恶性程度及生存状况的关系。方法: 应用 SABC 免疫组化技术, 检测 32 例胶质瘤 Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达, 并对其与肿瘤恶性程度及预后生存状况的关系比较进行统计学分析。结果: 胶质瘤 Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达在低度恶性组与高度恶性组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Log-rank 检验及 Kaplan-Meier 生存曲线分析显示, Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达强度与胶质瘤的预后生存时间呈显著的负相关性, Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达水平反映了胶质瘤患者的预后情况。结论: Topo- II α 、Ki-67、PCNA 在人脑胶质瘤中的表达与其恶性程度相关, 与患者的预后生存相关。联合检测三者的表达水平对判断肿瘤的恶性程度有一定的参考意义, 同时, 这 3 个因子可作为判断与预测人脑胶质瘤患者预后的重要指标。

[关键词] 胶质瘤; 拓扑异构酶 II α ; Ki-67; 增殖细胞核抗原; 预后

[中图分类号] R739.41 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)06-0728-03

The expression of DNA topoisomerase II α , Ki-67 and PCNA in cerebral gliomas and its correlation with patient survival

ZHAO Hong-yu¹, CAI Wei-song², WANG Cheng-lin¹, CHEN Duo¹, GUAN Jun-hong¹

(1. Department of Neurosurgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Laboratory of Congenital Malformation of Ministry of Health)

[Abstract] Objective: To examine the expression of topoisomerase II α (Topo- II α), Ki-67 and PCNA in glioma, and investigate the correlation of Topo- II α , Ki-67, PCNA with tumor malignant degree and prognosis. Methods: The SABC immunohistochemical staining method was used to examine the expression of Topo- II α , Ki-67 and PCNA in 32 human gliomas. The correlation of the three factors with malignant degree and prognosis was analyzed statistically. Results: The expression of Topo- II α , Ki-67 and PCNA was significantly different between low grade and high grade gliomas ($P < 0.01$). Log-rank test and Kaplan-Meier curves analysis indicated the expression of Topo- II α , Ki-67 and PCNA had significant negative correlation with survival period. The expression levels of Topo- II α , Ki-67 and PCNA reflected the prognosis of gliomas. Conclusion: The expression of Topo- II α , Ki-67 and PCNA is correlated with glioma malignant degree and its prognosis. The assay of the three factors has referential significance to the estimation of tumor malignant degree, and the three factors can be used as the important markers of gliomas prognosis.

[Key words] glioma; topoisomerase II α ; Ki-67; proliferating cell nuclear antigen; prognosis

脑胶质瘤(glioma)是中枢神经系统中发病率最高的肿瘤,无控性增殖和侵袭性生长是胶质瘤的恶性表型,也是其临床治疗失败的根本原因。Ki-67、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是与胶质瘤增殖密切相关的增殖标志物^[1], DNA 拓扑异构酶 II α (topoisomerase II α , Topo- II α)则是一种多药耐药基因,是多种抗癌药物的作用靶点,同时也已成为肿瘤增殖的标志物^[2]。本文应用免疫组化技术检测了 Topo- II α 、Ki-67、PCNA 在星形细胞瘤中的表达,并探讨其与肿瘤恶性程度及预后的关系。

[基金项目] 辽宁省教育厅青年科研基金资助项目(2004F0780)

[作者简介] 赵宏宇(1974 -),男,主治医师,博士研究生。

E-mail: zhaocmu1974@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

我院神经外科 1999 年 1 月至 2002 年 6 月手术切除的临床资料完整的胶质瘤病人 32 例,男 18 例,女 14 例,年龄 7~74 岁。均为第一次手术,标本取自切除的肿瘤组织,术前未进行任何形式的放疗和化疗。按中枢神经系统肿瘤分类(WHO, 1990),低度恶性组 14 例,包括 I 级星形细胞瘤 7 例, II 级星形细胞瘤 7 例;高度恶性组 18 例,包括间变性星形细胞瘤 10 例,多形性胶质母细胞瘤 8 例。24 例位于大脑半球,5 例位于小脑,1 例位于鞍上及第三脑室内,1 例位于基底核区,1 例位于胼胝体膝部。

1.2 实验方法

鼠抗人 Topo- II α 、鼠抗人 Ki-67、小鼠抗大鼠 PCNA, SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒(北京中山公司)。以肿瘤细胞胞浆染色强度高于背景非特异染色为阳性,细胞不着色,与背景一致为阴性。

1.3 判断标准

PCNA 免疫组化表达阳性颗粒呈棕黄或棕褐色,位于细胞核或细胞浆内,阳性结果判定参照陈氏^[3]等标准,至少观察 10 个高倍视野。阳性反应着色浓度:(1)淡染为 1,深染边界清楚为 2;(2)阳性细胞比例<20%为 1,20%~50%为 2,>50%为 3。以上两项指标相加<3 为(-),>4 为(+). Topo- II α 阳性染色主要定位于细胞核中,染色为棕黄色颗粒,阳性细胞比

例<5%为(-),5%~30%为(+). Ki-67 阳性染色定位于细胞核中,染色为棕黄色,阳性细胞比例<5%为(-),5%~30%为(+).

