

SLC12A5 和 Ki-67 在结直肠癌中的表达及临床意义

王晓元¹, 赵轶峰¹, 杨永江¹, 武雪亮², 李坤³, 李曙光¹

摘要 目的 观察结直肠癌组织中溶质载体家族 12A5 基因(SLC12A5)、Ki-67 的表达变化, 并探讨其临床意义。

方法 选取结直肠癌组织 40 例(癌组)、30 例结直肠腺瘤(腺瘤组)和 40 例结直肠正常组织(正常组), 采用免疫组化法检测 3 组结直肠组织的 SLC12A5、Ki-67 的表达, 分析 SLC12A5、Ki-67 阳性表达与结直肠癌临床病理参数的关系。
结果 癌组、腺瘤组和正常组中 SLC12A5 阳性表达率分别为 87.50% (35/40)、46.67% (14/30) 和 32.50% (13/40), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 癌组、腺瘤组和正常组中 Ki-67 阳性表达率分别为 82.50% (33/40)、50.00% (15/30) 和 20.00% (8/40), 差异有统计学意义($P < 0.05$); SLC12A5 和 Ki-67 在结直肠癌中的表达呈正相关性($r = 0.518, P = 0.000$); SLC12A5、Ki-67 阳性表达均与结直肠癌浆膜浸润、TNM 分期、淋巴结转移、肝转移及脉管浸润相关($P < 0.05$)。
结论 结直肠癌组织中 SLC12A5、Ki-67 表达升高, 其高表达与结直肠癌分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、肝转移及脉管浸润密切相关。

关键词 SLC12A5; Ki-67; 结直肠肿瘤; 免疫组化; 临床病理特征; 临床意义

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0420-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.019

尽管近年来结直肠癌的普查力度不断加强、手术方式不断改进、靶向药物的大力推广, 并取得了一系列的突破, 但其术后 5 年生存率仍不到 50%^[1], 因而深入探寻结直肠癌的分子机制和特异性强的标志物, 对于早期诊断、临床治疗、术后监测有着极其重要的价值。

SLC12A5 是近年来发现的一种新型致癌基因, 该基因能显著增强细胞增殖和促进 G1-S 期转化, 抑制肿瘤细胞凋亡^[2]。目前仅在膀胱移行细胞癌

中显示 SLC12A5 呈高表达状态, SLC12A5 在癫痫等一些神经功能疾病中发挥重要作用^[3-4], 而在结直肠癌方面的研究鲜有报道。Ki-67 是目前应用较广的肿瘤增殖性抗原, 其表达指数常用于评估恶性肿瘤细胞的增殖活性^[5]。该研究通过免疫组化法检测 SLC12A5 和 Ki-67 表达在结直肠癌中的表达情况, 探讨其相互关系及与相关临床病理因素间的相关性, 为结直肠癌的诊断、靶向治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2016 年 9 月~2017 年 1 月河北北方学院附属第一医院胃肠肿瘤外科手术切除的结直肠癌组织 40 例、结直肠腺瘤 30 例和正常结直肠组织 40 例, 癌组织取自癌灶中心处, 另取标本残端切缘经病理证实为正常肠组织。全部病例为原发性肿瘤, 且术前未行新辅助放化疗等针对性治疗, 术后标本均在 1 h 内获得, 并存于液氮中。其中结直肠癌组织中男 25 例, 女 15 例, 年龄 32~70(50.5 ± 14.6) 岁; 腺瘤组织中, 男 19 例, 女 11 例, 年龄 30~66(51.3 ± 11.8) 岁, 正常结直肠组织中, 男 22 例, 女 18 例, 年龄 31~68(51.6 ± 11.5) 岁, 3 组一般资料具有可比性。

1.2 主要试剂与实验方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人单克隆浓缩型 SLC12A5 抗体、鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体购自香港 Abcam 公司; DAB 显色剂购自上海 Gene Tech 公司。

1.2.2 免疫组织化学染色 10% 甲醛溶液固定标本, 石蜡包埋, 切片 4 μm, 苏木精-伊红染色, 病理诊断。切片经 80 °C 烤箱烤片 30 min, 乙醇脱水, 灭活内源性过氧化物酶, 枸橼酸缓冲液高温高压水化修复; PBS 洗 3 次, 加一抗(1:100) 50 μl, 4 °C 过夜; PBS 洗 3 次, 加二抗 50 μl。室温下 DAB 显色, PBS 洗 3 次, 苏木精轻度复染, 盐酸乙醇分化, 流水冲洗 10 min, 梯度乙醇脱水, 松节油透明, 树胶封片, 阴性对照为 PBS 代替一抗, 光镜下观察。

