

论著·临床研究

胆囊癌中 PLEK2 的表达及对预后的影响

许盛琪¹, 张庆梅², 童朝刚^{1△}

(安徽医科大学附属巢湖医院; 1. 肝胆外科; 2. 麻醉科, 安徽 合肥 238000)

[摘要] **目的** 测定胆囊癌组织中血小板-白细胞 C 激酶底物 2(PLEK2) 抗体的表达, 分析 PLEK2 的表达与胆囊癌患者临床特征的相关性及对预后的影响。**方法** 选取 2017 年 3 月至 2022 年 2 月该院收治的行胆囊切除术或胆囊癌根治术且术后病理提示胆囊恶性肿瘤患者 46 例。收集患者病历及随访资料, 进行肿瘤组织免疫组织化学染色试验, 分析 PLEK2 的表达与患者临床特征的相关性及对生存情况的影响。随访结束时间为 2022 年 8 月 30 日。**结果** 46 例患者中位总体生存时间为 28 个月(95% 可信区间: 20~36); 46 例患者中胆囊癌标本 PLEK2 表达阳性 41 例(89.13%), 阳性表达程度与 T 分期、性别、癌抗原 15-3 阳性明显相关, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 意外胆囊癌(术前诊断为胆囊良性疾病而在术中或术后病理检查提示恶性者)、性别、癌抗原 125 阳性、PLEK2 表达、T 分期均与生存相关, T 分期、PLEK2 表达是胆囊癌患者预后的危险因素, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PLEK2 在胆囊癌组织中多呈阳性表达, 其表达阳性程度与 T 分期、性别、癌抗原 15-3 阳性相关, 是影响胆囊癌患者预后的独立危险因素。

[关键词] 胆囊癌; 血小板-白细胞 C 激酶底物 2; T 分期; 免疫组化; 生存分析

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2023.14.019

中图法分类号: R735.8

文章编号: 1009-5519(2023)14-2433-05

文献标识码: A

Expression of Pleckstrin-2 in gallbladder carcinoma and its effect on prognosis

XU Shengqi¹, ZHANG Qingmei², TONG Chaogang^{1△}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery; 2. Department of Anesthesiology, Chaohu Hospital

Affiliated to Anhui Medical University, Hefei, Anhui 238000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of platelet-leukocyte C kinase substrate 2(PLEK2) antibody in gallbladder carcinoma, and analyze the correlation between the expression of PLEK2 and the clinical characteristics of patients with gallbladder carcinoma and its impact on the prognosis after surgery. **Methods** A total of 46 patients who underwent cholecystectomy or radical resection of gallbladder carcinoma in Chaohu Hospital Affiliated to Anhui Medical University from March 2017 to February 2022, and whose postoperative pathology showed gallbladder carcinoma, were selected. Their medical records and follow-up data were collected and tumor tissue immunohistochemical staining test was performed to analyze the correlation between the expression of PLEK2 and the clinical characteristics of patients and the impact on the survival of patients with gallbladder carcinoma. The follow-up end at August 30, 2022. **Results** The overall median survival time was 28 months(95% CI: 20-36 months). Among the 46 patients, 41 cases(89.13%) were positive for PLEK2 in gallbladder carcinoma samples, and the degree of positive expression was significantly correlated with T stage, sex and cancer antigen 15-3 positive, with statistical significance($P < 0.05$). Univariate survival analysis showed that unexpected gallbladder carcinoma(preoperative diagnosis of benign gallbladder disease and intraoperative or postoperative pathological examination indicated malignancy), gender, CA125 positive, PLEK2 expression, and T stage were related to survival. T stage, PLEK2 expression were risk factors for the prognosis of patients with gallbladder carcinoma($P < 0.05$). **Conclusion** PLEK2 is positive expressed in gallbladder carcinoma mostly, and its positive degree is related to T stage, sex and CA15-3 level, and it is an independent risk factor affecting the prognosis of patients with gallbladder carcinoma.

