

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.14.008

文章编号: 1005-8982(2016)14-0037-05

论著

库欣综合征中 FHIT、Ki-67、PCNA 的表达及相关因素的研究*

洗晶¹, 黄高明², 梁秀就³, 黄松¹, 蔡劲薇¹, 李励¹, 卢德成¹, 罗佐杰¹

(1. 广西医科大学第一附属医院 内分泌科, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学公共卫生学院 流行病学与统计学教研室, 广西 南宁 530021; 3. 广西医科大学第一附属医院 病理科, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 探讨库欣综合征肾上腺皮质病变中肿瘤抑制基因脆性组氨酸三联体(FHIT)、肿瘤增殖抗原 Ki-67、增殖细胞核抗原(PCNA)的表达,探索鉴别库欣综合征肾上腺皮质病变的相关因素。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 49 例库欣综合征肾上腺皮质病变(腺癌 14 例、腺瘤 26 例、增生 9 例)中 FHIT、Ki-67、PCNA 的表达,对临床病理及生化指标采用有序结果的累积比数 Logistic 回归分析探索鉴别库欣综合征皮质病变的相关因素。**结果** FHIT 在肾上腺皮质增生中表达最高,腺瘤次之,腺癌最低(分别为 100%、96.15%和 42.96%), Ki-67 与 PCNA 在肾上腺皮质腺癌的表达最高,腺瘤次之,增生最低(分别为 85.71%、7.69%、0.00%和 100%、96.15%、77.78%)。应用 Logistic 回归分析发现 FHIT、PCNA 两个因素与鉴别腺癌、腺瘤、增生的关系更为密切。**结论** FHIT、Ki-67 和 PCNA 的表达与库欣综合征肾上腺皮质病变密切相关。Logistic 回归分析提示 FHIT、PCNA 与鉴别诊断的关系更为密切。

关键词: 库欣综合征;FHIT;Ki-67;PCNA;Logistic 回归分析

中图分类号: R586.2

文献标志码: A

Expression of FHIT, Ki-67 and PCNA in Cushing syndrome and related factors*

Jing Xian¹, Gao-ming Huang², Xiu-jiu Liang³, Song Huang¹,

Jing-wei Cai¹, Li Li¹, De-cheng Lu¹, Zuo-jie Luo¹

(1. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Epidemiology and Statistics, Public Health College of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To study the expression of FHIT, Ki-67 and PCNA in hypercortisolism of various adrenocortical diseases and explore the correlative factors of the differential diagnosis of hypercortisolism of adrenocortical adenocarcinoma, adenoma and hyperplasia. **Methods** The expressions of FHIT, Ki-67 and PCNA were detected by immunohistochemical staining in 49 cases of adrenocortical diseases, which included 14 cases of adrenocortical carcinoma, 26 cases of adrenocortical adenoma and 9 cases of adrenocortical hyperplasia. The factors correlated to differential diagnosis of hypercortisolism of various adrenocortical diseases were analyzed statistically by ordinal logistic regression. **Results** The expression rate of FHIT in adrenocortical hyperplasia, adrenocortical adenoma and adrenocortical adenocarcinoma was 100.00%, 96.15% and 42.96%, respectively. The expression rate of Ki-67 in adreno-

收稿日期: 2015-11-30

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(No: 81060220); 广西自然科学基金项目(No: 2011GXNSFA018172); 广西留学回国人员科学基金(No: 桂科回 0731019); 广西青年科学基金(No: 桂科青 0728073); 广西卫生厅自筹经费科研课题项目(No: Z20133027)

[通信作者] 罗佐杰, E-mail: zluo888@163.com

cortical adenocarcinoma and adrenocortical adenoma was 85.71% and 7.96%, respectively, while there was no expression at all in adrenocortical hyperplasia (0.00%). The expression rate of PCNA in adrenocortical adenocarcinoma, adrenocortical adenoma and adrenocortical hyperplasia was 100.00%, 96.15% and 77.78%, respectively. Logistic regression single-factor analysis revealed that 8 factors including FHIT, Ki-67, PCNA, abdominal mass, tumor size, osteopenia or fracture, serum cortisol level (4 pm) and blood ACTH level (8 am) were possibly linked to the differential diagnosis of hypercortisolism of the adrenocortical diseases, and multiple-factor analysis showed that FHIT and PCNA were the factors closely correlated to differential diagnosis of adrenocortical carcinoma, adenoma and hyperplasia.

