

TK1、Ki-67 在非小细胞肺癌组织中的表达及预后意义

冯 蕾^{1,2}, 饶 秋³, 刘 标³, 樊祥山⁴, 石永利¹, 孟凡青⁴, 冯振卿^{1*}

(¹南京医科大学病理学系, 江苏 南京 210029; ²泰州职业技术学院医学技术学院, 江苏 泰州 225300; ³南京军区南京总医院病理科, 江苏 南京 210002; ⁴南京大学医学院附属鼓楼医院病理科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨细胞质胸苷激酶 1(thymidine kinase 1, TK1)和 Ki-67 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达水平及其对 NSCLC 患者预后的意义。方法:将 202 例 NSCLC 及 63 例癌旁肺组织标本制作成组织芯片,采用免疫组织化学 EnVision 法检测 TK1 和 Ki-67 的表达,探讨其表达水平与临床病理特征及预后的关系。结果:NSCLC 组织中 TK1 (60.89%) 和 Ki-67 (55.45%) 的阳性表达率均显著高于癌旁肺组织 ($P < 0.01$); Spearman 等级相关分析显示二者的表达呈正相关 ($r = 0.518$, $P < 0.001$); NSCLC 中, TK1 和 Ki-67 的表达均与肿瘤分化程度和 TNM 分期显著相关 ($P < 0.05$); Kaplan-Meier 生存分析显示随 TK1 表达的增强和 Ki-67 指数的增高, NSCLC 患者的总体生存期逐渐降低 ($P < 0.01$); Cox 回归分析提示肿瘤 TK1 表达和 TNM 分期是影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$)。结论:TK1 在 NSCLC 的表达与肿瘤的分化、进展有关, TK1 表达有助于对患者预后的评价。

[关键词] 细胞质胸苷激酶 1; Ki-67; 非小细胞肺癌; 组织芯片; 预后

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)07-983-06

The expression and prognostic significance of TK1 and Ki-67 in non-small cell lung cancer

FENG Lei^{1,2}, RAO Qiu³, LIU Biao³, FAN Xiang-shan⁴, SHI Yong-li¹, MENG Fan-qing⁴, FENG Zhen-qing^{1*}

(¹Department of Pathology, NJMU, Nanjing 210029; ²School of Medicine Technology, Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; ³Department of Pathology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002; ⁴Department of Pathology, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of thymidine kinase 1 (TK1) and Ki-67 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and their prognostic value in NSCLC. **Methods:** The tissue microarrays which contain 202 NSCLC cases and 63 normal lung cases were constructed. The expressions of TK1 and Ki-67 were detected in these tissues by immunohistochemistry method. The relationship between expression levels of two makers and the clinicopathological and survival parameters of NSCLC were evaluated. **Results:** The positive expression rates of TK1 (60.89%) and Ki-67 (55.45%) in the NSCLC tissues were significantly higher than those in normal tissue group ($P < 0.0001$, $P < 0.0005$). The Spearman correlation analysis showed that the expression of TK1 were positively correlated with Ki-67 expression ($r = 0.518$, $P < 0.001$). In the group of NSCLC, both TK1 and Ki-67 expression were significant correlated with tumor grade and TNM stage. Kaplan-Meier survival analysis indicated that the survival rate was markedly lower in patients with high expression level of two markers than those with low expression level ($P < 0.05$); Multivariate analysis using Cox regression model identified that TNM stage and TK1 expression were independent prognostic factors of NSCLC ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of TK1 was significantly correlated with tumor grade and TNM stage. TK1 might be employed to evaluate the prognosis of NSCLC patients.

[Key words] thymidine kinase 1; Ki-67; non-small cell lung cancer; tissue microarray; prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 983-988]

[基金项目] 江苏省卫生厅科研基金(H200938)

*通讯作者, E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,其发病率及病死率不仅在欧美国家居首位^[1],在我国也已占城市居民恶性肿瘤病死率的第 1 位^[2],目前肺癌患

