

鼻咽癌组织 ki67 表达与外周血 NK 细胞的关系及意义 *

韦祝新¹ 李 萍^{2△} 王仁生¹ 康 敏¹ 胡 凯¹

(1 广西医科大学第一附属医院放疗科 2 广西医科大学第一附属医院病理科 广西 南宁 530021)

摘要 目的:研究鼻咽癌组织 Ki67 的表达及外周血 NK 细胞水平的意义。方法:检测 66 例鼻咽癌组织 Ki67 水平及与外周血 NK 细胞的百分含量。结果:Ki67 表达阳性率为 96.97%,与临床分期有关($r=0.290, P=0.030<0.05$),与淋巴结转移状态相关性在统计学上无意义($r=0.068, P=0.412>0.05$);放疗前中后鼻咽癌外周 NK 细胞水平差别均有统计学意义(前中、中后、前后 $F=0.513, 0.627, 0.623$, P 分别为 0.005, 0.004, 0.000, 均 <0.05) Ki67 的表达与放疗后 NK 细胞 NK 值负相关($r=-0.433, P=0.017<0.05$)。结论:Ki67 的表达可能与临床分期有关,可能与放疗后 NK 值有关, Ki67 表达与外周血 NK 细胞水平可以提示鼻咽癌组织增殖活跃程度和机体防御系统的状态。
关键词 鼻咽癌; Ki67 基因; NK 细胞
中图分类号 R739.63 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)18-3531-03

Relationship between Expression of Ki-67 Protein and NK Cell
of Peripheral Blood*

WEI Zhu-xin¹, LI Ping^{2△}, WANG Ren-sheng¹, KANG Min¹, HU Kai¹

(Dept. of Radio Therapy of the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021 China)

ABSTRACT Objective: To investigate relationship between expression of Ki-67 protein and NK cell of peripheral blood. **Methods:** We detected Ki67 level of NPC tissue and NK cell percentage composition of peripheral blood in 66 NPC cases. **Results:** The positive rate of Ki-67 in was 96.97%, The expression intensity of Ki-67 had significant relation with the clinical stage of NPC ($r=0.290, P=0.030<0.05$) and no significant relation with metastasis state of lymph ($r=0.068, P=0.412>0.05$). There are significance differences in the level of NK cell of peripheral blood either before or underway or after radiotherapy of NPC(the seperated F values of front part, rear part and middle part are 0.513, 0.627, 0.623 and the counterparts of P values are 0.005, 0.004, 0.000, all of which are less than 0.05). The expression intensity of Ki-67 had Negative correlation with the NK cell of peripheral blood. **Conclusion:** The expression intensity of Ki-67 may be related with clinical stage and NK level after radiotherapy, expression of Ki-67 protein and NK cell in peripheral blood may indicate proliferation activity of NPC tissue and status of body defense.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Ki-67; NK cell
Chinese Library Classification(CLC): R739.63 **Document code:** A
Article ID:1673-6273(2011)18-3531-03

Ki67 是一种细胞核增殖抗原,其表达和细胞周期密切相关,广泛应用于评估肿瘤组织细胞的增殖活性,一般情况下其分化程度和增殖活跃度对评估恶性肿瘤的预后和放射治疗效果具有重要意义^[1]。自然杀伤细胞(NK 细胞)是含有穿孔蛋白和粒酶颗粒的非特异性细胞毒淋巴细胞,对杀伤肿瘤细胞具有重要作用,检测外周血 NK 细胞活性对了解恶性肿瘤细胞免疫功能有重要价值^[2]。本研究以鼻咽癌为研究对象,研究鼻咽癌组织 Ki67 的表达及与外周血 NK 细胞的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

2007 年 1 月-2008 年 12 月我院收治 66 例经病理证实的鼻咽癌患者,其中男性 50 人,女性 16 人,年龄 15-73 岁,平均年龄 44.91 岁。排除急、慢性感染、糖尿病、自身免疫疾病和急

性创伤患者。
1.2 病理类型
临床分期 期 2 例, 期 21 例, 期 25 例, 期 18 例。有颈淋巴结转移者 39 例,无颈淋巴结转移者 27 例。低分化鳞状细胞癌 62 例,低分化鳞状细胞癌 2-3 级 1 例,未分化癌 3 例。
1.3 治疗
分次常规采用 6MVX 照射,原发灶总剂量(68~76)Gy,每次 2Gy,每周 5 次;颈部淋巴结总剂量(68~74)Gy,每次 2Gy,每周 5 次。
1.2 方法
1.2.1 Ki67 检测及结果判定 66 例鼻咽癌标本经中性福尔马林固定、石蜡包埋,切片后采用 SP 免疫组化染色盒检测,结肠癌为阳性对照, PBS 缓冲液代替一抗进行阴性对照。Ki67 表达计数标准分 5 级:无阳性细胞为 "-", 阳性细胞 $<25\%$ 为 "+", 阳性