Conclusions The expressions of FHIT, Ki-67 and PCNA are strongly related with hypercortisolism of various adrenocortical diseases. They might be applied as the markers for distinguishing adrenocortical carcinoma, adrenocortical adenoma and adrenocortical hyperplasia. The results of logistic regression analysis suggest that FHIT, Ki-67, PCNA, abdominal mass, tumor size, osteopenia or fracture, serum cortisol (4 pm) and blood ACTH level (8 am) may be the correlated factors of differential diagnosis of adrenocortical carcinoma, adenoma and hyperplasia; moreover, FHIT and PCNA are the factors closely correlated to differential diagnosis of hypercortisolism of adrenocortical diseases.

Keywords: hypercortisolism; FHIT; Ki-67; PCNA; logistic regression

库欣综合征(Hypercortisolism,cushing syndrome)肾上腺皮质病变表现为皮质腺癌、腺瘤及增生。3者在临床上均可表现为库欣综合征,但治疗方法及预后各不相同,而在临床及病理形态学的鉴别诊断上有较大难度^[1]。目前尚未见库欣综合征肾上腺皮质腺癌、腺瘤、增生的诊断相关因素的研究报道。本研究应用免疫组织化学方法,检测库欣综合征肾上腺皮质病变(腺癌、腺瘤及皮质增生)中肿瘤抑制基因脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad,FHIT)、肿瘤增殖抗原 Ki-67(Ki-67 nuclear antigen,Ki-67)、增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen,PCNA)的表达并探讨它们与皮质病变的关系。对库欣综合征的各项临床病理及生化指标进行 Logistic 回归分析,探讨鉴别库欣综合征肾上腺皮质腺癌、腺瘤、增生的相关因素,旨在寻找在库欣综合征肾上腺皮质病变中有鉴别诊断意义的客观指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料

组织标本为广西医科大学第一附属医院 2005~2012 年手术切除、经病理证实的库欣综合征肾上腺皮质病变石蜡包埋标本 49 例。其中,肾上腺皮质腺癌 14 例,腺瘤 26 例,增生 9 例;男性 19 例(37.5%),女性 30 例(62.5%);年龄 5~68 岁,平均(35.84±16.18)岁。全部病例都有 Cushing 综合征典型的临床症状、体征和实验室改变。全部病例行小剂量地塞米松抑制试验均不被抑制。该研究获得本单位伦理委员会的批准及受试者签署的知情同意书。

1.2 检测方法

采用 EliVisionTMs^{super} 二步法,参照试剂盒说明书进行免疫组织化学染色。主要染色步骤:切片脱蜡和水化后抗原修复,一抗 FHIT(工作浓度 1:100)、Ki-67(即用型)、PCNA(即用型)室温下孵育 60 min,然后滴加放大剂、多聚酶结合物,DAB 显色,复染等。兔抗人 FHIT 浓缩型多克隆抗体购自北京中山生物技术公司,鼠抗人 Ki-67、PCNA 单克隆抗体和 EliVisionTMs^{super} 检测试剂盒为福州迈新生物技术公司产品。

1.3 结果判断

根据多数文献的判断方法,综合考虑切片中阳性细胞着色强度、阳性细胞占所观察同类细胞数的百分比两项指标,判断免疫组织化学结果:细胞核或细胞质呈棕褐色或棕黄色颗粒者为阳性细胞。FHIT 蛋白定位于细胞质。Ki-67、PCNA 阳性定位于细胞核。按染色强度评分:无色 0 分,浅黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分;再按阳性细胞所占的百分比评分:阳性细胞 <5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积:0 分为阴性(-),1~4 分为弱阳性(+),5~8 分为中等阳性(++),9~12 分为强阳性(+++)。Ki-67 阳性定位于细胞核,阳性细胞数 <10%为阴性(-),阳性细胞数 ≥10%为阳性:其中 10%~25%为弱阳性(+),25%~50%为中等阳性(++),>50%为强阳性(+++)^[2-3]。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 19.0 统计学软件包进行处理。计量指标采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间

差异比较用方差分析及其两两检验(*q* 检验);分类资料用率或构成比(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法,其两两比较采用 Bonferroni 检验水准调整法;因素筛选采用有序结果的累积比数 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激素及生化指标情况

血皮质醇各时间段 3 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。血促肾上腺皮质激素(adreno cortico tropic hormone,ACTH)8AM 和 0AM 2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),而 4PM 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。24 h 尿 17-OH、24 h 尿 17-KS 以及血钾 3 组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。激素及生化