者的5年生存率仅15%，其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占全部肺癌的80%^[3]。细胞质胸苷激酶1(thymidine kinase 1, TK1)与细胞的生长和分裂密切相关,主要在细胞周期的S期表达,这与Ki-67的细胞增殖周期特征不同,除G₀期外Ki-67在各期中均有表达。作为肿瘤生长及细胞增殖的标记,TK1目前在乳腺肿瘤、消化道肿瘤的血清检测方面有一些报道^[4-5],但在NSCLC组织内的表达鲜见文献报道。本研究采用组织芯片技术和免疫组织化学方法,检测TK1和Ki-67在NSCLC组织中的表达情况,分析其表达与NSCLC患者临床病理参数及预后的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

收集南京市鼓楼医院2006年1月~2008年12月接受手术治疗并具有完整临床病理及随访资料的NSCLC病例202例,患者术前均未接受放疗和化疗。其中男130例,女72例;年龄36~83岁,中位年龄60岁。术后生存时间1~68个月,中位生存时间30个月。随访日期截止2011年12月,生存期的计算为手术日期到随访日期,或由于复发、转移而死亡的日期为止,截尾值为0。按照2004年WHO肺癌组织学分类及分级标准,其中腺癌150例,鳞癌38例,腺鳞癌14例;高分化23例,中分化110例,低分化69例;TNM分期I期71例,II期48例,III期76例,IV期7例。对照组标本63例取自远离肿瘤的肺组织。

1.2 方 法

1.2.1 组织芯片的制备

查阅全部HE切片,确定有代表性的病变部位并在相应的蜡块上做好标记。应用组织微阵列打孔仪(美国Beecher Instrument公司)在一个空白蜡块(28 mm × 22 mm × 15 mm)上打孔(孔直径1 mm,长4 mm),然后在蜡块的标记部位穿刺与孔大小相同的蜡柱,准确放入空白蜡块的小孔中,依次按序操作。设计的组织阵列为14 × 11阵列。每个病例重复取点3次,以获得较好的代表性。制作完成的组织芯片蜡块连续4 μm切片50张,置于-20℃储存。

1.2.2 免疫组织化学染色

采用EnVision免疫组化染色法,按试剂盒操作说明书染色。鼠抗人TK1单克隆抗体(F12,美国Abnova公司),稀释度1:400;鼠抗人Ki-67单克隆抗体(MIB1,丹麦Dako公司),稀释度1:200;EnVi-

sion试剂盒均购自福州迈新公司。

1.2.3 结果判定

由2位富有经验的病理医师采取双盲法观察免疫组化结果。每张切片高倍镜下随机选取10个视野共纪录1 000个细胞,综合染色强度和阳性细胞数量进行判定^[6]。按切片中细胞着色深浅评分:0分为细胞无显色;1分为黄色;2分为棕黄色;3分为棕褐色。按阳性细胞数占同类细胞数的百分比评分:0分为≤5%;1分为6%~25%;2分为26%~50%;3分为51%~75%;4分为>75%。取2项评分的乘积作为总积分:0分为(-);1~4分为(+);5~8分为(++);9~12分为(+++)。

1.3 统计学方法

所有数据采用SPSS17.0统计软件包处理。采用 χ^2 检验、Spearman秩相关分析等统计学方法。生存数据进行Kaplan-Meier分析,并绘制生存曲线图,应用Log-rank检验差异性。对影响预后的因素采用Cox比例风险回归模型进行多因素分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TK1和Ki-67在NSCLC及癌旁肺组织中的表达

