

## IMP3 蛋白及 Ki-67 在脑胶质瘤中的表达及临床意义\*

张冉<sup>1</sup> 王全义<sup>1</sup> 张军臣<sup>1</sup> 于珊珊<sup>2</sup> 王海涛<sup>1</sup> 敖启林<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029; <sup>2</sup> 济宁市第二人民医院, 济宁 272049)

**摘要 目的** 探讨胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3 (IMP3 蛋白) 及 Ki-67 在脑胶质瘤中的表达以及临床意义。**方法** 选取我院 2008 年 1 月至 2012 年 10 月手术切除的不同级别的胶质瘤 60 例 (I 级 5 例, II 级 20 例, III 级 20 例, IV 级 15 例) 及 5 例正常脑组织, 应用免疫组化 Envision 二步法检测 IMP3 蛋白及 Ki-67 在不同级别胶质瘤中的表达, 分析二者与胶质瘤恶性程度的关系以及二者的相关性。**结果** IMP3 在胶质瘤各级别的表达中有统计学意义 ( $\chi^2=41.17, P<0.05$ ), 其中胶质瘤 III~IV 级阳性表达率明显高于 I~II 级 (91.4% vs 8%,  $\chi^2=41.34, P<0.05$ )。胶质瘤标本的 Ki-67 指数 (Ki-67 LI) 范围为 0%~50%, 在胶质瘤各级别的表达中有统计学意义 ( $\chi^2=29.80, P<0.05$ ), 其中胶质瘤 III~IV 级阳性表达率明显高于 I~II 级 (91.4% vs 20%,  $\chi^2=50.29, P<0.05$ )。IMP3 蛋白的阳性表达率与 Ki-67 蛋白的阳性表达率有正相关性 ( $r=0.774, P<0.05$ )。**结论** IMP3 及 Ki-67 在脑胶质瘤中的表达均与胶质瘤的恶性程度呈正相关, 二者联合应用可作为评价胶质瘤级别的重要参考指标。

**关键词** 胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3; 细胞增殖核抗原 Ki-67; 胶质瘤

**中图分类号:** R363.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2015)02-028-05

### Expression and clinical significance of IMP3 and Ki-67 in human gliomas

ZHANG Ran, WANG Quanyi, ZHANG Junchen, YU Shanshan, WANG Haitao, AO Qilin

(Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and clinical significance of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) and Ki-67 in human brain glioma. **Methods** 60 different grade of gliomas were selected from 2005 to 2012 in our hospital (grade I 5 cases, grade II 20 cases, grade III 20 cases, grade IV 15 cases) and 5 cases of normal brain tissue. The expression of IMP3 and Ki-67 was determined in gliomas using immunohistochemistry (Envision method). The correlation was analyzed between expression of IMP3, Ki-67 and malignant degree of gliomas. And the correlation between the expression of IMP3 and Ki-67 was also analyzed. **Results** The expression of IMP3 in different grade gliomas was statistically significant ( $\chi^2=41.17, P<<0.05$ ) and it was significantly higher in grade III-IV gliomas than that in grade I-II (91.4% vs. 8%,  $\chi^2=41.34, P<0.05$ ). The range of Ki-67LI was 0%-50%. The expression of Ki-67 in different grade gliomas was statistically significant ( $\chi^2=29.80, P<0.05$ ) and it was significantly higher in grade III-IV gliomas than that in grade I-II (91.4% vs. 20%,  $\chi^2=50.29, P<0.05$ ). There was positive correlation between IMP3 and Ki-67 expression in brain gliomas ( $r=0.774, P<0.05$ ). **Conclusion** The expression of IMP3 and Ki-67 in gliomas was positive correlated with the grades of gliomas. The united application of them can be used as important reference index for evaluation of gliomas's biological behavior.