* 基金项目 广西壮族自治区卫生厅医疗卫生科研课题 Z2003052
作者简介:韦祝新,女,肿瘤学硕士,主治医师。研究方向:鼻咽癌的临床与基础研究
△通讯作者:李萍(1973-),女,耳鼻喉专业博士,病理科副教授
(收稿日期:2011-04-09 接受日期:2011-05-23)

细胞 25%~50%为 "++" ,阳性细胞 50%~75%为 "+++" ,阳性细胞>75%~100%为 "++++"。

1.2.2 NK 细胞活性测定 采用流式细胞术检测患者放疗前后外周血 NK 细胞活性,检测仪器为 Beckman Coulter 公司 Epics MCL-XL 流式细胞仪 ,NK 细胞活性检测抗体为北京晶美生物工程公司生产。

1.3 统计分析

应用 SPSS17.0 统计学软件进行统计学处理,对数据进行

秩和检验、方差分析和相关分析 ,检验水平 $\alpha=0.05$,当 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ki67 表达情况

66 例鼻咽癌组织的 Ki67 表达阳性率为 96.97%(64/66)。经秩和检验($\alpha=0.05$) ,Ki67 在不同鼻咽癌临床分期正相关($r=0.29$, $P<0.05$)(表 1)。

表 1 Ki67 表达强度与鼻咽癌临床分期、淋巴结转移的关系

Table1 Relationship of Expression of Ki 67 and nasopharyngeal carcinoma stage, lymph node metastasis

	n	Ki67					P
		-	+	++	+++	++++	
Clinical stage							
	2	0	1	1	0	0	$r=0.29$ $0.03<0.05$
	21		2	8	5	6	
	25	2	3	4	11	5	
	18	0	0	4	7	7	
Lymph node metastasis							
Yes	39	2	4	7	15	11	$z=0.068$ $0.412>0.05$
No	2	0	2	10	8	7	

2.2 外周血 NK 细胞含量水平

放疗前、放疗中和放疗后鼻咽癌患者外周血 NK 细胞水平分别为 18.76 ± 9.45 、 23.39 ± 12.67 和 19.59 ± 10.17 。经 ANOVA

分析($\alpha=0.05$) ,放疗前与中、放疗中和放疗后三组鼻咽癌患者外周血 NK 细胞水平之间差别均有统计学意义 ($P<0.05$)(表 2)。

表 2 放疗前后鼻咽癌患者外周血 NK 细胞百分含量

Table2 Percentages of peripheral blood NK cells of Nasopharyngeal carcinoma patients before and after Radiotherapy

	Number of samples	NK cell (%)	F	P
Anterior radiation	66	18.76 ± 9.45	Anterior- Middle :0.513	$0.005<0.05$
Middle radiation	66	23.39 ± 12.67	Middle-after 0.527	$0.004<0.05$
After radiation	66	19.59 ± 10.17	Anterior- after 0.623	$0.000<0.05$

2.3 ki67 的表达与外周血 NK 细胞的关系

Ki67 的表达与放疗前和放疗中 NK 百分值在统计学上没

有相关 ,Ki67 的表达与放疗后 NK 的百分比负相关($r=-0.433$, $P=0.17<0.05$)(表 3)。

表 3 ki67 的表达与 NK 百分值在放疗前中后的关系

Table3 Relationship of ki67 expression and NK percentile in radiotherapy before, during and after the Radiotherapy

	Number	ki67	
		r	p
Anterior radiation	66	-0.164	$0.405>0.05$
Middler adiation		-0.264	$0.174>0.05$
After adiation		-0.433	$0.017<0.05$

3 讨论

鼻咽癌是发生于鼻咽粘膜的恶性肿瘤,恶性程度较高 ,早期即可出现颈部淋巴结转移。虽然鼻咽癌治疗以放疗为主 ,因转移等问题 ,至今疗效仍差强人意^[3]。因为肿瘤增殖和凋亡的比值各异 ,不同患者的鼻咽癌生长速度各不相同 ,导致肿瘤细胞的增殖活性与肿瘤的生物学行为息息相关 ,肿瘤细胞的分化程度越差、增殖活跃度越高 ,其越容易转移。Ki67 抗原是目前较为肯定的核增殖标志 ,其半衰期短 ,降解迅速 ,是目前检测肿