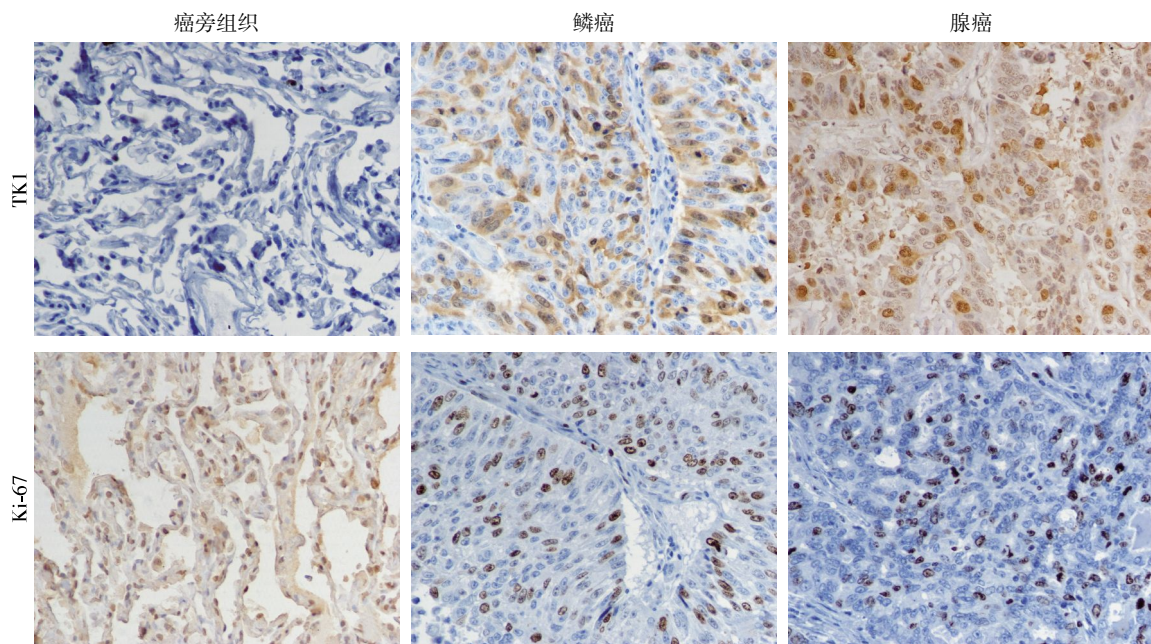
TK1以细胞质呈黄色颗粒为阳性(图1),在202例NSCLC中TK1的阳性表达率为60.89%(123/202),在63例癌旁肺组织中的阳性表达率为17.46%(11/63),差异有统计学意义($\chi^2 = 36.71, P < 0.000 1$);Ki-67以细胞核呈黄色颗粒为阳性(图1),在202例NSCLC中Ki-67的阳性表达率为55.45%(112/202),在63例癌旁肺组织中的阳性表达率为25.40%(16/63),差异有统计学意义($\chi^2 = 17.39, P < 0.000 5$,表1)。将TK1和Ki-67表达分为阴性表达(-)、低表达(+)和高表达(++/+++)3组。Spearman秩相关统计分析显示,NSCLC组织中TK1与Ki-67的表达关系密切,呈明显正相关关系($r = 0.518, P < 0.001$,表2)。

2.2 TK1和Ki-67的表达与NSCLC临床病理特征的关系

NSCLC中TK1和Ki-67的表达与肿瘤分化程度、TNM分期显著相关,与性别、年龄、组织学类型、肿瘤大小、淋巴结转移、神经侵袭、脉管侵袭、吸烟史等无明显相关(表3)。

2.3 Kaplan-Meier单因素生存分析

TK1阴性表达(-)、低表达(+)和高表达(++/+++)



TK1 在癌旁肺组织中呈阴性表达,在鳞癌、腺癌中呈弥漫性表达;Ki-67 在癌旁肺组织中有表达,在鳞癌、腺癌中有表达。

图 1 TK1 和 Ki-67 在非小细胞肺癌中的表达(EnVision,× 400)

Figure 1 The expressions of TK1 and Ki-67 in non-small cell lung cancer(EnVision,× 400)

表 1 TK1 和 Ki-67 在 NSCLC 及癌旁肺组织中的表达

Table 1 Expressions of TK1 and Ki-67 in NSCLC and adjacent normal lung cancer (n)

分组	n	TK1					Ki-67						
		-	+	++/+++	阳性率(%)	χ^2 值	P 值	-	+	++/+++	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
NSCLC 组织	202	79	69	54	60.89	36.71	0.000	90	80	32	55.45	17.39	0.000
癌旁肺组织	63	52	8	3	17.46			47	11	5	25.40		

表 2 Spearman 秩相关统计分析 NSCLC 组织中 TK1 与 Ki-67 表达的关系

Table 2 The correlation between expressions of TK1 and Ki-67 in NSCLC tissue by Spearman analysis (n)

Ki-67	TK1			r 值	P 值
	-	+	++/+++		
-	51	35	4	0.518	< 0.001
+	25	32	23		
++/+++	3	2	27		

