

CD133、Ki-67在胃癌的表达及临床病理意义

李亚卓, 王凤华, 赵坡

李亚卓, 赵坡, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853
王凤华, 中国人民解放军208医院病理科 吉林省长春市 130062

李亚卓, 2008级中国人民解放军军医进修学院博士, 主要从事消化肿瘤的病理研究。

作者贡献分布: 此课题由李亚卓、王凤华及赵坡设计; 操作及写作由李亚卓完成。

通讯作者: 赵坡, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院病理科. zhaopo@301hospital.com.cn

电话: 010-66937736

收稿日期: 2008-07-09 修回日期: 2008-08-12

接受日期: 2008-08-19 在线出版日期: 2008-10-08

Expressions of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma and their clinicopathologic significances

Ya-Zhuo Li, Feng-Hua Wang, Po Zhao

Ya-Zhuo Li, Po Zhao, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Feng-Hua Wang, Department of Pathology, 208 Hospital of Chinese PLA, Changchun 130062, Jilin Province, China

Correspondence to: Po Zhao, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. zhaopo@301hospital.com.cn

Received: 2008-07-09 Revised: 2008-08-12

Accepted: 2008-08-19 Published online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To investigate the expressions of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma and their clinical significances.

METHODS: Immunohistochemistry (PV6000 method) was used to detect CD133 and Ki-67 expressions in paraffin-embedded gastric carcinoma tissues of 336 cases and paracancerous normal mucosa of 60 cases using tissue array technology. In this study all cases were successfully followed up.

RESULTS: The positive expression rates of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma were 57.4% and 58.3%, respectively. CD133 and Ki-67 were all correlated to tumor size, differentiation degree, infiltrative depth, clinical stage, lymphatic invasion and distant metastasis (all $P < 0.05$). The 5-year survival rate of the patients

with CD133 or Ki-67 expression was lower than that of patients with negative expression (both $P < 0.05$). The CD133 expression in gastric carcinoma was positively correlated with the Ki-67 expression ($r = 0.188$, $P < 0.05$). The expressions of CD133 and Ki-67 in carcinoma were significantly higher than those in normal mucosa tissues (57.4% vs 28.6%, 58.3% vs 18.6%, both $P < 0.05$). CD133 and Ki-67 were both independent prognostic indicators for survival time after operation.

CONCLUSION: CD133 and Ki-67 play significant roles in the generation and evolution of gastric carcinoma and can be used as useful indicators for clinical assessment of tumor biological behavior and prognosis in patients with gastric carcinoma.

Key Words: Gastric neoplasms; Immunohistochemistry; Cancer stem-like cell; CD133; Ki-67

Li YZ, Wang FH, Zhao P. Expressions of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma and their clinicopathologic significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(28): 3167-3171

摘要

目的: 研究CD133和Ki-67在胃癌中的表达, 并探讨其与肿瘤生物学特征及患者术后生存时间的关系。

方法: 应用组织芯片技术, 采用PV6000二步法检测有完整随访资料的336例胃癌及60例癌旁正常组织中CD133和Ki-67表达的差异。

结果: 胃癌CD133和Ki-67的阳性率为57.4%, 58.3%。CD133和Ki-67的表达均与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目、TNM分期和出现腹腔及远处转移相关(均 $P < 0.05$)。CD133和Ki-67阳性组患者的5年生存率均低于阴性组(均 $P < 0.05$)。CD133和Ki-67在胃癌的表达呈正相关($r = 0.188$, $P < 0.05$)。CD133和Ki-67在胃癌组织中的表达显著高于在癌旁正常组织中的表达(57.4% vs 28.6%, 58.3% vs 18.6%, 均 $P < 0.05$)。CD133和Ki-67均

■背景资料

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一。目前仅仅依靠某些传统的病理指标来评估患者的预后和选择治疗方法, 并不能充分满足临床的需要。近年来, 随着对新的生物标志物的深入研究, 使得部分生物标志物在肿瘤的诊断、治疗及预测复发等方面发挥了重要作用。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研究前沿

目前CD133主要用于各种恶性肿瘤干细胞的研究,并发现其表达与多种癌细胞密切相关。但到目前为止,国内外未见CD133表达与胃癌干细胞相关性的报道,CD133表达与胃癌预后关系的报道亦少见。

是患者术后生存时间的独立预后因子。

结论: CD133和Ki-67在胃癌的发生、发展、转移及预后中发挥重要作用,可考虑作为胃癌临床评价肿瘤生物学行为及评估预后的指标。

关键词: 胃肿瘤; 免疫组化; 癌干细胞; CD133; Ki-67

李亚卓, 王凤华, 赵坡. CD133、Ki-67在胃癌的表达及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3167-3171
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3167.asp>