**Keywords:** Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3; Nuclear-associated antigen Ki-67; Brain glioma

胶质瘤是颅内常见的恶性肿瘤, 由于血脑屏障的特殊结构, 一般化疗药物的疗效不显著。因此,

脑胶质瘤治愈率差, 复发率、致残率以及死亡率高, 是全身恶性肿瘤中预后最差者之一。胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3 (insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3, IMP3) 是癌胚

\* [基金项目] 济宁市科技局 2012 年计划内科研项目 (编号: 2012jnwk04)

RNA 结合蛋白,它在胚胎形成时调节胰岛素样生长因子 II(IGF-II)的转录,在许多正常组织中的表达非常低。一些肿瘤被发现表达 IMP3 蛋白,包括肺癌、直肠癌、胰腺癌<sup>[1-3]</sup>以及发生于他组织的肿瘤。细胞增殖核抗原 Ki-67(nuclear-associated antigen Ki-67)是评价肿瘤增殖程度的较好指标。它广泛表达于增殖期细胞,而静止期细胞则不表达<sup>[4]</sup>。Ki-67 表达水平反映了细胞增殖情况,是目前肿瘤增殖活动研究中较为精确、可靠的增殖期标志物。

虽然 IMP3 是近年来基础与临床的研究热点,但目前在中枢神经系统肿瘤中关于 IMP3 的表达研究不多,本课题研究 IMP3 和 Ki-67 在各级别脑胶质瘤中的表达以及临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究资料

选取 2008 年 1 月至 2012 年 10 月济宁医学院附属医院神经外科手术切除的脑胶质瘤组织标本 60 例及正常脑组织 5 例。其中男 47 例,女 18 例;平均年龄(47.4±9.5)岁。所有切片均经两名病理专业高级职称医师共同诊断,并参考免疫组织化学如 GFAP、Olig-2、CD34、EMA、Ki-67 等结果,以世界卫生组织 WHO(2000)神经系统肿瘤分类标准(核异型性、核分裂象、血管增生和/或坏死),将胶质瘤分为 I~IV 级。在 60 例胶质瘤组织标本中, I 级 5 例、II 级 20 例、III 级 20 例、IV 级 15 例;其中节细胞胶质瘤 3 例,毛细胞星型细胞瘤 2 例,弥漫型星型细胞瘤 21 例,少突胶质细胞瘤 15 例,间变型室管膜细胞瘤 4 例,胶质母细胞瘤 15 例。

### 1.2 仪器设备

石蜡切片机 LEICA-RM2245(德国);YF-TFB 型生物组织摊烤片机(湖北孝感亚光医疗电子有限公司);KB-TK-72 精密烤箱(东莞科宝);家用微波炉(美的);冰箱 BCD-206TS(青岛 Hair);隔水式电热恒温箱(上海);微量移液器(上海大迈仪器有限公司);光学照相显微镜(LEICA-DM2500 德国);WMY-01 数显温控仪(上海);101-A 型数显电热鼓风干燥箱(北京永光明医疗仪器厂);高清晰度彩色病理图片分析系统(西安华海 HMIAS)。

### 1.3 试剂

鼠抗人 IMP3 单克隆抗体(英国 DAKO 公司);免疫组化试剂盒(SP)(北京中杉生物技术有

限公司);DAB 显色试剂盒(北京金桥生物技术有限公司);APES 北京中杉金桥生物技术有限公司;缓冲液(0.05M PBS pH 7.4 缓冲液,0.05M pH 6.0 柠檬酸缓冲液)、梯度酒精(100%、95%、90%、80%、70%)、二甲苯、松节油、甘油、丙酮、过氧化氢、碳酸氢二钠、苏木精、伊红染液等。