指标情况见表 1。

2.2 库欣综合征肾上腺皮质病变中 FHIT、Ki-67、PCNA 的表达

库欣综合征肾上腺皮质病变中 FHIT 的表达,腺癌的总阳性率均较腺瘤($\chi^2=11.925, P=0.001$)及皮质增生低($\chi^2=5.568, P=0.018$)。腺癌总阳性率为 42.86%,仅表现为弱阳性,其余全部为阴性。腺瘤与皮质增生在总阳性率的比较中无统计学意义(Fisher 精确概率 $P=1.000$)。见表 2。

库欣综合征肾上腺皮质病变中 Ki-67 的表达,总阳性率的表达腺癌较腺瘤($\chi^2=21.041, P < 0.001$)、皮质增生为高($\chi^2=12.878, P < 0.001$)。腺瘤与皮质增生在总阳性率的表达比较中无统计学意义(Fisher 精确概率 $P=1.000$)。见表 3。

表 1 激素及生化指标情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	腺癌	腺瘤	皮质增生	F 值	P 值
血皮质醇 I/(nmol/L)					
8AM	897.09 ± 231.87	821.83 ± 247.53	920.26 ± 192.22	0.781	0.464
4PM	519.93 ± 239.34	666.41 ± 226.16	798.49 ± 306.61	3.272	0.047
0AM	523.54 ± 128.64	531.65 ± 269.70	771.38 ± 337.63	2.996	0.060
血 ACTH/(pmol/L)					
8AM	3.55 ± 1.56	3.78 ± 1.63	5.85 ± 1.53	6.055	0.005
4PM	3.27 ± 1.89	2.49 ± 0.92	3.56 ± 0.81	3.363	0.043
0AM	3.99 ± 1.78	2.73 ± 1.30	3.36 ± 1.27	3.414	0.041
24 h 尿 17-OH/(μ mol/L)	21.20 ± 10.08	16.29 ± 8.96	15.71 ± 5.58	1.487	0.237
24 h 尿 17-KS/(μ mol/L)	25.43 ± 11.88	17.65 ± 8.57	18.79 ± 5.42	3.152	0.052
血钾 I/(mmol/L)	3.69 ± 0.59	3.32 ± 0.65	3.30 ± 0.79	1.489	0.236

表 2 FHIT 在皮质醇增多症肾上腺病变中的表达 例(%)

组织学类别	例数	阴性(-)	阳性			总阳性率(+~+++) [†]
			+	++	+++	
腺癌	14	8(57.14)	6(42.86)	0(0.00)	0(0.00)	6(42.86)
腺瘤	26	1(3.85)	0(0.00)	16(61.54)	9(34.62)	25(96.15)
皮质增生	9	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	9(100.00)	9(100.00)

注:† $\chi^2=19.720, P=0.000$

表 3 Ki-67 在皮质醇增多症肾上腺病变中的表达 例(%)

组织学类别	例数	阴性(-)	阳性			总阳性率(+~+++) [†]
			+	++	+++	
腺癌	14	2(14.29)	7(50.00)	4(28.57)	1(7.14)	12(85.71)
腺瘤	26	24(92.31)	2(7.69)	0(0.00)	0(0.00)	2(7.69)
皮质增生	9	9(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)

注:† $\chi^2=31.554, P=0.000$

库欣综合征肾上腺皮质病变中 PCNA 的表达,虽然腺瘤、腺癌、皮质增生 3 者的总阳性率总的差异无统计学意义($\chi^2=4.560, P=0.102$),但是在分级比较中,腺癌在较高阳性(++/+++)的表达比腺瘤($\chi^2=4.660, P=0.031$)及增生高($\chi^2=9.136, P=0.003$);腺瘤与增生差异无统计学意义($\chi^2=1.571, P=0.210$)。见表 4。

2.3 库欣综合征肾上腺皮质病变中 FHIT、Ki-67、PCNA 表达与临床指标的关系

49 例组织标本中 FHIT、Ki-67、PCNA 表达与患者的年龄、性别、发病部位(左侧或右侧)无关($P > 0.05$)。见表 5。

2.4 库欣综合征肾上腺皮质病变影响因素分析

分析库欣综合征与各项临床及生化指标的关系,用 logistic 回归作因素筛选。由于库欣综合征的组织学类型分为皮质增生、腺瘤、腺癌 3 类,属有序

多分类的资料,故采用有序结果的 Logistic 回归分析。因素筛选采用逐步法,入选 α 水平为 0.05,剔除 α 水平为 0.10。方程的拟合优度检验: $\chi^2=9.422$, $P=0.991>0.05$,说明方程拟合效果好。分析结果表明:只有 FHIT 和 PCNA 2 个因素与库欣综合征肾上腺皮质病变有关,FHIT 呈负相关,PCNA 呈正相关。见表 6。