0 引言

CD133是一种分子质量为120 kDa的跨膜蛋白,最初被认为是造血干细胞标志物,后发现正常非淋巴造血组织中也检测到CD133 mRNA转录本^[1]。目前CD133主要用于各种恶性肿瘤干细胞的研究,但在胃癌中尤其是对预后的影响方面,少见报道。Ki-67是一种公认的与细胞增殖特异性相关的核抗原,主要用于判断细胞增殖活性。本研究应用免疫组化技术测定胃癌中CD133和Ki-67的表达情况,并探讨他们与临床病理特征及患者预后的可能关系。

1 材料和方法

1.1 材料 构建组织芯片的336例标本均来自中国人民解放军总医院1998-2001年间实施手术切除并有完整随访资料的胃癌病例(已剔除失访病例),男274例,女62例。患者均为首次发现胃癌,术前未经过放疗或免疫治疗;影像学检查均未发现有远隔器官转移。按照2003年国际抗癌联盟修订的胃癌临床病理TNM分期,Ⅰ期66例,Ⅱ期77例,Ⅲ期147例,Ⅳ期46例;组织学分级,Ⅰ级17例,Ⅱ级65例,Ⅲ级254例;组织学类型,管状腺癌(中高分化腺癌)75例,黏液腺癌32例,低分化腺癌183例,印戒细胞癌35例,其他类型11例。截至到2008-03,患者平均随访时间为45.4 mo,所有患者中死亡251例,存活85例,最长生存时间为120 mo。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的构建: 在336例胃癌和60例癌旁正常组织的石蜡标本上采集组织芯,直径1.0 mm,孔间距1.2 mm,排列成9行×8列共72点微阵列,每2点代表1例患者组织,共制成组织芯片11块。

1.2.2 免疫组化染色: 应用免疫组化PV6000二步法进行检测,所采用试剂兔抗人CD133多克隆抗体(北京博奥森)、鼠抗人Ki-67 mAb(美国

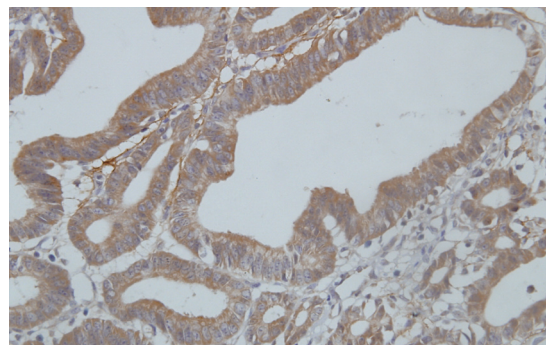


图1 胞膜CD133阳性(IHC × 400)。

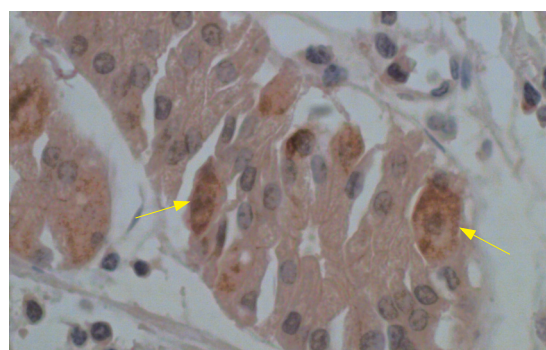


图2 CD133点染箭头所示(IHC × 400)。

Zymed)、枸橼酸抗原修复液(pH6.0)、DAB显色液及PBS等均购自北京中杉公司。每个组织芯片蜡块取4 μm厚连续切片,经脱蜡、高压锅热修复、过氧化氢(H₂O₂)封闭后滴加一抗,CD133(1:500),Ki-67(1:100),4℃过夜,滴加二抗试剂(Polyperoxidase-anti-mouse/rabbit IgG),37℃孵育30 min,最后DAB显色、苏木素复染、封片。CD133、Ki-67分别为细胞膜和细胞核表达,阳性细胞≥10%定为阳性。

