

动力相关蛋白1、Ki-67在胃腺癌组织中的表达及其临床意义

吕佳乐¹, 王雅¹, 朱云娜², 梁路¹, 李宁^{3*}

1.山西医科大学,山西太原 030001

2.北京航天总医院 病理科,北京 100076

3.山西医科大学第一医院 病理科,山西太原 030001

【摘要】目的 探讨胃腺癌组织中动力相关蛋白1(DRP1)、Ki-67表达情况及其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测DRP1在112例接受根治性手术切除的胃癌患者的胃腺癌组织及相应癌旁组织中的表达,检测Ki-67在胃腺癌组织中的表达。应用透射电镜观察胃腺癌组织超微结构的变化。**结果** DRP1在胃腺癌组织中的阳性率明显高于癌旁组织($P<0.001$);DRP1在浸润深度、TNM分期、淋巴结转移、脉管侵犯等情况不同的胃腺癌组织中表达有差异,且差异有统计学意义($P<0.05$);Ki-67在年龄、分化程度、Lauren分型不同的胃腺癌组织中表达有差异,差异有统计学意义($P<0.05$);DRP1表达情况与Ki-67呈正相关($r=0.474, P<0.001$)。透射电镜下,胃腺癌细胞线粒体肿胀、膜缺失,线粒体嵴断裂。**结论** DRP1在胃腺癌组织中高表达,且与较差的生物学行为相关。

【关键词】 动力相关蛋白1; Ki-67; 胃腺癌

Expression of dynamin related protein 1, Ki-67 in gastric adenocarcinoma and its clinical significance

Lyu Jiale¹, Wang Ya¹, Zhu Yunna², Liang Lu¹, Li Ning^{3*}

1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

2. Department of Pathology, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China

3. Department of Pathology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

Corresponding author: Li Ning, E-mail: shanxingning@126.com

【Abstract】Objective To investigate the expression of dynamin related protein 1 (DRP1) and Ki-67 in gastric adenocarcinoma tissues and their clinical significance. **Methods** The expression of DRP1 and Ki-67 in 112 cases of gastric adenocarcinoma who underwent radical surgical resection were detected by immunohistochemistry. The ultrastructure of gastric adenocarcinoma was observed by transmission electron microscope. **Results** The positive rate of DRP1 in gastric adenocarcinoma tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P<0.001$). DRP1 was expressed differently in gastric adenocarcinoma tissues with different infiltration depth, TNM stage, lymph node metastasis and vascular invasion, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); Ki-67 was expressed differently in gastric adenocarcinoma tissues with different age, differentiation degree and Lauren type, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); the expression of DRP1 was positively correlated with cell proliferation index Ki-67 ($r=0.474, P<0.001$). Under transmission electron microscope, mitochondria of gastric adenocarcinoma cells were swollen, membrane-deficient and mitochondrial cristae broken. **Conclusion** DRP1 is highly expressed in gastric adenocarcinoma tissues and is associated with poor biological behavior.

【Key words】 Dynamin related protein 1; Ki-67; Gastric adenocarcinoma

胃癌是全世界常见的恶性肿瘤之一,且死亡率较高,在癌症相关的死亡原因中排第3位^[1]。中国是胃癌的高发地区,近年来,随着检查手段和治

疗水平的不断提高,胃癌患者的预后得到了很大改善,但是由于原发性或获得性耐药,患者的5年存活率仍旧较低,仅为27.4%^[2]。因此,探索胃癌诊断的新型标志物,研究胃癌治疗靶点,对改善患者生存质量,延长生存时间有重要意义。

