

# Ki-67和VEGF在食管腺癌中的表达及意义

卢明芳, 王 蓉

卢明芳, 中国人民解放军南京军区福州总医院干部病房二科 福建省福州市 350025

王蓉, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化内科 福建省福州市 350025

卢明芳, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事老年消化疾病的基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题由卢明芳与王蓉共同设计, 完成并撰写。

通讯作者: 卢明芳, 350025, 福建省福州市西环北路156号, 南京军区福州总医院干部病房二科。lumingfangdoc@163.com  
电话: 0591-22859354

收稿日期: 2008-10-05 修回日期: 2008-10-25

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

## Roles of Ki-67 and vascular endothelial growth factor in development of esophageal adenocarcinoma

Ming-Fang Lu, Rong Wang

Ming-Fang Lu, Department of Gerontology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Rong Wang, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Ming-Fang Lu, Department of Gerontology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 Xihuan North Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. lumingfangdoc@163.com  
Received: 2008-10-05 Revised: 2008-10-25

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of Ki-67 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in esophageal adenocarcinoma (EA), and to reveal their roles in EA occurrence and development as well as their influences on EA prognosis.

**METHODS:** The expression levels of Ki-67 and VEGF protein were investigated in normal esophageal squamous epithelium ( $n = 50$ ) and EA specimens ( $n = 50$ ) using immunohistochemical staining respectively. The differences between groups was compared and correlation analysis was performed.

**RESULTS:** Ki-67 was hardly expressed in normal esophageal squamous epithelium, but was strongly expressed in the cell nucleus of EA

specimens. There was a significant difference in Ki-67 staining ( $\chi^2 = 85.463$ ,  $P < 0.01$ ) between them. Moreover, there were significant correlations between the expression of Ki-67 and cell differentiation or pathologic stages of EA ( $\chi^2 = 13.11$ ,  $17.78$ , both  $P < 0.01$ ). Similarly, there was a significant difference in VEGF staining between normal esophageal squamous epithelium and EA specimens ( $\chi^2 = 80.60$ ,  $P < 0.01$ ), and VEGF expression was correlated with tumor differentiation degree, invasion depth and pathologic stages ( $\chi^2 = 16.378$ ,  $15.50$ ,  $15.882$ ; all  $P < 0.05$ ); VEGF was strongly expressed in the cytoplasm of EA specimens. Ki-67 and VEGF expression were up-regulated synergically in EA ( $\chi^2 = 74.678$ ,  $P = 0.00$ ).

**CONCLUSION:** Up-regulation of Ki-67 and VEGF may play an important role in the development of in EA progression.

**Key Words:** Esophageal adenocarcinoma; Ki-67; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry

Lu MF, Wang R. Roles of Ki-67 and vascular endothelial growth factor in development of esophageal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3621-3625

## 摘要

**目的:** 通过对人食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EA)标本进行Ki-67和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的检测, 揭示上述两者在EA发生发展中的作用及对预后的影响。

**方法:** 经病理确诊的EA患者50例, 取其术后切除标本作为EA组, 另取正常食管鳞状上皮50例作为正常对照组。采用免疫组化染色法检测EA标本中Ki-67蛋白和VEGF蛋白的表达情况, 并进行组间比较和相关性分析。

**结果:** Ki-67蛋白在正常鳞状上皮中几乎不表达, 而在EA中呈中强阳性表达, 广泛表达于腺癌细胞胞核, 与正常食管鳞状上皮比较, 差异均有显著性( $\chi^2 = 85.463$ ,  $P < 0.01$ ), 且癌细胞分

## ■背景资料

食管腺癌是近期发病率上升最快的恶性肿瘤之一, 东西方国家皆然。其恶性程度高、病变进展快。因而, 临床需要有更多更好的检测手段来评价预后、指导治疗。

## ■同行评议者

王健生, 副教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

## ■相关报道

近年关于Ki-67及VEGF的研究很多,广泛涉及机体各不同系统,例如在肺、皮肤、胃与食管、前列腺、肾脏及卵巢等诸多疾病领域的应用。上述文章分别探讨了这两个指标在肿瘤组织中的表达及其与生物学表现的关系,为肿瘤的临床分期、预后判断及综合治疗提供了实验依据。

