

## 结直肠癌组织内 Nek8 表达及病理意义\*

王露<sup>1</sup>, 何常<sup>2\*\*</sup>, 胡斌<sup>2</sup>, 李珀<sup>2</sup>

(1. 贵州医科大学 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院 病理科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨 Nek8 在结直肠癌组织中的表达及意义。方法: 应用免疫组化 SP 法检测配对的 40 例结直肠癌患者的癌组织和结直肠正常黏膜组织、18 例结直肠黏膜慢性炎症、18 例结直肠管状腺瘤和 50 例结直肠管状腺癌(Ⅱ级)中的 Nek8 蛋白表达水平, 采用 spearman 分析 Nek8 表达水平与结直肠癌组织、正常黏膜组织和慢性炎症组织的相关性, 分析 Nek8 表达水平与结直肠癌临床病理参数的关系。结果: 在 40 例配对的标本中, 结直肠癌组织中 Nek8 的表达阳性率(62.5%)高于正常黏膜组织(15.0%) ( $P < 0.05$ ); 结直肠管状腺瘤和管状腺癌组织中 Nek8 的表达阳性率(83.3%, 84.0%)明显高于结直肠黏膜慢性炎症组织(22.2%) ( $P < 0.05$ ), Nek8 在结直肠黏膜慢性炎症、管状腺瘤及管状腺癌组织中的阳性表达存在正相关关系( $r_s = 0.442, P < 0.001$ ); 结肠癌组织中 Nek8 的表达水平与患者性别、年龄、5 年生存率及癌组织的浸润深度、分期、是否发生淋巴转移无关( $P > 0.05$ )。结论: Nek8 在结直肠癌组织中表达上调, 可能参与了结直肠癌的发生发展。

**[关键词]** 免疫组织化学; Nek8; 结直肠肿瘤; 腺瘤息肉病; 结肠; 慢性炎症

**[中图分类号]** R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)03-0352-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.024

## Expression and Pathological Significance of Nek8 in Colorectal Carcinoma Tissues

WANG Lu<sup>1</sup>, HE Chang<sup>2</sup>, HU Bin<sup>2</sup>, LI Po<sup>2</sup>

(1. Teaching Division of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression and significance of Nek8 in colorectal carcinoma tissues. **Methods:** Adopting IHC SP method tested and paired 40 cases of colorectal carcinoma tissues and healthy colorectal mucosa tissues, 18 cases colorectal chronic inflammation, 18 cases of colorectal tubular adenoma, and Nek8 protein expression level of 50 cases of colorectal tubular adenocarcinoma (Level II); adopting Spearman to analyze expression level of Nek8 and correlation among colorectal carcinoma tissues, healthy colorectal mucosa tissues and chronic inflammation tissues. **Results:** Positive expression rates of Nek8 protein in colorectal carcinoma(62.5%) was higher than those in healthy colorectal mucosa(15.0%,  $P < 0.05$ ) in 40 paired samples; positive expression rates of Nek8 protein increased in colorectal tubular adenoma and colorectal tubular adenocarcinoma(83.3%, 84.0%) were obviously higher than those of colorectal mucosal chronic inflammatory (22.2%,  $P < 0.05$ ). There was positive correlation among Nek8 expression in chronic inflammation, colorectal tubular adenoma and colorectal tubular adenocarcinoma( $r_s = 0.442, P < 0.001$ ); there was no correlation between Nek8 protein expression level in colorectal carcinoma tissue and sex, age, depth of invasion, tumor staging, five year survival rate, metastasis of the patient ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of Nek8 is up-regulated in colorectal carcinoma tissues, which may be involved in tumorigenesis and development of colorectal carcinoma.

**[Key words]** immunohistochemistry; Nek8; colorectal neoplasms; adenomatous polyposis coli; chronic inflammation

\*[基金项目] 贵州省科技厅基金(E2014-4)

\*\*通信作者 E-mail: hechang\_66@163.com

网络出版时间: 2017-3-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2319.009.html>