*通信作者:李宁, E-mail: shanxingning@126.com

线粒体是为细胞供能的“能量工厂”,通过不断地分裂、融合为参与调控细胞的多种生命活动。动力相关蛋白1(dynamin related protein 1,DRP1)是调控线粒体分裂的关键蛋白,在多种肿瘤中出现了表达上调,并参与了肿瘤细胞的增殖、转移。Ki-67是一种DNA结合蛋白,被广泛应用于标记细胞尤其是肿瘤细胞的增殖指数。本研究希望通过免疫组织化学法检测人胃腺癌组织中DRP1、Ki-67的表达,分析其与临床病理资料之间的关系及二者之间的相关性,探讨胃腺癌治疗的新靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性收集山西医科大学第一医院2018年12月至2020年11月行根治性手术切除的胃癌组织样本及相应癌旁组织。纳入标准:经术后病理明确诊断为胃腺癌;临床资料完整;术前未经过放化疗或免疫治疗等抗肿瘤措施;癌旁组织距肿物距离>3 cm。排除标准:患有其他恶性肿瘤的患者;胃癌术后复发或残胃癌。入选病例112例,根据国际抗癌联盟和美国癌症联合会(UICC/AJCC)第8版胃癌TNM分期指南,由2名病理医师对纳入病例进行重新评估,最终结果如下:男性79例,女性33例;年龄27~82岁,平均年龄60.66岁;肿瘤直径1.8~14.0 cm,平均4.93 cm;浸润深度,T₁+T₂期21例,T₃+T₄期91例;淋巴结转移80例,未转移32例;脉管侵犯62例,未侵犯50例;TNM分期,I+II期64例,III+IV期48例。所有入选病例均经医院伦理委员会批准。

前瞻性收集2019年12月至2020年12月行根治性手术切除的胃腺癌组织及相应癌旁组织。纳入标准及排除标准同前所述。共纳入15例病例,男性11例,女性4例,年龄53~67岁,平均年龄62岁。

1.2 方法

1.2.1 标本及试剂 DRP1鼠抗人单克隆抗体(TA506112,工作浓度1:150),Ki-67鼠抗人抗体(ZM-0166),通用试剂盒PV-6000,DAB显色剂试剂盒、戊二醛固定液均购自北京中杉金桥有限公司。免疫组织化学法所用标本均经10%甲醛固定,脱水,包埋,4 μm连续切片。

1.2.2 免疫组织化学 免疫组织化学染色采用Envision法:石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,置于pH值为6.0的柠檬酸盐缓冲液中120°C,

3 min,后3%过氧化氢溶液中15 min封闭内源性过氧化氢酶,加入一抗DRP1、Ki-67,37°C恒温箱孵育1.5 h,加入二抗,37°C恒温箱孵育20 min,滴加DAB显色剂显色,苏木精复染,脱水,封片。

1.2.3 透射电镜样品制备 选取未经固定的新鲜肿瘤样本,离体时间10 min以内,制成1 mm³组织块,置于戊二醛固定液中,保存于4°C条件2 h,冲洗液冲洗后,经梯度酒精和100%丙酮脱水,包埋剂浸透组织制备成组织块,制成超薄切片,染色。

1.3 染色结果判读 由2名病理医师进行判读。DRP1染色结果为胞质着色,根据染色程度和染色细胞百分率进行组织学评分:深棕黄色为3分,棕黄色为2分,淡棕黄色为1分,细胞基本不着色为0分;阳性细胞率≥51%为3分,26%~50%为2分,6%~25%为1分,≤5%为0分。阳性细胞率评分与每张切片着色程度的乘积为最后得分:0~3分为阴性,4分及以上为阳性。

Ki-67染色结果为胞核着色。显微镜下选取肿瘤热点区,连续计数10个高倍视野,记录阳性肿瘤细胞的百分比,≥50%记为阳性,<50%记为阴性^[3]。

1.4 统计学方法 通过SPSS 26.0软件进行分析,DRP1、Ki-67在胃腺癌中的表达情况与临床病理资料之间的关系采用 χ^2 检验,DRP1与Ki-67之间的相关性采用Spearman相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DRP1在癌旁组织和胃腺癌组织中的表达 免疫组织化学染色结果如图1所示,DRP1在细胞内为胞质着色,阳性结果为棕黄色。胃腺癌组织中阳性表达率为71.42%,在癌旁组织中阳性表达率为40.18%。DRP1在胃腺癌组织中阳性表达率高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.001$)。

2.2 DRP1在胃腺癌组织中的表达及其与患者临床病理特征的关系 DRP1在性别、年龄、分化程度及Lauren分型不同的胃腺癌组织中的表达差异无统计学意义($P>0.05$),而在浸润深度、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM分期不同的胃腺癌组织中表达不同,差异有统计学意义($P>0.05$)。浸润深度为全层及浆膜外、可见淋巴结转移、脉管侵犯、TNM分期III+IV期的患者DRP1阳性表达率高于浸润深度为黏膜层及固有肌层、未见淋巴结转移、未见脉管癌栓、TNM分期I+II期的患者(表1)。

