

胃癌组织中 ENO1、M2-PK 蛋白表达及其临床意义 *

倪田根¹ 祝秉东² 周欣¹ 王娜¹ 曾峰³ 关泉林^{1△}

(1 兰州大学第一医院肿瘤外科 甘肃 兰州 730000 2 兰州大学病原微生物研究所 甘肃 兰州 730000 ;

3 兰州大学第一医院病理科 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的 :探讨胃癌组织中烯醇化酶 -α (enolase-α ,ENO1)、肿瘤型丙酮酸激酶(tumor M2 pyruvate kinase,M2-PK)的表达、相互关系及临床病理学意义。**方法 :**应用免疫组织化学 SP 染色方法分别对 55 例胃癌组织和 23 例胃良性病变组织切片染色,观察胃癌组织和良性病变组织 ENO1、M2-PK 的表达情况及分析两者临床病理关系。**结果 :**胃癌组织中 ENO1 阳性表达率为 67.3% (37 / 55),明显高于胃良性病变组 30.4%(7 / 23) (P<0.01),其表达与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期均显著相关(均 P<0.05)。M2-PK 在胃癌组织中的阳性表达率为 78.2%(43 / 55),明显高于胃良性病变组织 39.1%(9 / 23) (P<0.01),其表达与胃癌分化程度、浸润深度均显著相关(均 P<0.05)。胃癌组织中 ENO1 与 M2-PK 的表达呈正相关(r=0.5729,P<0.05)。**结论 :**ENO1 和 M2-PK 的表达上调与胃癌的发生、发展可能有关,联合检测两种蛋白在肿瘤组织中的表达,对临床判断胃癌的预后有一定的指导意义。

关键词 :胃癌 烯醇化酶 -α 肿瘤型丙酮酸激酶 免疫组化 肿瘤转移

中图分类号 R735.2 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273 (2011) 20-3871-04

Expressions and Clinical Significances of ENO1 and M2-PK
in Gastric Cancer*

NI Tian-gen¹, ZHU Bing-dong², ZHOU Xin¹, WANG Na¹, ZENG Feng³, GUAN Quan-lin^{1△}

(1 Department of Oncological Surgery,First Hospital of Lanzhou Universtiy, Lanzhou,730000,China;

2 Institute of Pathogenic Biology of Lanzhou University, Lanzhou,730000, China;

3 Department of Pathology,First Hospital of Lanzhou Universtiy, Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinicopathological significance of enolase-α (ENO1) and tumor M2 pyruvate kinase (M2-PK) in gastric cancer. **Methods:** The expression of ENO1 and M2-PK in 55 paraffin-embedded specimens of gastric cancer and 23 paraffin-embedded specimens of benign gastric tissue was detected by S-P immunohistochemistry. The correlation of ENO1 expression to M2-PK expression , and their correlations to the clinicopathologic features of gastric cancer were analyzed. **Results:** The positive rate of ENO1 was significantly higher in gastric cancer than in benign gastric tissue (67.3% vs . 30.4%, P<0.01) , and closely related to differentiation grade (P<0.01) , depth of invasion (P<0.01), lymph node metastasis (P<0.05) and TNM staging(P<0.05).The positive rate of M2-PK was significantly higher in gastric cancer than in benign gastric tissue (78.2%vs . 39.1%, P<0.01) , and closely related to differentiation grade (P<0.05) , depth of invasion (P<0.05) .The expression of ENO1 was positively correlated to that of M2-PK (r=0.5729,P<0.05) . **Conclusion:** The up-regulation of ENO1 and M2-PK expression may play important roles in the oncogenesis and progression of gastric cancer. Combined detection of the expression of ENO1 and M2-PK in gastric cancer may provide a significant parameter to judge the clinical prognostic of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; Enolase-α ; Tumor M2 pyruvate kinase; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification: R735.2 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)20-3871-04

前言

近年来,Warbug 效应逐渐受到人们的重新重视。1929 年, Otto Warburg 先生观察到恶性肿瘤细胞代谢的改变,即在氧充足的条件下,肿瘤细胞主要通过有氧糖酵解途径利用葡萄糖,同时降低线粒体内的有氧磷酸化,并认为这个不可逆的改变最终导致肿瘤的形成,这就是著名的 Warburg 效应^[1]。尽管该理论

