

CD44 和 VEGF 在胃癌中的表达及其与 Ki67 的相关性研究^①

吴雪铭¹, 黄炳臣¹, 王英杰²

(1. 右江民族医学院附属医院病理科, 广西 百色 533000

E-mail: wuxueming0120@163.com;

2. 右江民族医学院附属医院急诊科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 探讨胃癌组织中 CD44、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达与 Ki67 的相关性。**方法** 应用免疫组化方法检测 122 例胃癌手术切除标本 CD44、VEGF 和 Ki67 的分布及表达。**结果** CD44、VEGF 和 Ki67 在胃癌中的表达率分别为 51.63%(63/122)、35.24%(43/122)和 58.20%(71/122);CD44 在男性患者中的表达(57.47%)高于在女性患者中的表达(37.14%),两者差异有统计学意义($\chi^2=4.13$, $P=0.042$);Ki67 在中、高分化胃癌组中的表达(44.44%)低于低分化胃癌组(66.23%)中的表达,差异有统计学意义($\chi^2=5.54$, $P=0.02$);VEGF 在胃癌中的表达与性别、年龄、肿瘤直径、分化程度、淋巴转移、分期等临床病理参数无明显相关性($P>0.05$)。**结论** CD44、VEGF 和 Ki67 在胃癌组织中存在不同程度表达,且 CD44 和 Ki67 在胃癌组织中表达与性别、组织分化存在一定相关性,提示其在胃癌发生、发展过程中发挥一定作用,可能成为预后判断的生物学指标和治疗的靶点。

关键词: 胃肿瘤;CD44;VEGF;细胞增殖

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)04-0375-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.04.007

Expressions of CD44 and VEGF in gastric carcinoma and their correlation with Ki67

Wu Xueming¹, Huang Bingchen¹, Wang Yingjie²

(1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China E-mail: wuxueming0120@163.com; 2. Department of Emergency, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation of Ki67 and expressions of CD44 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric carcinoma tissues. **Methods** CD44, VEGF and Ki67 protein distribution and expressions were detected in surgical resection specimens for 122 patients with gastric carcinoma by immunohistochemistry. **Results** The positive rates of CD44, VEGF and Ki67 were 51.63% (63/122), 35.24% (43/122), 58.20% (71/122) in gastric carcinoma. The expression of CD44 in male patients with gastric carcinoma (57.47%) was significantly higher than that in female patients with gastric cancer (37.14%), comparison of the two groups showed statistical difference ($\chi^2=4.13$, $P=0.042$). The positive—Ki67 expression rate in the low differentiation group was 66.23%, higher than that in the medium—high differentiation group (44.44%) ($\chi^2=5.54$, $P=0.02$). The positive—VEGF expression in gastric carcinoma had no relation with clinical pathological indexes such as gender, age, tumor diameter, differentiation degree, lymphatic metastasis and TNM stage ($P>0.05$). **Conclusion** Expressions of CD44, VEGF and Ki67 remain in gastric carcinoma tissues at different degree, and the expressions of CD44 and Ki67 in gastric carcinoma tissues have some relation with gender and tissue differentiation, which suggests they may play a role in the genesis and development of gastric carcinoma, and may be used as important prognostic indicators in clinical judgment and therapy targets.

Key words: stomach neoplasms; CD44; VEGF; cell proliferation

① 基金项目: 广西高等学校立项科研项目(201204LX324)

胃癌是我国常见恶性肿瘤之一,其发生发展是与多基因调控异常相关的复杂过程,包括细胞的增殖、肿瘤血管生成及侵袭转移等多因素的调控。尽管胃癌的诊疗技术不断发展,但很多患者确诊时已处于中晚期且常伴有转移,预后差,5 年生存率低。胃癌干细胞是一群具有自我更新能力且可不定向分化的肿瘤细胞^[1-2]。由于肿瘤干细胞的自我更新、不断分化与胃癌复发、侵袭转移和耐药密切相关,是胃癌研究的热点,对胃癌干细胞标志物的研究有利于阐明胃癌的发生发展和寻找新的治疗靶点。而肿瘤血管的生成不仅提供肿瘤生长所需的营养、促进细胞增殖,而且有利于肿瘤细胞通过血管发生转移,是治疗的靶点^[3]。本文应用免疫组化方法检测 122 例胃癌组织中 CD44、血管内皮生长因子(VEGF)和 Ki67 的表达,探讨其表达与临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所用标本选取右江民族医学院附属医院胃肠外科 2014 年 1 月~2015 年 12 月 122 例胃癌患者手术切除病理存档石蜡组织标本,其中男性 87 例,女性 35 例,年龄 29~74 岁,中位年龄 52 岁。中高分化管状腺癌和乳头状腺癌 45 例为中高分化组,低分化腺癌和黏液腺癌 77 例为低分化组,根据 2009 年 AJCC 分期对病例进行 TNM 分期:Ⅰ+Ⅱ期 62 例、Ⅲ+Ⅳ期 60 例。患者术前均未行化疗。