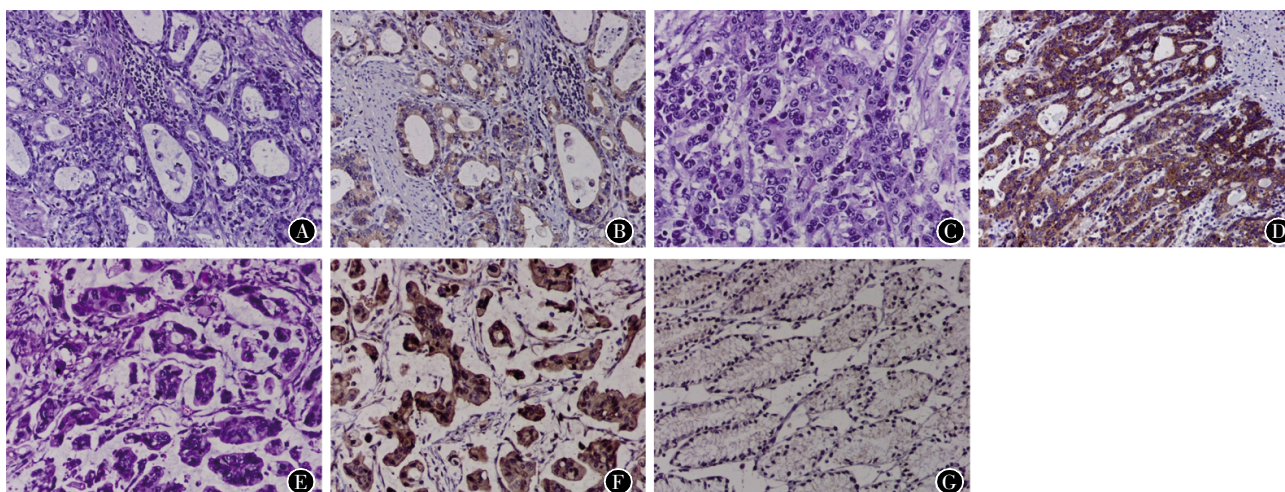


图 1 1 DRP1 在胃腺癌组织及癌旁组织中的表达

注:A,高分化胃腺癌(苏木精-伊红染色,×200);B,DRP1在高分化胃腺癌中的表达(Envision法,×200);C,中分化胃腺癌(苏木精-伊红染色,×200);D,DRP1在中分化胃腺癌中的表达(Envision法,×200);E,低分化胃腺癌(苏木精-伊红染色,×200);F,DRP1在低分化胃腺癌中的表达(Envision法,×200);G,DRP1在癌旁组织中的低表达(Envision法,×200)。

表 1 DRP1、Ki-67 在胃腺癌组织中的表达及其与患者临床病理特征的关系(例)

参数	DRP1		χ^2 值	P 值	Ki-67		χ^2 值	P 值
	+	-			<50%	≥50%		
性别			1.392	0.238			3.312	0.069
男	59	20			33	46		
女	21	12			20	13		
年龄			1.040	0.308			7.350	0.007
≤60岁	46	15			36	25		
>60岁	34	17			17	34		
肿物大小			0.295	0.587			0.430	0.512
<5 cm	47	17			32	32		
≥5 cm	33	15			21	27		
分化程度			0.230	0.632			22.888	<0.010
高、中分化	44	16			41	19		
低分化	36	16			12	40		
Lauren 分型			2.672	0.263			18.229	<0.010
肠型	33	8			30	11		
弥漫型	25	12			10	27		
混合型	22	12			13	21		
浸润深度			4.595	0.032			1.000	0.317
T ₁ +T ₂	11	10			12	9		
T ₃ +T ₄	69	22			41	50		
淋巴结转移			9.220	0.002			2.642	0.104
有	65	17			35	47		
无	15	15			18	12		
脉管侵犯			3.934	0.047			0.793	0.373
有	49	13			27	35		
无	31	19			26	24		
TNM 分期			8.054	0.005			0.242	0.623
I + II 期	39	25			29	35		
III + IV 期	41	7			24	24		

2.3 Ki-67在胃腺癌组织中的表达及其与患者临床病理特征的关系 Ki-67在细胞中表现为胞核着色,为深棕色颗粒,如图2所示。根据统计学分析结果,Ki-67在不同年龄、分化程度、Lauren分型的胃腺癌组织中表达差异具有统计学意义,而在性别、浸润深度、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM分期等情况不同的胃腺癌组织中表达差异无统计学意义($P>0.05$)。年龄 >60 岁、分化程度为低分化、弥漫型胃腺癌的患者 Ki-67指数更高(表1)。