与肿瘤形成的确切关系到目前为止还不清楚,然而在恶性肿瘤中糖酵解代谢增强的普遍广泛存在是一个不可争辩的事实。一项研究证实,恶性肿瘤中糖酵解酶基因存在广泛的过表达,且这种情况似乎仅限于糖酵解,其他的生化途径(例如三羧酸循环)到目前为止未发现类似的情况,从而支持肿瘤中经典 Warburg 效应的观点^[2]。因此,肿瘤细胞中糖酵解酶表达的改变也是

* 基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助(lzujbky-2010-143)

作者简介 倪田根,男,主要从事胃肠道肿瘤的研究,电话:13919318562,E-mail nitiangen2009@126.com

△通讯作者 :关泉林,副教授,博士,E-mail:guanquanlin@126.com

(收稿日期 2011-02-20 接受日期 2011-03-16)

Warburg 效应的一个关键因素。而在糖酵解途径中,ENO1 和 M2-PK 都属于关键酶。尽管 ENO1 和 PKM2 的表达改变在许多肿瘤细胞中被观察到,然而其表达与临床的关系认识还有待探索。本文应用免疫组织化学方法检测 ENO1 和 M2-PK 在胃癌中表达情况,探讨 ENO1 和 M2-PK 对胃癌病情发生发展及预后的临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

收集兰州大学第一医院 2009 年 6 月至 2010 年 10 月病理科存档的石蜡包埋胃组织,经重新阅片证实,筛选出组织标本 78 例,其中胃癌 55 例,均为腺癌,男性 39 例,女性 16 例,年龄 27-79 岁,平均年龄 57.4 岁,根据国际 TNM 分期法(2002 版)分期 I 期及 II 期共 20 例,III 期及 IV 期共 35 例;高分化腺癌 19 例,低分化腺癌 36 例,其中发生淋巴结转移者 37 例;浸润深度 T1 和 T2 共 16 例,T3 和 T4 共 39 例;胃良性病变组织 23 例,均为胃溃疡,男性 18 例,女性 13 例,年龄 22-68 岁,平均年龄 43 岁。所有标本均经 10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋,连续切片厚 4μm。所有病例均来自住院手术病人,术前均未接受化疗及放疗。

1.2 试剂和方法

1.2.1 试剂 兔抗人 ENO1 多克隆抗体为 Proteintech Group 公司产品,工作效价为 1:100。兔抗人 M2-PK 多克隆抗体为北京博奥森有限公司产品,工作效价为 1:200。SP 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 免疫组化染色及结果判定 每个病例的切片均分为三部分,分别检测 ENO1 和 M2-PK 蛋白的表达。免疫组化按 SP 试

剂盒说明书步骤操作,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。在高倍镜下每张切片选择 5 个有代表性的视野,每个视野计数 100 个肿瘤细胞,共计数 500 个细胞。ENO1 定位于细胞浆或胞膜,M2-PK 定位于胞浆或胞核,出现黄色或棕黄色颗粒为阳性细胞。阳性结果判断:免疫组化结果采用半定量计分法判定。按阳性着色程度评分,0 分为无着色;1 分为浅黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。按阳性细胞占比例评分,0 分为 < 5%;1 分为 5%~ 10%;2 分为 11%~50%;3 分为 51%~80%;4 分为 > 80%。两者乘积判定阳性结果:0 为阴性(-);1~ 4 分为弱阳性(+);5~ 8 分为中度阳性(++);9~ 12 分为强阳性(+++~++++)。

1.3 统计学分析

对实验结果及临床资料运用统计软件 SPSS 17.0 进行 chi-square 检验,Spearman 相关分析进行统计学处理。检验水准为 P<0.05 有统计学意义。