组的 3 年生存率分别为 54%、49%和 30%;Ki-67 阴性表达(-)、低表达(+)和高表达(++/+++)组的 3 年生存率分别为 58%、41%和 29%。采用 Kaplan-Meier 法绘制 NSCLC 患者生存曲线,Log-rank 检验不同样本的生存曲线,结果显示如图 2 所示:TK1 不同表达水平组的 NSCLC 患者生存期差异存在统计学意义 ($\chi^2 = 9.271, P = 0.010$);Ki-67 不同表达水平组的 NSCLC 患者生存期差异存在统计学意义 ($\chi^2 = 15.478, P = 0.000$,表 4)。

2.4 Cox 比例风险回归模型分析

对影响预后的因素采用比例风险模型进行多因素分析,纳入的变量有年龄、性别、吸烟史、组织学类型、分化程度、TNM 分期、肿瘤大小、淋巴结转移、TK1 表达等,采用前向逐步法,显示在 $\alpha = 0.05$ 的水平上,TK1 表达和 TNM 分期这 2 个因素是影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素(表 5)。

3 讨论

DNA 补救合成利用体内游离的碱基或核苷合成核苷酸,因反应过程简单,消耗 ATP 少,节省氨基酸的消耗而成为许多恶性肿瘤细胞主要的核苷酸合成途径。胸苷激酶(thymidine kinase,TK)是 DNA 补救合成途径的限速酶,它催化脱氧核糖尿嘧啶核苷(dUrd)生成单磷酸脱氧核糖尿嘧啶核苷(dUMP),然后在其他磷酸激酶的作用下,生成三磷酸脱氧核糖尿嘧啶核苷(dUTP),参与 DNA 的合成^[7]。该酶有 2 种同工酶,即细胞质胸苷激酶(TK1)和线粒体胸苷

表 3 TK1 和 Ki-67 的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

Table 3 Relationship between the expressions of TK1 and Ki-67 and the pathological characteristics of NSCLC (n)

临床病理特征	n	TK1				Ki-67				χ^2 值	P 值		
		-	+	++/+++	阳性率(%)	-	+	++/+++	阳性率(%)				
性别										4.465	0.107	4.468	0.107
男	130	44	47	39	66.15	52	53	25	60.00				
女	72	35	22	15	51.39	38	27	7	47.22				
年龄(岁)										1.267	0.531	4.097	0.129
≤60	103	42	37	24	59.22	39	47	17	62.14				
>60	99	37	32	30	62.63	51	33	15	48.48				
组织学类型										4.035*	0.401	9.204	0.056
腺癌	150	60	55	35	60.00	72	61	17	52.00				
鳞癌	38	14	11	13	63.16	13	14	11	65.79				
腺鳞癌	14	5	3	6	64.29	5	5	4	64.29				
分化程度										9.910	0.042	29.408	0.000
低	69	21	23	25	69.57	17	35	17	75.36				
中	110	46	36	28	58.18	53	42	15	51.82				
高	23	12	10	1	47.83	20	3	0	13.04				
TNM 分期										8.960	0.011	11.138	0.004
I~II	119	54	42	23	54.62	63	44	12	47.06				
III~IV	83	25	27	31	69.88	27	36	20	67.47				
肿瘤最大径(cm)										2.465	0.292	4.197	0.123
≤4.0	121	42	44	35	65.29	61	43	17	49.59				
>4.0	81	37	25	19	54.32	29	37	15	64.20				
淋巴结转移										2.246	0.325	4.568	0.102
无	80	35	28	17	56.25	43	26	11	46.25				
有	122	44	41	37	63.93	47	54	21	61.48				
神经侵袭										1.860	0.395	5.644	0.059
无	163	63	59	41	61.35	76	66	21	53.37				
有	39	16	10	13	58.97	14	14	11	64.10				
脉管侵袭										0.010	0.995	0.268	0.874
无	115	45	39	31	60.87	53	44	18	53.91				
有	87	34	30	23	60.92	37	36	14	57.47				
吸烟										2.246	0.325	3.269	0.195
无	124	53	38	33	57.26	60	43	21	51.61				
有	78	26	31	21	66.67	30	37	11	61.54				

