

• 临床研究 •

膀胱移行细胞癌中 Ki-67 与 p53 及 VEGF 的表达及临床意义

费夏玮¹ 刘光香¹ 祝帅¹ 陈崧¹ 陈骏² 张士伟¹
赵晓智¹ 刘铁石¹ 姚林方¹ 李笑弓¹ 郭宏骞¹

【摘要】 目的:探讨膀胱移行细胞癌(TCCB)中 Ki-67 与 p53、VEGF 的表达与 TCCB 临床病理特征的关系及其临床意义。方法:应用免疫组织化学染色方法检测 113 例 TCCB 组织中 Ki-67、p53 及 VEGF 的表达,并将结果与临床分期、病理分级进行相关性分析。结果:TCCB 中 Ki-67、p53 和 VEGF 的表达率分别为 82.3%(93/113)、80.5%(91/113)、90.3%(102/113),Ki-67、p53 的表达率及表达强度随着 TCCB 的临床分期、病理分级的升高而升高($P<0.05$),VEGF 的表达率和表达强度与肿瘤的临床分期呈正相关($P<0.05$),与病理分级无显著相关性($P>0.05$);Ki-67 与 p53、VEGF 均呈正相关, r 分别为 0.240、0.239,相关性有统计学意义($P<0.05$);在高分期、高分级组 TCCB 中 Ki-67 和 p53、Ki-67 和 VEGF 联合阳性表达率高于低分期、低分级组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:Ki-67 的表达与 TCCB 的恶性程度有关,其与 p53 和 VEGF 的过度表达对 TCCB 的发生、发展起着协同的作用,Ki-67 与 p53、VEGF 的联合检测更有助于 TCCB 临床分期、病理分级、预后判断及术后辅助治疗方案的制定。

【关键词】 膀胱肿瘤;Ki-67 抗原;p53;血管内皮生长因子类

【中图分类号】 R737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-1420(2013)11-0801-05

Expression and clinical significance of Ki-67, p53 and VEGF in transitional cell carcinoma of the bladder

FEI Xiaowei¹ LIU Guangxiang¹ ZHU Shuai¹ CHEN Yin¹ CHEN Jun² ZHANG Shiwei¹
ZHAO Xiaozhi¹ LIU Tieshi¹ YAO Linfang¹ LI Xiaogong¹ GUO Hongqian¹

(¹Department of Urology, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing, 210008, China; ²Department of Pathology, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University)

Corresponding author: LI Xiaogong, E-mail: lxx6691@126.com

Abstract Objective: To study the expression of Ki-67, p53 and VEGF in transitional cell carcinoma of the bladder (TCCB) tissue, and to investigate the relationship between the expression and clinicopathologic parameters in patients with TCCB. **Method:** The expression of Ki-67, p53 and VEGF in 113 cases of bladder cancer were assessed by immunohistochemistry, and their correlations with clinicopathological factors were statistically analyzed. **Result:** The expression rates of Ki-67, p53 and VEGF in bladder cancer were 82.3% (93/113), 80.5% (91/113), 90.3% (102/113) respectively. In addition, the expression rates and intensity of Ki-67 and p53 increased along with the rising of clinical stage and pathologic grade ($P<0.05$). The expression of VEGF is also positively correlated with clinical stage ($P<0.05$), but not with the pathologic grade ($P>0.05$). Ki-67 was positively correlated with p53 and VEGF, which were statistically significant ($P<0.05$). The positive co-expression rates of Ki-67, p53 in advanced-type and high-grade group were higher than that in the early-stage and low-grade group, which the same result could be seen in the positive co-expression rates of Ki-67 and VEGF. Thus, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression of Ki-67 was associated with the degree of malignancy of bladder cancer. The over expression of Ki-67, p53 and VEGF might reveal synergistic action on the course of the occurrence, development of transitional cell carcinoma of the bladder. Detecting the expression of Ki-67 as well as p53 and VEGF can better indicate the clinical stage, pathologic grade, the prognosis and provide basis for postoperative adjunctive therapy.