1.2.3 阳性结果判定标准 SLC12A5 阳性染色主要集中于细胞质中, 少量表达于细胞核, Ki-67 阳性染色主要集中于细胞核, 均为棕黄色或褐色颗粒, 计

2017-11-27 接收

基金项目: 河北省卫计委医学科研重点计划(编号: 20160364); 张家口市科技局指导性计划(编号: 1621068D)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院¹ 胃肠肿瘤外科、² 血管腺体外科、³ 病理科, 张家口 075000

作者简介: 王晓元, 男, 主治医师, 硕士;

李曙光, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shu-guangli6688@126.com

算阳性细胞百分比并评分, $\leq 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 时为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 时为 3 分, $>75\%$ 时为 4 分; 无着色: 0 分, 浅黄色: 1 分, 黄色: 2 分, 深黄色: 3 分。两者相乘, 0 分为(-), 1~4 分为(+), 5~8 分为(++), 9~12 分为(+++), (+)~(+++) 均视为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计数资料以百分率表示, 运用 χ^2 检验分析 SLC12A5 和 Ki-67 的表达与临床病理参数之间的关系, 相关性分析采用 Pearson 法, 设 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 结直肠癌、腺瘤、正常组织中 SLC12A5 和 Ki-

67 表达情况 癌组、腺瘤组和正常组织中 SLC12A5 阳性表达率组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 癌组、腺瘤组和正常组织中 Ki-67 阳性表达率组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1 和表 1、2。

2.2 SLC12A5 和 Ki-67 表达与结直肠癌临床病理特征的关系 SLC12A5 和 Ki-67 的表达均与肿瘤的浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移、肝转移及脉管浸润相关 ($P < 0.05$)。TNM 分期高、伴淋巴结转移、肝转移和脉管浸润的患者 SLC12A5 和 Ki-67 的表达均增强, 而 SLC12A5 和 Ki-67 的阳性表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小、分化程度等均无相关性, 见表 3。

2.3 SLC12A5 和 Ki-67 在结直肠癌中表达的相互关系 SLC12A5 和 Ki-67 在结直肠癌中的表达呈正相关性 ($r = 0.518, P = 0.000$)。SLC12A5 在 Ki-67

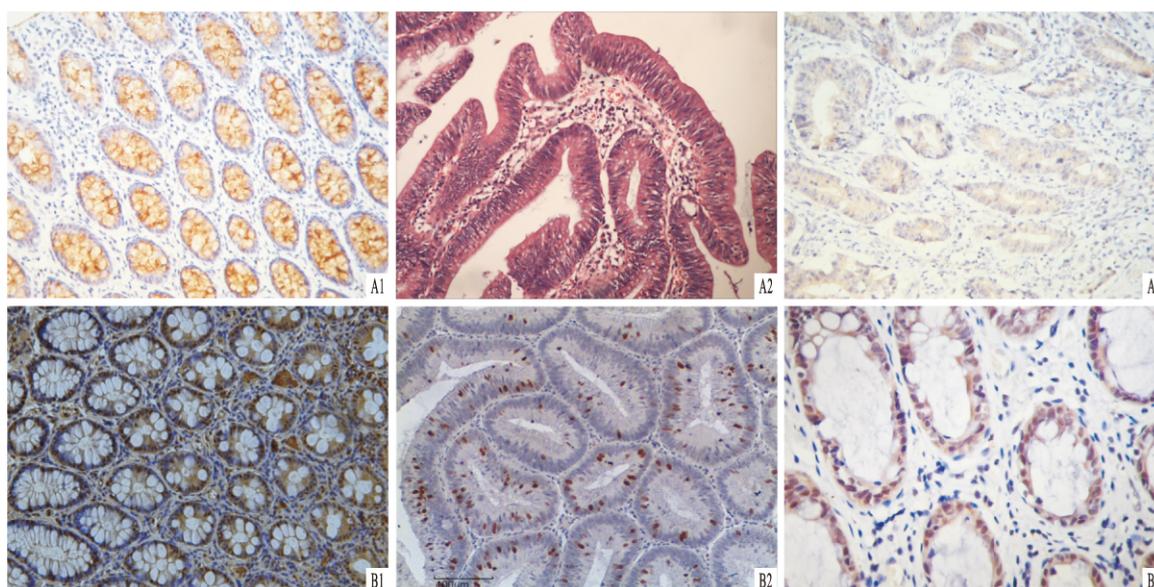


图 1 结直肠正常组织、腺瘤和癌组织中 SLC12A5、Ki-67 蛋白的表达 SP $\times 200$

A: SLC12A5; B: Ki-67; 1: 正常组织; 2: 结直肠腺瘤组织; 3: 结直肠癌组织

表 1 SLC12A5 在结直肠癌组织及癌旁正常组织中的表达

组别	n	SLC12A5(n)				阳性率(%)	χ^2 值	P 值
		-	+	++	+++			
癌	40	5	6	11	18	87.50	16.386	0.000
腺瘤	30	16	6	5	3	46.67	7.957* #	0.008
正常	40	27	7	3	3	32.50	4.525*	0.032

