

## 结直肠癌细胞增殖核抗原 及生长抑制因子 4 表达的关系及预后因素

孙旭凌<sup>1</sup>, 申 婧<sup>2</sup>, 黄桂林<sup>1</sup>, 李豫江<sup>1</sup>, 李志刚<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 探讨细胞增殖核抗原(Ki-67)和生长抑制因子4(ING4)在结直肠癌发病机制中的作用及其对患者预后的影响。**方法** 应用免疫组织化学法检测71例结直肠癌组织和30例癌旁正常组织中Ki-67、ING4的表达情况,分析其表达与临床病理特征及预后的关系。**结果** Ki-67在癌组织中阳性表达率(85.9%)高于癌旁组织(6.7%)( $P < 0.05$ ), ING4在癌组织中阳性表达率(56.3%)低于癌旁组织(90%)( $P < 0.05$ )。Ki-67表达与肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移、淋巴结转移数目、TNM分期有关( $P < 0.05$ ), ING4表达与分化程度、有无淋巴结转移、淋巴结转移数目、TNM分期有关( $P < 0.05$ )。Ki-67、ING4在结直肠癌组织中表达呈负相关性( $r = -0.428, P < 0.05$ )。Ki-67高表达组和低表达组术后5年生存率分别为63.9%、85.5%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); ING4阳性组和阴性组术后5年生存率分别为97.4%、45.2%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Cox多因素分析结果显示, TNM分期、ING4表达情况均为影响患者预后的独立因素。**结论** Ki-67、ING4可能参与直肠癌的发生和发展, ING4是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素。

**关键词** 结直肠癌; 细胞增殖核抗原; 生长抑制因子4; 预后  
**中图分类号** R 735.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0132-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.028

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,从2000年~2011年,我国结直肠癌发病率及年龄标准化发病率均显著上升,对患者的生活质量造成了严重的影响<sup>[1]</sup>。细胞增殖核抗原(Ki-67)是具有代表性的增殖抗原之一,与肿瘤的增殖、转移相关<sup>[2]</sup>,生长抑制因子4(inhibitor of growth family member 4, ING4)是近年来新发现的候选抑癌基因,与细胞周期调控、细胞凋亡、DNA损伤修补及血管生成密切相关<sup>[3]</sup>。该研究通过比较结直肠癌患者中Ki-67和ING4的表达情况,观察其与临床病理特征的关系,探讨二者的相关性以及对预后的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集2010年1月~2010年12月石河子大学医学院第一附属医院结直肠癌患者石蜡病理标本71例。71例患者术前均未经过化疗,其中有5例术前肝转移,1例肺转移。其中男33例,女38例,年龄34~79岁,中位年龄62岁;右半结肠癌11例,横结肠2例,左半结肠癌18例,直肠癌39

2017-07-24 接收

基金项目: 新疆生产建设兵团卫生科技计划

作者单位: 石河子大学医学院第一附属医院<sup>1</sup> 普外二科、<sup>2</sup> 神经内科, 石河子 832008

作者简介: 孙旭凌,男,主治医师;

李志刚,男,主任医师,责任作者, E-mail: lizhigang.dyx@163.com

tively, and add up to 91.7% of total CED. The mean CED received per patient was 34.07 mSv (95% CI: 30.845 ~ 37.304), and 51 patients (22.2% of total patients) with CD were exposed to no less than 50 mSv CED. Patients with long disease duration, surgical intervention, ileal location, stricturing or penetrating pattern received a higher dose of radiation. In a Logistic regression, stricturing or penetrating pattern ( $OR = 3.711, 95\% CI: 2.239 \sim 6.151, P < 0.001$ ) and the requirement for azathioprine ( $OR = 4.218, 95\% CI: 1.221 \sim 14.579, P = 0.023$ ) were independent risk factors for the high levels of radiation in CD. **Conclusion** More than one in five of patients with CD are exposed to high levels of ionizing radiation, mainly caused by CT examination. Stricturing or penetrating pattern and the usage of azathioprine are independent risk factors for the high levels exposure of radiation in CD patients. During the clinical management and follow-up, it is important to either monitor the effective dose received per patient, minimizing unnecessary CT examination, or to transform to use no radiation imaging examination, such as MR enterography.