Key words tumor of bladder; Ki-67 antigen; p53; vascular endothelial growth factors

¹南京大学医学院附属鼓楼医院泌尿外科(南京,210008)

²南京大学医学院附属鼓楼医院病理科

通信作者:李笑弓, E-mail: lxx6691@126.com

膀胱癌是中老年人常见的泌尿系恶性肿瘤,据统计全球每年约 386 300 例新发病例被确诊为膀胱

膀胱癌,而且全球每年死于膀胱癌的人数达到了150 200之多^[1]。肿瘤的发生、发展与细胞的异常增殖相关,Ki-67 是一种与增殖细胞相关的核抗原,其与抑癌基因的突变、肿瘤新生血管的形成之间的关系日益受到重视。本研究采用免疫组织化学方法检测膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of the bladder, TCCB)组织中 Ki-67、p53 及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,并结合 TCCB 病理分级、临床分期,分析它们之间的相关性及其临床意义。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取我院 2008~2012 年间 113 例根治性全膀胱切除术标本。男 95 例,女 18 例,年龄 40~86 岁,平均(66.8±10.7)岁,术前经膀胱镜确诊或术后病理证实为 TCCB。TCCB 临床分期:非肌层浸润性癌(T_a,T_b,T₁)44 例,肌层浸润性癌(T₂~T₄)69 例;病理分级(WHO/ISUP,1998):低分级癌(I~II)20 例,高分级癌(III)93 例;

1.2 试剂与方法

采用免疫组织化学染色的方法,对患者的病理切片进行 Ki-67、p53、VEGF 化学染色。p53 兔抗人单克隆抗体、VEGF 鼠抗人多克隆抗体购自美国 Zymed 公司,Ki-67 兔抗人单克隆抗体购自美国 Neomarkers 公司。Ki-67、p53 阳性细胞多数为核着色,呈棕黄色,少数为较弱的细胞质染色,VEGF 阳性细胞主要为细胞质着色。结果判断方面随机选择 10 个高倍视野(×400)计数分析,以 10 个视野阳性细胞的平均数所占比例来判断染色结果,分为以下四级:阳性细胞数<10%为-,阳性细胞数 10%~25%为+,阳性细胞数 26%~50%为++,阳性细胞数>51%为+++。选择典型部位,随意取 5 个高倍视野,计数 100 个细胞,以平均数作为最后判定。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。计数资料之间的比较采用卡方检验;计量资料以均数±标准差表示;相关性分析采用 Spearman 相关;当样本量<40 时,采用 Fisher 精确概率法; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ki-67、p53 及 VEGF 表达与 TCCB 临床病理特征的关系

113 例 TCCB 组织中,Ki-67、p53 和 VEGF 阳性表达与患者的性别、年龄和肿瘤数量无相关性($P>0.05$);三者的阳性表达率与癌细胞侵犯神经、脉管、淋巴结转移情况的相关性比较见表 1;在不同临床分期、病理分级中,Ki-67、p53 阳性表达

率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),VEGF 阳性表达率与临床分期有关($P<0.05$),与病理分级无关($P>0.05$,表 1、图 1);随着肿瘤临床分期、病理分级的升高,Ki-67、p53 阳性表达强度增加($P<0.05$),肌层浸润性 TCCB 组织中 VEGF 表达强度高于非肌层浸润性 TCCB,差异有统计学意义($P<0.05$),VEGF 在 III 级 TCCB 组织中的表达强度虽高于 I~II 级 TCCB,但差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