结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一,其发病率、死亡率均较高<sup>[1]</sup>。在我国,随着生活水平不断的提高,环境和饮食习惯的逐步改变,结直肠癌的总体发病率呈现逐年上升的趋势<sup>[2]</sup>,其发病原因尚不清楚。Nek8 是丝氨酸/苏氨酸激酶 Nek 家族(NIMA related kinases)成员之一<sup>[3]</sup>。有极少数的研究报道称 Nek8 与肿瘤的发生发展有关<sup>[3]</sup>。为进一步探讨 Nek8 与结直肠癌的关系,本研究通过比较 40 例配对结直肠癌组织和癌旁正常黏膜组织中的 Nek8 蛋白表达水平,并分析 Nek8 蛋白在结肠癌组织、结直肠管状腺瘤及结直肠黏膜慢性炎症标本中表达水平变化,探讨 Nek8 蛋白在结直肠癌发生和发展中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2015 年 7 月~10 月结直肠癌首发病例 40 例,患者术前均未行放疗、化疗和生物治疗,术中分别取患者癌旁正常黏膜组织(距离癌组织 8.0~10.0 cm)和结肠癌组织;同时选取 2014 年 1 月~2016 年 12 月结直肠癌标本 50 例,所有标本术前治疗方案均相同,病理诊断为管状腺癌 II 级,有完整的临床随访资料;同时选取同期的 18 例结直肠管状腺瘤标本及 18 例结直肠黏膜慢性炎症标本。上述所有的标本均经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋、切片厚 4  $\mu\text{m}$ 。病理诊断与分型均在未知情的情况下由 2 名有经验的病理医师反复审核后确诊,所有患者均知情同意并签署相关文件。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色** 采用 SP 法检测,照说明书步骤进行。每批标本染色均设立阳性对照(已知阳性的乳腺癌组织)及阴性对照。Nek8 兔抗人多克隆抗体购自 Gene Tex 公司,兔二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2.2 结果判断** 在结直肠癌中 Nek8 以癌细胞细胞质着色为阳性表达,管状腺瘤、黏膜慢性炎症及正常黏膜组均以相应病变处黏膜上皮细胞细胞质着色为阳性。在显微镜下随机选取 5 个高倍视野进行观察(不足 5 个视野的,以可以观察到的最多高倍视野计算),计算阳性细胞数占细胞总数的比例作为阳性细胞率。阳性结果判断:(1)根据阳性细胞所占百分比计分,阳性细胞率 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,>50%为 3

分;(2)根据染色强度计分,不着色为 0 分,黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色为 3 分;两项评分相加,0~2 分为阴性(-),3~4 分为阳性(+),5~6 分为强阳性(++)。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。计数资料用百分比(%)表示,两两比较采用 $\chi^2$ 检验,等级资料相关性分析采用 spearman 秩相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Nek8 在结直肠正常黏膜组织及结直肠癌组织中的表达

在 40 例配对的结直肠癌患者标本中,Nek8 癌组织阳性表达 25 例,阴性表达 15 例,阳性表达率为 62.5%;正常的结直肠黏膜组织中,Nek8 阳性表达 6 例,阴性 34 例,阳性率为 15.0%;Nek8 在结直肠癌组织中的阳性表达率高于结直肠正常黏膜组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 Nek8 在结直肠黏膜慢性炎症、腺瘤及腺癌组织中的表达

在 18 例结直肠黏膜慢性炎症中 Nek8 阳性表达 4 例,阴性 14 例,阳性表达率 22.2%;18 例结直肠管状腺瘤中 Nek8 阳性表达 15 例,阴性 3 例,阳性表达率 83.3%;50 例结直肠管状腺癌中 Nek8 阳性表达 42 例,阴性 8 例,阳性表达率 84.0%,Nek8 在结直肠管状腺瘤和管状腺癌组织中的阳性表达率明显高于结直肠黏膜慢性炎症组织( $P < 0.05$ );同时对 Nek8 在结直肠黏膜慢性炎症、管状腺瘤及管状腺癌这 3 种不同组织中的阳性表达进行关联性分析发现,Nek8 在 3 种组织中的表达存在正相关关系,相关系数( $r_s$ )=0.442, $P < 0.001$ ,见图 1。

### 2.3 Nek8 表达与结直肠癌临床病理参数的关系

结肠癌组织中 Nek8 的表达水平与患者性别、年龄、五年生存率及癌组织的浸润深度、分期、是否发生淋巴转移和转移无关( $P > 0.05$ )。见表 1。

## 3 讨论

细胞分裂的一个细胞周期(cell cycle)包括了细胞的生长和分裂,分裂后的 2 个子细胞分别各含有一套完整的染色体。在典型的细胞周期中通过细胞周期的关卡调节细胞周期的控制系统,有丝分