* :为 likelihood ratio 值。

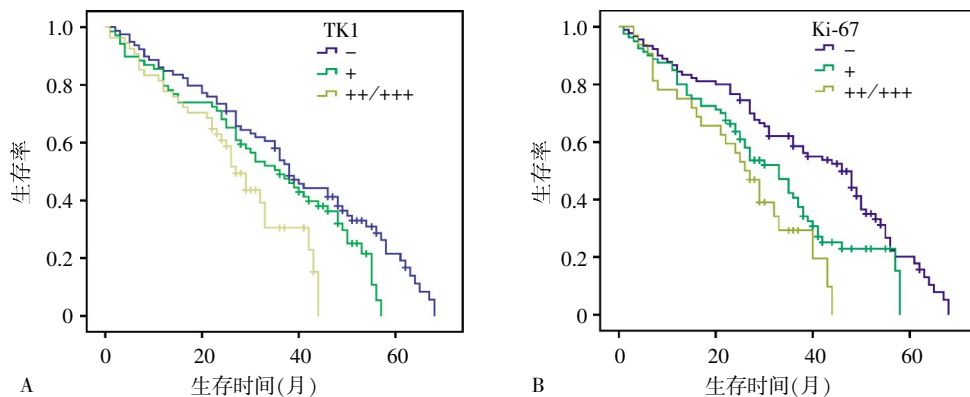


图 2 TK1(A)或 Ki-67(B)阴性表达、低表达和高表达组 NSCLC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

Figure 2 Kaplan-Meier survival curves of NSCLC patients with negative, low and high expressions of TK1 (A) or Ki-67(B)

表 4 NSCLC 患者总生存期的单因素分析(Log-rank test)

变量	n	中位生存时间(月)	χ^2 值	P 值
TK1			9.271	0.010
-	79	38.62 ± 2.481		
+	69	34.33 ± 4.524		
++/+++	54	27.63 ± 1.875		
Ki-67			15.478	0.000
-	90	46.87 ± 4.482		
+	80	33.39 ± 3.370		
++/+++	32	26.97 ± 2.571		

表 5 Cox 回归模型筛选的影响 NSCLC 患者的危险因素

Table 5 The risk factors of NSCLC patients selected by Cox regression model

因素	Wald	P	OR(95%CI)
TK1	4.229	0.040	1.278(1.012~1.615)
TNM	8.753	0.003	1.698(1.196~2.410)

激酶(TK2)。TK2 与细胞分裂周期无关,TK1 则与细胞的生长和分裂密切相关。Johnson 等^[8]发现 TK1 活性呈细胞周期性变化的特点,即在细胞休眠期(G₀期)几乎无法检测到 TK1 的活性,但进入 S 期后其活性迅速增强至少 30 倍;至 G₂期,TK1 的活性又回到 G₁期的水平。这说明 TK1 的表达水平与肿瘤细胞增殖活跃程度一致。由于 TK1 在健康人血清中含量极微或检测不到^[7,9],故目前肿瘤患者多应用血清检测。然而,TK1 表现出细胞质定位特征的免疫组织化学检测要比血清检测更为精准^[10]。目前国内仅见乳腺癌、大肠癌免疫组化检测的相关文献^[11-12],而对于非小细胞肺癌则尚无报道。

本研究结果表明,在 NSCLC 组织中 TK1 的阳性表达率为 60.89%,癌旁肺组织为 17.46%,TK1 在 NSCLC 组织中的阳性表达率明显高于癌旁肺组织,差异有统计学意义 ($P < 0.000 1$)。NSCLC 组织中 Ki-67 的阳性表达率为 55.45%,癌旁肺组织为 25.40%,差异有统计学意义($P < 0.000 5$)。对 TK1 和 Ki-67 进行 Spearman 等级相关分析显示二者的表达呈正相关($r = 0.518, P < 0.001$)。该研究结果与以往文献报道的在乳腺癌和大肠癌中的研究结论一致^[13]。TK1 和 Ki-67 表达与临床病理学参数之间的统计学分析显示,两者均与肿瘤的分化程度、TNM 分期密切相关($P < 0.05$),而与患者的性别、年龄、吸烟史、组织学类型、肿瘤大小、淋巴结转移、神经及脉管侵袭等均无显著相关性。本研究结果提示 TK1 的表达与 NSCLC 肿瘤的分化、进展相关。但