[Key words] Gallbladder carcinoma; Platelet leukocyte C-kinase substrate 2; T stage; Immunohis-

tochemistry; Survival analysis

胆囊癌是胆道系统常见恶性肿瘤,侵袭性强,致死率高,总体 5 年生存率仅为 5%^[1]。血小板-白细胞 C 激酶底物 2(PLEK2)是 PLEK 家族一员,广泛表达于胸腺、胃、大肠、小肠、前列腺等器官^[2]。近年来,多项研究表明,PLEK2 在多种恶性肿瘤中高表达,如食管鳞状细胞癌^[3]、头颈部肿瘤^[4]、非小细胞肺癌^[5]、胰腺癌^[6]、胆囊癌^[7]、胃癌^[8]和结直肠癌^[9],促进癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究通过回顾胆囊癌患者病历及随访资料、测定胆囊癌组织中 PLEK2 的表达,分析了胆囊癌患者 PLEK2 表达与临床特征的相关性,研究了 PLEK2 高表达是否为影响胆囊癌患者预后的危险因素,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象 以 2017 年 3 月至 2022 年 2 月本院收治的 46 例胆道恶性肿瘤患者为研究对象,收集其人口统计特征、临床表现、既往史、实验室检查、影像学表现、手术方式和常规术后病理结果资料。本研究符合医学伦理学规定,并通过医院伦理委员会审批(编号:KYXM-202211-003)。

1.1.2 纳入标准 手术方式为胆囊切除术或胆囊癌根治术且术中或术后病理检查确诊为胆囊癌。

1.1.3 排除标准 (1)合并其他部位恶性肿瘤;(2)术后 30 d 内死亡;(3)失访者;(4)病历资料不完善者。

1.1.4 试验试剂 购置兔抗人 PLEK2 多克隆抗体(1:100,美国 Proteintech 公司)、抗小鼠免疫组化试剂盒[内含辣根过氧化物酶标记二抗、二氨基联苯胺(DAB)原液、DAB 稀释液、一抗稀释液、5%山羊血清和 3%过氧化氢,美国 Proteintech 公司]、磷酸盐缓冲液(PBS,1:1 000,武汉赛尔维公司)、苏木素染色液等。

1.2 方法

1.2.1 染色试验 对 46 例胆囊癌组织标本及 10 例良性胆道组织标本进行染色试验。组织常规石蜡包埋,蜡块切片工作由病理科医生提前完成。染色步骤:(1)脱蜡。载玻片在二甲苯中脱蜡 2 次,每次 15 min,再经 100%、100%、95%、85%、75%梯度乙醇及蒸馏水水化,每次 5 min。(2)抗原修复。采用高压锅蒸馏水修复法,上汽后 5 min,室温(26℃)冷却,PBS 漂洗载玻片 3 次,每次 3 min。(3)淬灭过氧化物酶活性、封闭。采用 3%过氧化氢溶液室温孵育 15 min,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,滴加 5%山羊血清,室温封闭 20 min。(4)滴加一抗。弃封闭液,滴加 PLEK2 抗

体(1:100),室温 80 min,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。(5)滴加二抗。滴加山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。(6)染色。滴加 DAB 显色液,2~5 min,显微镜下观察,形成棕黄色时立即蒸馏水冲洗,终止染色。(7)复染。将玻片浸入苏木素液,室温 3 min,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。(8)脱水、封片。甩干玻片,浸入 60%、80%、90%、100%梯度乙醇各 5 min,二甲苯中脱水 2 次,每次 5 min,烘干后中性树胶封片。

1.2.2 结果判读 由 3 名病理科医生共同判读结果,未见明显染色为“-”,染色呈淡黄色为“+”、橘黄色为“++”、棕褐色为“+++”;“-、+”为低表达,“++、+++”为高表达。

