

## Ki-67、VEGF 在卵巢交界性肿瘤中的表达及其意义

王捷文<sup>1,2</sup>, 赵卫东<sup>1</sup>, 承泽农<sup>3</sup>

**[摘要]**目的:探寻卵巢交界性肿瘤(BOT)中细胞增殖核抗原(Ki-67)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达特点及变化规律,并与相应的良、恶性肿瘤比较,为诊断及鉴别诊断BOT提供更有价值的辅助指标。方法:应用免疫组织化学Elivision™ plus法检测Ki-67、VEGF在30例卵巢良性肿瘤、38例卵巢交界性肿瘤、30例卵巢恶性肿瘤组织中的表达。结果:Ki-67、VEGF在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达随着恶性程度增高呈增加趋势,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。卵巢交界性肿瘤组织中阳性表达在肿瘤的病理类型间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。且Ki-67、VEGF两者表达呈较好的一致性( $P < 0.01$ )。结论:Ki-67、VEGF高表达往往提示肿瘤的恶性程度高。Ki-67、VEGF可能共同参与卵巢上皮性肿瘤恶性增殖过程,对卵巢上皮性肿瘤的发生发展有重要作用。联合检测它们在卵巢肿瘤组织中的表达,可能成为判断卵巢肿瘤的恶性程度及估计其预后的重要指标。

**[关键词]** 卵巢肿瘤; 免疫组织化学; 细胞增殖核抗原; 血管内皮生长因子

[中国图书资料分类法分类号] R 737.31 [文献标识码] A

### The expressions and clinical significance of Ki-67 and vascular endothelial growth factor in borderline ovarian tumor

WANG Jie-wen<sup>1,2</sup>, ZHAO Wei-dong<sup>1</sup>, CHENG Ze-nong<sup>3</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University Hefei Anhui 230001;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Medical College Bengbu Anhui 233040;

3. Department of Pathology Bengbu Medical College Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the expressions and clinical correlations of Ki-67 and vascular endothelial growth factor(VEGF) in borderline ovarian tumors(BOT) in order to help differential diagnosis from other ovary tumors. **Methods:** Immunohistochemistry test (Elivision™ plus method) was used to detect the expressions of Ki-67 and VEGF in 38 cases with BOT, compared to 30 cases with benign ovarian tumors and 30 cases with epithelial ovarian cancer. **Results:** The expressions of Ki-67 and VEGF in BOT, benign ovarian tumors and epithelial ovarian cancer were gradually increased( $P < 0.01$ ). The expression of Ki-67 was increased with the increment of VEGF expression. The expressions of Ki-67 and VEGF did not correlate to pathological type( $P > 0.05$ ). And there was a good unanimity and significant correlation between the expressions of Ki-67 and VEGF. **Conclusions:** The over-expressions of Ki-67 and VEGF in ovarian tumors indicated high malignant degree, and these changes may prompt the aggressive behavior. Combined detection with Ki-67 and VEGF may be a valuable marker for prediction of tumor progression and managements of ovarian tumors.

**[Key words]** borderline neoplasm; immunohistochemistry; Ki-67; vascular endothelial growth factor

卵巢交界性肿瘤(borderline ovarian tumor, BOT)<sup>[1]</sup>又称低度恶性潜能肿瘤,是一种组织学和生物学特点介于良性和恶性肿瘤之间的肿瘤亚型,具有低度恶性潜能。在卵巢肿瘤中的发病率达4%~14%。具有分期早、恶性程度低、远期复发多的特点。由于卵巢肿瘤组织分化程度不同、生物学特性复杂以及肿瘤发生癌变的机制不清,探讨其发病机

制一直是研究的热点。国内外一直致力于研究影响卵巢肿瘤预后的因素。多种肿瘤标志物被用于卵巢肿瘤的研究,而对卵巢交界性肿瘤的研究则较少。而卵巢交界性肿瘤可能是卵巢良性肿瘤和卵巢恶性肿瘤的过渡阶段。本研究采用免疫组织化学染色的技术分析卵巢良性肿瘤、卵巢交界性肿瘤和卵巢恶性肿瘤病例,观察肿瘤组织中细胞增殖核抗原(Ki-67)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达情况。

#### 1 材料与与方法

1.1 组织标本和临床资料 选取蚌埠医学院第一附属医院病理科2007~2010年存档的卵巢交界性肿瘤组织石蜡标本38例(交界组),其中黏液性交

[收稿日期] 2011-04-19

[作者单位] 1. 安徽医科大学附属省立医院 妇产科,安徽 合肥 230001; 2. 蚌埠医学院第二附属医院 妇产科,安徽 蚌埠 233040; 3. 蚌埠医学院 病理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王捷文(1977-)女,主治医师。

[通讯作者] 赵卫东,硕士研究生导师,副主任医师, E-mail: victorzhaow@163.com.