**Key words** Crohn's disease; imaging examination; ionizing radiation; risk factors

例,多发癌(降结肠+低位直肠癌)1例;高分化5例,中分化56例,低分化10例;T1期3例,T2期23例,T3期22例,T4期23例;无淋巴结转移41例,淋巴结转移24例(12例N1,12例N2);I期19例,II期26例,III期20例,IV期6例。同时选择30例距肿瘤>5cm的癌旁正常组织作为对照组。

**1.2 试剂与方法** 兔抗人 ING4 多克隆抗体购自美国 abcam 公司;鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物科技有限公司。采用免疫组织化学 SP 法。将标本连续切片,常规脱蜡、水化,经 0.3%  $H_2O_2$  消化内源性过氧化物酶后,高压抗原修复,一抗(兔抗人 ING4、鼠抗人 Ki-67)、二抗(生物素标记)、三抗(链霉抗生物素-过氧化物酶)作用后,DAB 显色,苏木精复染后脱水透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

**1.3 结果判定** 由两名高年资病理科医师在双盲情况下进行染色评分。Ki-67 以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性。ING4 阳性表达以细胞核和或胞质内出现棕黄色颗粒为准;使用半定量的评分系统来评估抗体的染色效果,计数 5 个高倍视野或 500 个细胞。按染色强度计分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;按阳性细胞所占百分比计分:0 分为阴性,1 分为阳性细胞 $\leq 10\%$ ,2 分为阳性细胞数 11%~50%,3 分阳性细胞数 51%~75%,4 分为阳性细胞数>75%,染色强度与阳性细胞所占百分比乘积为最后评分,本研究以 3 分以上判定为阳性结果。

**1.4 随访** 术后采用电话及入户方式进行随访,起点为手术日,终点事件定义为患者死亡,定义从手术日到患者死亡的时间为生存时间,如患者出现失访或截止研究结束时患者仍生存,则定义为截尾数据,终点为患者出现死亡、失访或至截止时间(2015 年 12 月 30 日)。随访结束时,获得完整随访资料 69 例,随访率为 97.1%。18 例患者死亡,其中 11 例死于癌转移,2 例死于心梗,1 例死于肝硬化。术前肝转移的 4 例患者中 3 例死亡,1 例带瘤生存。术后出现转移的患者有 9 例,其中 5 例肝转移,3 例肺转移,1 例骨转移。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学处理,计数资料的比较用  $\chi^2$  检验,相关性采用 Spearman 相关性分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 和 Longrank 检验,多因素分析采用 Cox 比例风险模型,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Ki-67、ING4 在结直肠癌组织和癌旁组织的表达** Ki-67 在结直肠癌组织阳性表达率为 85.9% (61/71),高于癌旁组织的 6.7% (2/30),两者差异有统计学意义( $\chi^2 = 56.437, P = 0.001$ )。ING4 结直肠癌组织阳性表达率为 56.3% (40/71),低于癌旁组织的 90% (28/30),两者差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.701, P = 0.001$ )。见图 1。

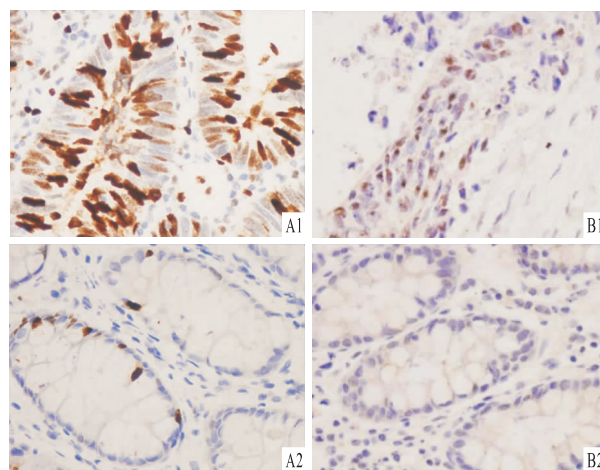


图1 结直肠癌及癌旁组织中 Ki-67 和 ING4 表达 SP $\times 400$   
A: Ki-67; B: ING4; 1: 结直肠癌; 2: 癌旁组织

**2.2 Ki-67、ING4 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系及两者相关性** 71 例结直肠癌组织中 Ki-67 阳性表达率极高,从 5%~95%,不服从正态分布,中位数 75%,以此将 Ki-67 分为高表达、低表达组。分组后,Ki-67 表达与肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移、淋巴结转移数目、TNM 分期有关( $P < 0.05$ ),而与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、分化程度无关;71 例结直肠癌组织中,ING4 阳性表达与分化程度、有无淋巴结转移、淋巴结转移数目、TNM 有关( $P < 0.05$ ),而与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、浸润深度无关。见表 1。