统计学处理 SPSS13.0软件对数据处理。CD133和Ki-67在胃癌表达的相关性采用Spearman等级资料相关分析;二者在肿瘤和正常组织中表达的差异以及与临床病理类型中的差异采用χ²检验;对生存率影响的单因素分析采用Log-rank检验;多因素分析采用Cox比例风险模型。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD133和Ki-67的表达及其与临床病理特征的关系 336例胃癌中CD133阳性193例(图1-2),阳性率为57.4%。Ki-67阳性196例(图3),阳性率为58.3%。随肿瘤增大、分化降低、浸润加深、淋巴结转移数目增多、TNM分期递增,出现腹腔及远处转移CD133和Ki-67的表

表 1 CD133和Ki-67的阳性表达与临床病理特征的关系

临床病理因素	CD133		统计值	Ki-67		统计值
	+	-		+	-	
年龄情况						
<i>n</i> ≤40	16	18	$\chi^2 = 1.67$	20	14	$\chi^2 = 2.47$
40< <i>n</i> ≤65	116	82	<i>P</i> >0.05	109	89	<i>P</i> >0.05
<i>n</i> >65	61	43		67	37	
肿瘤大小						
<i>d</i> <4 cm	30	47	$\chi^2 = 22.15$	32	45	$\chi^2 = 15.16$
4 cm≤ <i>d</i> <8 cm	117	84	<i>P</i> <0.05	121	80	<i>P</i> <0.05
<i>d</i> ≥8 cm	46	12		43	15	
组织学分级						
I 级	7	10	$\chi^2 = 6.87$	6	11	$\chi^2 = 9.95$
II 级	30	35	<i>P</i> <0.05	30	35	<i>P</i> <0.05
III 级	156	98		160	94	
浸润深度						
达黏膜下层	4	19	$\chi^2 = 33.82$	6	17	$\chi^2 = 21.95$
达浆膜下层	47	56	<i>P</i> <0.05	52	51	<i>P</i> <0.05
出浆膜层	122	65		118	69	
邻近器官	20	3		20	3	
淋巴结受累						
LN = 0	43	68	$\chi^2 = 28.16$	44	67	$\chi^2 = 33.51$
LN = 1-6	78	50	<i>P</i> <0.05	77	51	<i>P</i> <0.05
LN = 7-15	52	20		52	20	
LN>15	20	5		23	2	
TNM分期						
I 期	19	47	$\chi^2 = 41.26$	20	46	$\chi^2 = 41.07$
II 期	38	39	<i>P</i> <0.05	40	37	<i>P</i> <0.05
III 期	98	49		96	51	
IV 期	38	8		40	6	
腹腔及远处转移						
无转移	180	140	$\chi^2 = 3.90$	182	138	$\chi^2 = 5.88$
有转移	13	3	<i>P</i> <0.05	14	2	<i>P</i> <0.05
5年生存率						
生存	44	82	$\chi^2 = 41.82$	46	80	$\chi^2 = 39.51$
死亡	149	61	<i>P</i> <0.05	150	60	<i>P</i> <0.05

■**相关报道**
CD133在肿瘤组织水平上的研究少见, 国外文献报道多从细胞水平进行研究, 并认为他是多种肿瘤干细胞的特异性标志物. CD133在胃癌发生、发展过程中表达的趋势及机制目前仍不清; 大量文献报道Ki-67增殖指数高低与肿瘤的分化程度、浸润转移以及预后密切相关, 在肿瘤中Ki-67与CD133表达的相关性未见报道.

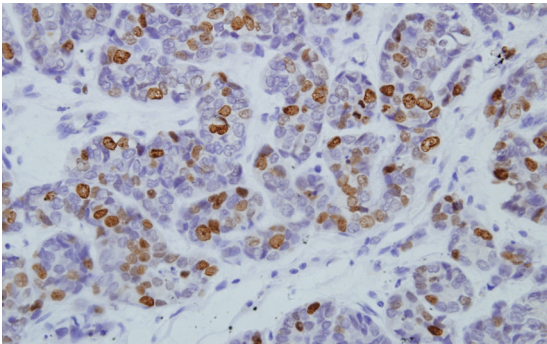


图 3 胞核Ki-67阳性(IHC×400).

达逐渐增高(*P*<0.05, 表1).