表 5 库欣综合征肾上腺皮质病变中 FHIT、Ki-67、PCNA 表达与临床指标的关系 例(%)

临床指标	n	FHIT	P 值	Ki-67	P 值	PCNA	P 值
年龄 / 岁							
<40	30	25(83.33)	0.959	9(30.00)	0.511	29(96.67)	0.296
≥40	19	15(78.95)		14(73.68)		17(89.47)	
性别							
男	17	13(76.47)	0.424	7(41.18)	0.154	17(100.00)	0.878
女	32	27(84.38)		7(21.88)		29(90.63)	
部位							
左侧	29	23(79.30)	0.962 [†]	9(31.00)	0.978 [†]	27(93.10)	1.000 [†]
右侧	19	16(84.20)		5(26.30)		18(94.70)	
双侧	1	0		0		1(100.00%)	

注:† 双侧因只有 1 例,没有列入统计

表 6 多因素有序 Logistic 回归分析结果

因素	回归系数	标准误	Wald	P 值
常数 1	-7.06	2.401	8.646	0.003
常数 2	1.942	1.733	1.255	0.263
FHIT	-3.099	0.891	12.108	0.001
PCNA	2.089	0.752	7.712	0.005

3 讨论

FHIT 是 1996 年 OHTA 等^[4]发现的拟定的抑癌基因,其基因结构和功能改变与人类多种恶性肿瘤的发生、发展有关^[5]。在人类多种恶性肿瘤及多种恶性肿瘤细胞系中 FHIT 基因呈现高频率的纯合缺失、杂合缺失或异常转录。大约 70% 的人类上皮肿瘤和某些癌出现 FHIT 基因缺失、甲基化或蛋白质表达减少^[6]。各种致癌因素影响亦可使 FHIT 蛋白表达受阻,从而使 FHIT 蛋白表达降低。病变组织中检测到 FHIT 蛋白表达的缺失以及缺失的程度与其良恶性及预后有关,相反 FHIT 蛋白的高表达提示为良性^[7]。本研究发现,在库欣综合征肾上腺皮质病变中,FHIT 在腺瘤的表达率最低($P<0.05$),且全部为阴性或弱阳性,皮质增生的表达率最高($P<0.05$),且全部为强阳性表达,腺瘤的表达介于两者之间,提

表 4 PCNA 在皮质醇增多症肾上腺病变中的表达 例(%)

组织学类别	例数	阴性(-)	阳性			总阳性率(+~+++) [†]
			+	++	+++	
腺瘤	14	0(0.00)	1(7.14)	6(42.86)	7(50.00)	14(100.00)
腺癌	26	1(3.85)	11(42.31)	11(42.31)	3(11.54)	25(96.15)
皮质增生	9	2(22.22)	5(55.56)	2(22.22)	0(0.00)	7(77.78)

注:† $\chi^2=4.560$, $P=0.102$

示在库欣综合征肾上腺皮质病变中,肾上腺皮质腺瘤的 FHIT 基因转录产物异常及其蛋白缺失或减少较腺癌和增生更为明显,FHIT 基因转录产物异常及其蛋白表达的改变与肾上腺皮质病变的良恶性有密切关系,其表达下调与肾上腺皮质腺癌发生、发展有密切关系。本研究同时发现 FHIT 在肾上腺皮质腺癌中除有阴性表达外,另有 6/14 例为弱阳性表达,提示 FHIT 基因转录产物异常及其蛋白缺失或减少在恶性肿瘤中亦非全部缺失,部分特别是恶性程度较低腺癌仅为蛋白表达的减少而非完全缺失。

Ki-67 是目前已知的增殖抗原中最具增殖能力及应用最广泛的增殖细胞标记之一,与肿瘤恶性程度、浸润、转移、复发密切相关^[8-9]。本研究发现库欣综合征肾上腺皮质病变中,Ki-67 在腺瘤的表达率最高($P<0.05$),较腺癌和增生更为明显($P<0.05$),提示皮质腺瘤的细胞增殖较腺癌和皮质增生更为活跃。另外发现 Ki-67 的表达随增生、腺瘤、腺癌的细胞增殖程度的提高,表达的阳性强度增加,阳性率亦有增加。提示 Ki-67 表达的高低可反映肿瘤的良恶性。