以每位患者 Ki-67、ING4 的原始数据作为变量,Ki-67、ING4 在结直肠癌组织中表达呈负相关性( $r = -0.428, P = 0.001$ )。

**2.3 Ki-67、ING4 的表达水平与结直肠癌患者术后生存率的关系** Ki-67 高表达组和低表达组术后 5 年生存率分别为 63.9%、85.5%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。ING4 阳性组和阴性组术后 5 年生存率分别为 97.4%、45.2%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。单因素分析显示,肿瘤分化程度、浸润深

表1 Ki-67、ING4 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Ki-67		$\chi^2$ 值	P 值	ING4		$\chi^2$ 值	P 值
		低表达(n)	高表达(n)			阴性(n)	阳性(n)		
性别									
男	33	18	15	0.680	0.410	14	19	0.038	0.845
女	38	17	21			17	21		
年龄(岁)									
<60	30	13	17	0.739	0.390	14	16	0.191	0.662
≥60	41	22	19			17	24		
肿瘤部位									
结肠	31	17	14	1.918	0.383	12	19	1.698	0.428
直肠	39	17	22			18	21		
结肠+直肠	1	1	0			1	0		
肿瘤大小(cm)									
<5	36	21	15	2.386	0.122	17	19	0.376	0.540
≥5	35	14	21			14	21		
分化程度									
高分化	5	4	1	3.387	0.184	0	5	13.040	0.001
中分化	56	28	28			22	34		
低分化	10	3	7			9	1		
浸润深度									
T1	3	2	1	9.578	0.023	0	3	4.284	0.232
T2	23	17	6			8	15		
T3	22	7	15			12	10		
T4	23	9	14			11	12		
淋巴结转移									
无	47	28	19	5.877	0.015	7	40	46.781	0.001
有	24	7	17			24	0		
淋巴结转移个数									
0	47	28	19	7.377	0.025	7	40	46.781	0.001
1~3	12	2	10			12	0		
≥4	12	5	7			12	0		
TNM 分期									
I	19	17	2	17.493	0.001	1	18	53.389	0.001
II	26	9	17			4	22		
III	20	6	14			20	0		
IV	6	3	3			6	0		

度、有无淋巴结转移、转移淋巴结数目、TNM 分期、Ki-67 和 ING4 表达情况与患者的预后均差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2、图2、3。

#### 2.4 Cox 模型分析影响结直肠癌患者预后的因素

Cox 多因素分析结果显示,TNM 分期、ING4 表达情况均为影响患者预后的独立因素。见表3。

### 3 讨论

Ki-67 是具有代表性、应用广泛的增殖抗原之一,在细胞周期各期中,其表达受到高度准确的调控,在多种恶性肿瘤中均能检测到高表达的 Ki-67,并表明其与肿瘤的增殖、转移呈正相关性<sup>[2]</sup>。本课题结果显示 Ki-67 在结直肠癌组织阳性表达率为 85.9%(61/71),高于癌旁组织的6.7%(2/30),71