化程度和肿瘤病理学分期与Ki-67蛋白表达相关( $\chi^2 = 13.11$ ,  $\chi^2 = 17.78$ , 均 $P < 0.01$ ); VEGF蛋白在正常鳞状上皮中不表达,在EA细胞胞质中呈强表达,与正常食管比较,差异均有显著性( $\chi^2 = 80.60$ ,  $P < 0.01$ )。且癌细胞分化程度、肿瘤的浸润程度及肿瘤病理学分期与VEGF蛋白表达相关( $\chi^2 = 16.378$ ,  $\chi^2 = 15.50$ ,  $\chi^2 = 15.882$ , 均 $P < 0.05$ )。Ki-67和VEGF在EA中表达升高,呈正协同关系( $\chi^2 = 74.678$ ,  $P = 0.00$ )。

**结论:** Ki-67和VEGF在EA中表达均升高,说明两者的表达上调在EA的增殖及转移中起了重要作用,对肿瘤的预后起较好的高效能预测作用。

**关键词:** 食管腺癌; Ki-67; 血管内皮生长因子; 免疫组化

卢明芳, 王蓉. Ki-67和VEGF在食管腺癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3621-3625

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3621.asp>

## 0 引言

流行病学和临床研究结果表明,食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EA)是近期发病率上升最快的恶性肿瘤之一,自20世纪70年代以来,EA的发病率在西方国家上升了350%以上<sup>[1-2]</sup>。在我国,EA的发病率也呈上升趋势。大体上,恶性肿瘤的形成及发展可以分两个阶段,即肿瘤细胞的克隆性增殖阶段和肿瘤的血管形成阶段<sup>[3]</sup>。细胞核增殖抗原Ki-67是一种与细胞增殖密切相关的核内蛋白,因其只表达于增殖细胞各期中,静止期细胞阴性,而被作为评价细胞生长分数的自效指标,广泛应用于临床及基础研究<sup>[4-8]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异的血管生成因子,与人类多种肿瘤生长和转移有关<sup>[3]</sup>。本文采用免疫组织化学法检测了50例EA组织中Ki-67、VEGF蛋白的表达,并分析了两者的相互关系,以探讨两者在EA发生发展及浸润、转移中的意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 共收集2005-07/2007-07在中国人民解放军南京军区福州总医院诊治的EA患者50例为EA组,其中男42例,女8例,男女比例为5.25:1,年龄35-85(平均60.93±12.31)岁。所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。均经病理组织学证实为EA,其中EA平均病变长度为5 cm,中位发病年龄为61.5岁。发现时多为II期、III期患

者,无I期患者,其中II期16例,占32%,III期28例,占56%,IV期6例,占12%;淋巴结转移多见,占72%,其中高分化8例,占16%,中分化8例,占16%,低分化例34例,占68%。未发现仅侵及黏膜层及黏膜下层的病例,侵及肌层、浆膜下者10例,占20%;穿透浆膜层者34例,占68%;远处转移者6例,占12%。另取食管正常的非肿瘤患者距胃食管连接处约5 cm处的食管黏膜50例作为对照组,其中男42例,女8例,男女比例为5.25:1,年龄33-86(平均61.21±10.28)岁。

**EA诊断标准:** 根据Siewert<sup>[9]</sup>分类方法,如果肿瘤中心或超过66%的肿瘤组织位于解剖学上的食管胃连接处之上超过1 cm,为I型,食管腺癌;如果肿瘤中心或肿块位于解剖学上的胃食管连接部口侧1 cm内至远端2 cm内,为II型胃食管连接部腺癌;如果肿瘤中心或超过66%的肿瘤组织位于解剖学上的胃食管连接部远端2 cm以外,则为III型胃食管连接部腺癌。2000年这种分类有些细微改变,肿瘤中心位于解剖上贲门近端至远端5 cm内被定为胃食管连接部腺癌。这包括I型腺癌,可能从上浸润胃食管连接部;II型,起源于胃食管连接部;III型腺癌或贲门下癌,从下向上浸润胃食管连接部。本文仍以I型腺癌作为取材标准。肿瘤病理分期参照食管癌TNM分期第6版(2002版)。

### 1.2 方法

**1.2.1 HE染色及免疫组化检测:** 常规固定、包埋、切片、HE染色。应用免疫组化二步法(Elivision<sup>TM</sup> plus)参照说明书对各组标本进行染色。均滴加即用型一抗(鼠抗人Ki-67单抗,鼠抗人VEGF单抗,均为美国Santa Cruze公司生产),室温孵育3 h, DAB显色。阳性对照以公司提供的阳性片作对照,阴性对照以PBS代替一抗。