与癌组比较: * $P < 0.05$; 与正常组比较: # $P < 0.05$

表 2 Ki-67 在结直肠癌组织及癌旁正常组织中的表达

组别	n	Ki-67(n)				阳性率(%)	χ^2 值	P 值
		-	+	++	+++			
癌组	40	7	6	11	16	82.50	23.438	0.000
腺瘤组	30	15	8	5	2	50.00	6.581* #	0.012
正常组	40	32	4	2	2	20.00	14.775*	0.000

与癌组比较: * $P < 0.05$; 与正常组比较: # $P < 0.05$

表3 SLC12A5、Ki-67 在结直肠癌组织中的表达及与临床病理因素的关系

病理参数	n	SLC12A5 阳性(%)	χ^2 值	P 值	Ki-67 阳性(%)	χ^2 值	P 值
性别			0.390	0.511		0.584	0.411
男	25	22(88.00)			21(84.00)		
女	15	13(86.67)			12(80.00)		
年龄(岁)			0.455	0.499		0.509	0.437
≥60	22	19(86.36)			18(81.82)		
<60	18	16(88.89)			15(83.33)		
肿瘤大小(cm)			0.083	0.781		1.965	0.193
≥5	26	23(88.46)			22(84.62)		
<5	14	12(85.71)			11(78.57)		
分化程度			0.071	0.962		0.083	0.869
高	9	7(75.00)			8(88.89)		
中	18	16(71.43)			14(77.78)		
低	13	11(70.59)			11(84.62)		
浆膜浸润			8.954	0.002		7.341	0.008
有	34	32(94.12)			30(88.24)		
无	6	3(50.00)			3(50.00)		
TNM 分期			7.097	0.011		7.995	0.006
I + II	8	5(62.50)			4(50.00)		
III + IV	32	30(93.75)			29(90.63)		
淋巴结转移			8.151	0.006		8.004	0.007
有	24	23(95.83)			22(91.67)		
无	16	12(75.00)			11(68.75)		
肝转移			6.333	0.016		6.997	0.012
有	9	9(100.00)			9(100.00)		
无	31	26(83.81)			24(77.42)		
脉管浸润			4.097	0.041		4.511	0.030
有	11	11(100.00)			11(100.00)		
无	29	24(82.76)			22(75.86)		

阳性组中的表达(阳性率 82.05%)明显高于在 Ki-67 阴性组中的表达(阳性率 36.36%),差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 4。

表4 SLC12A5、Ki-67 在结直肠癌组织中表达的相关性(n)

SLC12A5	Ki-67		总计	r 值	P 值
	+	-			
+	29	6	35	0.518	0.000
-	4	1	5		
总计	33	7	40		

3 讨论

SLC12A5 是溶质载体家族 12 亚组中的重要成员之一,定位于人染色体 20q13.12,这是人类多种恶性肿瘤最常见的扩增区^[6]。SLC12A5 最初是作为一种跨膜氯化钾转运体被发现的,这种转运体可以维持神经元内外氯平衡,因而最初对 SLC12A5 的研究仅局限于癫痫、精神分裂症、情感障碍等神经系统疾病^[7-8]。而近年来研究^[9]显示 SLC12A5 突变或异常表达参与某些实体瘤的发生发展。研究^[10]

表明,SLC12A5 抗凋亡的作用是通过抑制凋亡诱导因子和核酸内切酶 G- 依赖的凋亡信号通路介导的,而促转移作用是通过调节基质体系结构的关键要素,包括各类基质金属蛋白酶(MMPs)和纤维连接蛋白(FN 类)等。

Ki-67 是目前应用最广泛的细胞增殖标志物之一,与多种肿瘤的发展、浸润、转移及预后有关,其在细胞周期的 G1、Gs、G2 和 M 期均有表达,是全面准确评估增殖活性的客观指标^[11-12]。