表 1 Ki-67、p53 和 VEGF 表达与 TCCB 临床病理特征的关系

临床特征	例数	Ki-67	p53	VEGF
性别				
男	95	78(82.1)	75(78.9)	85(89.5)
女	18	15(83.3)	16(88.9)	17(94.4)
P 值		1.000	0.518	1.000
年龄				
≤60	34	26(76.5)	26(76.5)	33(97.1)
>60	79	67(84.8)	65(82.3)	69(87.3)
P 值		0.287	0.475	0.169
肿瘤数量				
单发	59	52(88.1)	49(83.1)	52(88.1)
多发	54	41(75.9)	42(77.8)	50(92.6)
P 值		0.089	0.479	0.425
神经侵犯				
无	81	63(77.8)	64(79.0)	71(87.7)
有	32	30(93.8)	27(84.4)	31(96.9)
P 值		0.045	0.517	0.176
脉管侵犯				
无	69	52(75.4)	54(78.3)	59(85.5)
有	44	41(93.2)	37(84.1)	43(97.7)
P 值		0.016	0.445	0.048
淋巴结转移				
无	95	76(80.0)	77(81.1)	86(90.5)
有	18	17(94.4)	14(77.8)	16(88.9)
P 值		0.189	0.750	0.687
临床分期				
T _a ,T _b ,T ₁	44	30(68.2)	31(70.5)	35(79.5)
T ₂ ~T ₄	69	63(91.3)	60(87.0)	67(97.1)
P 值		0.002	0.031	0.003
病理分级				
I~II	20	11(55.0)	12(60.0)	17(85.0)
III	93	82(88.2)	79(84.9)	85(91.4)
P 值		0.002	0.025	0.408