交界性肿瘤 21 例(其中 2 例出现局灶恶变),浆液性交界性肿瘤 17 例(其中 1 例伴微浸润);患者年龄 16 ~ 73 岁;临床(FIGO)分期,1 期 31 例,2 期 3 例,3 期 4 例。双侧发病 13 例。共随访 20 例,随访时间为 6 个月至 3 年,2 例复发。随机选卵巢良性肿瘤组织石蜡标本 30 例(良性组),其中浆液性囊腺瘤 14 例,黏液性囊腺瘤 16 例,患者年龄 15 ~ 66 岁。随机选卵巢恶性肿瘤石蜡标本 30 例(恶性组),其中浆液性癌 10 例,黏液性癌 15 例,子宫内膜样癌 3 例,透明细胞癌 2 例,患者年龄 48 ~ 67 岁。复习全部 HE 切片,患者均为初发者,术前未接受过放化疗且所有病例诊断均经病理切片证实。

1.2 主要试剂 一抗:鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体,克隆号:MIB-1;鼠抗人 VEGF 单克隆抗体,克隆号:VG-1;二抗:Elivision™ plus 试剂盒。均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 方法 免疫组织化学染色 Elivision™ plus 法检测 Ki-67、VEGF 表达情况。石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS(pH 7.4)冲洗 3 次,每次 3 min(3 × 3');每张切片加 1 滴 3% 过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS(pH 7.4)冲洗(3 × 3');甩去 PBS,每张切片加 1 滴第一抗体 4 ℃ 过夜;PBS 冲洗(3 × 5');甩去 PBS,每张切片加 1 滴聚合物增强剂(试剂 A),室温下孵育 20 min;PBS 冲洗(3 × 3');甩去 PBS,每张切片加 1 滴酶标鼠聚合物(试剂 B),室温下孵育 30 min;PBS 冲洗(3 × 3');甩去 PBS,每张切片加 2 滴新鲜配制的 DBA,显微镜下观察 3 ~ 10 min,阳性显色为棕色;蒸馏水或自来水冲洗,苏木精复染 0.1% 盐酸分化,自来水冲洗,PBS 冲洗返蓝;切片经过梯度乙醇脱水干

燥(二甲苯透明)中性树脂封片,镜下观察。

1.4 染色对照和结果判定 判断标准:Ki-67 结果判定以细胞核中出现棕黄色颗粒为染色阳性细胞;VEGF 结果判定以细胞胞质或胞核出现黄染为阳性标志。随机观察 5 个视野,计算阳性细胞数目。阳性细胞 < 25% 为阴性组(-);25% ~ 50% 为弱阳性组(+);> 50% ~ 75% 为阳性组(2+);> 75% 为强阳性组(3+)。

1.5 统计学方法 采用  $\chi^2$  检验、四格表确切概率法;一致性检验采用 Kappa 分析。

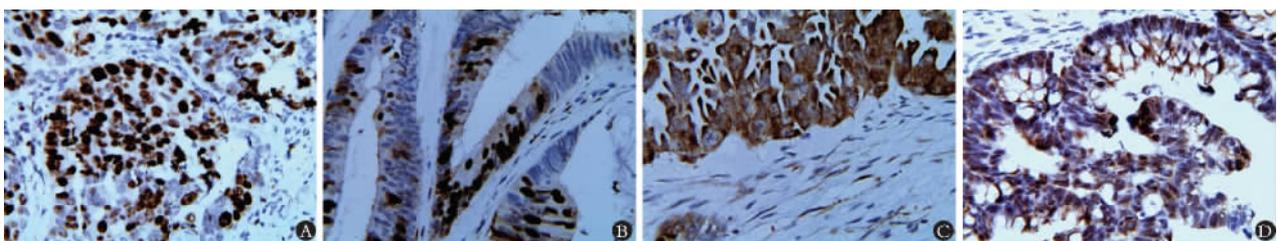
## 2 结果

2.1 Ki-67、VEGF 在卵巢上皮性肿瘤中的免疫组织化学结果 Ki-67 在良性组、交界组和恶性组的阳性率分别为 10.0%、42.1% 和 83.3%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );VEGF 在 3 组中的阳性率分别为 20.0%、52.6% 和 86.7%,差异亦有统计学意义( $P < 0.01$ );Ki-67、VEGF 在恶性组中阳性率均高于交界组( $P < 0.01$ );交界组阳性率均高于良性组( $P < 0.01$ )(见表 1、图 1)。