1.2 研究方法 即用型鼠抗人 CD44 单克隆抗体、即用型兔抗人 VEGF 多克隆抗体、即用型鼠抗人 Ki67 单克隆抗体、SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂均购自福州迈新试剂生物技术开发公司。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法即 SP 法进行染色,组织标本均经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 厚切片,依次脱蜡、水化。采用柠檬酸抗原修复液高温高压修复法进行抗原修复。用磷酸缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。一抗室温下 60 min 或 4℃ 过夜, DAB 显色。

1.3 结果判定 CD44 表达定位于细胞膜,VEGF 表达定位于细胞质,Ki67 表达定位于细胞核,均呈淡黄、棕黄、棕褐色。根据染色强度以多数细胞呈现的着色评分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。400 倍下随机对每张切片取 10 个视野,每个视野计数 100 个细胞,计算阳性细胞占同类细胞的百分数:0~5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分,两项得分之和<3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。组间的比较用 χ^2 检验,两者之间相关性分析应用 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统

计学意义。

2 结果

2.1 CD44、VEGF、Ki67 在胃癌组织中的表达 胃癌组织中 CD44 表达于细胞膜,呈棕黄色或棕褐色,阳性率为 51.63%(63/122);VEGF 表达于细胞质,呈棕黄色或棕褐色,阳性率为 35.24%(43/122);Ki67 表达于细胞核,呈棕黄色或棕褐色,阳性率为 58.20%(71/122)。

2.2 CD44、VEGF、Ki67 表达与胃癌临床病理特征的关系 CD44 在男性组的表达率与女性组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);Ki67 在低分化组中的表达率与在中、高分化组中的表达率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.54$, $P = 0.02$)。VEGF 在各临床病理参数分组间的表达率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.3 CD44、VEGF、Ki67 在胃癌中表达的相关性 CD44 与 VEGF 均为阳性 25 例,均为阴性 41 例,CD44 阳性而 VEGF 阴性 20 例,VEGF 阳性而 CD44 阴性 36 例,两者表达无相关性($r = 0.096$, $P = 0.293$);CD44 与 Ki67 均为阳性表达 41 例,均为阴性表达 29 例,CD44 阳性而 Ki67 阴性 22 例,Ki67 阳性而 CD44 阴性 30 例,两者表达无相关性($r = 0.117$, $P = 0.199$);VEGF 与 Ki67 均为阳性表达 22 例,两者均为阴性表达 30 例,VEGF 阳性而 Ki67 阴性 21 例,Ki67 阳性而 VEGF 阴性 49 例,两者表达无明显相关性($r = -0.105$, $P = 0.249$)。

3 讨论

胃癌干细胞标志物 CD44 是一类重要的黏附分子,许多正常细胞表面 CD44 处于相对静止状态,许多肿瘤细胞表面 CD44 处于活化状态而表达,能与其主要配体透明质酸(hyaluronic acid, HA)结合,介导细胞与细胞、细胞与细胞基质间的相互作用,参与肿瘤细胞生长、分化、迁移等过程^[4-5]。研究发现,CD44 通过 Jagged1 相连,激活 Notch 和 Wnt 信号通路,促进肿瘤细胞增殖和 VEGF 分泌^[6-7]。而 VEGF 是目前公认的具有促血管生成作用最强的因子,在肿瘤的生长过程中 VEGF 起着至关重要的作用,促进肿瘤生长的机制除促进血管形成以外,对某些体外培养的肿瘤细胞也有直接的促增殖作用,并能增加肿瘤对化学药物的抗药性^[8-10]。近年来的研究发现,CD44、VEGF 在胰腺癌、胃癌、大肠癌中的高表达与肿瘤的分化、淋巴转移及临床分期有关,可能成为这些肿瘤的独立预后指标和治疗的靶点^[11-14]。细胞增殖是细胞生物学过程中最重要的基础,肿瘤恶性程度由肿瘤细胞增殖活性决定。Ki67 是一种与细胞增殖周期有关、参与 DNA 合成的蛋白质,是目前应用最广泛的细胞增殖标志之

