

· 临床研究 ·

联合检测 Δ Np63、Ki-67 和 VEGF 与膀胱移行细胞癌预后的相关性研究伍 季¹, 苟 欣², 李云祥¹

(1. 川北医学院第二临床学院泌尿外科, 四川南充 637000;

2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400162)

摘要:目的 探讨 Δ Np63、Ki-67 和血管内皮生长因子(VEGF)在膀胱移行细胞癌(TCCB)中的免疫组化表达及与膀胱癌病理分级、临床病理分期和预后的相关性。方法 用 SP 法对 56 例膀胱移行上皮癌病理切片行 Δ Np63、Ki-67 和 VEGF 免疫组化染色,将免疫组化染色结果与病理分级、分期和预后进行分析。结果 TCCB 中 Δ Np63、Ki-67 和 VEGF 阳性表达率明显高于正常膀胱黏膜,在高级别、浸润性癌组织中的阳性表达率明显高于低级别、浅表性癌组织,在复发患者中的阳性表达率显著高于初发组,在膀胱癌的病理分级、临床分期和预后之间表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。采用 Spearman 等级相关性分析, Δ Np63 与 Ki-67、VEGF 呈正相关,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Δ Np63 可能通过促进细胞增殖和肿瘤血管生成发挥促癌作用,联合检测 Δ Np63、Ki-67 和 VEGF 多项肿瘤标记物可以更好地判断 TCCB 的预后。

关键词:膀胱癌;免疫组化; Δ Np63;Ki-67;血管内皮生长因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.022

中图分类号:R737.14;R730.45

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)22-3056-03

Study on relationship of combined detection of expressions of Δ Np63, Ki-67, VEGF and prognosis of bladder cancer

WU Ji¹, GOU Xing², LI Yun-xiang¹

(1. Department of Urology, Second Clinical College of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;

2. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400162, China)

Abstract: Objective To evaluate the immunohistochemistry expressions of Δ Np63, Ki-67, VEGF in transitional cell carcinoma of bladder and the relationship between the expressions of Δ Np63, Ki-67, VEGF and the pathological stage, grade and prognosis of bladder cancer. **Methods** To detect the expressions of Δ Np63, Ki-67 and VEGF on these pathological sections by immunohistochemical staining. The immunoassay results were analyzed in relation to the tumor stage, grade and compared them with the clinical parameters of prognosis. **Results** The expressions of TCC-positive rate of Δ Np63, Ki-67 and VEGF were higher than those of the cell of normal bladder mucous membrane; the expressions of positive rate of Δ Np63, Ki-67 and VEGF in the high-grade and the invasive TCCB were significantly higher than those of low-grade and the superficial TCCB. The expressions of TCC-positive rate of Δ Np63, Ki-67 and VEGF in the recurred cases were much higher than those of the primary cases. The expression difference of the three marker in the pathology grade, clinical stage and prognosis had statistical significance($P < 0.05$). To compare and analyze three markers expression in the bladder cancer by using Spearman rank correlation, Δ Np63 and Ki-67, Δ Np63 and VEGF showed positive correlation, rank correlation had statistical significance($P < 0.05$). **Conclusion** Δ Np63 may play a role of promoter in create cancer's genesis through the promotion of cell proliferation and blood vessel form. The combined detection of the expressions of Δ Np63, Ki-67 and VEGF can give a better judgment on prognosis of bladder cancer.

Key words: bladder carcinoma; immunohistochemistry; Δ Np63; Ki-67; VEGF

膀胱癌是人类常见的一种恶性肿瘤,约占全部恶性肿瘤的 3%,在我国其发病率居泌尿生殖系肿瘤的首位。目前临床常用的方法难以准确预测膀胱癌的生物行为及预后。近年来许多肿瘤标记物相继被发现可用于膀胱癌的预后判断,但迄今为止几乎没有标记物可供临床常规使用。目前有研究表明, Δ Np63 与膀胱癌的生物特性有一定的相关性,但其作用存在争议。本实验目的在于通过联合检测和分析 Δ Np63、Ki-67 和血管内皮生长因子(VEGF)在膀胱癌组织中的表达情况以探讨其在膀胱癌发生发展中可能的作用及其相关性。

1 材料与方

1.1 一般资料 选取川北医学院第二临床学院病理科 2006~2008 年经手术切除的并有完整临床资料的膀胱移行细胞癌(TCCB)标本 56 例,其中男 34 例,女 22 例,年龄 30~82 岁,平均 56 岁。病理分级按世界卫生组织(WHO)1998 年标准确定,低级别(0~I 级)37 例,高级别(II~III 级)19 例。临床病理分期按国际抗癌联盟 TNM 分期(UICC-TNM)标准确定,分为浅表性肿瘤(Tis~T₁)32 例,浸润性肿瘤(T₂~T₄)24 例;初