### 1.4 实验方法

1)石蜡切片,厚 4 $\mu$ m,将石蜡组织片贴附于防脱多聚赖氨酸载玻片上,置于 60 $^{\circ}$ C 烤箱中烤片 1h,取出备用。2)石蜡切片脱蜡。3)将切片置于 3% 过氧化氢中,10min 后取出,以阻断内源性过氧化物酶 PBS 冲洗 3 次,每次 5min。4)对组织抗原进行修复,取一定量 EDTA 缓冲液(pH=9.0)于抗原修复盒中,将组织切片置于塑料切片架上,微波炉中火修复 10min,取出,冷却至室温。之后用 PBS 洗 3 次,每次 5min。5)甩去切片 PBS 液,每张切片加 50 $\mu$ l IMP-3(1:50 稀释),37 $^{\circ}$ C 下静置 1h。6)用 PBS 液冲洗 3 次,每次 5min。7)甩去切片 PBS 液,每张切片加 Envision DAB-A 50 $\mu$ l 37 $^{\circ}$ C 烤箱中静置 30min 或者室温下静置 1h。8) PBS 液冲洗 3 次,每次 5min。9)甩去切片 PBS 液,每张切片加 100 $\mu$ l DAB 显色剂工作液(DAB-B 液与 DAB-C 液比例为 50:1,避光,用前 30min 配制)。镜下观察 3~10min,阳性显色为棕黄色颗粒。10)用蒸馏水冲洗 10min,苏木素复染 2min,1%盐酸酒精分化,自来水冲洗 10~15min。11)脱水,透明,封片,镜检。

### 1.5 结果判定

IMP3 阳性细胞百分比评分:阴性(-),未见着色细胞;弱阳性(+),着色细胞数<25%;中度阳性(++),着色细胞数占 25%~50%;强阳性(+++),着色细胞数>50%。

Ki-67 蛋白一般采用 Ki-67 指数(Ki-67LI)表示细胞的增殖程度,高倍镜( $\times 400$ )下每个视野数 200 个瘤细胞,计算其阳性细胞所占百分比。阴性(-),着色细胞<5%;弱阳性(+),着色细胞数 5%~10%;中度阳性(++),着色细胞数占 11%~25%;强阳性(+++),着色细胞数>25%。

### 1.6 统计学方法

所有数据采用 SPSS13.0 处理,应用  $\chi^2$  检验分析 IMP3 和 Ki67 在各级别胶质瘤中的表达,应用 Spearman 等级相关性分析进行 IMP3 和 Ki67 的相关分析, $P<0.05$  为差异显著,具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IMP3 在各级别脑胶质瘤中的表达

IMP3 蛋白主要表达于细胞质内,以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性,在正常脑组织中无表达,在胶质细胞瘤 I 级未见有表达(见图 1),但随着胶质瘤级别的升高,IMP3 表达强度也随着增加(见图 2~图 4)。

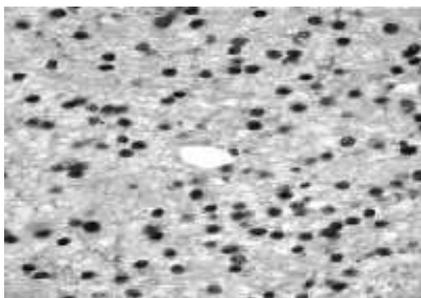


图 1 IMP3 在 WHO I 级胶质瘤中的阴性表达( $\times 100$ )

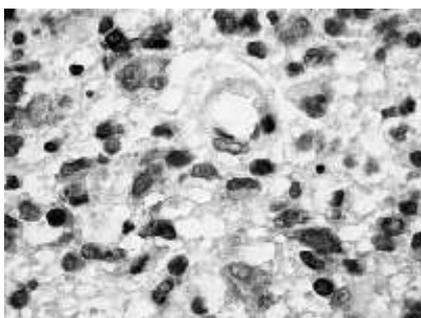


图 2 IMP3 在 WHO II 级胶质瘤中的弱阳性表达( $\times 200$ )

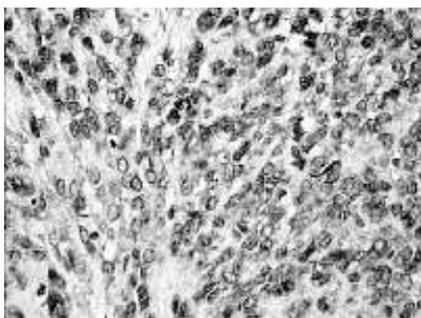


图 3 IMP3 在 WHO III 级胶质瘤中的中阳性表达( $\times 200$ )