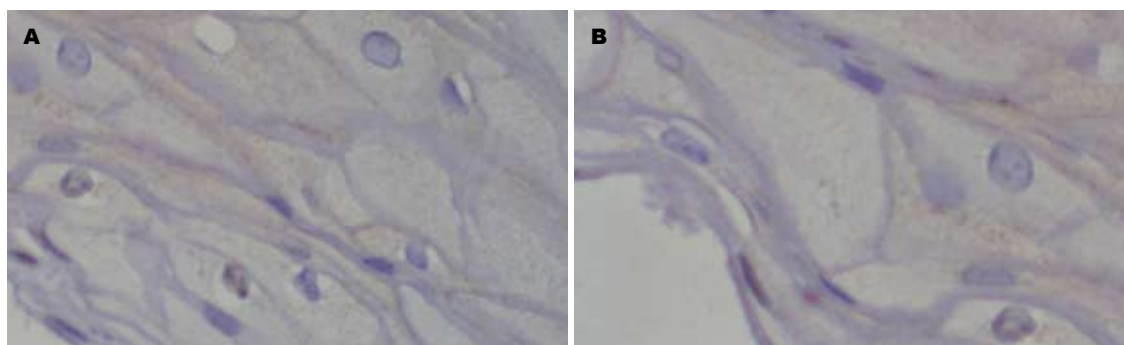
**1.2.2 病理结果的判定标准:** Ki-67表达于胞核,VEGF表达于胞质,呈现棕黄色颗粒为阳性,每个高倍视野下观察并计算阳性的腺上皮细胞/总的腺上皮细胞的百分率,每例随机观察20个高倍视野,求出平均值。参照Kawasaki *et al*<sup>[10]</sup>半定量积分法判断结果。

**统计学处理** 应用SPSS13.0软件进行等级资料的秩和检验及相关分析。

## 2 结果

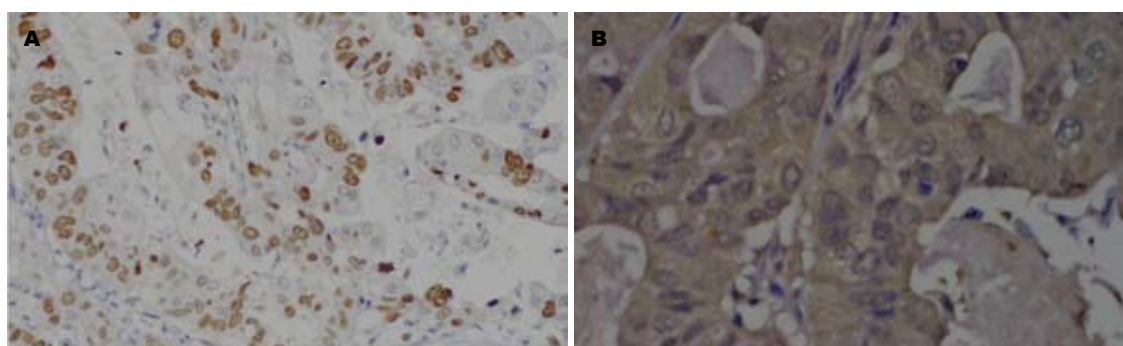
### 2.1 Ki-67的蛋白表达检测结果

**2.1.1 Ki-67的蛋白表达:** Ki-67表达的细胞定位为细胞核,棕黄色颗粒为阳性染色。Ki-67在正常鳞

图1 食管鳞状上皮免疫组化染色( $\times 400$ ). A: Ki-67; B: VEGF.

## ■应用要点

本文着重研究这两个指标在食管腺癌中的表达, 结果显示, 二者在食管腺癌的生长及转移过程中起了重要作用, 联合检测可用于评价食管腺癌的预后、指导治疗.

图2 EA的免疫组化染色. A: Ki-67( $\times 200$ ); B: VEGF( $\times 400$ ).表1 食管正常鳞状上皮、EA上皮中Ki-67和VEGF表达的比较 ( $n = 50$ )

蛋白	分组	-	+	++	+++	平均等级
Ki-67	对照组 <sup>b</sup>	48	2	0	0	26.78
	EA组	2	12	12	24	74.22
VEGF	对照组 <sup>b</sup>	46	3	1	0	27.02
	EA组	2	6	14	28	73.98

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs EA组.

状上皮组染色为阴性(图1A), 而在EA细胞均呈弥漫强阳性表达(图2A). 两组之间比较, 差异均有统计学意义( $\chi^2 = 85.463$ ,  $P < 0.01$ , 表1).