PCNA 在肿瘤细胞中的表达情况可以敏感地反映肿瘤细胞的增殖活性,与肿瘤的生物行为及恶

性程度密切相关。较高的 PCNA 表达率反映了高水平的细胞增殖状态^[10]。本研究发现,在库欣综合征肾上腺皮质病变中,PCNA 的表达在腺癌最高,腺瘤次之,增生最低($P < 0.05$)。从增生、腺瘤到腺癌,随着细胞增殖水平的提高,PCNA 表达的阳性强度亦随之增加。且由于增生和腺瘤的细胞增殖水平不同,PCNA 表达高低也可以作为两者的判断指标。

在临床上,肿瘤大小常作为区别肿瘤良恶性的指标。肾上腺皮质肿瘤直径超过 5 cm 应考虑有恶变的可能。而肾上腺位于腹后腔,肿瘤太小时不易触到,体格检查时发现腹部包块提示肿瘤直径较大。能否触及腹部包块及肿瘤大小对鉴别库欣综合征肾上腺皮质病变的类型有价值。库欣综合征超过半数患者出现骨量减少或病理性骨折。皮质腺癌的骨量减少甚至病理性骨折更明显。其原因可能与皮质醇增多引起的骨量丢失过多、破骨增加等因素有关。但骨量减少或骨折是否与肿瘤的良恶性有关尚未见相关报道。临床上库欣综合征患者血皮质醇 8AM、4PM 和 0AM 均可出现升高并伴有节律紊乱。4PM 血皮质醇可能因受影响因素较多而未见有相关统计的报道。库欣综合征患者由于肾上腺皮质腺癌、腺瘤或增生自主分泌皮质醇增多,抑制垂体 ACTH 的分泌,使血 ACTH 水平降低。8AM 血 ACTH 水平可能是鉴别肾上腺皮质腺癌、腺瘤及增生的指标之一。

多因素 Logistic 回归分析模型结果只有 FHIT、PCNA 两个因素进入模型。提示 FHIT 和 PCNA 这两个因素与鉴别诊断的关系更为密切。主要原因是其他因素与这两个因素具有较高的相关性,因此,在多因素分析时被排除在方程之外。另外研究的病例数相对较少也是影响多因素分析结果的可能原因。

参 考 文 献:

- [1] ISIDORI A M, KALTSAS G A, MOHAMMED S, et al. Discriminatory value of the low-dose dexamethasone suppression test in establishing the diagnosis and differential diagnosis of cushing's syndrome [J]. *J. Clin Endocrinol Metab*, Nov 2003, 88 (11): 5299-5306.
- [2] KHALIFEH I, MUNKARAH A R, SCHIMP V, et al. The impact of c-kit and Ki-67 expression on patients prognosis in advanced ovarian serous carcinoma [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2005, 24(3): 228-234.
- [3] KISIELEWSKA J, LU P, WHITAKER M. GFP-PCNA as an S-phase marker in embryos during the first and subsequent cell cycles[J]. *Bio of the Cell*, 2005, 97(3): 221-229.
- [4] OHTA M, INOUE H, COTT ICELLI M G, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14. 2 fragile site and renal carcinoma -associated t (3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. *Cell*, 1996, 84: 587-597.
- [5] HU B C, HAN S Y, WANG X, et al. Involvement of the FHIT gene in the ionizing radiation-activated ATR/CHK1 pathway[J]. *J cell Physiol*, 2005, 202(2): 518-523.
- [6] LI W, DENG J, JIANG P, et al. Association of 5'-CpG island hypermethylation of the FHIT gene with lung cancer in south-central Chinese population[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(10): 997-1000.
- [7] SYED V, MUKHERJEEK, LYOUS-WEILER J, et al. Identification of ATF-3, caveolin-1, DLC-1, and NM23-H2 as putative antitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling[J]. *Oncogene*, 2005, 24: 1774-1787.
- [8] KIM S J, KIM B S, CHOI C W, et al. Ki-67 expression is predictive of prognosis in patients with stage I/II extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type[J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(8): 1382-1387.
- [9] VERNILLO R, LORENZI B, BANDUCCI T, et al. Immunohistochemical expression of p53 and Ki67 in colorectal adenomas and prediction of malignancy and development of new polyps[J]. *Int J Biol Markers*, 2008, 23(2): 89-95.
- [10] 赵阳, 李晓军, 隋昕, 等. PCNA 和 Caspase-3 在肺癌组织中的表达及意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(2): 154-156.

(张蕾 编辑)