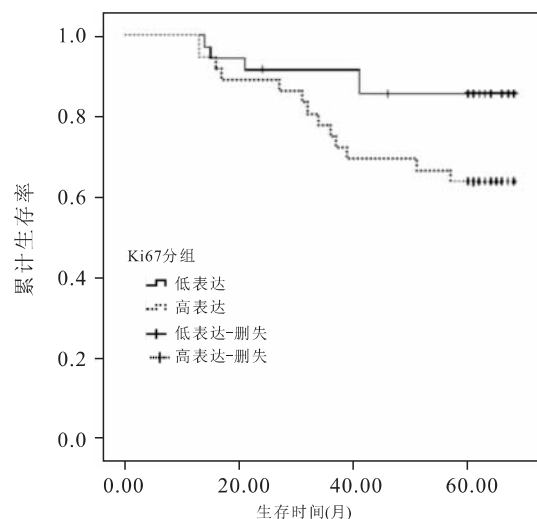


图2 Ki-67 表达阳性与 Ki-67 阴性生存曲线

表2 结直肠癌患者预后影响因素的单因素分析结果

临床病理特征	n	生存率(%)	$\chi^2$ 值	P 值
性别				
男	33	72.1	0.165	0.684
女	38	76.3		
年龄(岁)				
<60	30	65.6	1.931	0.165
≥60	41	80.5		
肿瘤部位				
结肠	31	73.7	2.319	0.314
直肠	39	76.8		
结肠+直肠	1	0.0		
肿瘤大小(cm)				
<5	36	77.1	0.550	0.459
≥5	35	71.4		
分化程度				
高	5	100.0	14.308	0.001
中	56	78.2		
低	10	40.0		
浸润深度				
T2	23	90.7	9.308	0.025
T3	22	72.7		
T4	23	56.5		
淋巴结转移				
无	47	84.9	8.041	0.005
有	24	54.2		
淋巴结转移个数				
0	47	84.9	14.092	0.001
1~3	12	75.0		
≥4	12	33.3		
TMN 分期				
II	26	80.8	30.692	0.001
III	20	60.0		
IV	6	16.7		
Ki-67				
低表达	35	85.5	4.020	0.043
高表达	36	63.9		
ING4				
阴性	31	45.2	26.068	0.001
阳性	40	97.4		

表3 结直肠癌患者预后影响因素的 Cox 多因素回归分析结果

因素	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	RR 值	95% CI	P 值
TMN	0.919	0.350	6.898	2.508	1.263~4.980	0.009
ING4	-3.704	1.137	10.621	0.025	0.003~0.228	0.001

例结直肠癌组织中 Ki-67 阳性表达率极高,从 5% ~ 95%,且不服从正态分布,中位数 75%,以此将 Ki-67 分为高表达、低表达组,其表达与肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移、淋巴结转移数目、TNM 分期有关。这与侯宝洲等<sup>[4]</sup>、马海龙等<sup>[5]</sup>研究结果类似,证实淋巴结转移数量越多、浸润程度越深, Ki-67 的阳性率越高。在本课题中, Ki-67 高表达组和低表达组术后 5 年生存率分别为 63.9%、85.5%,差异有统计

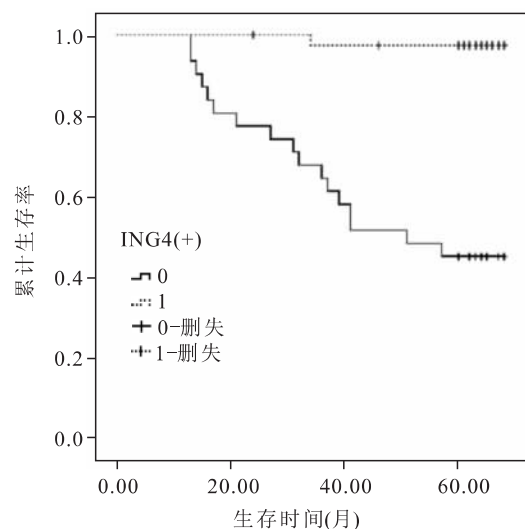


图3 ING4 表达阳性与 ING4 阴性生存曲线

学意义。但侯宝洲、马海龙等未进行 Cox 多因素分析,来判断 Ki-67 是否为结直肠癌的独立危险因素。而本课题在进行 Cox 多因素分析分析时显示, Ki-67 并不是结直肠癌的独立危险因素,原因何在,还需进一步研究探讨,可能是 Ki-67 在结直肠癌中的阳性表达太高,加之免疫组化在多个实验室的评估方法不一致,标准无法统一。这不同于目前 Ki-67 在乳腺癌中的认识,目前在乳腺癌基因分型中 14% 是重要临界值,目前国内外大多数学者认为,虽然 Ki-67 的高低表达的判定值在不同病理实验中心可能不同,可统一采用 14% 作为判断其高低的界值,以区分 Luminal 分型<sup>[6]</sup>。

ING4 蛋白的 C 端有一植物同源结构域,该结构域通过和磷脂酰肌醇磷酸信号分子结合调节细胞生长、增殖与存活<sup>[7]</sup>。Yan et al<sup>[8]</sup> 研究显示 ING4 与乳腺癌、胃癌的浸润转移密切相关。在本课题中, ING4 结直肠癌组织阳性表达率为 56.3% (40/71), 低于癌旁组织的 90% (28/30), ING4 阳性表达与分化程度、有无淋巴结转移、淋巴结转移数目、TNM 有关,而与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、浸润深度无关。ING4 阳性组和阴性组术后 5 年生存率分别为 97.4%、45.2%,差异有统计学意义。Cox 多因素分析结果显示, TNM 分期、ING4 表达情况均为影响患者预后的独立因素。这与赵海舟等<sup>[9]</sup>研究结果相似,该学者研究显示 ING4 在直肠癌组织中的阳性率 53.4% 显著低于正常直肠组织的阳性率 85.5%,多因素 Cox 分析 ING4 表达水平是影响直肠癌患者术后的独立因素。本研究显示,结直肠癌组织中 Ki-67 和 ING4 蛋白的表达呈负相关性,且二者