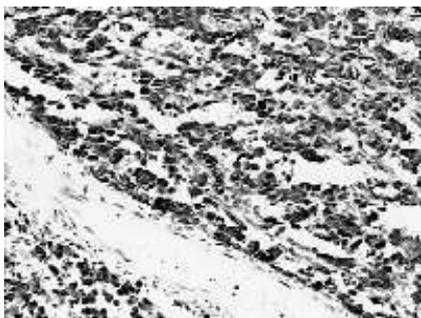


图 4 IMP3 在 WHO IV 级胶质瘤中的强阳性表达( $\times 100$ )

免疫组化实验结果显示:在胶质细胞瘤 I 级阳性表达率为 0%,胶质细胞瘤 II 级阳性表达率为 10%(弱阳 2 例、中阳 0 例、强阳 0 例),胶质细胞瘤 III 级阳性表达率为 90%(弱阳 6 例、中阳 10 例、强阳 2 例),胶质细胞瘤 IV 级阳性表达率为 93.3%(弱阳 0 例,中阳 1 例,强阳 13 例)。IMP3 在胶质瘤各级别的表达中有统计学意义( $\chi^2 = 41.17, P < 0.05$ ),其中胶质瘤 III~IV 级阳性表达率明显高于 I~II 级(91.4% vs 8%,  $\chi^2 = 41.34, P < 0.05$ )差异有统计学意义。见表 1。

表 1 IMP3 在不同级别胶质瘤中的表达

胶质瘤 分级	n	阳性 率/%	IMP3(n)			
			-	+	++	+++
I	5	0	5	0	0	0
II	20	10	18	2	0	0
III	20	90	2	6	10	2
IV	15	93.3	1	0	1	13

### 2.2 Ki-67 在各级别脑胶质瘤中的表达

Ki-67 表达于细胞核内,以核内出现棕色或棕黄色染色为阳性。正常脑组织中未见阳性表达,胶质瘤细胞的 Ki-67 染色范围为 0%~50%,I 级胶质瘤为阴性表达(见图 5),但随着胶质瘤级别的升高,Ki-67 表达强度也逐渐增强(图 6~8)

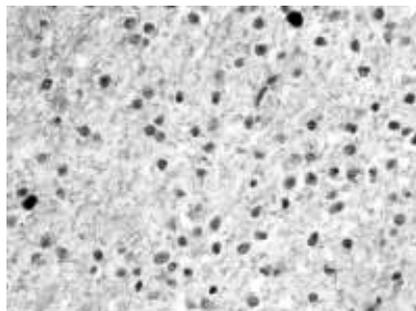


图 5 Ki-67 在 WHO I 级胶质瘤中的阴性表达( $\times 100$ )

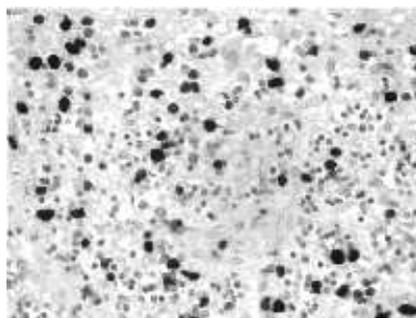


图 6 Ki-67 在 WHO II 级胶质瘤中的弱阳性表达( $\times 200$ )

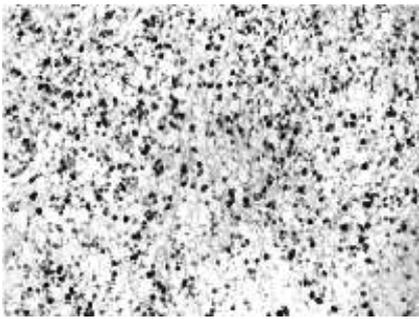


图 7 Ki-67 在 WHO III 级胶质瘤中的中阳性表达(×100)