表 1 3 组 Ki-67、VEGF 的表达比较(n)

分组	n	Ki-67			VEGF		
		阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)
恶性组	30	25	5	83.3	26	4	86.7
交界组	38	16	22	42.1**	20	18	52.6**
良性组	30	3	27	10.0 $\Delta\Delta$	6	24	20.0 $\Delta\Delta$
合计	98	44	54	44.9	52	46	53.1
$\chi^2$				30.80			26.77
P				<0.01			<0.01

率的两两比较:与恶性组比较 \*\*  $P < 0.01$ ;与交界组比较  $\Delta\Delta P < 0.01$



A:Ki-67 在卵巢癌组织中的表达;B:Ki-67 在 BOT 组织中的表达;C:VEGF 在卵巢癌组织中的表达;D:VEGF 在 BOT 组织中的表达

图 1 Ki-67、VEGF 在卵巢癌、卵巢交界性肿瘤中的表达(免疫组织化学染色)

2.2 肿瘤病理类型与 Ki-67、VEGF 在 BOT 中阳性表达的关系 Ki-67、VEGF 在浆液性和黏液性 BOT 中的阳性率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 2)。

2.3 卵巢上皮性肿瘤组织中 Ki-67 和 VEGF 表达的相关性 在 98 例卵巢上皮性肿瘤组织中,Ki-67 和 VEGF 共表达阳性 40 例,共阴性 42 例,两者有高度一致性( $P < 0.01$ )(见表 3)。

表 2 病理类型与 Ki-67、VEGF 在 BOT 中阳性率的关系

病理类型	n	Ki-67			P	VEGF			P
		阳性	阴性	阳性率(%)		阳性	阴性	阳性率(%)	
浆液性	17	7	10	41.2	1.000*	8	9	47.1	0.745*
黏液性	21	9	12	42.9		12	9	57.1	
合计	38	16	22	42.1		20	18	52.6	

\* 示四格表确切概率法

表 3 卵巢上皮性肿瘤组织中 Ki-67、VEGF 表达的相关性

Ki-67	VEGF		合计	Kappa	P
	阴性	阳性			
阴性	42	12	54	0.675 5	<0.01
阳性	4	40	44		
合计	46	52	98		

### 3 讨论

BOT 的一些生长方式和细胞学特征介于明显良性和肯定恶性的同类肿瘤之间,有恶变倾向。因为病理诊断有一定困难,很大程度上是凭经验,易受人为因素影响,诊断可重复性相对较低。所以加强对此类肿瘤的认识,从而把最具有复发、恶变潜能的卵巢交界性肿瘤鉴别出来就显得尤为重要。

增殖是细胞的重要生物学行为之一,细胞周期失控和异常增殖将导致肿瘤发生。肿瘤细胞增殖与肿瘤组织的分化状态、侵袭能力以及预后密切相关。Ki-67 是增殖细胞核抗原,由相对分子质量为 345 000 和 395 000 的 2 条多肽链组成的核蛋白。它的合成、表达与增殖细胞的增殖周期有关,在 G<sub>1</sub> 中晚期开始表达, S 期和 G<sub>2</sub> 期逐渐增高, M 期达最高峰,而在 G<sub>0</sub> 期则不表达,由于 Ki-67 覆盖于 G<sub>0</sub> 期以外的各增殖周期,是反映细胞增殖活性的良好指标。吕艺<sup>[2]</sup>研究发现在卵巢癌组织中,病理分化差的 Ki-67 阳性率明显高于分化较好组;在临床 III ~ IV 期组 Ki-67 阳性率明显高于临床 I ~ II 期组;卵巢癌患者的生存时间与 Ki-67 阳性率呈负相关。同样 Munsted 等<sup>[3]</sup>研究认为 Ki-67 升高可作为卵巢癌的不利预后因素, Ki-67 免疫染色呈强表达与疾病进展和患者生存下降联系在一起, Ki-67 标记指数较高的患者复发的趋势增加。Ki-67 在肿瘤组织中的高表达,正是肿瘤细胞异常增生的表现。文献<sup>[4-6]</sup>报道多种恶性肿瘤中均存在 Ki-67 过度表达。由于恶性肿瘤组织分化越差,增殖越迅速,肿瘤的恶性程度越高,预后则不良,因此 Ki-67 能够较好地反映肿瘤患