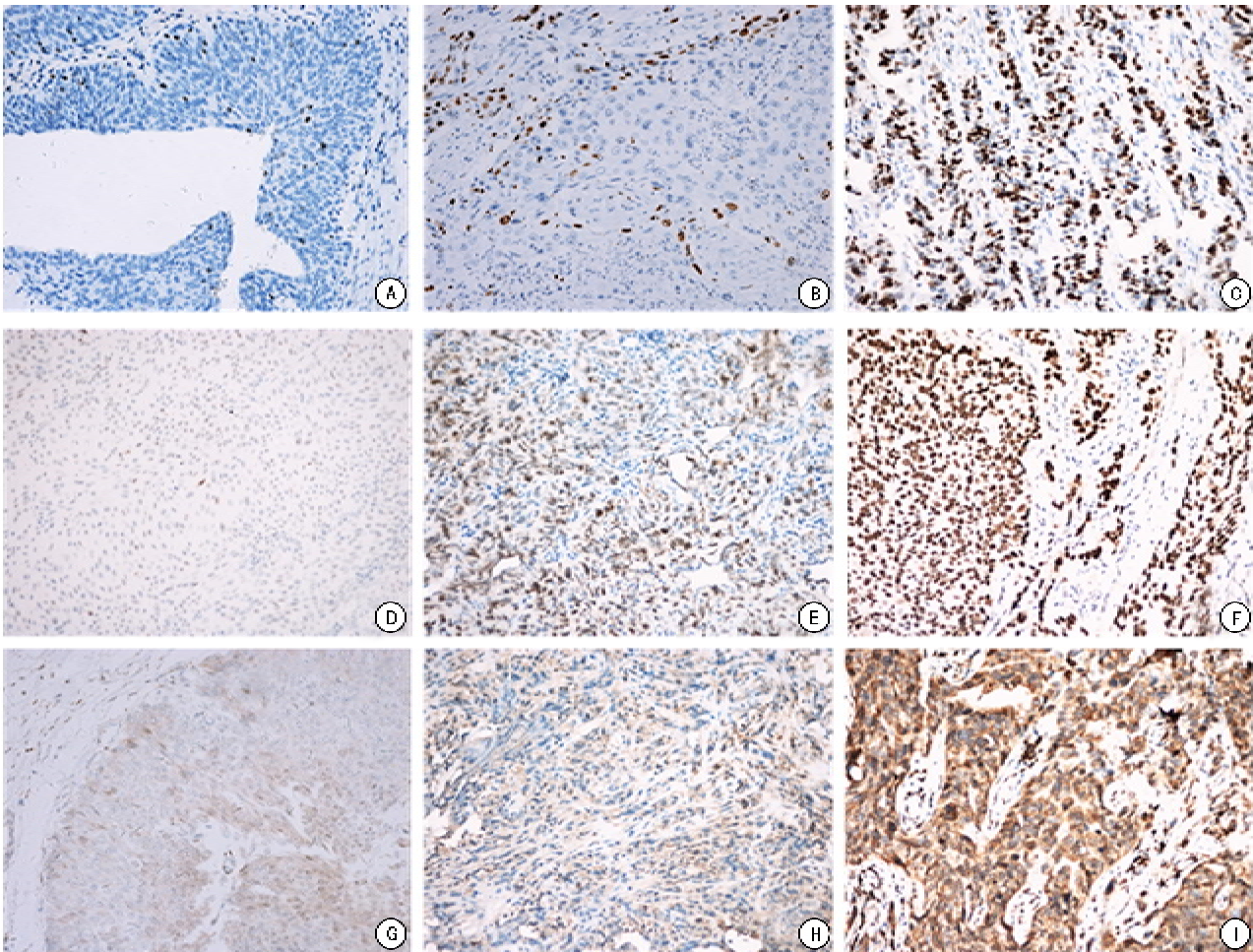
2.2 Ki-67 与 p53、VEGF 表达的相关性分析

对 Ki-67 与 p53、VEGF 间的相关性分析显示,Ki-67 阳性表达与 p53、VEGF 表达呈明显正相关(表 3)。

2.3 Ki-67 和 p53、Ki-67 和 VEGF 联合表达与 TCCB 临床病理特征的关系

表 2 Ki-67、p53 和 VEGF 阳性表达强度与 TCCB 临床分期、病理分级的关系例(%)

指标	T _a , T _{is} , T ₁	T ₂ ~T ₄	P 值	I ~ II	Ⅲ	P 值
Ki-67						
—	14(31.8)	6(8.7)	0.000	9(45.0)	11(11.8)	0.001
+	16(36.4)	10(14.5)		6(30.0)	20(21.5)	
++	11(25.0)	29(42.0)		3(15.0)	37(39.8)	
+++	3(6.8)	24(34.8)		2(10.0)	25(26.9)	
p53						
—	13(29.5)	9(13.0)	0.030	8(40.0)	14(15.0)	0.028
+	17(38.6)	22(31.9)		6(30.0)	33(35.5)	
++	9(20.5)	16(23.2)		5(25.0)	20(21.5)	
+++	5(11.4)	22(31.9)		1(5.0)	26(28.0)	
VEGF						
—	9(20.5)	2(2.9)	0.011	3(15.0)	8(8.6)	0.480
+	6(13.6)	19(27.5)		3(15.0)	22(23.7)	
++	18(40.9)	27(39.1)		10(50.0)	35(37.6)	
+++	11(25.0)	21(30.5)		4(20.0)	28(30.1)	



A: Ki-67+; B: Ki-67++; C: Ki-67+++; D: p53+; E: p53++; F: p53+++; G: VEGF+; H: VEGF++; I: VEGF+++

图 1 TCCB 中 Ki-67、p53、VEGF 的阳性表达(200×)

联合表达即两个指标表达均阳性,非联合表达即单一阳性表达或均阴性表达。在高分级、高分期组中 Ki-67 和 p53、Ki-67 和 VEGF 联合阳性表达率高于低分级、低分期组,差异有统计学意义($P<0.05$,见表 4)。

表 3 Ki-67 与 p53、VEGF 表达的相关性分析

例

Ki-67	p53				VEGF			
	阴性	阳性	<i>r</i>	<i>P</i> 值	阴性	阳性	<i>r</i>	<i>P</i> 值
阴性	8	12			5	15		
阳性	14	79	0.240	0.010	6	87	0.239	0.011

表 4 联合表达与 TCCB 临床分期、病理分级的关系

例(%)

指标	Ki-67 和 p53			Ki-67 和 VEGF		
	联合表达	非联合表达	<i>P</i> 值	联合表达	非联合表达	<i>P</i> 值
临床分期						
T _s , T _{is} , T _i	25(56.8)	19(43.2)		26(59.1)	18(40.9)	
T ₂ ~T ₄	54(78.3)	15(21.7)	0.015	61(88.4)	8(11.6)	0.000
病理分级						
I~II	9(45.0)	11(55.0)		11(55.0)	9(45.0)	
III	70(75.3)	23(24.7)	0.007	76(81.7)	17(18.3)	0.017