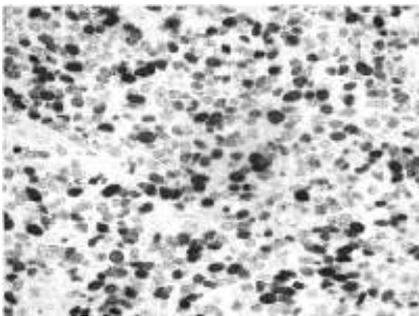


图 8 Ki-67 在 WHO IV 级胶质瘤中的强阳性表达(×200)

免疫组化实验结果显示: I 级胶质瘤的阳性表达率为 0%、II 级胶质瘤的阳性表达率为 25%(弱阳性 4 例,中阳性 1 例,强阳性 0 例)、III 级胶质瘤阳性表达率为 90%(弱阳性 17 例,中阳性 1 例,强阳性 0 例)、IV 级神经胶质瘤阳性表达率为 93.3%(弱阳性 5 例,中阳性 7 例,强阳性 2 例)。Ki67 在胶质瘤各级别的表达中有统计学意义( $\chi^2=29.80, P<0.05$ ),其中胶质瘤 III~IV 级阳性表达率明显高于 I~II 级(91.4% vs 20%, $\chi^2=50.29, P<0.05$ ),差异有统计学意义。见表 2。

表 2 Ki-67 在不同级别胶质瘤中的表达

胶质瘤 分级	n	阳性 率/%	Ki-67(n)			
			-	+	++	+++
I	5	0	5	0	0	0
II	20	25	15	4	1	0
III	20	90	2	17	1	0
IV	15	93.3	1	5	7	2

### 2.3 脑胶质瘤中 IMP3 和 Ki-67 表达的关系

在 60 例脑胶质瘤中,IMP3 蛋白的阳性表达与 Ki-67 蛋白的阳性表达采用 Spearman 等级相关性分析( $r=0.774, P<0.05$ )。二者呈正相关。

见表 3。

表 3 IMP3 和 Ki-67 的表达关系

Ki-67 (n)	IMP3(n)				合计
	-	+	++	+++	
-	20	0	3	0	23
+	6	8	8	4	26
++	0	0	0	9	9
+++	0	0	0	2	2
合计	26	8	11	15	60

### 3 讨论

高级别的恶性程度较高的脑胶质瘤起源于脑神经胶质细胞,是最常见的颅内恶性肿瘤,脑胶质瘤呈侵袭性生长,总体疗效不佳,尤其是恶性程度较高的胶质瘤,具有高度间变的生长特点,术后复发快,预后差,严重威胁人类的健康。而肿瘤细胞的恶性程度则和其增殖能力,以及诱导产生蛋白酶降解细胞外基质、基底膜的能力有关。

IMP3 在胚胎形成时调节胰岛素样生长因子 II (IGF- II) 的转录,进而调节 IGF- II 的表达,而在肝癌和癌旁肝组织中均有 IGF- II 的异常表达<sup>[5-7]</sup>, IGF- II 基因高表达可能不仅与 IGFn 基因的异常表达有关,也与 IMP3 异常调控有关。IMP3 促进 IGF- II mRNA 的翻译,进而增加 IGF- II 水平。而 IGF- II 和细胞表面的受体(IGF- I 和 IGF- II 受体)结合,产生胞浆内循环短路,放大了细胞持续生长信号的传递,加速了肿瘤细胞的增殖,维持其恶性表型<sup>[7-8]</sup>。

Findeis-Hosey 等研究报道小鼠 IMP3 家族基因缺失可使 CD44mRNA 的下调,CD44 是一种细胞黏附分子,能促使 IV 型胶原蛋白的降解并与细胞骨架蛋白相结合,CD44 的下调可降低细胞与基质之间的黏附,促进细胞的转移<sup>[9]</sup>。IMP3 还可间接调节基质金属蛋白 1 的表达,IMP3 家族基因缺失可使基质金属蛋白 1 降低对细胞外基质的浸润,而细胞外基质的降解又是肿瘤侵袭、转移及血管形成的重要因素;因此认为 IMP3 还能够间接通过 CD44 和基质金属蛋白酶等途径参与了肿瘤恶性生物行为<sup>[10]</sup>。