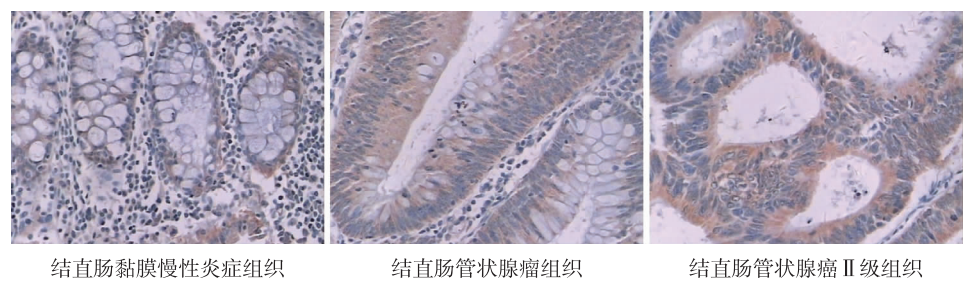


图 1 Nek 蛋白在 3 种结肠组织中的表达(SP, ×400)

Fig. 1 Expression of Nek8 protein in three colorectal tissues

表 1 Nek8 表达与 50 例结直肠癌临床病理特征的关系

Tab. 1 Relationship between Nek8 expression and 50 colorectal carcinoma clinical pathological features

参数	n	Nek8 表达( n ,%)		$\chi^2$	P
		阴性	阳性		
性别					
男	27	6(22.2)	21(77.8)	0.834	0.361
女	23	2(8.7)	21(91.3)		
年龄(岁)					
>60	32	4(13.3)	26(86.7)	1.651	0.199
≤60	18	6(33.3)	12(66.7)		
浸润深度					
肌层以内	11	2(18.2)	9(81.8)	0.000	1.000
浆膜及浆膜外	39	5(12.8)	34(87.2)		
分期					
A + B 期	30	5(16.7)	25(83.3)	3.396	0.065
C + D 期	20	8(40.0)	12(60.0)		
淋巴道转移					
无	31	3(9.7)	28(90.3)	2.488	0.115
有	19	6(31.6)	13(68.4)		
生存率					
<5 年	18	3(16.7)	15(83.3)	0.000	1.000
≥5 年	32	5(15.6)	27(84.4)		
转移					
无	47	8(17.0)	39(83.0)	0.000	1.000
有	3	0(0.0)	3(100.0)		

裂关卡是监测姐妹染色体是否能够稳定地附着在纺锤体上一个重要的细胞周期关卡。细胞在自我

354

增殖、分化和凋亡方面的异常都能参与肿瘤的发生发展,其中细胞周期的紊乱是肿瘤发生的重要机制。因此在细胞周期调控中,各类分子出现异常都有可能引起肿瘤的发生,促进肿瘤的发展。Nek 家族成员在细胞周期有丝分裂中参与 G<sub>2</sub>-M 期关键点的调控,能够促进中心体成熟并影响染色体的浓集和纺锤体的形成<sup>[4-5]</sup>。到目前为止人类识别了 11 个 Nek 家族基因,对于细胞周期调控和纤毛的功能有着非常重要的作用,而其中的 Nek8 与纤毛的形成有关<sup>[6-8]</sup>。

目前对 Nek8 的相关研究中大多都集中在其与囊性肾病的研究。Nek8 基因编码定位于纤毛轴丝的激酶,Nek8 基因突变是在多囊肾(PKD)模型 jck 小鼠中发现的<sup>[9-10]</sup>。使用反义核苷酸敲低 Nek8 能够导致斑马鱼出现前肾囊肿,在小鼠中敲除 Nek8 后小鼠的肾发育同样也受到损害<sup>[9]</sup>。目前,关于 Nek8 与肿瘤相关性的报道较少,Bowers 等<sup>[5]</sup>研究发现 Nek8 在人类的乳腺正常组织中的表达明显低于乳腺肿瘤组织中的表达,在骨肉瘤 U2-OS 细胞系中一种突变的激酶区域 Nek8 的高表达导致肌动蛋白的减少,细胞周期蛋白微量增加,可能与 G<sub>2</sub>/M 进程相关。Chan 等<sup>[11]</sup>研究也发现肝细胞肝癌标本定量 RT-PCR 结果提示,Nek8 在肿瘤组织中的含量也高于正常组织<sup>[12-13]</sup>。郭亚平等<sup>[14]</sup>研究提示,食管鳞癌组织和食管鳞癌 Eca109 细胞系中 Nek8 过表达,且明显高于癌旁黏膜组织中的表达,其与食管鳞癌的发生机制有关。因此,本研究通过观察探讨 Nek8 蛋白在结直肠癌组织中的表达,同时探讨 Nek8 与其的相关性。结果发现,Nek8 在结直肠癌组织中的表达量明显高于配对的正常结直肠黏膜组织。传统病理认为结直肠癌均有腺瘤期,占结直肠癌 60% 左右<sup>[15]</sup>。本研究发现现在结直肠黏膜慢性炎症、结直肠管状腺瘤及结直肠管状腺癌 3 种不同的组织中 Nek8 表达的相关