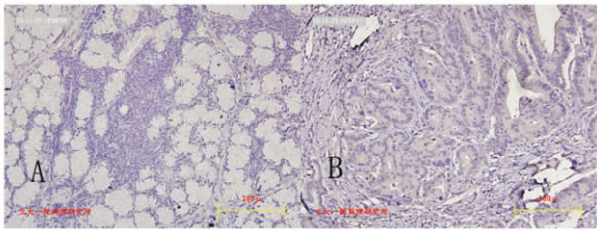
2 结果

2.1 胃癌组织中 ENO1 和 M2-PK 的表达

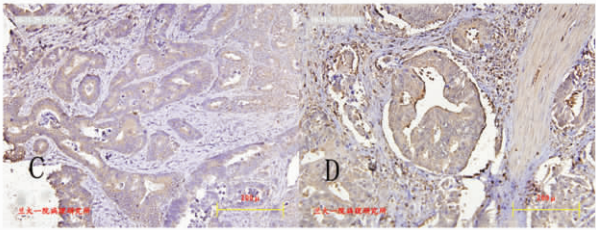
ENO1 在胃癌组织中的表达呈胞浆、胞膜分布,阳性信号为棕黄色颗粒。本组病例在胃良性病变组织中 ENO1 阳性表达 7 例,阳性率为 30.4%(7 / 23)。在胃癌组织中阳性表达 37 例,阳性率为 67.3%(37 / 55),显著高于胃良性病变组的表达(P=0.003)。M2-PK 在胃癌组织中的表达呈胞浆、胞核分布,阳性信号为棕黄色颗粒。本组病例在胃良性病变组织中 M2-PK 阳性表达 9 例,阳性率为 39.1%(9 / 23);在胃癌组织中阳性表达 43 例,阳性率为 78.2%(43 / 55),显著高于良性病变组的表达(P=0.001),见图 A-D,表 1。

表 1 胃良性病变组织及胃癌组织中 ENO1、M2-PK 的表达
Table 1 The expression of ENO1 and PK-M2 in benign gastric tissues and gastric cancer

Group	Benign gastric tissues			Gastric cancer			P value
	n	Positive	Negative	n	Positive	Negative	
ENO1	23	7	16	55	37	18	0.003
M2-PK	23	9	14	55	43	12	0.001



A: ENO1 在胃良性病变组织中表达(× 200)
A: ENO1 expression in benign gastric tissues(× 200)
B: M2-PK 在胃良性病变组织中表达(× 200)
B: M2-PK expression in benign gastric tissues(× 200)



C: ENO1 在胃癌组织中表达(× 200)
C: ENO1 expression in gastric cancer tissues(× 200)
D: M2-PK 在胃癌组织中表达(× 200)
D: M2-PK expression in gastric cancer tissues(× 200)

2.2 胃癌组织中 ENO1 和 M2-PK 的表达与临床病理特征的关系

结果表明,胃癌组织中 ENO1 的表达与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期均显著相关(均 P<0.05),与患

者的年龄、性别无显著相关(均 P>0.05)。胃癌组织中的 M2-PK 表达与胃癌分化程度、浸润深度显著相关(均 P<0.05),与患者的年龄、性别、临床分期及有无淋巴结转移无显著相关(均 P>0.05),见表 2。

表 2 ENO1 和 M2-PK 与胃癌临床病理特征的关系

Table 2 Correlations of ENO1 and PK-M2 expression to clinicopathologic features of gastric cancer

Clinicopathologic features	n	ENO1	P value	M2-PK	P
Age					
≥ 55y	30	22 (73.3%)	0.294	23 (76.7%)	0.766
<55y	25	15 (60%)		20 (80%)	
Gender					
Male	39	26 (70.3%)	0.881	31 (79.5%)	0.995
Female	16	11 (68.8%)		12 (75%)	
Differentiation grade					
Low	36	28 (77.8%)	0.022	32 (88.9%)	0.021
High	19	9 (47.4%)		11 (57.9%)	
Depth of invasion					
T1+T2	16	7(43.8%)	0.017	9(56.3%)	0.031
T3+T4	39	30(76.9%)		23(87.2%)	
Lymph node metastasis					
Yes	37	31(83.8%)	<0.01	31(83.8%)	0.274
No	18	6(33.3%)		12(66.7%)	
TNM stage					
I+II	20	8(40%)	0.001	13(65%)	0.147
III+IV	35	29(82.9%)		30%(85.7%)	

2.3 胃癌组织中 ENO1、M2-PK 表达的相关性

胃癌组织中 33 例 ENO1 与 M2-PK 共阳性表达,8 例 ENO1 和 M2-PK 共阴性表达,仅 ENO1 阳性 4 例,仅 M2-PK

阳性 10 例,经相关性分析表明 ENO1、M2-PK 表达呈正相关 (r=0.5729,P<0.05),见表 3。

表 3 ENO1、M2-PK 在胃癌中表达的相互关系 (例)