瘤细胞增殖活性比较可靠的指标,其表达与肿瘤细胞发生、发展、浸润、分期、转移密切相关 ,检测标本中病变组织的 Ki67 抗原 ,对鼻咽癌治疗和预后具有重要的理论意义^[4]。鼻咽癌治疗以的治疗局部控制因放疗设备的改进及新技术的应用 ,其局部控制效果有所提高 ,但远处转移问题仍难有改善。如果治疗前能准确地预知鼻咽癌病人的免疫及是否容易转移等情况 ,对鼻咽癌的干预治疗和预后将有重要意义。一般说来 ,患者的免疫功能好 ,抵抗力强 ,治疗疗效就好 ,不易发生转移。NK 细胞是非特异性细胞毒细胞 ,表型为 CD16+ 或 CD56+ ,是机体重要的免疫细

胞,不仅与抗肿瘤和免疫调节有关,还可以杀伤肿瘤细胞,是机体抗肿瘤免疫监视的一道重要防线,检测外周血中NK细胞含量可以了解细胞免疫状态,对于选择临床治疗方法、评估预后具有一定的参考价值^[5]。

3.1 鼻咽癌组织 Ki67 表达

Ki67 高表达是细胞增殖活跃的重要标记,能够准确反映肿瘤细胞的增殖速率,对肿瘤的转移及预后有影响。申玉梅等研究认为 ki67 与有无远处转移、生存期及临床分期有关,而与有无淋巴结转移在统计学上无意义^[6]。钟伟铭等报道 159 例鼻咽癌患者中 Ki-67 阳性率为 98.7%,其表达强度与临床分期、原发灶无明显关系,但与颈部淋巴结转移有关^[7]。蔡良真等报道 Ki67 在鼻咽癌组织的表达率明显高于鼻咽慢性炎,在鼻咽癌淋巴结转移组中的表达率高于非转移组,说明 Ki67 参与了鼻咽上皮的恶性转化和增殖,促进鼻咽癌的淋巴道转移,影响患者的预后^[8]。本研究中 66 例鼻咽癌组织中 Ki67 表达阳性率为 96.97%,与鼻咽癌临床分期正相关,与淋巴结转移状态的表达强度在统计学上没有差异。与申玉梅等的结果相同,与钟伟明等结果不同。可能与取材、实验方法、病例数及样本的偏移等有关。本研究中与临床分期有关而与淋巴结分期无关,可能是鼻咽癌临床分期已包含淋巴结转移状态,而且比淋巴结转移状态更能反映患者的真实情况。更多更准确的结果有待进一步扩大样本等的研究。

3.2 外周血 NK 细胞水平

NK 细胞是机体抗肿瘤的重要免疫因素,杀伤活性无 MHC 限制,不依赖抗体,作用于靶细胞后杀伤作用出现早,在体外 1 小时、体内 4 小时即可见到杀伤效应,在机体免疫监视、与免疫调节方面起重要作用。有研究报道,肿瘤患者外周血 NK 细胞活性明显低于正常人,病期越晚活性越低^[9,10]。本研究中 NK 细胞的表达与临床分期无关,推测样本选择偏移引起,需要加大样本量重复检测。放疗前、放疗中和放疗后三组间鼻咽癌患者外周血 NK 细胞水平均有显著差别,且放疗中最高,放疗结束有所下调,可能与肿瘤患者存在细胞免疫异常,瘤负荷的存在对免疫有所刺激,且放疗刺激对 NK 细胞活化有影响等诸多综合因素有关,在放疗中到放疗后,随着瘤负荷的减少,对免疫的刺激也减少,故外周血 NK 细胞水平有所下调。

3.3 Ki67 阳性表达与外周血 NK 水平含量关系

有研究报道 Ki67 的表达是细胞增殖活跃的重要标记,与肿瘤的增生、浸润、转移等有相关,而外周血 NK 细胞水平含量与肿瘤的发生、发展密切相关,在一定程度上能够反映肿瘤宿主的细胞免疫状态^[11]。本研究表明 Ki67 阳性表达强度与放疗后外周血 NK 细胞水平含量有负相关关系,说明鼻咽癌的发生及治疗效果是多因素共同作用的结果,虽然 Ki67 表达与放疗前外周血 NK 细胞水平没有直接关系,但是它们受机体免疫状态影响,可以提示鼻咽癌组织增殖活跃程度和机体防御系统的状态,对及时了解患者机体免疫状态和指导临床治疗均有积极意义。