本研究通过免疫组化法检测显示 SLC12A5 在结直肠癌组织中的阳性表达率明显高于正常组织,表明 SLC12A5 过表达在结直肠癌癌变过程中发挥促进作用,SLC12A5 是一种促进结直肠癌发生和发展的致癌基因。结直肠癌伴浆膜浸润者较未侵及浆膜者 SLC12A5 蛋白表达明显增高;伴肝转移、淋巴结转移、脉管浸润者较无转移浸润者 SLC12A5 蛋白表达明显增高;TNM 分期越高,SLC12A5 蛋白表达也越高,表明 SLC12A5 蛋白表达水平与结直肠肿瘤的恶性生物学行为密切相关,对结直肠癌的侵袭、转移有促进作用。Yu et al^[13]通过单细胞测序研究发

现突变型 SLC12A5 在大肠癌患者中呈高表达,而在正常人群中呈低表达,因而表明突变型 SLC12A5 在大肠癌中有潜在的致癌作用。进一步研究显示 SLC12A5 的过表达与大肠癌患者生存期显著下降关系密切。Xu et al^[14] 通过基因测序、基因扩增技术发现 SLC12A5 与原发大肠癌的发生密切相关,其能显著促进细胞增殖,诱导细胞周期 G1 过渡,增强其侵袭、迁移能力。Liu et al^[15] 通过实时定量逆转录聚合酶链反应检测癌细胞系、Western blot 法和免疫组织化学法检测 SLC12A5 在膀胱肿瘤中的表达,发现 SLC12A5 可能作为调节 NF- κ B 信号通路,促进膀胱肿瘤转移。此外,本研究显示 SLC12A5 和 Ki-67 二者在结直肠癌中呈明显正相关性,二者在结直肠癌的发生、进展过程中具有协同作用,但具体机制目前尚不明确。

总之,SLC12A5 的异常高表达参与结直肠癌的发生、演进,其诱导 Ki-67 的过表达可能是促进其浸润、转移的重要途径之一,对二者作用机制的深入探讨将有望为结直肠癌精准化治疗提供科学依据。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] Tao R, Li C, Newburn E N, et al. Transcript-specific associations of SLC12A5 (KCC2) in human prefrontal cortex with development, schizophrenia, and affective disorders [J]. J Neurosci, 2012, 32(15): 5216-22.
- [3] Saito T, Ishii A, Sugai K, et al. A de novo missense mutation in SLC12A5 found in a compound heterozygote patient with epilepsy of infancy with migrating focal seizures [J]. Clin Genet, 2017, 11(5): 2241-52.
- [4] Kursan S, McMillen T S, Beesetty P, et al. The neuronal K⁺ Cl⁻ co-transporter 2 (Slc12a5) modulates insulin secretion [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1732-40.
- [5] Sobocki M, Mrouj K, Camasses A, et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organizes heterochromatin [J]. Elife, 2016, 5: e13722.
- [6] Doshina A, Gourgue F, Onizuka M, et al. Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 370-81.
- [7] Tang X, Kim J, Zhou L, et al. KCC2 rescues functional deficits in human neurons derived from patients with Rett syndrome [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(3): 751-6.
- [8] Saito H, Watanabe M, Akita T, et al. Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay [J]. Sci Rep, 2016, 6(11): 30072-81.
- [9] Burrell R A, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution [J]. Nature, 2013, 501(9): 338-45.
- [10] Merner N D, Chandler M R, Bourassa C, et al. Regulatory domain or CpG site variation in SLC12A5, encoding the chloride transporter KCC2, in human autism and schizophrenia [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9(15): 386-95.
- [11] Yin H, Sheng Z, Zhang X, et al. Overexpression of SOX18 promotes prostate cancer progression via the regulation of TCF1, c-Myc, cyclin D1 and Ki-67 [J]. Oncol Rep, 2017, 37(2): 1045-51.
- [12] 汪洁, 刘斌, 李莉, 等. 孤立性纤维性肿瘤影像学表现及与 Ki-67 表达的相关性 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(5): 777-89.
- [13] Yu C, Yu J, Yao X, et al. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing [J]. Cell Res, 2014, 24(6): 701-12.
- [14] Xu L X, Li X X, Cai M Y, et al. Increased expression of Solute carrier family 12 member 5 via gene amplification contributes to tumour progression and metastasis and associates with poor survival in colorectal cancer [J]. Gut, 2016, 65(4): 635-46.
- [15] Liu J Y, Dai Y B, Li X, et al. Solute carrier family 12 member 5 promotes tumor invasion/metastasis of bladder urothelial carcinoma by enhancing NF- κ B/Ki-67 signaling pathway [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2691.