Table 3 Correlations of ENO1 and PK-M2 expression in gastric cancer

	M2-PK(+)	M2-PK(-)	P value
ENO1(+)	33	4	<0.05
ENO1(-)	10	8	

3 讨论

我们的研究证实,ENO1 和 M2-PK 的表达与胃癌的分化程度及浸润深度有关,二者在胃癌的发生发展中可能发挥重要的作用,同时也证实支持了肿瘤细胞中的 Warburg 效应的理论。

ENO1 是一个高度保守的胞浆糖酵解酶,由两个含有 433 个氨基酸,分子量约 47kDa 的亚单位构成的二聚体,在细胞质中起催化作用,形成磷酸烯醇式丙酮酸。与之前报道一致,在大多数的肿瘤中 ENO1 呈高表达状态,如头颈部鳞状细胞癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌、小细胞型肺癌、子宫内膜癌等^[3-7]。同时有研究证实,在低分化和静脉血管浸润的肝癌中 ENO1 表达更高^[8]。在非小细胞肺癌中 ENO1 的高表达与临床预后相关,分期越晚,表达越高。Kim JW 等^[9]最近研究表明,ENO1 是一个多功能蛋白,ENO1 不仅表达于胞浆,也表达与细胞膜的表面,除了在胞

质中发挥糖酵解的作用外,细胞膜表面 ENO1 起着纤溶酶原的受体的作用,参与结合、活化、稳定纤溶酶原以及肿瘤细胞的侵袭和转移^[10,11]。此外,ENO1 的高表达可以增强单核巨噬细胞的浸润能力,提高穿透基质的能力^[12],还可能通过 Notch 信号通路控制 C-MYC 癌蛋白的表达,参与肿瘤的形成过程^[13]。

M2-PK 是糖酵解限速酶丙酮酸激酶的一种同工酶。M2-PK 主要存在于胚胎细胞、成体干细胞、肿瘤细胞等增殖细胞中,在正常细胞中主要以四聚体形式存在,而在肿瘤中则大量表达并主要以二聚体形式存在^[14],例如在肺癌、乳腺癌、胃肠道肿瘤、肾癌等肿瘤细胞中,其二聚体形式的含量远高于正常组织^[15]。最近一项研究利用小发夹结构的 RNA 抑制 M2-PK 的表达,同时用 M1-PK 代替它,结果表明乳酸产物减少,氧消耗增加,同时在裸鼠异体移植中的肿瘤形成能力降低,证实肿瘤中 M2-PK 的表达对肿瘤细胞的增殖是必需的,其代谢类型的改变为肿瘤

生长提供了必要的条件^[16]。M2-PK 受变构激活剂 1,6- 二磷酸果糖调节,当 1,6- 二磷酸果糖(fructose-1,6-bisphosphate,FBP)水平达到一定高浓度时,无活性的二聚 PKM2 重新转化为高活性的四聚体 M2-PK,而低水平则相反^[14]。PKM2 同时又是一种磷酸酪氨酸结合蛋白,它直接地和(或)选择性地与磷酸酪氨酸肽特异性结合。当磷酸酪氨酸肽与 M2-PK 结合后,可促使与 M2-PK 相结合的 FBP 释放,转化为二聚体的 M2-PK 活性被抑制,这种调节也是 PKM2 特有的^[17]。此外,M2-PK 还受其他一些小分子物质调节,如 L- 丝氨酸通过变构效应增加 PKM2 对磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的亲和力和降低 FBP 浓度,而另一方面 L- 丙氨酸则降低 PKM2 对 PEP 的亲和力,增加 FBP 的浓度,其他氨基酸,如 L- 一半胱氨酸、L- 蛋氨酸等则抑制 PKM2 的活性^[14]。

实体肿瘤中,肿瘤细胞适应低氧微环境对肿瘤细胞增殖、浸润、转移是至关重要的一步。缺氧诱导因子 HIF-1 α 参与机体对缺氧的反应,是一个转录因子,能激活编码葡萄糖转运蛋白,糖酵解酶,VEGF 的基因转录。多项研究显示,ENO1、PKM2 基因同为 HIF-1 α 作用的靶基因^[18-20];在缺氧的情况下,HIF-1 α 通过不断的途径启动 ENO1、M2-PK 基因表达。ENO1 的高表达,产生更多的 PEP,而表达低活性的肿瘤型 M2-PK 糖酵解酶,导致 PEP 的积聚,两者共同导致磷酸烯醇类物质的积累,代谢转进合成过程,作为细胞增殖的原料,有利于肿瘤细胞向核酸合成的方向进行。因此,ENO1、M2-PK 对调控恶性肿瘤的发生、发展可能起着重要作用。