发 30 例,复发 26 例。以 12 例膀胱切开取石术及开放前列腺切除术患者的膀胱黏膜为对照组。

1.2 方法 应用免疫组织化学染色的方法,对患者的病理切片进行 Δ Np63、Ki-67 和 VEGF 染色。鼠抗人 Δ Np63 IgG 单克隆抗体、鼠抗人 Ki-67 核抗原、羊抗人 VEGF 多克隆抗体、免疫组织化学染色 SP 试剂、DAB 显色试剂盒购自北京中山生物制品有限公司。按试剂盒说明书操作。

1.3 结果判定 由 2 位病理科医生在临床和病理资料不知晓的情况下进行观察,2 位观察者重复观察同一张病理切片进行结果判定。随机选择 5 个高倍视野,计数 500 个肿瘤细胞中阳性染色细胞,阳性表达率(PI) = (阳性表达肿瘤细胞数/500) × 100%, Δ Np63 抗原阳性表达表现为细胞核内出现棕黄色颗粒,PI < 25% 为阴性,PI ≥ 25% 为阳性(图 1)。Ki-67 阳性表达表现为肿瘤细胞核内出现棕黄色颗粒,以 PI < 20% 为阴性,≥ 20% 为阳性(图 2)。VEGF 阳性表达以肿瘤细胞及其附近的血管内皮细胞胞质出现黄色或棕黄为阳性染色,无肿瘤细胞着色或着色肿瘤细胞数小于 10% 为阴性表达,着色肿瘤细胞数

表 1 ΔNp63、Ki-67 和 VEGF 的染色结果 (n)

项目	n	ΔNP63				Ki-67				VEGF			
		-	+	χ^2	P	-	+	χ^2	P	-	+	χ^2	P
对照组	12	11	28	7.014	0.008	12	40	4.484	0.034	12	27	10.835	0.001
膀胱癌组	56	1	28			0	16			0	29		
病理分级													
低级别	37	22	6	3.903	0.048	30	10	4.979	0.026	22	5	5.523	0.019
高级别	19	15	13			7	9			15	14		
临床分期													
浅表型	32	20	8	4.667	0.031	28	12	9.450	0.002	20	7	6.103	0.013
浸润型	24	12	16			4	12			12	17		
初发组	30	19	9	4.595	0.032	25	15	4.487	0.034	19	8	5.916	0.015
复发组	26	11	17			5	11			11	18		

大于或等于 10% 为阳性表达(图 3)。

1.4 统计学处理 使用 SPSS10.0 版统计软件作统计分析, ΔNp63、Ki-67 和 VEGF 在膀胱癌中的表达及与临床分期、病理分级的关系采用 χ^2 检验,各指标阳性表达相关性分析采用 Spearman 等级相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ΔNp63、Ki-67 和 VEGF 的表达与膀胱癌病理分级、分期及预后的相关性 ΔNp63、Ki-67 和 VEGF 在正常膀胱黏膜、不同分级及不同分期膀胱癌组织中的阳性表达率见表 1,结果表明,随癌细胞恶性程度及浸润程度增加,ΔNp63、Ki-67、VEGF 的阳性表达有增强趋势,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$);ΔNp63、Ki-67、VEGF 在复发组中的表达均明显高于初发组,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

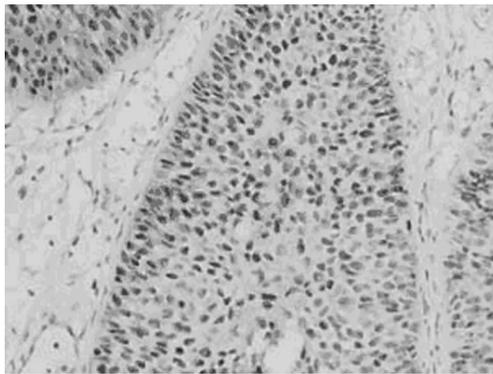


图 1 ΔNp63 在 TCCB 中的阳性表达

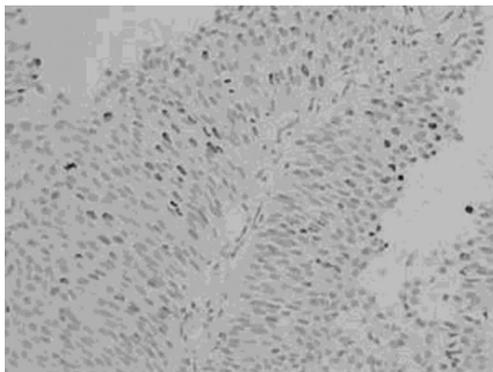


图 2 Ki-67 在 TCCB 中的阳性表达

2.2 ΔNp63 与 VEGF、Ki-67 在 TCCB 中表达的相关性 ΔNp63、Ki-67 和 VEGF 在膀胱癌组织中的表达情况经分别采用 Spearman 等级相关性分析,ΔNp63 与 Ki-67、ΔNp63 与