2.2 CD133和Ki-67的表达与患者预后的关系

表 2 CD133和Ki-67的表达与预后的关系

标志物	<i>n</i>	平均术后生存时间(mo)	χ^2 值	<i>P</i> 值
CD133				
+	193	36.3±2.5	54.88	<i>P</i> <0.05
-	143	66.0±3.1		
Ki-67				
+	196	36.7±2.4	58.54	<i>P</i> <0.05
-	140	66.4±3.2		

CD133和Ki-67阳性表达组患者的术后生存时间短于阴性表达组(*P*<0.05, 图4). CD133和Ki-67阳性表达组患者的平均术后生存时间分别为36.3

■应用要点

本研究发现, CD133和Ki-67的表达均与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目、TNM分期和出现腹腔及远处转移相关; CD133和Ki-67在胃癌的表达呈正相关; CD133和Ki-67均是患者术后生存时间的独立预后因子。两者联合使用进行免疫组织化学检测, 可考虑作为胃癌临床评价肿瘤生物学行为及判断预后的有用指标之一。

表 3 术后生存时间多因素分析结果

变量	回归系数	标准误	χ^2	自由度	P值	危险比
年龄	0.475	0.109	18.843	1	0.000	1.608
组织学分级	0.043	0.166	0.067	1	0.796	1.044
组织学类型	0.227	0.078	8.434	1	0.004	1.255
浸润深度	0.206	0.168	1.496	1	0.221	1.229
淋巴结受累	0.240	0.139	2.965	1	0.085	1.271
远处及腹腔转移	0.957	0.314	9.303	1	0.002	2.604
TNM分期	-0.130	0.189	0.474	1	0.491	0.878
肿瘤大小	0.557	0.123	20.433	1	0.000	1.746
CD133	0.589	0.146	16.384	1	0.000	1.802
Ki-67	0.690	0.149	21.427	1	0.000	1.993

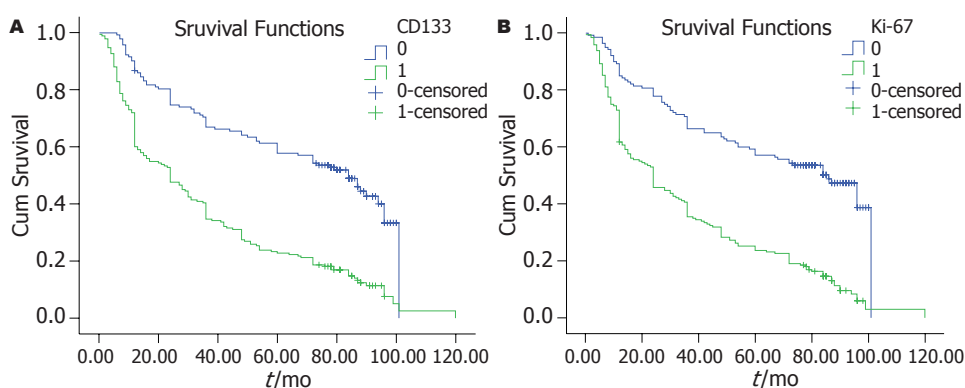


图 4 CD133及Ki-67阳性组和阴性组术后生存曲线. A: CD133; B: Ki-67; 绿色: 阳性组; 蓝色: 阴性组.

mo和36.7 mo, 阴性表达组患者的平均术后生存时间分别为66.0 mo和66.4 mo(表2).

2.3 CD133和Ki-67在胃癌表达的相互关系 CD133、Ki-67在胃癌的表达呈正相关($r = 0.188$, $P = 0.001$).

2.4 CD133和Ki-67在胃癌组织与癌旁正常组织中表达的差异 CD133在胃癌组织中的阳性表达率为57.4%, 在癌旁正常组织中的阳性表达率为28.6%, 二者差异具有统计学意义($P = 0.0001$). Ki-67在胃癌组织中的阳性表达率为58.3%, 在癌旁正常组织中的阳性表达率为18.6%, 二者差异具有统计学意义($P = 0.0001$).

2.5 CD133和Ki-67与患者生存时间的多因素分析 Cox多因素术后生存分析结果显示, CD133、Ki-67、患者年龄、肿瘤大小、组织学类型、腹腔及远处转移是胃癌术后生存时间的独立预后因子, 其中CD133、Ki-67的回归系数为正, 表明他们与患者的术后生存时间呈正相关, 其表达为阳性者, 术后生存时间短(表3).

3 讨论

肿瘤干细胞(tumor stem cell, TSC), 又称癌干细

胞, 是指癌组织中一些较少的具有无限自我更新潜能并促使肿瘤形成的细胞, 而CD133是目前用于各种肿瘤干细胞研究的热点标志物之一. CD133较早应用于脑瘤干细胞的研究, 每只小鼠接种100个CD133阳性脑肿瘤干, 结果在接种后6 mo内形成肿瘤; 而每只接种10万个CD133阴性非肿瘤干细胞的小鼠在相同时间内未形成肿瘤^[2]. 此外, O'Brien *et al*^[3]用流式细胞仪纯化结肠癌组织中的CD133阳性细胞, 并把他移植到小鼠肾被膜下使其形成肿瘤, 结果提示CD133可能为结肠癌干细胞的标志物. 但到目前为止, 国内外未见从人类胃癌组织中分离出胃癌干细胞的报道, 有关CD133与胃癌临床病理特征及预后关系的报道也不多.

