

胃镜活检组织 Ki67 和 E-Cad 水平预测胃癌淋巴结转移的临床价值 *

刘敏¹ 王蕊² 饶卉明¹ 谢华平^{3*}

三亚市人民医院 ¹ 消化内科; ² 病理科, 海南三亚 572000

³ 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科, 湖北武汉 430030

摘要 目的:探讨胃镜活检组织中 Ki67 和 E-Cad 对胃癌诊断及淋巴结转移的评估价值。方法:采用免疫组织化学检测在 60 例浅表性胃炎、60 例萎缩性胃炎及 180 例胃癌内镜活检组织中 Ki67 和 E-Cad 的表达,并按胃癌的临床病理特征分类统计。采用单因素方差分析、卡方检验、Z 检验分析显著性, Spearman 系数分析相关性,受试者工作特征(ROC)曲线分析临床价值。结果:在胃癌组织和胃炎组织中 Ki67 和 E-Cad 阳性表达率存在明显差异(P 均 < 0.01),其中 Ki67 表达在浅表性胃炎、萎缩性胃炎和胃癌活检组织中逐次上升(18.3% vs 31.7% vs 77.2%),而 E-Cad 呈现逐次下降(98.3% vs 84.6% vs 37.8%);在有无淋巴结转移的 2 组胃癌患者之间 Ki67 和 E-Cad 表达率存在明显差异(P 均 < 0.01);Ki67 联合 E-Cad 检测预测淋巴结转移的预测值与实际值呈现强相关性($r = 0.707$);Ki67 和 E-Cad 联合预测在准确度、灵敏度、特异性、阳性及阴性预测值、假阳性及假阴性率等方面皆优于单独预测(P 均 < 0.05),且两者联合预测的 ROC 曲线下面积明显高于单独 Ki67 或 E-Cad 预测(P 均 < 0.01)。结论:Ki67 和 E-Cad 胃癌诊断联合检测对判定和评估胃癌淋巴结转移可能具有参考价值。

关键词 胃癌; Ki67; E-Cad; 萎缩性胃炎; 浅表性胃炎; 淋巴结转移

中图分类号 R735.2 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20230308

Clinical value of Ki67 and E-Cad detection of gastroscopic biopsy tissue in predicting gastric cancer lymph node metastasis

LIU Min¹, WANG Han², RAO Hui-ming¹, XIE Hua-ping^{3*}. ¹Department of Gastroenterology; ²Department of Pathology, the People's Hospital of Sanya, Hainan Sanya 572000, China. ³Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China

Corresponding author: XIE Hua-ping, E-mail: hpxie@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the value of Ki67 and E-Cad detection of gastroscopic biopsy tissue for the diagnosis of gastric cancer and lymph node metastasis. Methods: The expression of Ki67 and E-Cad in endoscopic biopsies of 60 cases of chronic superficial gastritis, 60 cases of chronic atrophic gastritis and 180 cases of gastric cancer was detected by immunohistochemistry, and classified statistically according to the clinicopathological characteristics of gastric cancer. One-way ANOVA, chi-square test and Z-test were used to analyze significance. The Spearman coefficient was used to analyze correlation, and the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze clinical value. Results: There were significant differences in Ki67 and E-Cad positive expression rates between gastric cancer tissues and gastritis tissues ($P < 0.01$), of which Ki67 increased successively in chronic superficial gastritis, chronic atrophic gastritis and gastric cancer cases (18.3% vs. 31.7% vs. 77.2%), while E-Cad showed a gradual decrease in contrast (98.3% vs. 84.6% vs. 37.8%). There were significant differences in the expression rates of Ki67 and E-Cad between the two groups of gastric cancer patients with or without lymph node metastasis (both $P < 0.01$). The predicted value of lymph node metastasis by Ki67 combined with E-Cad detection showed a strong correlation with the actual value ($r = 0.707$). The combined prediction of Ki67 and E-Cad outperformed the prediction alone in terms of accuracy, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, false positive and false negative rates (all $P < 0.05$), and the area under the ROC curve predicted by the two was significantly higher than that of Ki67 or E-Cad alone (both $P < 0.01$). Conclusion: In the diagnosis of gastric cancer, the combined detection of Ki67 and E-Cad may have reference value for the determination and evaluation of gastric cancer lymph node metastasis.

