

# Smac 和 Ki67 在胃癌组织中的表达及其临床意义

魏少忠<sup>1</sup>, 陈继红<sup>2</sup>, 陈 健<sup>1</sup>

## Expression of Smac and Ki67 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance

WEI Shao-zhong<sup>1</sup>, CHEN Ji-hong<sup>2</sup>, CHEN Jian<sup>1</sup>

1. Department of Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China; 2. Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University

Corresponding Author: CHEN Ji-hong, E-mail: chenjihong2006 @126.com

**Abstract:** **Objective** To study the expression of Smac and Ki67 in gastric cancer and the correlation of Smac and Ki67, the clinical significance as well. **Methods** Immunohistochemical staining of Smac and Ki67 expression was performed by the standard streptavidin-peroxidase (SP) technique for the paraffin sections of 71 gastric cancers. The relationship between the Smac expression and the clinicopathological parameters, prognosis or the cell proliferation index Ki67 was analyzed. **Results** The positive rate of Smac in gastric cancer was 71.8% (51/71), all of the normal gastric tissues expressed Smac (20/20). The positive rate of Ki67 expression in gastric cancer was 66.2% (47/71). Significant correlation was found between Smac and Ki67 expression with histological differentiation grade, tumor depth, lymph node metastasis, TNM stage of gastric cancer ( $P < 0.05$ ). The Ki67 expression in negative expression of Smac (17/20) was significantly higher than that in positive expression of Smac (30/51,  $P < 0.05$ ). The survival time of patients with Smac-positive tumors was significantly longer than that of Smac-negative tumors ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The Smac and Ki67 expression can serve as an important parameter of malignant degree and prognosis of gastric cancer. Smac expression was significantly correlated with Ki67 expression.

**Key words:** Gastric cancer; Smac; Ki67; Apoptosis; Cell proliferation

**摘要:**目的 观察 Smac 和 Ki67 在胃癌中的表达,并探讨 Smac 表达与 Ki67 的关系及其临床意义。方法 应用免疫组织化学法检测 71 例胃癌组织中 Smac 和 Ki67 的表达,分析 Smac 表达与临床病理因素、预后及 Ki67 的关系。结果 Smac 在胃癌组织中的表达率为 71.8% (51/71),在所有的癌旁组织中均见表达 (20/20)。Ki67 在胃癌组织中表达阳性率为 66.2% (47/71)。Smac 表达和 Ki67 表达与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期明显相关 ( $P < 0.05$ )。Ki67 在 Smac 表达阴性的胃癌组织的阳性率 (17/20) 明显高于 Smac 表达阳性组 (30/51,  $P < 0.05$ )。Smac 表达阳性患者的生存时间明显长于 Smac 表达阴性患者 ( $P < 0.05$ )。结论 Smac 和 Ki67 可作为判断胃癌组织恶性程度和预后的指标之一,其中 Smac 的表达与 Ki67 的表达呈负相关。

**关键词:** 胃癌; Smac; Ki67; 凋亡; 增殖

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)12-0937-03

## 0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,在我国的发病率和死亡率均较高,其异常的细胞凋亡和增殖在胃癌的形成和进展中具有重要意义<sup>[1]</sup>。Smac 是 2000 年在线粒体中发现的一种蛋白,可释放到胞浆中促进凋亡的发生<sup>[2]</sup>。Ki67 是一种与增殖细胞相关的核抗原,是近年研究较多的反映肿瘤增殖活性的蛋白,其与肿瘤的增殖、浸润、转移潜能和预后密

切相关<sup>[3]</sup>。本文旨在观察促凋亡蛋白 Smac 在胃癌中的表达情况并探讨其表达与增殖相关抗原 Ki67 的关系及其临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