Expressions of SLC12A5 and Ki-67 in colorectal cancer tissues and its clinical significance

Wang Xiaoyuan, Zhao Yifeng, Yang Yongjiang, et al

(Dept of Gastroenteral Tumor Surgery, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract Objective To explore the expressions of SLC12A5 and Ki-67 in human colorectal adenocarcinoma tissues and discuss the clinical significances. **Methods** The expressions of SLC12A5 and Ki-67 in 40 specimens of colorectal adenocarcinoma tissues (cancer group), 30 specimens of colorectal adenoma tissues (adenoma group) and 40 specimens of normal colorectal tissues (normal group) were selected and immunohistochemistry technique

体外受精-胚胎移植后妊娠早期阴道流血对妊娠结局的影响

徐千花¹, 郭培培¹, 陈娟¹, 张勤², 吴欢¹, 贺小进¹, 曹云霞¹

摘要 **目的** 探讨体外受精-胚胎移植(IVF-ET)后妊娠早期阴道流血的发生率及其对妊娠结局的影响。**方法** 回顾性分析行IVF-ET或胚胎解冻-移植(F-ET)获得临床妊娠823例患者的临床资料,分析早期阴道流血与患者年龄、不孕年限、体质指数(BMI)、孕酮及人绒毛膜促性腺激素水平、不孕类型、流产、妊娠期并发症、早产及剖宫产率的相关性。**结果** ①妊娠早期阴道流血发生率为23.69%,多元回归分析结果显示妊娠早期阴道流血与妊娠期并发症的发生明显相关,差异有统计学意义($OR = 2.90, 95\% CI: 1.85 \sim 4.57, P < 0.05$),与流产、早产及剖宫产率无明显相关;②患者孕前BMI是影响剖宫产的独立危险因素($OR = 1.09, 95\% CI: 1.02 \sim 1.17, P < 0.05$)。**结论** IVF/F-ET后妊娠早期阴道流血对妊娠结局如流产、早产率无明显影响,但与妊娠期并发症的发生密切相关。

关键词 体外受精-胚胎移植;阴道流血;妊娠结局

中图分类号 R 714.12

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0424-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.020

随着体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)广泛开展,在给不孕患者带来福音的同时,也带来了远高于自然妊娠的病理性妊娠风险^[1],因此探讨IVF-ET助孕后影响妊娠结局的因素意义重大。阴道出血是妊娠早期最常见的病理现象,其主要原因包括胚胎发育异常、异位妊娠、早期流产、宫腔积血等,以及合并生殖系统病变如宫颈息肉、宫颈糜烂、阴道炎或创伤等,常给患者带来恐慌和焦虑情绪。目前尚无IVF-ET后早期少量阴道流血是否影响妊娠结局的大样本量研究报道,该研究通过对IVF-ET助孕后患者临床资料的分析旨在进一步探讨IVF-ET后妊娠早期阴道流血对妊娠结局及妊娠期并发症的影响。

2017-12-07 接收

基金项目: 卫生行业科研专项项目(编号: 201402004)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心, 合肥 230022

² 安徽医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系, 合肥 230032

作者简介: 徐千花,女,主治医师;

曹云霞,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: caoyuxia6@126.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2015年1月~2016年1月安

was used to detect the expression of SLC12A5 and Ki-67. The correlation between their positive expression and the clinicopathologic features were analyzed. **Results** The positive rates of SLC12A5 in cancer group, adenoma group and normal group were 87.50% (35/40), 46.67% (14/30) and 32.50% (13/40) respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive rates of Ki-67 in the cancer group, adenoma group and normal group were 82.50% (33/40), 50.00% (15/30) and 20.00% (8/40) respectively, the difference was statistically significant. The positive rates of SLC12A5 in cancer group, adenoma group and normal group were 87.50% (35/40), 46.67% (14/30) and 32.50% (13/40) respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive rates of Ki-67 in the cancer group, adenoma group and normal group were 82.50% (33/40), 50.00% (15/30) and 20.00% (8/40) respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Expression of SLC12A5 was positively related with expression of Ki-67 in esophageal squamous cell carcinoma tissues ($r = 0.518, P = 0.000$). The positive expression of SLC12A5 and Ki-67 were correlated with the depth of tumor invasion, TNM stage, lymph node metastasis, liver metastasis and vessel invasion ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of SLC12A5 and Ki-67 are higher in colorectal adenocarcinoma tissues, which have correlation with the depth of tumor invasion, TNM stage, lymph node metastasis, vessel invasion and liver metastasis.

Key words SLC12A5; Ki-67; colorectal neoplasms; immunohistochemistry; clinicopathological features; clinical significance