性为正相关的关系,Nek8 在这 3 种不同的组织中阳性表达量逐渐升高,正好证实了传统的结直肠癌概念即腺瘤-癌相关学说。本研究的上述结果均提示 Nek8 可能参与了结直肠癌的发生和发展,与结直肠癌的发病机制有关,Nek8 基因可能是一种癌基因,但该基因在肿瘤的发生与发展中的具体作用及机制还有待研究。另外,本研究还对 Nek8 与结直肠癌临床病理特征的关系进行分析,结果提示 Nek8 的表达与结直肠癌患者的性别、年龄、五年生存率及癌组织的浸润深度、分期、淋巴转移和转移无关,提示 Nek8 表达水平不能作为结直肠癌分期、转移和判断预后的指标。

## 4 参考文献

- [1] Network CGA. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer[J]. *Nature*, 2012;330-337.
- [2] 李鹏,王拥军,陈光勇,等. 中国早期结直肠癌及癌前病变筛查与诊治共识[J]. *中国实用内科杂志*, 2015(3):211-227.
- [3] Fry AM, O'Regan L, Sabir SR, et al. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases[J]. *Journal of Cell Science*, 2012(19):4423-4433.
- [4] Fry AM. The Nek2 protein kinase; a novel regulator of centrosome structure[J]. *Oncogene*, 2002(40):6184-6194.
- [5] Bowers AJ, Boylan JF. Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors[J]. *Gene*, 2004(328):135-142.
- [6] Moniz L, Dutt P, Haider N, et al. REVIEW Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer[J]. *Cell Division*, 2011(10):1-10.
- [7] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2007(1):60-65.
- [8] Naro C, Barbagallo F, Chieffi P, et al. The centrosomal kinase NEK2 is a novel splicing factor kinase involved in cell survival. [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014(5):3218-3227.
- [9] Manning DK, Sergeev M, Van Heesbeen RG, et al. Loss of the ciliary kinase Nek8 causes left-right asymmetry defects. [J]. *Journal of the American Society of Nephrology* Jasn, 2013(1):100-112.
- [10] Zalli D, Bayliss R, Fry AM. The Nek8 protein kinase, mutated in the human cystic kidney disease nephronophthisis, is both activated and degraded during, ciliogenesis [J]. *Human Molecular Genetics*, 2012(5):1155-1171.
- [11] Chan WL, Yuo CY, Yang WK, et al. Transcribed pseudogene  $\psi$ PPM1K generates endogenous siRNA to suppress oncogenic cell growth in hepatocellular carcinoma [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013(6):3734-3747.
- [12] 吴浩,邹文斌,刘枫,李兆申. 早期胃癌及癌前病变内镜下切除治疗现状及进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2014(5):530-538.
- [13] 邹文斌,李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2014(4):408-415.
- [14] 郭亚平,朱红,付茂勇,等. Nek8 在食管鳞癌中的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2015(5):597-599.
- [15] 徐富星. 大肠癌研究现状[J]. *国际消化病杂志*, 2006(6):365-366.

(2017-01-01 收稿,2017-03-01 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 351 页)

- [9] 徐慧玲,程青虹. 心钠肽、肾损伤分子-1 在脓毒症发生急性肾损伤中的变化及意义[J]. *临床和实验医学杂志*, 2014(4):294-297.
- [10] 刘文洁,杨浩,蔚有权,等. 心钠肽、脑钠肽与心房颤动的相关性研究[J]. *皖南医学院学报*, 2016(1):34-37.
- [11] 陈德理,秦鸣. 食管超声心动图引导下经胸微创封堵先心病的应用[J]. *医学影像学杂志*, 2015,25(8):1358-1360.
- [12] 李珺,任卫东,杨军,等. 实时三维超声心动图评价房间隔缺损及其在手术中的应用[J]. *中国医科大学学报*, 2013(5):457-459.
- [13] 袁新春,赵春晓,周爱云,等. 实时三维超声心动图诊断结构性心脏病的应用价值[J]. *军事医学*, 2015(10):773-776.

(2017-01-11 收稿,2017-02-26 修回)

中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 苏晓庆