随机收集 71 例我院 1999 年 1 月~2002 年 6 月胃癌手术病例,有完整的临床病理学资料和随访资料,术前均未接受放疗或化疗。患者年龄为 24~75 岁,平均年龄为 54.3 岁。其中男 47 例,女 24 例。病理结果均经两名以上病理医师确认,按 1999 年 WHO 标准分类:腺癌 49 例,黏液腺癌 12 例,印戒细胞癌 5 例,未分化癌 5 例;肿瘤细胞组织学分化:高中分化 38 例,低分化或未分化 33 例。采用 1997 年 UICC 第 5

收稿日期:2007-08-20;修回日期:2007-10-30

基金项目:湖北省卫生厅科研基金资助项目(JX2B51)

作者单位:1. 430079 武汉,湖北省肿瘤医院外科;2. 武汉大学人民医院消化内科。

通讯作者:陈继红, E-mail: chenjihong2006 @126.com

作者简介:魏少忠(1967-),男,硕士,副主任医师,主要从事腹部肿瘤外科研究

版胃癌 TNM 分期: 期 5 例, 期 25 例, 期 29 例, 期 12 例。所有病例获得随访, 随访时间 8 ~ 81 月, 总体 5 年生存率为 45.1 % (32/71)。

1.2 试剂

鼠抗人 Smac/Diablo 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 兔抗人 Ki67 单克隆抗体 (Lab Vision 公司, 美国), 即用型 SP 试剂盒 (北京中杉生物公司), DAB 染色试剂盒 (北京博奥森生物公司) 等。

1.3 方法

取 71 例患者手术切除标本存档的石蜡组织块重新制作, 4 μm 厚连续切片。每份标本常规苏木精-伊红染色, 进行组织形态学观察和细胞分化程度判断。SP 法检测 Smac、Ki67 的表达。方法简述如下: 石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化; 柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 95 °C 修复 10 min; 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗后滴加非免疫性动物血清室温孵育 15 min, 加一抗 (抗 Smac 抗体 1:200, 抗 Ki67 抗体 1:100), 4 °C 孵育过夜; PBS 冲洗后滴加生物素标记二抗 37 °C 孵育 10 min, 辣根过氧化物酶标记抗生物素三抗 37 °C 孵育 15 min, PBS 冲洗后 DAB 显色, 冲洗, 苏木精复染, 封片, 显微镜观察并拍照。每次实验用已知阳性切片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。另随机选取本研究病例中距胃癌组织边缘至少 5cm 的癌旁黏膜组织标本 (镜下未见癌细胞累及) 20 份做对照。

1.4 结果判定

(1) Smac 染色的判断标准<sup>[4]</sup>: 以胞浆染为淡黄或棕黄色定义为阳性细胞, 随机选择 5 ~ 10 个高倍镜视野 (×400), 每个视野计数 500 个细胞, 阳性细胞数 > 30 % 的组织切片视为阳性标本。(2) Ki67 染色的判定<sup>[3]</sup>: 随机选择 5 ~ 10 个高倍镜 (×400) 视野进行计数, 每个视野计数 500 个细胞, 计算 Ki-67 阳性细胞数占总细胞数的百分数, 以阳性细胞数 > 20 % 视为阳性标本。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 样本间采用  $\chi^2$  检验, 生存率采用 Kaplan-Meier 法分析并行 Log-rank 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 Smac 的表达

Smac 表达于细胞浆内, 呈淡黄色或棕黄色分布 (图略)。71 例中 Smac 表达阳性者 51 例, 阳性率为 71.8 %, 20 例癌旁正常组织均为阳性表达。两者差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 5.67$ )。

2.2 Smac 表达与临床病理指标的关系

Smac 表达与性别无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 与癌细胞的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期明显相关 ( $P < 0.05$ ), 即 Smac 在低分化、T3 和 T4、有淋巴结转移、及 期胃癌患者中的表达明显降低, 见表 1。

表 1 Smac 表达与胃癌临床病理和预后的关系  
Table 1 The relationship of the expression of Smac and clinicopathology and prognosis an gastric cancer