1.2.3 随访 以门诊随访方式为主,未定期门诊就诊者采取电话随访,记录事件终止时间,随访时间截止至 2022 年 8 月 30 日。

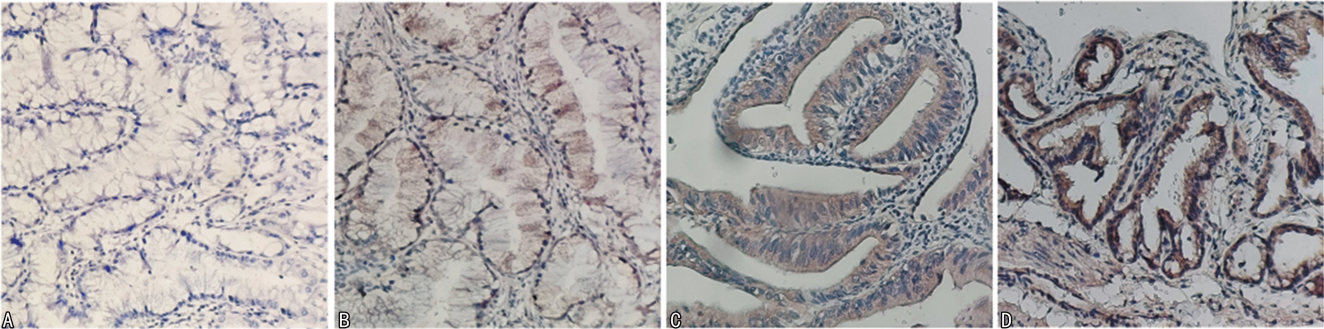
1.3 统计学处理 应用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析,符合正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不符合正态分布计量资料以中位数(四分位间距)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,计数资料以率或构成比表示,采用 t 检验、秩和检验、 χ^2 检验等;应用 Kaplan-Meier(log-rank)生存曲线分析患者人口统计学、临床表现、既往史、实验室检查、影像学表现、手术方式、常规术后病理结果、PLEK2 表达对生存有无影响,由于其中部分变量与 T 分期相关,遂行 T 分期分层抽样的单因素生存分析,结果显著项纳入 Cox 风险回归分析;使用 Graphpad Prism 9.0 制作条形图及生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 46 例患者中男 14 例,女 32 例;年龄 61~76 岁,中位 71 岁;体重指数 20.54~26.59 kg/m²,中位 22.86 kg/m²;平均中性粒细胞淋巴细胞比值 5.23±4.50;平均胆囊壁厚度(6.80±4.76)mm;既往胆囊炎病史 17 例,胆囊炎急性发作 30 例,意外胆囊癌 26 例,合并胆囊结石 31 例;肿瘤标志物阳性:癌胚抗原 7 例,糖链抗原 19-9 21 例,癌抗原 15-3(CA15-3)5 例,癌抗原 125(CA125)6 例;手术方式:胆囊切除术 21 例,胆囊癌根治术 25 例;T 分期:I 期 10 例,II 期 15 例,III 期 21 例;PLEK2 表达:(-)5 例,(+)17 例,(++)17 例,(+++)7 例;肿瘤部位:底部 23 例,体部 21 例,颈部 2 例;分化程度:低分化 19 例,中分化 22 例,高分化 5 例。

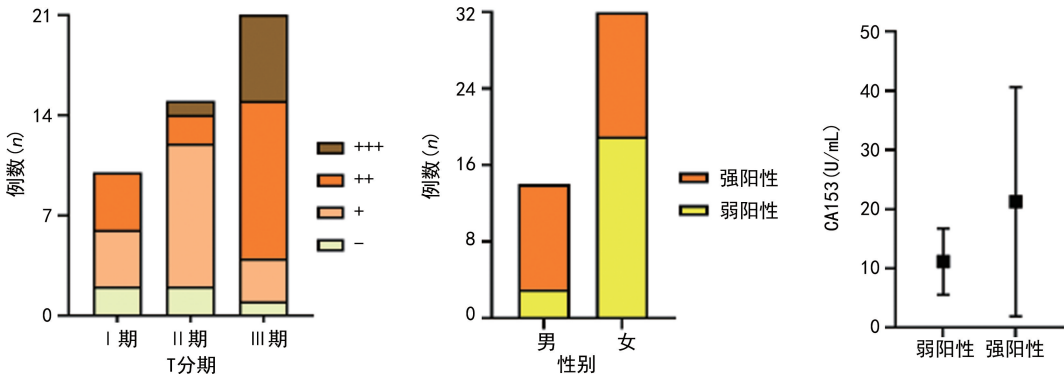
2.2 PLEK2 在胆囊癌组织中的表达 10 例良性胆

囊标本 PLEK2 表达均为阴性,46 例胆囊癌标本中 PLEK2 表达阳性 41 例(89.13%)。PLEK2 在胆囊癌组织中的表达见图 1。46 例患者中位总体生存时间为 28 个月(95%可信区间:20~36)。PLEK2 低表达患者 1、3 年生存率分别为 86%、77%,中位生存时间为 36 个月。PLEK2 高表达患者 1、3 年生存率分别为 79%、50%,中位生存时间为 15(27,9)个月。