均与5年生存率有关,究其原因可能 ING4 可能抑制肿瘤细胞恶性增殖,使细胞生长停滞,促进细胞凋亡等,两者存在紧密的负调节关系。目前已有学者将 ING4 可作为治疗骨肉瘤的候选基因<sup>[10]</sup>。

综上所述,本研究结果证实了 Ki-67 和 ING4 在结直肠癌生长、侵袭和转移中的作用,并证实 ING4 是结直肠癌预后的独立危险因素,为进一步的临床研究提供更多参考。

### 参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–32.
- [2] Yin Y, Zeng K, Wu M, et al. The levels of Ki-67 positive are positively associated with lymph node metastasis in invasive ductal breast cancer [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2): 1145–51.
- [3] Unoki M, Kumamoto K, Takenoshita S, et al. Reviewing the current classification of inhibitor of growth family proteins [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(7): 1173–9.
- [4] 侯宝洲, 孙剑经, 赵秀芳, 等. 胃癌中  $\beta$ -catenin、ki67 与 Her-2/Neu 的关系及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(2): 258–61.
- [5] 马海龙, 邱春丽, 邵志勇, 等. Ki-67、p53 及 HER-2 在结直肠癌组织中表达的临床意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(12): 1921–4.
- [6] 邵志敏, 徐兵河, 等. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范 (2015 版) [J]. *中国癌症杂志*, 2015, 25(9): 716.
- [7] Shi X, Hong T, Walter K L, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression [J]. *Nature*, 2006, 442(7098): 96–9.
- [8] Yan R, He L, Li Z, et al. SCF(JFK) is a bona fide E3 ligase for ING4 and a potent promoter of the angiogenesis and metastasis of breast cancer [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(6): 672–85.
- [9] 赵海舟, 牛跃平, 任潇毅, 等. 生长抑制因子 4 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  在直肠癌组织中的表达及其与预后的关系 [J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(3): 389–92.
- [10] Xu M, Xie Y, Sheng W, et al. Adenovirus-mediated ING4 gene transfer in osteosarcoma suppresses tumor growth via induction of apoptosis and inhibition of tumor angiogenesis [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2015, 14(4): 369–78.

## Relationship between Ki-67 and ING4 expression and their prognostic significance in colorectal cancer

Sun Xuling<sup>1</sup>, Shen Jing<sup>2</sup>, Huang Guilin<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>The Second Dept of Genral Surgery, <sup>2</sup>Dept of Neurology,

The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832008)

**Abstract Objective** To investigate the expression of Ki-67 and ING4 and their influence on survival in patients with colorectal cancer. **Methods** The expressions of Ki-67 and ING4 proteins were detected by immunohistochemistry in colorectal cancer tissues from 71 cases of colorectal cancer and normal colorectal tissues from 30 corresponding para-cancerous normal tissues. The correlations between the expressions of Ki-67, ING4 and clinicopathological parameters and prognostic significance were also analyzed. **Results** The colorectal cancer tissues' s positive expression rates of Ki-67 was 85.9%, which was significantly higher in innormal tissue group( 6.7%) ( $P < 0.05$ ). The colorectal cancer tissues' s positive expression rates of ING4 was 56.3%, which was significantly lower in innormal tissue group( 90%) ( $P < 0.05$ ). Ki-67 expressions in colorectal cancer tissues were correlated with infiltration depth, lymph node metastasis, number of lymph node metastasis and TNM staging( $P < 0.05$ ). ING4 expressions in colorectal cancer tissues were correlated with histological grade, lymph node metastasis, number of lymph node metastasis and TNM staging( $P < 0.05$ ). Ki-67 was negatively correlated with ING4( $r = -0.428, P < 0.05$ ). The 5-year survival rate in the Ki-67 positive group( 63.9%) was lower compared with the Ki-67 negative group ( 85.5%) ( $P < 0.05$ ). The 5-year survival rate in the ING4 positive group( 97.4%) was higher compared with the ING4 negative group ( 45.2%) ( $P < 0.05$ ). The multivariate analysis showed that TMN stage and ING4 are independent prognostic factors in colorectal cancer. **Conclusion** Ki-67 and ING4 may be involved in the occurrence and development of colorectal cancer, and ING4 is independent factors affecting the prognosis in patient with colorectal cancer.

**Key words** colorectal cancer; Ki-67; ING4; prognosis