Chinical	n	Smac expression			Ki67 expression		
		positire (%)	$\chi^2$	P	positire (%)	$\chi^2$	P
Sex							
male	47	34	0.018	>0.05	21	1.26	>0.05
female	24	17			28		
Tissue differentiation							
well	38	32	6.19	<0.05	21	4.37	<0.05
low or no	33	19			26		
Invisive degree							
T1 and T2	15	15	5.78	<0.05	6	5.83	<0.05
T3 and T4	56	36			41		
Lymphomode Metastass							
negative	26	23	5.60	<0.05	12	7.36	<0.01
positive	45	28			35		
TNM Stage							
、	30	26	5.65	<0.05	16	3.84	<0.05
、	41	25			31		
Survival time							
< 5 years	39	24	4.53	<0.05	20	8.60	<0.01
> 5 years	32	27			27		

2.3 Ki67 在胃癌中的表达情况

Ki67 表达于胃癌细胞核, 呈棕黄色颗粒状 (图略), 共 47 例 (66.2 %) 胃癌患者 Ki67 表达阳性。本组胃癌 Ki67 表达与性别无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与癌细胞的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期明显相关 ( $P < 0.05$ )。

2.4 Smac 表达与 Ki67 表达的关系

20 例 Smac 表达阴性胃癌组织 Ki67 表达阳性为 17 例, 51 例 Smac 表达阳性组织中 Ki67 阳性者 30 例, 统计学分析两者呈负相关 ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 4.40$ )。

2.5 Smac 表达与预后的关系

本组患者全部获得随访, 总 5 年生存率为 45.1 %。生存时间大于 5 年的 32 例患者中 Smac 表达阳性者 27 例, 生存时间小于 5 年的 39 例患者有 24 例阳性, 统计学分析有明显差异 ( $P < 0.05$ )。经 Log-rank 检验, Smac 表达阳性患者的生存时间明显长于

Smac 表达阴性患者(见图 1,  $P=0.002$ )。

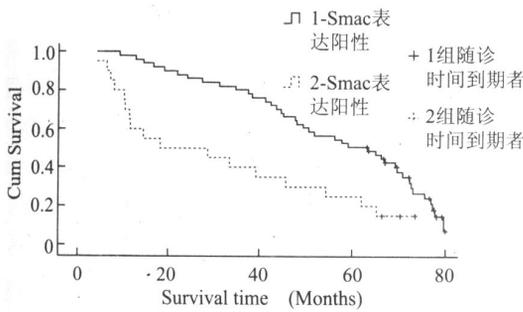


图 1 胃癌患者 Smac 表达情况与术后特定时间生存率的关系

### 3 讨论

目前研究表明,肿瘤不仅是一种细胞凋亡异常的疾病,也是一种细胞增殖和分化异常的疾病,在致癌因子的作用下,细胞凋亡的抑制和(或)细胞增殖的增强是肿瘤形成、浸润和转移的生物学基础<sup>[1]</sup>。Smac 是 2000 年首次报道在 HeLa 细胞中分离出的一种线粒体蛋白,在凋亡信号刺激下与细胞色素 C (cyt c) 一同从线粒体中释放,可通过结合并活化 apaf-1 以及结合并解除凋亡抑制蛋白 (IAPs) 对 caspase-3、7、9 的抑制作用而发挥促凋亡作用<sup>[2,4]</sup>。有研究证实<sup>[4-6]</sup>,Smac N 段多肽或其类似物或过表达 Smac 等可以促进多种形式诱导的凋亡而发挥抗肿瘤作用。