1.4 统计学分析

以 SSPS10.0 软件统计学分析,Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达与肿瘤恶性度的比较用 χ^2 检验。根据寿命表各随访年份生存率作生存曲线 ($\alpha=0.05$),用 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析,生存率的比较用 Log-rank 检验。

2 结果

2.1 Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达与组织学分级的关系(表 1)

表 1 Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达与组织学分级的关系

Tab.1 The comparison of the three factors position expression rates between two groups

组别	n	Topo- II α 表达			Ki-67 表达			PCNA 表达		
		(-)	(+)	阳性率(%)	(-)	(+)	阳性率(%)	(-)	(+)	阳性率(%)
低度恶性组	14	10	4	28.5	11	3	21.4	10	4	28.5
高度恶性组	18	0	18	100.0 ¹⁾	0	18	100.0 ¹⁾	2	16	88.8 ¹⁾
合计	32	10	22	69.0	11	21	65.0	12	20	63.0

注:1)与低恶性组比较, $P < 0.01$

表 2 Topo- II α 、Ki-67、PCNA Log-rank 检验结果

Tab.2 Log-rank test of Topo-IIa, Ki-67, PCNA

预后因素	分组	n	死亡数	X ² 值	df 值	P
Topo- II α	(-)	10	2	7.1255	1	<0.01
	(+)	22	17			
Ki-67	(-)	11	2	9.3329	1	<0.01
	(+)	21	17			
PCNA	(-)	12	2	11.8240	1	<0.01
	(+)	20	17			

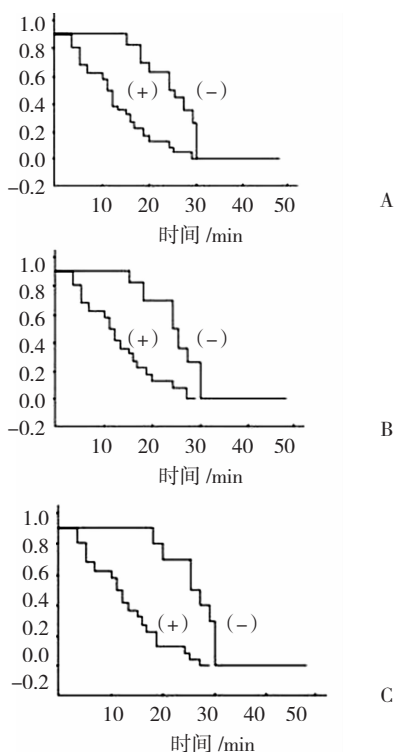
2.2 Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达与人脑胶质瘤预后的关系

经 Log-rank 检验,Topo- II α 的(-)组与(+)组的生存率差异有显著的统计学意义;Ki-67、PCNA 的表达在(-)组与(+)组之间比较,其差异也有显著的统计学意义(表 2)。用 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。生存曲线显示:在 Topo- II α 的 2 个不同水平的曲线上,随着 Topo- II α 表达强度的增高,生存率曲线逐渐下移;Ki-67、PCNA 也存在类似的表达强度与生存情况的关系(图 1),同时可见高表达组生存率曲线下降明显,低表达组较之下降稍缓。两种分析检验方法均表明 3 个指标的阳性表达率与生存时间存在着显著的负相关性,有统计学意义($P < 0.01$)。

Kaplan- Meier 生存曲线分析显示,在这 3 个指标的两个不同表达水平上,均可见随着每个指标的表达强度的增高,生存率曲线下移,生存时间缩短的情况;并且每个指标的阳性表达率与生存时间之间均存在着显著的负相关性($P < 0.01$)。

3 讨论

PCNA 是一种酸性核蛋白,参与 DNA 的复制、合成、细胞的增殖分裂,在细胞周期中起着重要的调控作用^[4]。Ki-67 是一个 395 kDa 的抗原,其表达同细胞周期联系密切。研究发现,Ki-67、PCNA 在细胞核内表达程度的高低,与细胞增殖活性密切相关,通过检测 Ki-67、PCNA 的表达,能较好地反映肿瘤细胞的增殖活性^[5]。本组研究结果显示,随着胶质瘤