本研究显示, 胃癌组织中的CD133阳性细胞越多、分化越差、浸润越深、分期越晚, 淋巴结转移数目越多, 术后生存时间也就越短, 提示肿瘤组织中CD133阳性细胞越多, 含有的癌干样细胞就越多. 术后一些残留的癌干样细胞通过自我更新和多向分化, 导致肿瘤复发和转移. 由此推测CD133可能是胃癌癌干样细胞的特异性

分子标志物. CD133作为一种人类干细胞或祖细胞膜抗原, 可在肿瘤血管内皮祖细胞及间质干细胞中表达, 而成熟血管内皮细胞和间质细胞则不表达CD133^[4-5]. 但本研究中观察到少数胃癌间质纤维结缔组织、血管内皮及紧邻癌组织的正常腺上皮细胞也有CD133的点彩状表达, 其确切机制及作用不明. 研究发现, 血管内皮祖细胞的活化可参与肿瘤血管生成^[6]; 间质干细胞可调控肿瘤微环境^[7], 故推测CD133标识胃癌组织中成熟血管内皮细胞和间质细胞及周围少量正常上皮细胞, 有可能导致这些细胞迅速增殖转化为癌细胞, 但此推断需进一步加以验证.

Ki-67与胃癌关系的研究报道较多, 但结论并不完全一致, Czyzewska *et al*^[8]研究证实Ki-67表达与肿瘤的分化程度、Lauren分型、淋巴结转移等明显相关, 与年龄、肿瘤部位无关; Oshima *et al*^[9]的研究表明Ki-67表达与年龄、性别、分期和预后等均无明显相关; 国内施俊 *et al*^[10]的研究认为Ki-67表达与预后因素无相关性. 本研究中, Ki-67的表达与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移、TNM分期和预后有关, 与Czyzewska *et al*^[8]研究一致. 一般认为细胞持续增殖时, 容易形成肿瘤^[11]. 本研究中发现Ki-67在胃癌组织中的阳性率显著高于癌旁组织, 提示胃癌组织中细胞增殖比正常组织中旺盛, 与张阳等的研究一致^[12]. 由此提示: Ki-67可反映肿瘤细胞的增殖情况, 而胃癌中CD133表达越高, 可能预示着增殖活跃的癌干样细胞越多, 在胃癌术后标本中联合检测Ki-67和CD133的表达, 一定程度上可反映胃癌细胞的生物学行为, 指导化疗方案的选择.

总之, CD133及Ki-67在胃癌的发生、发展及转移中发挥着重要作用, 两者联合使用进行

免疫组织化学检测, 可考虑作为胃癌临床评价肿瘤生物学行为及判断预后的有用指标之一.

4 参考文献

- 1 Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; 90: 5013-5021
- 2 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401
- 3 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110
- 4 Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Günsilius E, Hilbe G, Wöll E, Kähler CM. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57: 965-969
- 5 Yu Y, Fuhr J, Boye E, Gyorffy S, Soker S, Atala A, Mulliken JB, Bischoff J. Mesenchymal stem cells and adipogenesis in hemangioma involution. *Stem Cells* 2006; 24: 1605-1612
- 6 Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 294-300
- 7 Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 267-274
- 8 Czyzewska J, Guzińska-Ustymowicz K, Lebelt A, Zalewski B, Kemona A. Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. *Rocz Akad Med Białymst* 2004; 49 Suppl 1: 64-66
- 9 Oshima CT, Iriya K, Forones NM. Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasia* 2005; 52: 420-424
- 10 施俊, 魏品康, 许玲, 何金, 孙大志. 胃癌证型与肿瘤增殖的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 863-868
- 11 申漫里, 冯永东, 高纯, 陶德定, 龚建平. 细胞周期蛋白B1在肿瘤细胞中的非时相性表达. *中华肿瘤杂志* 2002; 24: 215
- 12 张阳, 张联, 潘凯枫, 游伟程, 李吉友. 山东省胃癌高发区人群胃黏膜肠化的预后与标记物. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2306-2310

■同行评价

本文采用组织芯片方法检测了CD133\Ki-67在336例胃癌中表达的临床意义, 病例数较多, 有长期随访的资料, 有一定的科学性和实用性, 具有较好的参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才