

PKM2在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征之间的关系

刘妍芳,张 谦,韩振魁,斯坎德尔,罗苏明

(新疆维吾尔自治区人民医院胃肠外科,新疆 乌鲁木齐 830001)

【摘要】 目的 探讨PKM2在人胃腺癌组织中的表达及其与临床病理参数之间的关系。方法 采用免疫组化SP法检测67例胃腺癌组织、53例癌旁组织中PKM2蛋白的表达及其与临床病理参数之间的关系。结果 PKM2蛋白在胃腺癌组织中的阳性表达(67.2%, 45/67)明显高于癌旁组织中PKM2蛋白的表达(28.3%, 15/53),PKM2蛋白在胃腺癌组织中的阳性表达与患者的性别、年龄、分化程度均无关($P>0.05$),而与患者的淋巴结($\chi^2=12.103, P=0.001$)是否转移与肿瘤浸润深度($\chi^2=4.030, P=0.045$)密切相关。结论 PKM2蛋白在胃腺癌组织中的阳性表达明显高于癌旁组织,且其阳性表达与患者淋巴结与否、肿瘤侵犯深度密切相关,有望成为胃腺癌诊断与治疗的靶向标志物。

【关键词】 胃腺癌;PKM2;免疫组织化学

【中图分类号】 R735.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2014)02-0161-03

Expression and clinical significance of PKM2 in human gastric adenocarcinoma. LIU Yan-fang, ZHANG Qian, HAN Zhen-kui, Sikandeer, LUO Su-ming. Department of Gastrointestinal Surgery, the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous, Urumqi 830001, Xinjiang, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the immunohistochemical expression and diagnostic significance of PKM2 in human gastric adenocarcinoma. **Methods** Immunohistochemical study was carried out to examine the expression of PKM2 and its association with clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. **Results** The positive rate for PKM2 expression in gastric adenocarcinoma tissues (67.2%, 45/67) was significantly higher than that in non-tumor tissues (28.3%, 15/53); the positive expression of PKM2 was not correlated with the patient's gender, age and histologic differentiation ($P>0.05$) except lymph node metastasis ($\chi^2=12.103, P=0.001$) and tumor invasion ($\chi^2=4.030, P=0.045$). **Conclusion** PKM2 prefers staining for gastric adenocarcinoma to for non-tumor tissues, and the positive expression was correlated with lymph node metastasis and tumor invasion.

【Key words】 Gastric adenocarcinoma; PKM2; Immunohistochemistry

胃癌(Gastric cancer, GC)是全球第四常见恶性肿瘤,在所有肿瘤致死率中排名第二^[1],就我国而言,其发病率和死亡率均居各类肿瘤首位。由于其发病的隐匿性,使得胃癌常常在确诊时已处于进展期(Ⅲ期或Ⅳ期),预后较差^[2]。目前为止,针对胃癌有效的分子靶向治疗仍然较少^[3]。因此,寻找胃癌新的分子标志物,提高胃癌早期确诊率,以及寻找胃癌治疗的新的靶点显得尤为重要。M2型丙酮酸激酶(M2 isoform of pyruvate kinase, PKM2)为细胞糖酵解过程中的关键酶,其在三磷酸核苷的合成过程中起决定性作用^[4]。近年发现其在包括肺癌、乳腺癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤细胞或组织中呈过表达,在肿瘤的代谢过程中发挥着举足轻重的作用^[5-6],但PKM2在胃腺癌组织中的表达尚未见报道。本文采用免疫组化SP法检测67例胃腺癌组织,53例癌旁组织中PKM2的表达情况,并初步探讨其与临床病理参数之间的关系,为下一步实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集我院2008年1月至2013年1月期间外科手术切除的120例石蜡标本,其中包括胃腺癌组织67例,均经HE染色确诊为胃腺癌;以及取同一标本距癌组织边缘3 cm以上的胃组织,均经HE染色证实无肿瘤细胞浸润,无明显细胞增生等病变的癌旁组织53例。所有的病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。67例胃腺癌组织中男性标本43例,女性24例,年龄47~73岁,中位年龄63岁;高分化19例,中分化29例,低分化19例;伴淋巴结转移42例,不伴淋巴结转移25例。肿瘤浸润深度:按照国际TNM分期标准,局限于黏膜或黏膜下层的早期胃癌定为T₁,侵及胃壁肌层,但大小不超过一个分区的1/2的为T₂,肿瘤侵及胃壁浆膜层,或虽未侵及浆膜层,但病变已大于一个分区的1/2,但未超出一个分区定为T₃,肿瘤占一个分区以上或已累及周围脏器定为T₄,其中T₁+T₂组28例,T₃+T₄组39例。