**2.1.2 Ki-67的蛋白表达与临床病理因素的关系:** 从表2可见, 不同分化程度EA Ki-67蛋白的表达不同( $\chi^2 = 13.11$ ,  $P = 0.001$ ), 且随着分化程度降低, Ki-67的表达升高; 不同的病理学分期, EA Ki-67蛋白的表达不同( $\chi^2 = 17.78$ ,  $P = 0.007$ ); 而是否有淋巴结转移、不同的浸润程度及是否有远处转移与Ki-67蛋白表达的强弱无关(表2).

**2.1.3 VEGF的蛋白表达检测结果:** VEGF表达的细胞定位于胞质, 棕黄色颗粒为阳性染色. VEGF在正常鳞状上皮组染色为阴性(图1B), 而在EA细胞均呈弥漫强阳性表达(图2B). 两组之间比较, 差异均有统计学意义( $\chi^2 = 80.60$ ,  $P =$

0.000, 表1).

**2.1.4 VEGF的蛋白表达与临床病理因素的关系:** 从表2可见不同分化程度EA VEGF蛋白的表达不同( $\chi^2 = 16.378$ ,  $P = 0.012$ ), 且随着分化程度降低, VEGF的表达升高; 不同的浸润程度, EA VEGF蛋白的表达不同( $\chi^2 = 15.50$ ,  $P = 0.017$ ); 不同的病理学分期, EA VEGF蛋白的表达不同( $\chi^2 = 15.882$ ,  $P = 0.014$ ), 而是否有淋巴结转移及是否有远处转移与VEGF蛋白表达的强弱无关(表2).

**2.1.5 EA中Ki-67蛋白与VEGF蛋白表达的相关性:** EA中Ki-67蛋白与VEGF蛋白表达呈正相关( $\chi^2 = 74.678$ ,  $P = 0.00$ , 表3).

### 3 讨论

EA尽管临床表现与食管鳞癌类似, 但与食管鳞癌相比, 具有转移早、恶性程度高、可向胸部淋巴结及腹部淋巴结转移等生物学特性. 目前国内对EA的研究报道的较少. Ki-67是目前临床上反映肿瘤增殖水平的最好指标之一<sup>[3,11-14]</sup>. 本研究发现, 在EA中, Ki-67蛋白呈高表达, 与常英、Kerkhot、Jin *et al*的研究一致<sup>[11,15-16]</sup>. 且Ki-67蛋白表达与癌细胞的分化程度及病理学分期相关, 即随着分化程度降低, Ki-67的表达升高; 随病理分期越晚, 则Ki-67蛋白表达越高. 说明Ki-67蛋白在EA的表达与肿瘤的生物学行为

### ■同行评价

本文主要研究Ki-67和VEGF在食管腺瘤的表达情况,设计合理,层次分明,具有一定创新性。

表 2 EA中Ki-67和VEGF表达与临床病理因素的关系

分组		Ki-67					VEGF				
		-	+	++	+++	平均等级	-	+	++	+++	平均等级
分化程度	高分化	2	4	2	0	9.75	1	3	2	2	15.25
	中分化	0	2	2	4	26.50	1	2	3	2	16.50
	低分化	0	6	8	20	28.97	0	1	9	24	30.03
淋巴结转移	有	2	8	10	16	24.78	2	4	10	20	25.28
	无	0	4	2	8	27.36	0	2	4	8	26.07
浸润程度	黏膜及黏膜下	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00
	肌层、浆膜下	0	2	4	4	25.30	1	2	5	2	16.30
	穿透浆膜层	2	8	6	18	26.09	0	3	6	25	30.06
	侵及邻近处	0	2	2	2	22.50	1	1	3	1	15.00
病理分期	I期	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00
	II期	2	8	4	2	14.38	1	3	9	3	16.69
	III期	0	4	6	18	30.36	1	2	3	22	30.79
	IV期	0	0	2	4	32.50	0	1	2	3	24.33
远处转移	有	0	2	2	2	22.50	1	3	10	22	27.11
	无	2	10	10	22	25.91	1	3	4	6	21.36

表 3 EA中Ki-67蛋白表达与VEGF蛋白表达的关系

分组		VEGF				平均等级
		-	+	++	+++	
Ki-67	-	2	0	0	14.83	1.50
	+	0	5	5	23.42	14.83
	++	0	1	6	33.88	23.42
	+++	0	0	3	1.50	33.88