参考文献(References)

[1] 朱晓玲,李蓉,黄裕等. p16 及 Ki67 在子宫颈癌及癌前病变中的表达[J].重庆医学,2009,38(16):55-57
Zhu Xiao ling, Li Rong, Huang Yu, et al. Expressions of p16 and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer and their clinical significance[J]. Chongqing medicine, 2009,38(16):55-57

[2] 周健,牛新清,梅家转等. 同种异体 NK 细胞对不同肿瘤细胞的体外杀伤活性及其机制的初步探讨[J].现代免疫学,2008,28(1):9-13
Zhou Jian, Niu Xinqing, Mei Jiazhuang, et al. Cytotoxic activities of allogenic NK cells on different tumor cells in vitro and their possible mechanism[J]. Current Immunology, 2008,28(1):9-13

[3] 高云生,胡超苏,应红梅等. 1837 例鼻咽癌疗效的回顾性分析[J].中华放射肿瘤学杂志,2008,17(5):86
Gao Yunsheng, Hu Chaosu, Ying MeiHong. Retrospectively analyse the effect Of 1837 cases of nasopharyngeal carcinoma [J]. Chinese Journal of Radiation Oncology, 2008,17(5):86

[4] 潘艳东,黎静,郭晓彤等. Ki67,VEGF 和 EGFR 的表达与鼻咽癌临床分期及分化程度的关系[J].广东医学,2009,30(7):85-87
Pan Yandong, Li Jing, Guo Xiaotong, et al. Relationship of Ki 67, VEGF and EGFR expression and clinical staging of nasopharyngeal carcinoma and degree of differentiation[J]. Guangdong Medical Journal, 2009,30(7):85-87

[5] 王杨,郭坤元,黄宇贤等. 不同遗传背景 NK 细胞对转化细胞的杀伤效应[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(18):83-86
Wang Yang, Guo Kun-yuan, Huang Yu-xian. Natural killer cells from different genetic backgrounds exert cytotoxic effects on transformed cells [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008,12(18):83-86

[6] 申玉梅,齐文娟,申洪.鼻咽癌组织 Ki67 表达的阳性单位与癌转移、TNM 分期及患者生存时间的关系[J].中国体视学与图象分析,2010,15(2) 213-218
Shen Yumei, Qi Wenjuan, Shen Hong. Relationship of Ki67 expression in nasopharyngeal carcinoma with metastasis-positive units, TNM stage and patient survival time[J]. Chinese Journal of Stereology and Image Analysis, 2010,15(2):213-218

[7] 钟伟铭,马丽萍,蔡永林等. Ki-67 表达与鼻咽癌放射敏感性的关系[J].肿瘤防治研究,2010,37(2):195-197
Zhong Wei-ming, Ma Li-ping, Cai Yong-li, et al. Relationship between Expression of Ki-67 Protein and Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2010,37(2):195-197

[8] 蔡良真,支梅芬,何文艳. 62 例鼻咽癌中 Ki67 和 CD44v6 表达及意义[J].肿瘤学杂志,2010,16(9):729-731
Cai Liang-zhen, Zhi Mei-fen, He Wen-yan. Expressions of Ki67 and CD44v6 in 62 Cases with Nasopharyngeal Cancer and its Significance [J]. Journal of Oncology, 2010,16(9):729-731

[9] 杨秀华,张羽,韩波等. 肝细胞癌患者外周血中调节性 T 细胞、NK 细胞及 NKT 细胞的表达及意义 [J]. 哈尔滨 医科大学学报,2010,44(3):31-33
Yang Xiu-hua, Zhang Yu, Han Bo, et al. Expression and significance of regulatory T cells,NK cells and NKT cells in peripheral venous blood of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Harbin Medical University, 2010,44(3):31-33

[10] 田志刚. 基于 NK 细胞的肿瘤免疫治疗研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2009,16(1):7-10
Tian Zhi-gang. Progress in NK cell-based immunotherapy of tumor [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy,2009,16(1):7-10

[11] 田志刚,陈永艳. NK 细胞的发育、分化与识别机制[J].中国免疫学杂志,2009,25(1):38-41
Tian Zhi-Gang, Chen Yong-Yan. Development,differentiation and immune recognition of natural killer cells [J]. Chinese Journal of Immunology, 2009,25(1):38-41