1.2 方法与试剂 所有 120 例标本均经过 4% 的多聚甲醛固定后,进行石蜡包埋,常规制备 4 μm 厚度连续切片,并使用免疫组化 SP 法严格按照说明书进行检测。二甲苯脱蜡,柠檬酸缓冲液进行抗原修复,10%正常羊血清室温孵育,兔抗人单克隆抗体 PKM2 孵育 4° 过夜(抗体购自 Cell Signaling Technology,抗体的使用浓度为 1:200),进而常温二抗孵育,DAB 显色等步骤。使用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。SP 试剂盒与二氨基联苯胺(DAB)显色剂均购自中山金桥生物有限公司。

1.3 结果判定 采用半定量积分方法^[7],每张切片选择 5 个高倍视野,计数不少于 1 000 个细胞,依据视野下阳性细胞数进行评分:阳性细胞数为 0%~24% 为 1 分,25%~49% 为 2 分,50%~74% 为 3 分,>75% 为 4 分。依据染色强度评分:细胞未着色或呈淡黄色为 0 分,棕黄色为 1 分,棕褐色为 2 分。采用将显色深浅与显色范围评分相乘的方法进行综合评分,而为便于统计分析,统一将 0~3 分为阴性,4~8 分为阳性。

1.4 统计学方法 使用 SPSS18.0 统计软件对结果进行处理,计数资料的组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PKM2 在胃腺癌组织中的表达情况 PKM2 在 67 例胃腺癌组织中有 45 例为阳性表达,阳性表达率为 67.2% (45/67,图 1),且主要定位在胞质中,而 53 例癌旁组织中仅有 15 例阳性表达,其阳性表达率为 28.3%(15/53),明显低于 PKM2 在胃腺癌组织中的表

达,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 PKM2 在胃腺癌组织及癌旁组织中的表达

样本	例数	PKM2 [例(%)]		χ^2 值	P 值
		+	-		
胃腺癌组织	67	45(67.2)	22(32.8)		
癌旁组织	53	15(28.3)	38(71.7)	17.877	0.000

2.2 PKM2 在胃癌组织中的表达与临床病理参数间的关系 PKM2 蛋白在胃癌组织中的表达与性别、年龄、分化程度均无关($P > 0.05$),而有淋巴结转移组 PKM2 蛋白的表达率明显高于无淋巴结转移组($\chi^2 = 12.103, P = 0.001$),肿瘤浸润深度 T₃+T₄ 组 PKM2 蛋白表达明显高于 T₁+T₂ 组中 PKM2 的表达率($\chi^2 = 4.030, P = 0.045$),差异均具有统计学意义,见表 2。

表 2 PKM2 的表达与临床病理参数间的关系(n=67,例)

临床病理因素	分类	PKM2		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
年龄(岁)	≥60	30	13	0.369	0.544
	<60	15	9		
性别	男	28	15	0.228	0.633
	女	17	7		
淋巴结转移与否	是	35	7	12.103	0.001
	否	10	15		
分化程度	G1	13	6	0.195	0.097
	G2	20	9		
	G3	12	7		
肿瘤浸润深度	T1+T2	15	13	4.030	0.045
	T3+T4	30	9		
大小(cm)	>5	26	12	0.063	0.802
	≤5	19	10		