表 1 CD44、VEGF、Ki67 在胃癌组织中的表达与临床病理参数的关系

临床病理特征	n	CD44		χ^2	P	VEGF		χ^2	P	Ki67		χ^2	P
		阳性	阴性			阳性	阴性			阳性	阴性		
性别				0.413	0.042			0.02	0.89			0.15	0.7
男	87	50	37			31	56			52	35		
女	35	13	22			12	23			19	16		
年龄(岁)				0.04	0.95			1.17	0.28			0.01	0.97
<50	50	26	24			13	37			29	21		
≥50	72	37	35			30	42			42	30		
肿瘤直径(cm)				0.6	0.44			1.94	0.17			0.33	0.57
<3	22	13	9			5	17			14	8		
≥3	100	50	50			38	62			57	43		
分化程度				2.65	0.104			0.2	0.65			5.54	0.02
中高分化组	45	25	20			17	28			20	25		
低分化组	77	38	39			26	51			51	26		
T 分期				0.14	0.71			1.16	0.28			0.58	0.44
T ₁ + T ₂	62	31	31			19	43			34	28		
T ₃ + T ₄	60	32	28			24	36			37	23		
淋巴结转移				0.12	0.73			0.86	0.35			0.58	0.44
有	64	34	30			25	39			40	24		
无	58	29	29			18	40			31	27		
TNM 分期				0.13	0.74			2.13	0.14			1.02	0.311
I + II 期	62	33	29			18	44			35	27		
III + IV 期	60	30	30			25	35			36	24		

一。Ki67 抗原在多种恶性肿瘤如胃癌、大肠癌等的表达显著高于其相应正常组织。Ki67 的检测已被广泛用于反映肿瘤细胞增殖速度和预测肿瘤预后,Ki67 指数高往往反映肿瘤的侵袭性更强、无瘤生存率低、复发率高^[15-16]。研究胃癌组织中干细胞的活化与表达及其对胃癌细胞增殖、侵袭、转移的影响,对胃癌的诊疗和预后判断,寻找治疗相关的药物靶点至关重要。

我们的研究结果显示,CD44 在男性组胃癌患者的表达高于女性组患者的表达,两者差异有统计学意义,提示 CD44 在胃癌中的表达可能与性别有关,而与临床分期、分化程度、肿瘤直径及淋巴转移无关,这与张杰等^[17]研究结果不一致,其机制有待深入研究。Ki67 在低分化组中的表达率高于其在中、高分化组中的表达,两者差异有统计学意义,提示肿瘤的增殖与分化程度有密切相关。VEGF 在胃癌中的表达与性别、年龄、肿瘤直径、分化程度、淋巴转移、临床分期等临床病理参数均未发现显著相关。这与相关文献报道结果不一致,其原因可能为我们的研究应用免疫组化方法,国内外对表达的阳性结果尚无统一标准、抗体的特异性、组织标本的处理等都可能造成结果的不一致,且胃癌的发生发展与种族遗传、区域地理分布特征等因素密切相关,其在胃癌中的表达和分子机制有待更多研究。

综上所述,本实验结果证实 CD44、VEGF 和 Ki67

在胃癌组织中存在不同程度表达,而 CD44 和 Ki67 的表达与性别、组织分化存在一定相关性,提示其在胃癌发生、发展过程中发挥一定作用,可能成为预后判断的生物学指标和治疗的靶点。进一步分析三者之间的相关性,结果未发现 CD44、VEGF 和 Ki67 三者之间存在相关性($P>0.05$),其机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Clarke MF,Dick JE,Dirks PB,et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2006,66(19):9339—9344.

[2] Takaishi S,Okumura T,Tu S,et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 [J]. Stem Cells,2009,27(5):1006—1020.

[3] 朱建峰,胥荣,李霞,等. EGFR 和 VEGF 在乳腺癌中的表达及意义分析[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(4): 588,591.

[4] Afifi A,Purnell P,Nguyen L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast carcinoma cell adhesion, migration, and invasion[J]. Exp Mol Pathol,2009,86(2):95—100.

[5] Platt VM,Szoka FC Jr. Anticancer therapeutics:targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan orCD44, ahaluronan receptor[J]. Mol Pharm, 2008,5(4): 474 — 486.

[6] Rodilla V, Villanueva A, Obrador—Hevia A, et al. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences(IF 9.737), 2009, 106 (15): 6315—6320.

[7] 赵娜,周梅恺,叶玉伟,等. 胃癌组织中 Notch1,Jagged1 及 NF- κ B 的表达及临床意义[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(8):1061—1065.

[8] TIAN X, SONG S, WU J, et al. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001,286(3):505—512.