VEGF 均呈正相关, r_s' 分别为 0.316、0.322,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 ΔNp63 与 Ki-67、VEGF 的相关性分析 (n)

ΔNP63	Ki-67					VEGF				
	-	+	合计	r_s'	P	-	+	合计	r_s'	P
-	16	12	28			9	19	28		
+	24	4	28	0.316	0.018	18	10	28	0.322	0.016
合计	40	16	56			27	29	56		

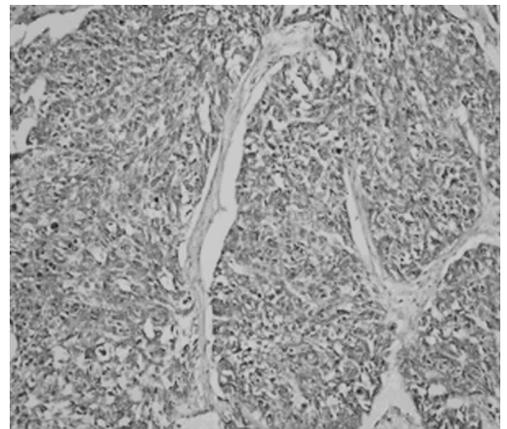


图 3 VEGF 在 TCCB 中的阳性表达

3 讨 论

p63 是 p53 的家族成员之一,主要有 TAp63 和 ΔNp63 两种亚型。p63 在尿路上皮的分化和膀胱癌发生中起着一定的作用^[1]。TAp63 功能类似 p53,ΔNp63 亚型无 TA 区,不具备转录激活活性,是缺乏酸性 N 端反式激活区的 p63,ΔNp63 以显性失活的方式抑制 TAp63 和 p53,主要与细胞增殖有关^[2]。ΔNp63 在膀胱癌中的作用存在争议, Park 等^[3] 研究证实,ΔNp63 在膀胱癌中表达增强,提示 ΔNp63 可能促成膀胱癌的进展。Compérat 等^[4] 研究证实,p63 的表达在膀胱癌进展期间,尤其从低级别向高级别转化过程中逐渐下降。何云锋等^[5] 研究认为,ΔNp63 与 TCCB 的发生密切相关,可能为 TCCB 发生的重要促进因素,但其表达水平和 TCCB 的临床分期、病理分级没有相关性,故 ΔNp63 在 TCCB 进展中的作用有待进一步研究。本实验结果显示,ΔNp63 在 TCCB 中的阳性表达率显著高于正常膀胱组织,并且与肿瘤的浸润程度和病理分级呈正相关,在复发组的表达率显著高于初发组,其差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。随癌细胞恶性程度及浸润程度增加,

Δ Np63 阳性表达有增强趋势。

Δ Np63 与膀胱癌进展的作用机制目前尚不清楚。研究表明, Ki-67 是一种增殖相关核抗原, 与细胞周期密切相关, 是判断肿瘤预后的重要标记物, 其表达越高预后越差^[6]。Ki-67 高表达的膀胱癌分化程度低、浸润性强, 可准确反映细胞增殖状况, 是研究肿瘤生物学行为和预后的一个重要参考指标^[7]。而 VEGF 是内皮细胞特有的有丝分裂原, 参与肿瘤营养血管的发生和构建, VEGF 和表浅性膀胱癌的生物学行为最为密切, 可作为表浅性膀胱癌的相对特异的指标。Yang 等^[8]取 161 例膀胱癌样本用免疫组化的方式研究 VEGF 基因的表达情况, 结果显示, 随着临床分期、分级的增高, VEGF 基因表达的阳性率明显提高。本实验结果显示, Δ Np63、Ki-67 和 VEGF 在 TCCB 中的阳性表达与肿瘤的浸润程度、病理分级及预后呈正相关, Δ Np63 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, Δ Np63 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。