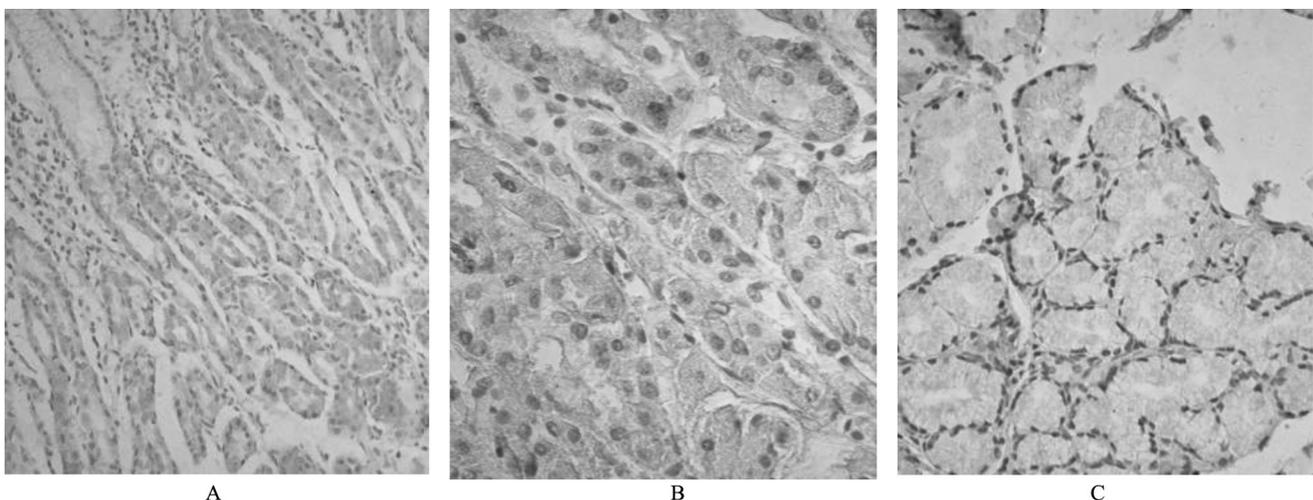


图 1 PKM2 在人胃腺癌组织与癌旁组织中的表达

注:A,高表达,×200;B,高表达,×400;C,PKM2 在癌旁组织中弱表达(×200)。

3 讨论

丙酮酸激酶是糖酵解途径的一个关键酶,其具有四种同工酶(L-PK、R-PK、M1-PK、M2-PK),而这四种同工酶通常以酶的活性四聚体形式存在,其分布亦有一定的组织特异性。M2-PK主要分布于肠、肺以及增殖或未分化的组织中,新近的研究逐渐发现在人类多种恶性肿瘤中亦有PKM2的异常表达,在恶性肿瘤的发生与发展中具有重要的作用。二十世纪50年代,诺贝尔奖得主奥托·瓦伯格提出所谓的“Warburg效应,”即由于肿瘤细胞的生长速度过快,明显高于正常组织,使得肿瘤细胞经常处于一种缺氧状态,为适应这种状态,癌细胞关闭线粒体的有氧氧化,从而基本依赖糖酵解供能^[8]。随着对恶性肿瘤代谢机制的进一步研究,发现存在于恶性肿瘤细胞内的PKM2可促进肿瘤细胞“Warburg效应”的发生,并对肿瘤的发生与发展起着至关重要的作用。PKM2的存在形式以活跃的四聚体和活性低的二聚体为主,而两者之间的转化速度主要由糖酵解磷酸化代谢果糖-1,6-二磷酸盐(Fructose-1,6-Diphosphate, FDP)控制,生理情况下, FDP水平和PKM2活性极低,而在肿瘤细胞中, FDP水平上调并PKM2的活性增加,使得低活性的二聚体向高活性的四聚体转变的速度加快,从而促进恶性肿瘤细胞中糖酵解的速度^[9-10]。