TK1 的表达未能表现出与淋巴结转移、脉管侵袭的相关性,可能与病例数少、随访时间不够长有关,还有待积累病例进一步观察。

Kaplan-Meier 单因素生存分析显示,随着 TK1 和 Ki-67 表达的增强,NSCLC 患者的生存期明显下降($P < 0.01$)。进行 Cox 比例风险回归模型分析显示,TK1 是影响 NSCLC 预后的独立危险因素,提示 TK1 的表达有助于对 NSCLC 患者预后的评价,TK1 有望成为 NSCLC 预后判定的新指标。

Ki-67 是可靠的检测细胞增殖活性的指标^[14],它和 TK1 在增殖指数及其与临床病理参数的相关性方面表现出共同的特征,但 Ki-67 的细胞增殖周期特征不同,除 G₀期外 Ki-67 在各期中均有表达^[15],所以,可以采取 TK1 和 Ki-67 联合检测的方法来观察肿瘤的增殖程度,辅助肿瘤的病理诊断。另外,Ki-67 在某些良、恶性疾病间的表达有一些交叉,有些良性病变的 Ki-67 指数甚至高于某些恶性病变^[16]。因此,相对于 Ki-67 而言,TK1 可能是一种更可靠的增殖相关分子标志物。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90
- [2] Yang L, Parkin DM, Ferlay J, et al. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005 [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(1):243-250
- [3] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277-300
- [4] Brockenbrough JS, Rasey JS, Grierson JR, et al. A simple quantitative assay for the activity of thymidine kinase 1 in solid tumors [J]. Nucl Med Biol, 2007, 34(6):619-623
- [5] 张毅敏, 单绿虎, 徐笑红. 细胞质胸苷激酶 1 在 106 例肿瘤病人的表达 [J]. 中国肿瘤, 2008, 17(3):247-248
- [6] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4):229-231

[7] Zhang F, Li H, Pendleton AR, et al. Thymidine kinase 1 immunoassay: a potential marker for breast cancer [J]. *Cancer Detect Prev*, 2001, 25(1): 8-15

[8] Johnson LF, Rao LG, Muench AJ. Regulation of thymidine kinase enzyme level in serum-stimulated mouse 3T6 fibroblasts [J]. *Exp Cell Res*, 1982, 138(1): 79-85

[9] Li HX, Lei DS, Wang XQ, et al. Serum thymidine kinase 1 is a prognostic and monitoring factor in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(1): 145-149

[10] Zhang F, Shao X, Li H, et al. A monoclonal antibody specific for human thymidine kinase 1 [J]. *Hybridoma*, 2001, 20(1): 25-34

[11] 吴鸿雁, 樊祥山, 孟凡青, 等. TK1、Ki-67 在大肠癌发生发展中作用及其相关性 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2009, 25(3): 282-286

[12] 陈秀娇, 蔡庆发, 张鹏飞, 等. TK1 蛋白在乳腺浸润性导管癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国临床实用医学*, 2009, 3(8): 3-5

[13] Molino A, Pedersini R, Micciolo R, et al. Relationship between the thymidine labeling and Ki-67 proliferative indices in 126 breast cancer patients [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002, 10(4): 304-309

[14] Zheng JN, Ma TX, Cao JY, et al. Knockdown of Ki-67 by small interfering RNA leads to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells [J]. *Life Sci*, 2006, 78(7): 724-729

[15] Martinez-Arribas F, Nunez MJ, Piqueras V, et al. Flow cytometry vs. Ki67 labelling index in breast cancer: a prospective evaluation of 181 cases [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(1A): 295-298

[16] Mao Y, Wu J, Skog S, et al. Expression of cell proliferating genes in patients with non-small cell lung cancer by immunohistochemistry and cDNA profiling [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(5): 837-846

[收稿日期] 2012-03-06

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围: 5~10; 注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$, 不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 不写成 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $(85 \pm 2)\%$ 不能写成 $85 \pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm × 80 cm × 100 cm, 不能写成 $50 \times 80 \times 100 \text{ cm}$, 或 $50 \times 80 \times 100 \text{ cm}^3$ 。

(本刊编辑: 接雅俐)