2.4 DRP1与Ki-67在胃腺癌组织中表达的相关性 Spearman相关性分析结果显示,在胃腺癌组织中,DRP1与Ki-67表达呈正相关($r=0.474, P<0.001$)

2.5 胃腺癌组织和癌旁组织在透射电镜下的表现 透射电镜下,观察到胃腺癌组织标本中,线粒体肿胀、膜缺失,线粒体嵴断裂;癌旁组织中,线粒体形态、数量相对正常(图3,图4)。

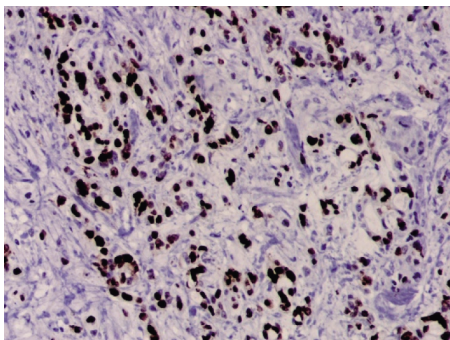


图2 Ki-67在胃腺癌组织中的表达(Envision法, $\times 200$)

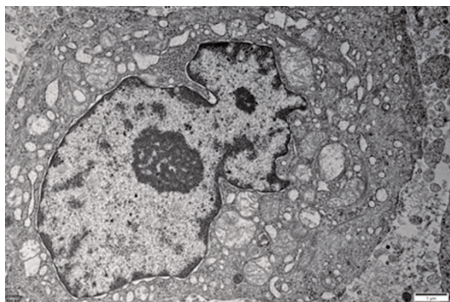


图3 胃腺癌组织在透射电镜下超微结构的变化($\times 15\ 000$)

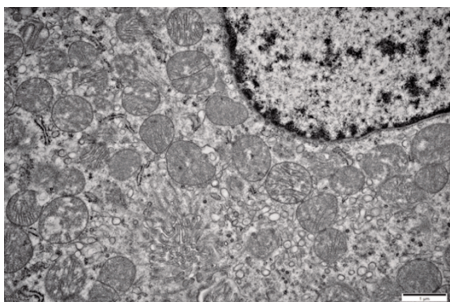


图4 癌旁组织在透射电镜下超微结构的变化($\times 15\ 000$)

3 讨论

线粒体是细胞内的双层膜细胞器,为细胞提供约90%的能量。线粒体通过不断的分裂、融合使得自身处于一种动态平衡之中,并参与细胞钙稳态、能量产生及活性氧调节等多种生命活动过程^[4],这一过程称为线粒体动力学。线粒体融合分为两部分,内膜的融合由OPA1调控,外膜由Mfn1与Mfn2两种蛋白控制融合,缺少其中任何一种蛋白,线粒体都无法完成融合。而线粒体分裂则是由DRP1调控^[5]。在这一过程中,DRP1通过Mff、Mid49/51和Fis1等受体的募集定位到线粒体外膜上,形成一个螺旋状结构,介导线粒体外膜向内凹陷,完成分裂,形成两个新的线粒体。DRP1是一种GTP酶大分子,主要存在于细胞质中,在1997年,日本学者Shin等^[6]首次报道了DRP1的存在,随后,Pitts等^[7]揭示了DRP1的分子结构,主要包括N端GTP酶结构域,C端GTP酶效应结构域,中间的螺旋形结构域以及Insert-B区。

近年来,线粒体动力学的紊乱已在多种癌症中观察到,在肺癌^[8]、乳腺癌^[9]、肝细胞癌^[10]中还发现线粒体动力学相关蛋白的表达改变。在肺癌细胞系中,Rehman等^[8]观察到DRP1/Mfn2的失衡,并在肺癌组织样本中检测到DRP1的增加和Mfn2的减少。Huang等^[11]研究则发现了肝细胞癌中线粒体片段化的增加,以及DRP1/Mfn1比例的升高。除了蛋白比例的失衡,在卵巢癌^[12]、甲状腺癌^[13]、胶质瘤^[14]、黑色素瘤^[15]等肿瘤中,均发现了DRP1表达的上调。本研究也发现了相似的结果,相较于癌旁组织,DRP1在胃腺癌组织中的表达明显升高。同时,我们在电镜下的观察结果也发现,胃腺癌组织中,线粒体数量增多,并且出现不同程度的形态学变化,如线粒体肿胀、线粒体嵴断裂等,而癌旁组织中线粒体的形态、数量相对正常。