Smac 在不同正常组织和肿瘤组织中表达各异。Yoo 等<sup>[7]</sup>研究发现约 62% 的癌组织中可见 Smac 表达,约 22% 的肉瘤组织可见表达,且在不同的癌或肉瘤组织中 Smac 的表达有差异。包仕廷等<sup>[8]</sup>发现 Smac 在肝癌中低表达。Mizutani 等<sup>[6]</sup>证实 Smac 在肾细胞癌中的表达下降,转染 Smac cDNA 可以增强 TRAIL 和顺铂介导的细胞毒作用。本研究证实约 70% (51/71) 的胃癌组织中 Smac 表达阳性,与 Yoo 等<sup>[7]</sup>研究基本一致。在随机选取的 20 例癌旁组织标本中均可见 Smac 表达。癌旁组织染色强度较部分胃癌组织为弱,这可能提示正常组织中多为正常的细胞凋亡,而胃癌组织中细胞凋亡减少,但存在部分凋亡过度活跃的细胞。且进一步分析表明 Smac 表达与癌细胞的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有明显相关性,提示 Smac 表达可能在胃癌的发生发展中发挥重要作用。结果还显示 Smac 表达阴性患者 5 年生存率明显低于 Smac 表达阳性组,在生存时间少于 1 年患者中表现尤为明显,提示 Smac 还可能作为术后判断预后的辅助指标。Smac 在胃癌中的表达减少,致使 IAPs 对 caspase 的抑制作用相对增加,凋亡过程被抑制,促

进肿瘤细胞生长和转移。

Ki67 是目前应用最广泛的增殖细胞指标之一,参与肿瘤的发生发展,可表达于除 G<sub>0</sub> 期外的所有细胞周期时相中。Ki67 与胃癌关系的研究报道较多,但结论并不完全一致<sup>[3,9]</sup>。Czyzewska 等<sup>[3]</sup>研究证实 Ki67 表达与肿瘤的分化程度、Lauren 分型、淋巴结转移等明显相关,与年龄、肿瘤部位无关;Oshima 等<sup>[9]</sup>的研究表明 Ki67 表达与年龄、性别、分期和预后等均无明显相关。本研究中超过 60% (47/71) 的患者表达阳性,进一步临床病理分析表明其与组织分化程度、分期和预后等有显著相关性,与 Czyzewska 等<sup>[3]</sup>研究一致。在 Smac 表达阴性的患者中 Ki67 表达阳性率高(17/20),而 Smac 表达阳性患者的 Ki67 表达阳性率相对较低(30/51),提示 Smac 的表达下降可能有促进胃癌细胞增殖的作用,可进一步定量分析其相关性。

总之,Smac 在胃癌组织中的表达下降,可能通过抑制 IAPs 的活性降低胃癌细胞的凋亡,并促进肿瘤细胞的增殖;且 Smac 表达下降与组织分化程度、分期、预后相关,可作为判断胃癌的恶性程度和预后的辅助指标,并可能作为胃癌治疗的新靶点。

### 参考文献:

- [1] 陶凯雄,陈道达,王国斌,等. 胃癌组织的细胞凋亡和增殖与其临床分期的关系研究[J]. 中华胃肠外科杂志,2001,4(2):108-110.
- [2] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1): 33-42.
- [3] Czyzewska J, Guziska-Ustymowicz K, Lebelt A, et al. Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers [J]. Roczn Akad Med Bialymst, 2004, 49(Suppl 1): 64-66.
- [4] Hasenjager A, Gillissen B, Muller A, et al. Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-xL in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells[J]. Oncogene, 2004, 23(26): 4523-4535.
- [5] Li L, Thomas RM, Suzuki H, et al. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF-mediated cell death[J]. Science, 2004, 305(5689): 1471-1474.
- [6] Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K, et al. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(3): 448-454.
- [7] Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, et al. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas[J]. APMIS, 2003, 111(3): 382-388.
- [8] 包仕廷, 桂水清, 林木生, 等. Smac 和 Survivin 基因在肝癌中的表达及与细胞凋亡的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(9): 1062-1063.
- [9] Oshima C, Iriya A, Forones NM. Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer [J]. Neoplasma, 2005, 52(5): 420-424.

[编辑:周永红;校对:安 凤]