密切相关。

实体肿瘤的生长和代谢需要持续的血管生长,如果肿瘤没有新生的血管供应,在其直径达到1-2 mm时即停止生长。VEGF属于PDGF家族,是血管生成的主要调控因子,与人类多种肿瘤生长和转移有关,不仅可促进内皮细胞移动,有利于血管生成,诱导血管通透性增加,而且有利于肿瘤细胞脱落进入血管,诱导肿瘤血管形成,从而促进肿瘤的生长和繁殖,或向邻近纤维蛋白和结缔组织基质扩散,为肿瘤的浸润转移创造条件<sup>[17-19]</sup>。本研究发现,在EA中,VEGF蛋白呈高表达,并与癌细胞的分化程度、肿瘤的浸润程度及病理学分期相关,即随着分化程度降低、浸润程度加深、病理学分期越晚,VEGF蛋白表达越高。说明VEGF蛋白在EA的表达,促进了肿瘤的浸润生长及转移。VEGF和Ki-67从血管生成和增殖活性两个不同的侧面反映了肿瘤细胞的生长能力。

本组研究结果显示,Ki-67随着VEGF增高而增高,即两者呈正相关性。说明肿瘤血管的生长

越丰富,肿瘤细胞的增殖能力越强,呈现正协同作用。两者在EA的生长及转移过程中起了重要作用。联合检测两者的表达对EA的预后可起较好的预测作用。

### 4 参考文献

- 姚汉清, 王贵齐. Barrett食管和食管腺癌: 东西方的差异. 胃肠病学 2006; 11: 513-515
- Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83: 2049-2053
- 张桂蓉, 梅同华, 马英. VEGF及Ki67与NSCLC生物学行为的相关性研究. 四川医学 2003; 23: 445-447
- 杜洁, 岑琪. pKi67及其临床应用现状. 华西医学 2004; 19: 322-323
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1705
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20
- Lababede O, Meziane MA, Rice TW. TNM staging of lung cancer: a quick reference chart. *Chest* 1999; 115: 233-235
- Soini Y, Kamel D, Paakko P, Lehto VP, Oikarinen A, Vahakangas KV. Aberrant accumulation of p53 associates with Ki67 and mitotic count in benign skin lesions. *Br J Dermatol* 1994; 131: 514-520
- Siewert JR, Stein HJ, Feith M. Adenocarcinoma of the esophago-gastric junction. *Scand J Surg* 2006; 95: 260-269
- Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer.

- Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 11 常英, 刘贵生, 张军, 龚均. 组织芯片研究胃食管黏膜病变中Ki67和C-erbB-2的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1184-1189
- 12 Inoue T, Segawa T, Shiraishi T, Yoshida T, Toda Y, Yamada T, Kinukawa N, Kinoshita H, Kamoto T, Ogawa O. Androgen receptor, Ki67, and p53 expression in radical prostatectomy specimens predict treatment failure in Japanese population. *Urology* 2005; 66: 332-337
- 13 Visapaa H, Seligson D, Huang Y, Rao JY, Beldegrun A, Horvath S, Palotie A. Ki67, gelsolin and PTEN expression in sarcomatoid renal tumors. *Urol Res* 2003; 30: 387-389
- 14 Czyzewska J, Guzinska-Ustymowicz K, Lebelt A, Zalewski B, Kemona A. Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004; 49 Suppl 1: 64-66
- 15 Kerkhof M, Steyerberg EW, Kusters JG, van Dekken H, van Vuuren AJ, Kuipers EJ, Siersema PD. Aneuploidy and high expression of p53 and Ki67 is associated with neoplastic progression in Barrett esophagus. *Cancer Biomark* 2008; 4: 1-10
- 16 Jin Y, Zhang W, Liu B. [Abnormal expression of p53, Ki67 and iNOS in human esophageal carcinoma in situ and pre-malignant lesions] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001; 23: 129-131
- 17 张娜, 高玉彤, 李向红, 潘彦珩. VEGF及PCNA在卵巢上皮性肿瘤中的表达. *诊断病理学杂志* 2004; 11: 340-342
- 18 Vallbohmer D, Peters JH, Kuramochi H, Oh D, Yang D, Shimizu D, DeMeester SR, Hagen JA, Chandrasoma PT, Danenberg KD, Danenberg PV, DeMeester TR. Molecular determinants in targeted therapy for esophageal adenocarcinoma. *Arch Surg* 2006; 141: 476-481; discussion 481-482
- 19 郭敏, Ivan Ding, 王立东. FGF2和VEGF对食管鳞癌、腺癌荷瘤裸鼠肿瘤组织结构血管、灌注血管及缺氧程度的影响分析. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 12: 124-129

编辑 史景红 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志被收录情况

**本刊讯** 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-18)