所有癌症的共同特征是细胞增殖的不受调控以及细胞凋亡的抑制,二者共同作用导致肿瘤的生长超出了正常组织的生长界限。线粒体动力学在细胞周期的调控中也起了至关重要的作用。Mitra等^[16]研究揭示了线粒体分裂、融合的周期与细胞周期高度耦合。在细胞分裂过程中,分配到每个子代细胞中的线粒体都是由母代细胞中的线粒体分裂而来,而不是重新生成。在G1期和G2期,线粒体相互之间形成一个网络,但是在细胞S期

和有丝分裂期,线粒体呈现高度片段化的状态^[17],这可能是在细胞周期过程中,DRP1表达增加,促进了线粒体的分裂。Mitra等^[16]的研究还发现了抑制细胞中DRP1的表达可以使细胞周期停留在G1期。肝细胞癌^[11]和胰腺癌^[18]的研究显示,DRP1过表达会通过加速细胞G1/S期的转变进而促进癌细胞增殖。Kitamura等^[19]在关于皮肤鳞状细胞癌的研究发现,敲低A431和DJM1细胞中的DRP1会使细胞周期阻滞在G2/M期。在乳腺癌^[9]、肺癌^[8]和胶质瘤^[14]等肿瘤的研究中也发现DRP1的过表达会促进肿瘤细胞的增殖,但是其机制尚未阐明。这些结果都表明DRP1的过表达可能与细胞增殖相关。Ki-67作为一种DNA结合蛋白,存在于细胞周期的各个过程,但是在G0期不表达。本研究首次对肿瘤组织中的DRP1和Ki-67进行联合检测,并分析二者之间的相关性,结果显示,DRP1和Ki-67在胃腺癌组织中的表达呈正相关。这一结果在组织学层面证明了DRP1参与了肿瘤细胞的细胞增殖过程,并且过表达DRP1的肿瘤组织增殖指数更高。

侵袭和转移是恶性肿瘤重要的两大生物学特征,也是临床上绝大多数肿瘤患者的致死因素。原发肿瘤可进行手术切除或放疗,但已发生转移的癌症通常预后较差。因此,早期识别易发生转移的患者,对其给予积极的治疗改善预后显得更加重要。最近,越来越多的研究发现了线粒体动力学在肿瘤迁移中发挥的作用。Liang等^[18]研究发现,在胰腺癌细胞系中,DRP1的过表达增强了胰腺肿瘤细胞的侵袭和转移能力,敲除DRP1能够抑制肿瘤细胞的迁移。Zhao等^[9]研究揭示了相较于非转移性乳腺癌,转移性乳腺癌组织中的DRP1表达更高,预示着DRP1的上调可能是乳腺癌发生转移的早期事件。本研究对比了胃腺癌组织中淋巴结转移、脉管癌栓的发生与DRP1表达情况之间的关系,结果显示发生淋巴结转移、脉管侵犯的患者DRP1阳性表达率更高。这一结果意味着DRP1在胃腺癌的转移中可能发挥着潜在的作用,可以作为胃腺癌治疗靶点进一步研究,改善患者预后。

此外,本研究还发现在浸润至全层及浆膜外、临床分期为Ⅲ~Ⅳ期的胃腺癌组织中DRP1阳性表达率更高。既往研究显示,淋巴结转移、浸润深度、临床分期等是胃腺癌患者独立预后因素^[20],因

此,DRP1可能也是胃腺癌患者潜在的预后指标,有待进一步研究。

基于线粒体动力学相关因素的靶向治疗正成为一种潜在的癌症治疗方法。Yang等^[21]发现,抑制DRP1介导的线粒体分裂能够增加卵巢癌细胞对顺铂的敏感性。Mdivi-1是一种线粒体分裂抑制剂,在急性肾损伤、心肌缺血再灌注损伤以及帕金森病等疾病模型中显示出很好的保护作用。在肿瘤研究中,Xie等^[14]发现缺氧会增加胶质母细胞瘤细胞中Drp1的表达,增强肿瘤的迁移,而Mdivi-1的治疗可减少这种缺氧诱导的迁移。但是Rehman等^[8]发现Mdivi-1虽然能够诱导肺癌细胞凋亡,对正常细胞却有一定的细胞毒性。选择性肽抑制剂P110是另一种DRP1抑制剂,在帕金森病的模型中,P110可以通过阻断DRP1/Fis1之间的相互作用,进而抑制线粒体过度分裂^[22]。但是P110在毒理学和药理学方面的研究尚不明确,在肿瘤中的作用也有待研究。