[9] ZHANG H, WU J, MENG L, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(6):994—998.

[10] ZHANG XS, ZHU XF, GAO JS, et al. Multiple drug resistance phenotype of human endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor 165 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(8):731—735.

[11] 李小平,张晓伟,郭伟剑,等. CD44 在胰腺癌中的表达及其临床意义[J]. 上海交通大学学报:医学版,2015,35(9):1354—1359.

[12] 杨家佳,张琳,郑茂金,等. 胃癌中 VEGF、NRP1 和干细胞标志物 CD44 的表达及相关性[J]. 临床与实验病理学杂志,2015,31(2):124—127,131.

[13] 吕林,刘海光,张筱骅. 过表达 CD44v6 基因对人大肠癌 SW480 细胞侵袭迁移能力的影响[J]. 世界华人消化杂志,2016,24(8):1175—1183.

[14] 王绍奎,杨麟珂,张爱云,等. 胃腺癌组织 Annexin II 和 VEGF 蛋白表达的临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015,22(15):1189—1192.

[15] Potemski P, Pluciennik E, Bednarek AK, et al. Ki-67 expression in operable breast cancer: a comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay [J]. Pathol Res Pract,2006,202(7):491—495.

[16] Singhal A, Jayaraman M, Dhanasekaran DN, et al. Molecular and serum markers in hepatocellular carcinoma: predictive tools for prognosis and recurrence[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 82(2):116—140.

[17] 张杰,贺宇,谢朝辉. 整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 、CD44V3 表达与胃癌临床病理特征的关系[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(4):538—539.

收稿日期:2016—06—28;修回日期:2016—08—02

(上接第 372 页)

疼痛方面有其独特之处^[7]。近年来人们越来越重视中药抗炎镇痛的研究,如杨静伟等^[8]研究表明常用清热解毒类中药金莲花具有良好的抗炎镇痛作用,秦莉花等^[9]研究表明冠盖藤有明显的抗炎镇痛的功效,温先敏等^[10]研究表明地胆草有极好的抗炎镇痛作用且地胆草的民间临床应用未见毒副作用。中药/天然药越来越凸显其药效良好、无成瘾性、不良反应少及资源丰富等优势^[11]。

菟丝藤易生长,资源十分丰富,具有清热、解毒、凉血、利尿等作用。但菟丝藤一直未作药物使用,而且往往是作为有害的杂草除去。近年来对菟丝藤的研究主要是菟丝藤的化学成分和生药学方面,但菟丝藤的药理作用研究极少,其药用价值未得到认识与开发。本实验结果表明,菟丝藤水煎液对实验动物模型具有明显的镇痛抗炎作用,不仅可以变废为宝,还为它的进一步研究及开发打下坚实基础,具有重要的理论意义,菟丝藤具有广阔的开发前景。

参考文献:

[1] 胡彦武,关颖丽,谢庆往,等. 长白山区野生金灯藤种子及种皮中总黄酮的含量测定[J]. 光谱实验室,2011,28(6):

3052—3054.

[2] 程虎印,马梅,卢元,等. 华阴市金灯藤寄生植物多样性调查[J]. 陕西中医学院学报,2014,37(4):110—113.

[3] 赵丹江. 菟丝子抗衰老作用机制的研究进展[J]. 中医药学报,2011,39(5):97—99.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2011:12.

[5] 李兰芳,李存满,张勤增,等. 苜蓿提取物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 河北医药,2010,32(7):789—791.

[6] 范燕青,曾阳,雷艳,等. 藏药翁布挥发油抗炎镇痛实验研究[J]. 青海师范大学学报:自然科学版,2013,29(4):24—28.

[7] 王海娜,傅永清,张娟. 神经病理性疼痛及其中医药治疗的研究进展[J]. 内蒙古中医药,2011,30(11):126—128.

[8] 杨静伟,张贵君,吴明侠,等. 中药金莲花药效组分抗炎镇痛作用研究[J]. 中国药物评价,2013,30(4):210—213.

[9] 秦莉花,钟华美,陈晓阳,等. 冠盖藤的抗炎镇痛作用[J]. 中国老年学杂志,2014,34(2):429—431.

[10] 温先敏,杨缙南,胡田魁,等. 地胆草水提物抗炎镇痛作用的动物实验研究[J]. 云南中医中药杂志,2015,36(12):71—72.

[11] 雷仲民,孙佩宇,刘欣,等. 定痛膏抗炎镇痛作用实验研究[J]. 北京中医药,2010,29(12):948—949.

收稿日期:2015—12—28;修回日期:2016—02—06