A: 2 个水平的 Topo- II α 表达的生存率曲线; B: 2 个水平的 Ki-67 表达的生存率曲线; C: 2 个水平的 PCNA 表达的生存率曲线

图 1 Kaplan-Meier 曲线
Fig.1 Kaplan-Meier curves

恶性程度的增高, Ki-67、PCNA 的表达增强, 阳性率也越高。

研究 Topo- II α 的表达, 可以为临床胶质瘤化疗筛选有效的抗癌药提供更好的条件^[6]。JOSEPH. A^[7] 等在人脑星形细胞瘤 Topo- II α 蛋白免疫组化的研究中发现, Topo- II α 的表达与肿瘤分级呈正相关, 且与 Ki-67 有很好的正相关性。卢培刚等^[8] 研究结果提示, 在低度恶性组与中高度恶性组之间阳性细胞百分率的差异有统计学意义, 而中高度恶性组之间则无显著性差异; 并且进一步指出在原发与复发的中度恶性胶质瘤中, Topo- II α 的表达差异有显著的统计学意义。本研究发现, 随着胶质瘤恶性程度的增高, Topo- II α 的表达强度(即阳性细胞百分率)也随之增高, 与上述研究结果一致。本研究通过对 3 个指标的研究, 认为 Topo- II α 、Ki-67、PCNA 均为反映及评价细胞增殖状态的重要指标, 三者的增殖活性均与肿瘤的恶性程度呈正相关, 因而是恶性胶质瘤发展过程中的重要责任基因。此外, 也说明在 WHO 分级中, I、II 级与 III、IV 级的胶质瘤在生物学活性上存在着显著的差异。

影响中枢神经系统胶质瘤患者预后的因素较多, 包括年龄、病理级别、KPS、治疗性因素(如肿瘤切除程度、术后是否辅助放疗化疗等)及 bFGF、

PTEN 等抑癌基因的表达情况等, 但是, 就 Topo- II α 、Ki-67、PCNA 在胶质瘤中表达情况与预后的相关性研究, 国内外的报道尚较少。PENOLOPE^[9] 等通过免疫组化方法对有丝分裂原与 Topo- II α 在人脑星形细胞瘤中的表达进行研究, 并分析表达情况与预后生存时间的关系, 指出这两个肿瘤增殖相关因子与患者的预后存在着明显的相关性。在本研究中, 对本组全部 32 例病例的随访资料进行 Log-rank 检验及 Kaplan-Meier 生存曲线分析。Log-rank 检验的表明, Topo- II α 、Ki-67、PCNA 在它们的两个不同表达水平之间, 其生存率差异均有显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示, 在 3 个指标的两个不同水平上, 均可见随着三者阳性表达率的增高, 生存率曲线下移, 生存时间缩短的情况, 并且三个指标的阳性表达率与生存时间之间均存在着显著的负相关性 ($P < 0.01$)。因此, 可以认为, 在胶质瘤的发展过程中, Topo- II α 、Ki-67、PCNA 的表达水平反映了胶质瘤转归的趋向, 具有预测预后的价值, 在临床上, 可以作为判断胶质瘤预后的指标。

参考文献:

[1] BRAVO R, FRANK R, BLUNDELL PA, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta [J]. Nature, 1987, 326 (6112): 51-52.
 [2] WATT P, HICKSON ID. Structure and function of type II DNA topoisomerase [J]. Biochem J, 1994, 303(11): 681-695.
 [3] 俞红, 潘建平. P27 和 PCNA 蛋白对儿童脑胶质瘤预后判断价值 [J]. 临床儿科杂志, 2001, 21(3): 159-161.
 [4] TAKANO S. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients [J]. Cancer Res, 1996, 56 (9): 2185-2190.
 [5] BARBARESCHI M. p53 protein expression in central nervous system neoplasm [J]. Clin Pathol, 1992, 45(7): 583-586.
 [6] SCHNEIDER E, HSIANG Y-H, LIU LF. DNA topoisomerase as anti-cancer drug targets [J]. Adv Pharmacol, 1990, 21(7): 149-183.
 [7] JOSEPH A, HOLDEN M, JEANNETTE J, et al. DNA topoisomerase II -alpha as a proliferation marker in astrocytic neoplasms of the central nervous system: correlation with MIB1 expression and patient survival [J]. Mod Pathol, 1999, 12(12): 1094-1100.
 [8] 卢培刚, 朱树干, 刘玉光. DNA 拓扑异构酶 II 在人脑胶质瘤中的表达及临床意义 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2002, 28(5): 380-381.
 [9] PENOLOPE K, EFSTRATION P, ANASTASIA E, et al. Mitosin and DNA topoisomerase II α : Two novel proliferation markers in the prognostication of diffuse astrocytoma patient survival [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001, 9(3): 207-214.

[收稿日期] 2006-06-21
(编辑 刘元健)