本研究结果表明 ENO1、M2-PK 对胃癌的发生、发展具有重要作用,为胃癌预后判断及治疗监测提供了新的潜在的肿瘤标志物,可作为判断胃癌浸润转移潜能和预后的参考指标。然而,ENO1、M2-PK 导致 Warburg 效应的机制还不切确清楚,有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Warburg O. On the origin of cancer cells. Science [J]. Science, 1956, 123(3191): 309-314
- [2] Altenberg B, Greulich K O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes [J]. Genomics, 2004, 84 (6): 1014-1020
- [3] Byrjalsen I, Mose Larsen P, Fey S J, et al. Two-dimensional gel analysis of human endometrial proteins: Characterization of proteins with increased expression in hyperplasia and adenocarcinoma[J]. Mol Hum Reprod,1999, 5(8): 748-756
- [4] Lee K A, Shim J H, Kho C W, et al. Protein profiling and identification of modulators regulated by the e7 oncogene in the c33a cell line by proteomics and genomics [J]. Proteomics, 2004, 4(3): 839-848
- [5] Lo Presti M, Ferro A, Contino F, et al. Myc promoter-binding protein-1 (mbp-1) is a novel potential prognostic marker in invasive ductal breast carcinoma[J]. PLoS One,2010, 5(9): e12961

- [6] Wu W G, Tang X M, Hu W, et al. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry [J]. Clin Exp Metastasis,2002, 19(4): 319-326
- [7] Zhang L, Cilley R E,Chinoy M R. Suppression subtractive hybridization to identify gene expressions in variant and classic small cell lung cancer cell lines[J]. J Surg Res,2000, 93(1): 108-119
- [8] Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, et al. Overexpression of alpha enolase in hepatitis c virus-related hepatocellular carcinoma: Association with tumor progression as determined by proteomic analysis[J]. Proteomics,2005, 5(6): 1686-1692
- [9] Kim J W, Dang C V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes [J]. Trends Biochem Sci,2005, 30(3): 142-150
- [10] Liu K J, Shih N Y. The role of enolase in tissue invasion and metastasis of pathogens and tumor cells[J]. J Cancer Mol, 2007, 3(2): 45-48
- [11] Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: Its role in diseases [J]. Cell Mol Life Sci,2001, 58(7): 902-920
- [12] Wygrecka M, Marsh L M, Morty R E, et al. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung[J]. Blood, 2009, 113(22): 5588-5598
- [13] Hsu K W, Hsieh R H, Lee Y H, et al. The activated notch1 receptor cooperates with alpha-enolase and mbp-1 in modulating c-myc activity[J]. Mol Cell Biol,2008, 28(15): 4829-4842
- [14] Mazurek S, Boschek C B, Hugo F, et al. Pyruvate kinase type m2 and its role in tumor growth and spreading [J]. Semin Cancer Biol,2005, 15(4): 300-308
- [15] Oremek G M, Teigelkamp S, Kramer W, et al. The pyruvate kinase isoenzyme tumor m2 (tu m2-pk) as a tumor marker for renal carcinoma[J]. Anticancer Res,1999, 19(4A): 2599-2601
- [16] Christofk H R, Vander Heiden M G, Harris M H, et al. The m2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth[J]. Nature,2008, 425(7184): 230-233
- [17] Christofk H R, Vander Heiden M G, Wu N, et al. Pyruvate kinase m2 is a phosphotyrosine-binding protein [J]. Nature,2008, 452 (7184): 181-186
- [18] Discher D J, Bishopric N H, Wu X, et al. Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-m promoters by modulating sp1/sp3 binding to a conserved gc element [J]. J Biol Chem,1998, 273(40): 26087-26093
- [19] Hamaguchi T, Iizuka N, Tsunedomi R, et al. Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1alpha is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 2008, 33(4): 725-731
- [20] Kress S, Stein A, Maurer P, et al. Expression of hypoxia-inducible genes in tumor cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1998, 124(6): 315-320