者的预后,是一个有独立意义的预后因素。

瘤细胞的侵袭和转移是恶变的特征,肿瘤血管的生成不仅促进肿瘤生长,而且和肿瘤的转移、侵袭密切相关。VEGF 可通过肿瘤血管形成来影响卵巢交界性肿瘤的侵袭和转移,是血管内皮细胞特异性有丝分裂原,能特异性作用于血管内皮细胞并促进其增殖;能提高血管通透性,引起血浆蛋白从血管内渗漏到血管外区域。另外, VEGF 促进血管内皮细胞产生,并调节纤溶酶原激活物及其抑制因子,从而促使渗漏到血管外区域的血浆蛋白形成纤维蛋白凝块作为血管新生的支持物。所以, VEGF 在一定程度上代表了组织血管生成的能力。此外, VEGF 还能诱导某些抗凋亡因子如 Bcl-2、X 连锁凋亡抑制蛋白等的表达,抑制血管内皮细胞凋亡<sup>[7]</sup>。因此 VEGF 对肿瘤获得浸润生长和血运转移都具有重要作用。VEGF 作为血管生长促进因子,在肿瘤的生长、发展及转移中起重要作用。缺氧是 VEGF 最主要的诱导因素。胃癌、膀胱癌、卵巢癌等多种肿瘤中 VEGF 表达明显增加,卵巢肿瘤组织中 mRNA 和蛋白的水平可检测到 VEGF 的表达,并且在 SKOV-3 卵巢癌细胞株接种到裸鼠皮下形成的卵巢癌动物模型中,使用人单抗 VEGF 治疗可以使肿瘤停止生长,提示 VEGF 在卵巢癌发展中起重要的作用。

本实验显示, Ki-67、VEGF 在卵巢癌表达率均高于 BOT ( $P < 0.01$ ); Ki-67、VEGF 在 BOT 表达率均高于卵巢良性肿瘤 ( $P < 0.01$ )。卵巢交界性肿瘤中的 Ki-67、VEGF 阳性率介于良、恶性肿瘤之间,且随肿瘤从良性、交界性、恶性的发展而递增,提示随着卵巢肿瘤的进展,肿瘤细胞 Ki-67、VEGF 的表达或分泌明显增高,发生侵袭转移的几率随之增加,还提示 Ki-67、VEGF 在卵巢癌发生中起关键作用;这两种分子在功能上可能存在某种联系,共同调节卵巢癌细胞的恶性增殖。另一方面,也证实了交界性卵巢肿瘤是介于良、恶性卵巢肿瘤之间的一种特殊类型肿瘤。本研究还显示在卵巢交界性肿瘤中, Ki-67、VEGF 阳性与肿瘤的病理类型无关。在卵巢交界性肿瘤组织中, Ki-67 值高伴随 VEGF 阳性例数多, Ki-67 值低与 VEGF 阴性例数多相一致,两组经一致性检验分析, Kappa 值 = 0.675 5, 表明两者一致性较好。我们推测肿瘤细胞的高增殖进一步加剧了肿瘤的缺氧,促使肿瘤细胞通过分泌 VEGF 刺激血管生成,为肿瘤提供营养并带走代谢产物。Ki-67

可能通过促进肿瘤细胞的增殖和肿瘤血管形成,发挥促癌作用,Ki-67表达越强,细胞增殖越活跃,肿瘤的恶性程度越高,浸润性生长和复发的可能性越大。VEGF的表达水平与肿瘤的分化程度之间存在密切相关,说明随着肿瘤的演进,肿瘤的生长速度加快,需要的营养物质以及需要排出的代谢产物增加,缺氧状况加剧,刺激肿瘤细胞分泌VEGF增加,从而使微血管密度也相应增加,促进肿瘤的生存和转移。近年来研究<sup>[8]</sup>表明人类许多肿瘤细胞比正常组织有高的VEGF表达。