注:A 为 PLEK2 表达阴性;B 为表达阳性程度+;C 为表达阳性程度++;D 为表达阳性程度+++。

图 1 PLEK2 在胆囊癌组织中的表达(IHC,200×)



注:弱阳性表达程度为一或+,强阳性表达程度为++或+++。

图 2 PLEK2 表达与 T 分期、性别、CA15-3 水平相关性

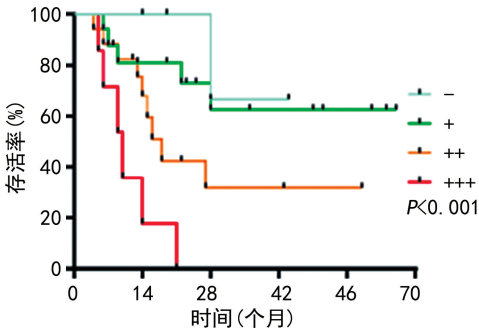


图 3 PLEK2 不同阳性程度患者的生存曲线

2.4 生存分析 T 分期、性别、意外胆囊癌(术前诊断为胆囊良性疾病而在术中或术后病理检查提示恶性者)、手术方式、CA125 阳性均与生存相关,差异均有统计学意义($P<0.05$)。由于意外胆囊癌、手术方式与 T 分期相关,遂行 T 分期分层抽样的单因素生存分析,意外胆囊癌、手术方式与生存无关,差异均无

2.3 PLEK2 表达阳性程度与其他变量的相关性 PLEK2 表达阳性程度与 T 分期、性别、CA15-3 水平明显相关,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。PLEK2 表达与生存相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。并且在 T 分期分层抽样的生存分析后,PLEK2 表达仍与生存明显相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。

统计学意义($P>0.05$)。T 分期、PLEK2 表达是胆囊癌患者预后的危险因素,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 Cox 风险回归分析					
变量	回归系数	χ^2	P	风险比	95%CI 可信区间
T 分期	0.844	4.768	0.029	2.325	1.090~4.957
性别	-0.798	2.788	0.095	0.450	0.177~1.149
CA125 阳性	-0.013	0.811	0.368	0.987	0.959~1.016
PLEK2 表达	0.781	5.580	0.018	2.184	1.142~4.176

3 讨 论

PLEK2 是 PLEK 家族一员,广泛表达于多个器官,既往研究发现,PLEK2 与磷脂酰肌醇-3-激酶脂类产物相互作用,参与了肌动蛋白重组、调节细胞骨架重组、促进细胞扩散等^[2,10]。近年来,国内外多项研究

表明,部分消化系统肿瘤患者 PLEK2 表达上调,参与了肿瘤的发生和发展。YANG 等^[6]发现,PLEK2 依赖磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 通路促进胰腺癌干细胞的自我更新和增殖;SHEN 等^[7]研究表明,PLEK2 通过含有 SH2 结构的 II 型肌醇 5-磷酸酶激活表皮生长因子受体/蛋白激酶 B 通路,促进胆囊癌细胞的迁移和侵袭;PLEK2 高表达通过激活上皮-间充质转化通路参与了胃癌的发生和进展^[8]。CHAI 等^[11]发现,结直肠癌抑癌基因表达与 PLEK2 呈负相关,靶向抑制 PLEK2 位点可能在治疗结直肠癌抑癌基因失活或缺失患者方面具有重要意义。