综上所述,线粒体分裂蛋白DRP1在胃腺癌组织中高表达,与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM分期等可能有关,可以作为胃腺癌的检测指标进一步研究,辅助胃腺癌临床分期,评估预后。关于DRP1抑制剂的研究将为靶向线粒体动力学的治疗提供了新的方向,也为胃腺癌患者治疗和预后带来新的希望。

参考文献

- [1] THRIFT A P, EL-SERAG H B. Burden of Gastric Cancer [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(3): 534-542.
- [2] 中国抗癌协会胃癌专业委员会. 胃癌诊治难点中国专家共识(2020版) [J]. 中国实用外科杂志, 2020, 40(8): 869-904.
- [3] 董梦艺, 赵秉超, 李叶兴, 等. 基于CT的影像组学术前预测胃癌Ki-67表达水平的研究[J]. 国际医学放射学杂志, 2020, 43(6): 631-638.
- [4] ARCHER S L. Mitochondrial dynamics --mitochondrial fission and fusion in human diseases[J]. N Engl J Med, 2013, 369(23): 2236-2251.
- [5] 郑凯, 杨梅桂, 闫朝君, 等. 线粒体动力学与细胞凋亡 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(8): 1467-1476.
- [6] SHIN H W, SHINOTSUKA C, TORII S, et al. Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p [J]. J Biochem, 1997, 122(3): 525-530.
- [7] PITTS K R, MCNIVEN M A, YOON Y. Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLPI is mediated by its C-terminal domains [J]. J Biol Chem, 2004, 279(48): 50286-

- 50294.
- [8] REHMAN J, ZHANG H J, TOTH P T, et al. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer [J]. *FASEB J*, 2012, 26(5): 2175–2186.
- [9] ZHAO J, ZHANG J, YU M, et al. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32(40): 4814–4824.
- [10] BAO D, ZHAO J, ZHOU X, et al. Mitochondrial fission – induced mtDNA stress promotes tumor – associated macrophage infiltration and HCC progression [J]. *Oncogene*, 2019, 38(25): 5007–5020.
- [11] HUANG Q, CAO H, ZHAN L, et al. Mitochondrial fission forms a positive feedback loop with cytosolic calcium signaling pathway to promote autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2017, 403:108–118.
- [12] TSUYOSHI H, ORISAKA M, FUJITA Y, et al. Prognostic impact of Dynamin related protein 1 (Drp1) in epithelial ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 467.
- [13] LIMA A R, CORREIA M, SANTOS L, et al. S616 –p –DRP1 associates with locally invasive behavior of follicular cell – derived thyroid carcinoma [J]. *Endocrine*, 2021, 73(1):85–97.
- [14] XIE Q, WU Q, HORBINSKI C M, et al. Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(4): 501–510.
- [15] WIEDER S Y, SERASINGHE M N, SUNG J C, et al. Activation of the Mitochondrial Fragmentation Protein DRP1 Correlates with BRAF(V600E) Melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(10): 2544–2547.
- [16] MITRA K, WUNDER C, ROYSAM B, et al. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(29): 11960–11965.
- [17] MA Y, WANG L, JIA R. The role of mitochondrial dynamics in human cancers [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(5): 1278–1293.
- [18] LIANG J, YANG Y, BAI L, et al. DRP1 upregulation promotes pancreatic cancer growth and metastasis through increased aerobic glycolysis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 35(5): 885–895.
- [19] KITAMURA S, YANAGI T, IMAFUKU K, et al. Drp1 regulates mitochondrial morphology and cell proliferation in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 88(3): 298–307.
- [20] 张怡, 韩永红, 徐慧丽. Sirtuin 4 在胃癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *实用癌症杂志*, 2020, 35(12): 1965–1968.
- [21] YANG Z, FENG Z, GU J, et al. microRNA –488 inhibits chemoresistance of ovarian cancer cells by targeting Six1 and mitochondrial function [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 80981–80993.
- [22] QI X, QVIT N, SU Y C, et al. A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 3): 789–802.