卵巢交界性肿瘤的预后判断一直困扰着临床医生,临床上采用的病理分级、分期方法曾为临床提供了有益于判断预后的资料,但手术中快速病理检查对于交界性卵巢肿瘤诊断能力有限<sup>[9-10]</sup>,仍很难准确预测卵巢交界性肿瘤的生物学行为及预后。近年来随着对肿瘤分子生物学机制认识的深入,许多卵巢肿瘤预后判断标志物相继被发现,但应用于卵巢交界性肿瘤的却很少。卵巢肿瘤的发生和发展是多因素、多基因影响的复杂过程,仅凭单一的肿瘤标志物不能全面准确地反映肿瘤的恶性潜能。因此,对卵巢病变除病理学因素外,联合检测2个有协同作用的标志物Ki-67和VEGF过表达对判断预后具有协同作用。Ki-67和VEGF过表达的联合检测,对交界性卵巢肿瘤的诊断、预后判断和选择治疗方案都有重要临床意义。Ki-67和VEGF在良性、交界性、恶性卵巢肿瘤组织中的阳性率存在明显差异,对组织学类型不典型卵巢肿瘤,可藉此作为鉴别诊断的分子指标之一。

Ki-67和VEGF将有可能作为临床上的新指标早期诊断卵巢交界性肿瘤。目前,VEGF信号通路及相关靶标的药物研究已取得一定进展<sup>[11]</sup>。改变卵巢肿瘤患者的Ki-67和VEGF水平,在早期应用抗血管生成药物<sup>[12]</sup>以阻断肿瘤细胞的营养供应,阻止肿瘤的进展,来达到治疗肿瘤的目的从而成为临床肿瘤治疗的新途径。

### [参 考 文 献]

- [1] Jones MB. Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management [J]. Clin Obstet Gynecol 2006 49(3): 517-525.
- [2] 吕艺. 上皮性卵巢癌 Ki-67 基因表达及意义 [J]. 黑龙江医学, 2008 32(1): 3-4.
- [3] Munsted K, voneorgi R, Franke FE. Correlation between MIBI-determined tumor growth fraction and incidence of tumor recurrence in early ovarian carcinomas [J]. Cancer Invest 2004, 22(21): 185-194.
- [4] Kerkh M, Steyerberg EW, Kusters JG *et al*. Aneuploidy and high expression of p53 and ki-67 is associated with neoplastic progression in barrett esophagus [J]. Cancer Biomark, 2008, 4(1): 1-10.
- [5] Chen L, Li X, Wang G L *et al*. Clinicopathological significance of overexpression of TSPAN1, Ki67 and CD34 in gastric carcinomal [J]. Tumori 2008 94(4): 531-538.
- [6] 王建法, 顾超, 叶宣光. 乳腺癌淋巴结转移与 Ki-67、VEGF 表达的相关性及其临床意义 [J]. 实用癌症杂志, 2009, 5(24): 450-451.
- [7] Park KH, Choi SE, Eom M *et al*. Downregulation of the anaphase promoting complex (APC) 7 in invasive ductal carcinomas of the breast and its clinico pathologic relationships [J]. Breast Cancer Res 2005 7(2): 238-247.
- [8] 刘显挺. 调控 VEGF 的转录因子及其与肿瘤的关系 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010 4(17): 468-472.
- [9] Temp fer CB, Polterauer S, Bentz EK *et al*. Accuracy of intraoperative frozen section analysis in borderline tumors of the ovary: a retrospective analysis of 96 cases and review of the literature [J]. Gynecol Oncol 2007 107(2): 248-252.
- [10] Kim K, Chung HH, Kim JW *et al*. Clinical impact of under diagnosis by frozen section examination is minimal in borderline ovarian tumors [J]. Eur J Surg Oncol 2009 35(9): 969-973.
- [11] Krupit S, Kaya Y, Wakelee H. Vascular endothelial grow the factor pathways in Hem ato-lymphoid malignancie [J]. J Thorac Oncol 2009 4(11 Suppl 3): S1071-S1073.
- [12] Sharafinski ME, Ferris RL, Ferrone S *et al*. Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Head Neck 2010 32(10): 1412-1421.

(本文编辑 姚仁斌)

欢 迎 订 阅

蚌 埠 医 学 院 学 报

邮发代号 26-37

国外代号 BM 6535

月刊

全年定价 96.00 元