3 讨论

Ki-67 为细胞核相关抗原,1983 年由 Gerdes 等在增殖细胞中发现,是 DNA 复制酶复合物中的蛋白组分。Ki-67 是目前较为肯定的细胞核增殖标志物,存在于细胞周期中除 G₀ 期以外的所有阶段,在细胞分裂晚期很快消失,有研究表明 Ki-67 表达能可靠而迅速地反应膀胱肿瘤的增殖率,与肿瘤的发展、转移及预后有关^[2]。Onozawa 等^[3]对 77 例行放化疗的 TCCB(pT₂₋₃N₀M₀)患者随访发现膀胱癌组织中 Ki-67 阳性表达患者的肿瘤复发率明显低于 Ki-67 阴性表达者,认为 Ki-67 是一个预测放化疗治疗膀胱移行细胞癌疗效的指标。本研究结果显示 TCCB 组织中 Ki-67 阳性率为 82.3%,其表达率及表达强度与 TCCB 临床分期、病理分级呈正相关,随着分期分级的升高,Ki-67 阳性率及阳性表达强度明显增高,说明 Ki-67 的表达能很好的反应 TCCB 的发生、发展及预后。目前 Ki-67 表达与淋巴结转移之间是否存在关联尚有争议^[4,5],本组资料分析显示不同临床分期、病理分级的 TCCB 组织中,Ki-67 的表达率无显著性差异,但在癌细胞侵犯脉管和神经组的阳性表达率显著高于未侵犯脉管和神经组,差异有统计学意义,说明目前虽无可靠证据证实 Ki-67 与淋巴结转移有着直接联系,但是其过度表达能间接反映癌细胞的生长、浸润、转移过程及程度,而且行膀胱根治性切除的患者中 Ki-67 蛋白普遍高表达,这为对那些行膀胱根治性切除术的患者(术后病理示膀胱癌组织中 Ki-67 高表达)行进一步辅助治疗提供了理论依据。

p53 基因是人类恶性肿瘤研究最为广泛的抑癌基因之一,对细胞分裂和增殖起负调控作用^[6]。研究表明,突变型 p53 的表达增高与 TCCB 的侵袭性有密切关系^[7]。陈智彬等^[8]研究显示随着 TCCB 临床分期及病理分级的进展,p53 蛋白表达阳性率

明显增高,肌层浸润性和高分级 TCCB 的 p53 蛋白表达明显高于非肌层浸润性和低分级 TCCB,提示 TCCB 的进展可能与 p53 基因异常改变密切相关。本组资料结果与多数国内外研究一致,在 I~II、III 级 TCCB 组织中 p53 的表达率分别为 60%、85%,高分期、高分级的 TCCB 中 p53 阳性率和表达强度明显高于低分期、低分级,与膀胱癌细胞分化、恶化有着密切的联系,本组资料全为根治性膀胱切除术患者,临床病理特征趋向于中晚期,p53 的过度表达不仅揭示了膀胱癌发生发展的可能机制,而且也可能是肿瘤发生的晚期事件^[9]。

杨立新等^[10]比较了非肌层浸润性膀胱癌 p53 和 Ki-67 的联合表达与肿瘤复发的关系,发现复发病例 p53 和 Ki-67 同时阳性者明显高于无复发的病例,说明 p53 和 Ki-67 联合表达是判断肿瘤复发更可靠的指标。本研究发现突变型 p53 蛋白的异常表达与 Ki-67 存在正相关,这可能与机体因野生型 p53 基因突变而失去了对细胞周期的调控,致使肿瘤细胞能继续分裂、增殖有关,随着 TCCB 分期分级的升高,p53 和 Ki-67 联合表达率显著高于其单一阳性表达或阴性,进一步提示我们突变型 p53 与 Ki-67 共同参与了膀胱癌细胞的分裂、增殖、分化的过程,而且两者共同表达可以更有效地预测 TCCB 的发展及预后。

目前研究发现,肿瘤的生长、浸润和转移与新生血管形成有着密切联系。VEGF 是一种重要的血管生成调控因子,其与受体结合后会导致血管内皮细胞的分裂、增殖和迁移,促进肿瘤新生血管形成,其过度表达往往与肿瘤细胞的生长活跃程度密切相关^[11]。本研究结果显示:随着膀胱癌的浸润生长,VEGF 的表达率、表达强度明显升高,说明 VEGF 参与了肿瘤血管的形成;Ki-67 和 VEGF 联合表达与 TCCB 分期、分级呈正相关,随着 TCCB 临床病理分级的升高,Ki-67 和 VEGF 联合表达显