膀胱癌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, 但仍很难准确预测膀胱癌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, 许多膀胱癌的预后判断标记物相继被发现, 但迄今没有任何一种标记物常规应用于临床。膀胱癌的发生和发展是多因素、多基因影响的复杂过程, 仅凭单一的肿瘤标记物不能全面准确地反映肿瘤的恶性潜能。一些学者进行了多指标联合检测判断膀胱癌预后的研究, 周占松等^[8]检测了 p21、p185、p53 蛋白在膀胱癌肿的表达, 说明多个基因协同激活在膀胱移行细胞癌发生、发展中起一定作用。温机灵和周祥福^[9]认为联合检测 p53、p21、Ki-67 和 VEGF 可以更加准确地预测膀胱癌的预后。Khaled 等^[10]经多因素分析显示联合检测 nm23-H1、EGFR 和 p53 是能用于预测高风险膀胱癌的生物学指标, 并且认为除病理学因素外, 联合检测 2 个或 2 个以上标记物对判断预后具有协同作用。本实验采用免疫组化检测了 Δ Np63、Ki-67 和 VEGF 在 TCCB 中的表达。结果显示, 由于 Δ Np63 在尿路上皮的分化中起重要作用, 并且扮演了癌基因的角色, Ki-67 是一种增殖相关核抗原, 反映了肿瘤细胞增殖状况, VEGF 参与肿瘤营养血管的发生和构建, 为肿瘤生长、浸润和转移提供适宜的条件。结果表明, Δ Np63、VEGF 和 Ki-67 表达水平及与 TCCB 分化程度、浸润程度及预后呈正相关, 三者膀胱癌的发生和发展过程中可能有协同作用, 三者表达越高, 肿瘤细胞的生长越活跃, 发生浸润和转移的概率就越大, 预后越差。联合检测 Δ Np63、Ki-67 和 VEGF 在膀胱

移行细胞癌中的表达有助于膀胱癌的预后判断, 并为临床治疗选择提供帮助。

参考文献:

- [1] Mills AA, Zheng BH, Wang XJ, et al. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis[J]. *Nature*, 1999, 398: 708.
- [2] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p63, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers[J]. *Cell*, 1997, 90(4): 809.
- [3] Park BJ, Lee SJ, Lee KSJ, et al. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 3370.
- [4] Compérat E, Camparo P, Haus R, et al. Immunohistochemical expression of p63, p53 and MIB-1 in urinary bladder carcinoma. A tissue microarray study of 158 cases[J]. *Virchows Arch*, 2006, 448: 319.
- [5] 何云锋, 吴小候, 罗春丽, 等. Δ Np63 mRNA 在膀胱癌组织中的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(14): 1350.
- [6] Matsumoto H, Wada T, Fukunaga K, et al. Bax to Bcl-2 ratio and Ki-67 index are useful predictors of neoadjuvant chemotherapy in bladder cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2004, 34(3): 124.
- [7] Yang CC, Hu KC, Yeh WL. The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression[J]. *Urol Oncol*, 2004, 22(1): 1.
- [8] 周占松, 金锡御, 熊恩庆, 等. 膀胱癌 p21、p185、p53 蛋白表达及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2000, 29(6): 505.
- [9] 温机灵, 周祥福. p53、p21、Ki-67 和 VEGF 与膀胱癌分期以及预后的关系[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2007, 22(5): 328.
- [10] Khaled HM, Bahnassy AA, Raafat AA, et al. Clinical significance of altered nm23-H1, EGFR, RB and p53 expression in bilharzial bladder cancer[J]. *BMC Cancer*, 2009, 26(9): 30.

(收稿日期: 2010-03-25 修回日期: 2010-05-06)

(上接第 3055 页)

Int, 2000, 86(6): 648.

- [3] Eaton AC, Francis RN. The provision of transurethral prostatectomy on a day-case basis using bipolar plasma kinetic technology[J]. *BJU Int*, 2002, 89(6): 534.
- [4] Akgül T, Nuhoglu B, Polat O, et al. An in vitro study comparing the coagulation and cautery effects of bipolar and unipolar cutting modalities on prostatic tissue[J]. *Urol Int*, 2009, 83(4): 458.
- [5] 赵晓风, 孙晓飞, 吕志红, 等. 经尿道前列腺等离子双极电切和经尿道前列腺电切治疗良性前列腺增生的临床结果比较[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2006, 27(9): 628.

- [6] Kong CH, Ibrahim MF, Zainuddin ZM. A prospective, randomized clinical trial comparing bipolar plasma kinetic resection of the prostate versus conventional monopolar transurethral resection of the prostate in the treatment of benign prostatic hyperplasia[J]. *Ann Saudi Med*, 2009, 29(6): 429.
- [7] Fung BT, Li SK, Yu CF, et al. Prospective randomized controlled trial comparing plasmakinetic vaporesction and conventional transurethral resection of the prostate[J]. *Asian J Surg*, 2005, 28(1): 24.

(收稿日期: 2010-08-25)