随着研究的深入,PKM2在人类多种恶性肿瘤细胞中异常表达,包括目前发现的在大肠癌患者的粪便样品中,肺癌、乳腺癌、肾细胞癌、卵巢癌血浆中以及胸部恶性肿瘤患者的胸腔积液中都可检测到PKM2蛋白的存在,肝癌、大肠癌肿瘤组织中PKM2的表达亦增高,且其含量与肿瘤的分期密切相关^[11-12]。本研究发现PKM2在人胃腺癌组织中的表达率(67.2%, 45/67)明显高于其癌旁组织(28.3%, 15/53),且差异具有统计学意义,提示PKM2蛋白的表达可能与胃腺癌的发生与发展密切相关,与之前的研究结果^[12]基本一致。Christofk等^[13]的研究结果显示PKM2的高表达可以促进肿瘤细胞的糖酵解的异常激活,通过使用shRNA技术敲除人肺癌细胞株H1299 PKM2基因后,致瘤性明显降低。在PKM2蛋白表达与肿瘤临床病理参数之间的关系分析中显示高表达的PKM2蛋白与肿瘤患者的性别、年龄以及肿瘤的组织学分化程度均无关,而与淋巴结转移与否以及肿瘤侵犯深度有关,提示PKM2蛋白的表达可能参与到胃腺癌的侵袭与转移过程中。谭丽等^[14]的研究提示使用siRNA敲除BGC-823细胞PKM2后,与对照组相比BGC-823细胞所表现的肿瘤迁移作用明显下降。这可能是由

于PKM2蛋白被下调后,糖代谢发生异常,使得ATP能量供应严重缺乏,最终影响细胞的增殖与迁移等生物学行为。

综上所述,人胃腺癌组织中PKM2的表达明显高于其癌旁组织,且与患者淋巴结转移与否,肿瘤侵犯深度密切相关,提示PKM2在胃腺癌的进展与迁移中可能发挥着重要的作用,但其在胃腺癌组织中的具体机制,还有待我们进一步探讨,以期对胃腺癌的早期诊断与靶向治疗提供一个新的方向。

参考文献

- [1] Jemal A. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Fock KM. Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(3): 351-365.
- [3] Hede K. Gastric cancer: trastuzumab trial results spur search for other targets [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(19): 1306-1307.
- [4] Lee J, Kim HK, Han YM, et al. Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40: 1043-1054.
- [5] Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas [J]. Am J SurgPath, 2006, 30: 216-222.
- [6] Vasko J, Allasia C. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant [J]. Eur J Endocrin, 2004, 151(6): 779-786.
- [7] Kim JH, Bogner PN, Ramnath N, et al. Elevated peroxiredoxin 1, but not NF-E2-related factor 2, is an independent prognostic factor for disease recurrence and reduced survival in stage I non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(13): 3875-3882.
- [8] Warburg O. On the origin of cancer cells [J]. Science, 1956, 123: 309-314.
- [9] Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer [J]. Thyroid, 2009, 19(12): 1351-1361.
- [10] Apio MR, Posca D, Raggioli A, et al. Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings [J]. Clin Endocrin, 2007, 66: 678-683.
- [11] Zhang B, Chen JV, Chen DD, et al. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(11): 1643-1646.
- [12] Schneider J. Tumor M2-pyruvate Kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study [J]. Cancer Lett, 2003, 193(1): 91-98.
- [13] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumor growth [J]. Nature, 2008, 452(7184): 2.
- [14] 谭丽, 巴亚斯古楞, 任建林. siRNA沉默PKM2对胃癌BGC-823细胞增殖和迁移的抑制作用[J]. 胃肠病学, 2012, 17(6): 329-333.

(收稿日期: 2013-07-22)