本研究进行 PLEK2 免疫组织化学染色后发现,46 例胆囊癌标本中 PLEK2 阳性表达 41 例(89.13%),并且 PLEK2 表达程度与 T 分期呈正相关,其高表达促进肿瘤细胞的迁移和侵袭,PLEK2 可能成为抑制胆囊癌迁移和侵袭的治疗靶点。由于部分胆囊癌患者术前诊断为良性疾病,术中未进行淋巴结清扫。因此,今后应该对 PLEK2 与淋巴结转移进行相关性分析。此外,本研究意外发现,PLEK2 高表达与性别(男性)及 CA15-3 升高水平相关(图 2),且 5 例 CA15-3 阳性患者均显示 PLEK2 高表达。据文献报道,CA15-3 升高与肿瘤 T 分期相关^[12]。因此,本研究控制 T 分期变量后进行偏相关检验发现,PLEK2 表达强度仍与 CA15-3 相关,差异有统计学意义($P<0.05$),对于二者的联系,国内外尚缺乏相关机制研究或相似的文献报道。

当前,由于胆囊癌缺乏特异性肿瘤标志物和临床特征,不仅难以做到早期诊断,而且对患者生存期的预测也主要通过美国癌症联合委员会发布的 TNM 分期系统实现^[13]。国内外部分研究表明,胆囊癌患者术后生存期短、5 年生存率低的因素可能还包括性别、高龄、相关肿瘤标志物阳性(包括癌胚抗原、糖链抗原 19-9、CA15-3、CA125 和癌抗原 242)、非意外胆囊癌、手术方式、外周血循环肿瘤细胞阳性、中性粒细胞淋巴细胞比值高等^[14-19],但结果仍有争议。本研究单因素生存分析结果显示,T 分期、性别、CA125 阳性、意外胆囊癌、手术方式、PLEK2 表达均与胆囊癌患者预后相关。考虑到意外胆囊癌 T 分期主要以 I、II 期为主,且意外胆囊癌和 T 分期也会影响到手术方式的选择,在行 T 分期分层抽样的单因素生存分析后证实意外胆囊癌和手术方式对生存并无影响,T 分期可能是造成其假阳性的原因。

本研究 Cox 风险回归分析发现,T 分期、PLEK2 表达是胆囊癌患者术后生存的独立危险因素(风险比=2.325、2.184, $P=0.029$ 、0.018),PLEK2 可能成

为预测胆囊癌患者预后的重要指标;并且在行 T 分期分层抽样的单因素生存分析时,PLEK2 表达仍与生存相关,考虑 PLEK2 高表达除通过促进肿瘤细胞的迁移和侵袭影响患者预后这一途径外,可能存在其他影响预后的机制,这些均需进一步研究。

本研究存在不足之处:(1)本研究为单中心研究,样本数量较少,期待未来多中心、大样本量的研究;(2)由于本研究随访结束时间较早,部分患者未能随访至终点事件,今后将继续随访,并纳入更多病例,进一步论证本研究结果。

综上所述,PLEK2 在胆囊癌组织中多呈阳性表达,其阳性程度与 T 分期、性别、CA15-3 阳性明显相关,是影响胆囊癌患者预后的独立危险因素。

参考文献

[1] KONDO S, TAKADA T, MIYAZAKI M, et al. Guidelines for the management of biliary tract and ampullary carcinomas: Surgical treatment [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2008, 15 (1): 41-54.

[2] HU M H, BAUMAN E M, ROLL R L, et al. Pleckstrin 2, a widely expressed paralog of pleckstrin involved in actin rearrangement [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (31): 21515-21518.

[3] WANG F, ZHANG C, CHENG H, et al. TGF- β -induced PLEK2 promotes metastasis and chemoresistance in oesophageal squamous cell carcinoma by regulating LCN2 [J]. Cell Death Dis, 2021, 12 (10): 901.

[4] ZHAO X, SHU D, SUN W, et al. PLEK2 promotes cancer stemness and tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma via the c-Myc-mediated positive feedback loop [J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42 (10): 987-1007.

[5] WU D M, DENG S H, ZHOU J, et al. PLEK2 mediates metastasis and vascular invasion via the ubiquitin-dependent degradation of SHIP2 in non-small cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2020, 146 (9): 2563-2575.

[6] YANG X L, MA Y S, LIU Y S, et al. microRNA-873 inhibits self-renewal and proliferation of pancreatic cancer stem cells through pleckstrin-2-dependent PI3K/AKT pathway [J]. Cell Signal, 2021, 84: 110025.