Ki-67 是一种核抗原蛋白,其在增殖细胞核中特异性表达,它半衰期较短,其阳性表达覆盖整个有丝分裂期,受背景干扰较小,能够反映肿瘤的恶

性程度及患者的预后<sup>[11]</sup>。被众多学者认为是反映肿瘤细胞增殖活性的一个重要指标<sup>[12]</sup>。

本文结果显示,IMP3 蛋白主要表达于高级别的胶质瘤中,且随着组织分级的增加其表达率增加,提示其可能通过调节 IGF-Ⅱ、CD44、基质金属蛋白酶等参与了胶质瘤细胞生长过程;Ki-67 在高级别胶质瘤(Ⅲ~Ⅳ级)中的阳性表达率明显高于低级别胶质瘤(Ⅰ~Ⅱ级),提示随着胶质瘤的级别及恶性程度的增高,肿瘤细胞的增殖能力增加。

综上所述,IMP3 及 Ki-67 在脑胶质瘤中的表达均与胶质瘤的恶性程度呈正相关。我们认为二者联合应用可作为评价胶质瘤级别及判断胶质瘤预后的重要指标。IMP3 和 Ki-67 在胶质瘤细胞上的表达呈现正相关,但机制及通路有所不同,具体关系还需要增加病例量及采用先进观察方法进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Wang T, Hokins D, Schmidt C, et al. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray alysis [J]. *Oncogene*, 2000, 19(12): 1519-1528.
- [2] Yuan R H, Wang C C, Chou C C, et al. Diffuse expression of RNA-binding protein IMP3 predicts high-stage lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(6): 1711-1719.
- [3] Yantiss R K, Woda B A, Fanger G R, et al. KOC(K homology domain containing protein over expressed in cancer): a novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of the pancreas[J]. *AmJ Surg Pathol*, 2005, 29(2): 188-195.
- [4] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the know and the unknown[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3): 311-322.
- [5] Su Q, Liu Y F, Zhang J F, et al. Expression of insulin-like growth factor in hepatitis, cirrhosis and hePatoCellular carcinoma; its relationship with hepatitis B virus antigen expression[J]. *Hepatology*, 1994, 20(4): 788-799.
- [6] 宁晓燕, 杨冬华. 原发性肝癌的体内基因治疗研究与进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2000, 8(1): 89-90.
- [7] 张冉, 敖启林. IMP3 在人类肿瘤细胞中的表达及研究现状[J]. *济宁医学院学报*, 2012, 35(4): 297-301.
- [8] Sohda T, Oka Y, Iwata k, et al. Co-localisation of insulin-like growth factor II and the proliferation marker MIB1 in hepatocellular carcinomacells[J]. *J Clin Pathol*, 1997, 50(2): 135-137.
- [9] Findeis-Hosey J J, Yang Q, Spuldig B O, et al. IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(4): 477-484.
- [10] Yuen M F, Cheng C C, Lauder I J, et al. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment [J]. *HongKong experience Hepatology*, 2000, 31(2): 330-334.
- [11] Gerdes J, Lemke H, Basch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67[J]. *J Immuno*, 1984, 133(4): 1710-1715.
- [12] 康春生, 蒲佩玉, 李捷, 等. 人脑胶质瘤表皮生长因子受体表达与增殖和侵袭相关性的研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2004, 30(5): 349-352.

(收稿日期 2014-12-11)

• 启事 •

## 本刊正式启用网上稿件处理系统

为了更好地适应数字出版的发展趋势,《济宁医学院学报》正式启用网上稿件处理系统。

作者投稿请登录本刊官方网站 <http://xuebao.jnmc.edu.cn>, 点击左上方“作者登录”, 输入用户名和密码登录后, 按页面提示进行投稿及查询操作。首次投稿作者须先行用户注册, 注意填写完整信息, 以免投稿不成功。

网上稿件处理系统正式开通后, 原投稿邮箱 [jyxbbjb0909@163.com](mailto:jyxbbjb0909@163.com) 将不再接受新投稿件。

若有疑问, 可拨打 0537-3616267 进行咨询。

本刊编辑部