著高于单一阳性及阴性表达,由此我们认为 TCCB 的侵袭能力体现在细胞的增殖活力、肿瘤新生血管的发生等生物因素上,对 Ki-67 与 VEGF 分析显示两者存在显著正相关,这更进一步表明它们在促进 TCCB 新生血管形成和肿瘤细胞过度增殖的机制中存在协同作用。

综上所述,TCCB 的发生发展是多因素、多基因影响的复杂过程,仅凭单一的肿瘤标记物不能完全准确地反映肿瘤的恶性潜能。本研究结果显示分化差和有浸润的 TCCB Ki-67 表达增强,同时伴有 p53、VEGF 表达增高,在统计学分析时也显示各自间有一定的相关性。提示 Ki-67、p53 和 VEGF 蛋白表达在评价 TCCB 的发生、发展和生物学行为上具有协同作用,联合检测其表达更有助于 TCCB 临床分期、病理分级、预后判断,并指导临床制定术后辅助治疗方案。

[参考文献]

- 1 Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69—90.
- 2 Margulis V, Shariat S F, Ashfaq R, et al. Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24): 7376—7373.
- 3 Onozawa M, Miyanaga N, Hinotsu S, et al. Analysis of intravesical recurrence after bladder-preserving therapy for muscle-invasive bladder cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(9): 825—830.
- 4 Kapur P, Lotan Y, King E, et al. Primary adenocarcinoma of the urinary bladder: value of cell cycle biomarkers[J]. Am J Clin Pathol, 2011, 135(6): 822—830.
- 5 Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz P I, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(2): 114—119.
- 6 Swana H S, Grossman D, Anthony J N, et al. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer[J]. N Engl J Med, 1999, 341(6): 452—453.
- 7 Schrier B P, Vriesema J L, Witjes J A, et al. The predictive value of p53, p27 (kip1), and alpha-catenin for progression in superficial bladder carcinoma[J]. Eur Urol, 2006, 50(1): 76—82.
- 8 陈智彬,宋彦,宋永胜. 联合评估凋亡相关蛋白 Survivin 和突变型 p53 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义[J]. 临床泌尿外科杂志, 2009, 24(1): 35—37.
- 9 Piston E, Faynel J, Ruffion A, et al. p53 immunodetection of liquid-based processed urinary samples helps to identify bladder tumors with a higher risk of progression[J]. Br J Cancer, 2005, 93(2): 242—247.
- 10 杨立新,张海峰,白淑芬. p53、Ki-67 基因表达与膀胱癌相关性的回顾性研究[J]. 现代医学, 2010, 38(1): 32—35.
- 11 Hainsworth J D, Spigel D R, Farley C, et al. Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in carcinomas of unknown primary site: the Minnie Pearl Cancer Research Network[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(13): 1747—1752.

(收稿日期:2013-04-26)

《泌尿外科诊疗手册(第四版)》出版

本书主编朱有华为国家重点学科——第二军医大学附属长征医院泌尿外科教授。本书是我国唯一连续出版的泌尿外科临床诊断和治疗的实用性手册。近年来,泌尿外科学的发展日新月异,为了与时俱进,适应学科发展和临床工作需要,在保留本书第三版的基本架构和编写风格的基础上,本版进行了全面的修订和补充,增加了“机器人泌尿外科手术”一章和十余种泌尿外科常见疾病的诊疗等章节,增补了一些新理论、新方法和新药物,删除了临床上已少用或基本不用的过时方法等内容。手册以临床诊疗工作为重点,以规范化和标准化诊疗为核心,突出了微创技术和器官移植在泌尿外科中的应用优势,内容更新颖,编排更合理,反映了当代泌尿外科学的最新进展,进一步体现了本书精、全、新的特点。

本书是从事泌尿外科和男科临床一线工作医师必读的书籍,也是普外科和妇产科等相关学科医师和医学院校师生的重要参考书。

本书定价 92 元,全国各大新华书店、医药书店、当当网(www.dangdang.com.cn)、卓越亚马逊网(www.amazon.cn)等均有售。如需邮购,请联系人民卫生出版社邮购组,地址:北京市朝阳区潘家园南里 19 号,邮政编码:100021,电话:010-59780011。

(李恒)