[7] SHEN H, HE M, LIN R, et al. PLEK2 promotes gallbladder cancer invasion and metastasis through EGFR/CCL2 pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):247.

[8] WANG J, HE Z, SUN B, et al. Pleckstrin-2 as a prognostic factor and mediator of gastric cancer progression[J]. Gastroenterol Res Pract, 2021, 2021:5527387.

[9] 李晓梅. 微生物中次级代谢产物的挖掘和 PLEK2 在结直肠癌中的作用机制研究[D]. 济南:山东大学, 2020.

[10] BACH T L, KERR W T, WANG Y, et al. PI3K regulates pleckstrin-2 in T-cell cytoskeletal reorganization[J]. Blood, 2007, 109(3):1147-1155.

[11] CHAI B, GUO Y, ZHU N, et al. Pleckstrin 2 is a potential drug target for colorectal carcinoma with activation of APC/ β catenin[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(6):862.

[12] 杨会锋, 牛志鹏, 冯新献. 血清 miR-182 与 CA153 联合检测在胆囊癌诊断中的意义[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(6):758-761.

[13] CANCER A J C O, GREENE F L, PAGE D L, et al. AJCC Cancer Staging Manual [M]. Springer, 2017:303-311.

[14] ALARABIYAT M, RAZA S S, ISAAC J, et al. Incidental gallbladder cancer diagnosis confers survival advantage irrespective of tumour stage and characteristics[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(18):1996-2007.

[15] 刘利民. 外周血循环肿瘤细胞、CA199 联合中性粒细胞淋巴细胞比值对胆囊癌预后评估价值[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(20):3339-3340.

[16] 朱云楼, 王巍. 术前血清 CA125 水平对于胆囊癌诊治的临床价值[J]. 复旦学报(医学版), 2018, 45(3):384-390.

[17] TANG H, LU W, LI B, et al. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in biliary tract cancers: A systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(22):36857-36868.

[18] YANG G, LU Z, MENG F, et al. Circulating miR-141 as a potential biomarker for diagnosis, prognosis and therapeutic targets in gallbladder cancer [J]. Sci Rep, 2022, 12(1):10072.

[19] WANG Y F, FENG F L, ZHAO X H, et al. Combined detection tumor markers for diagnosis and prognosis of gallbladder cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(14):4085-4092.

(收稿日期:2022-11-28 修回日期:2023-03-16)

(上接第 2432 页)

[9] 林秋月, 林秀香. 胸腔积液病理诊断中细胞蜡块技术与传统涂片技术的应用对比[J]. 中外医疗, 2022, 41(4):42-45.

[10] 余燕琪. 胸腔积液病理诊断中应用细胞块切片免疫组化染色检测的价值[J]. 医疗装备, 2017, 30(24):68-69.

[11] 龙兆博, 唐晓梅, 司婷婷, 等. 细胞块制片免疫组化对胸腹腔积液转移性腺癌的诊断价值[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(11):1787-1790.

[12] 王晗, 赵杰, 雷芹, 等. 细胞块石蜡包埋切片和细胞涂片鉴别诊断良、恶性胸腹腔积液的临床效果比较[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(1):77-80.

[13] 梁储财, 邵少慰. 细胞蜡块在免疫细胞化学和分子病理中的应用价值[J]. 诊断病理学杂志, 2022, 29(1):27-30.

[14] 肖同浩, 陈寿松, 熊丽萍, 等. 提高胸腹水肿瘤细胞检出率的方法探讨[J]. 临床军医杂志, 2009, 37(2):277-278.

[15] CHEN D, LI X, ZHAO H, et al. The efficacy of pemetrexed and bevacizumab intrapleural injection for malignant pleural mesothelioma-mediated malignant pleural effusion [J]. Indian J Cancer, 2014, 51(Suppl 3):e82-85.

[16] 梁海红. 细胞学诊断在浆膜腔积液中的应用现状[J]. 医学信息, 2020, 33(13):30-34.

(收稿日期:2022-09-19 修回日期:2023-02-25)