Key words Gastric cancer; Ki67; E-Cad; Superficial gastritis; Atrophic gastritis; Lymphatic metastasis

* 基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(No:21A200430)

* 通信作者:谢华平, E-mail: hpxie@tjh.tjmu.edu.cn, 湖北省武汉市解放大道 1095 号

Ki67 为细胞增殖相关的核抗原,是反映细胞增殖活性的敏感指标,作为病理学生物标志物已应用于多种肿瘤的诊断及预后评判^[1,2]。上皮细胞表型蛋白 E-钙粘蛋白(E-Cadherin,E-Cad)可反映与恶性肿瘤侵袭作用相关的上皮-间质转化的变化。研究显示 E-Cad 可作为一种生物标志物预测早期胃癌的淋巴结转移^[3,4]。上述 2 种蛋白分子在胃癌的发生、发展及预后中如何变化,联合应用能否对预测早期胃癌的淋巴结转移判断提供更高的临床价值,需要进一步验证。本研究检测胃癌、萎缩性胃炎和浅表性胃炎患者胃活检组织中 Ki67 和 E-Cad 蛋白的表达,探讨 2 种分子对胃癌的淋巴结转移的预测效能,为胃癌早期诊治寻找依据。

资料与方法

一般资料 收集 2018 年 1 月-2021 年 6 月间在三亚市人民医院接受胃癌根治术患者 180 例[男 109,女 71,平均年龄(57.8 ± 11.0)岁]术前胃镜活检组织石蜡标本块。纳入标准:①胃镜活检初步诊断为癌变,手术探查及术后病理证实为原发性胃癌;②住院期间临床资料完备,可完整采集性别、年龄、淋巴结转移、组织分化、肿瘤临床分期、浸润深度等资料。同时选取浅表性胃炎患者组织活检标本蜡块 60 例[男 34,女 26,平均年龄(54.5 ± 13.2)岁]和萎缩性胃炎患者组织标本蜡块 60 例[男 37,女 23,平均年龄(55.1 ± 11.8)岁]。本研究经医院伦理委员会批准,患者或家属均知情并签署同意书。

将上述 3 种蜡块标本分为胃癌组、浅表性胃炎组及萎缩性胃炎组,比较 3 组患者性别及年龄,差异无统计学意义(P 均 >0.05)。在胃癌组中,根据胃癌患者临床资料 and 不同病理特征(性别、年龄、淋巴结转移、组织分化、浸润深度和 TNM 分期^[5])将胃癌组再分为淋巴结转移 106 例和无淋巴结转移 74 例;低分化癌 54 例和中高分化癌 126 例;TNM 分期 I-II 期 111 例,III-IV 期 69 例;浸润至黏膜层(T1)87 例,肌层(T2)46 例,浆膜层(T3,T4)47 例。

检测方法 利用免疫组化染色 SP 法检测 Ki67 和 E-Cad 蛋白的表达,SP 试剂盒(北京中衫金桥生物技术有限公司),操作严格按试剂盒说明进行,包括脱蜡,水化,高压抗原修复,3% H_2O_2 孵育,山羊血清封闭,一抗和二抗分别进行室温孵育,DAB 显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化脱水,二甲苯透明,封片等步骤。

判定方法 ①Ki67 结果判定:由 2 位病理科医

师对阳性细胞(细胞核呈深褐色颗粒状染色)进行计数,选择显微镜 200 倍视野下 5 个视野,每个视野计数 50 个细胞,阳性细胞数所占比例为 0~25% 为(-), $>25\% \sim 50\%$ 为(+), $>50\%$ 为(++),(+)和(++)合并计数为阳性例数。若 2 人观察结果差异 $>10\%$,则需重新评定。②E-Cad 结果判定:由 2 位病理科医师采用半定量法对结果进行判定,E-Cad 定位细胞膜呈深棕色细小颗粒状着色,每个细胞着色强度分为无色 0 分,淡棕色 1 分,细胞膜深棕色 2 分,细胞膜和细胞质皆呈深褐色 3 分,选择显微镜 200 倍视野下 5 个视野,每个视野计数 50 个细胞,0~300 分为(-),300~600 分为(+),600~750 分为(++),(+)和(++)合并计数为阳性例数。若 2 人观察结果差异 $>10\%$,则需重新评定。

统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析显著性;计数资料以百分数(%)表示,采用 χ^2 检验进行显著性判定;用 Spearman 系数分析相关性,采用受试者工作特征(receiver operating characteristic curve,ROC)曲线分析单项检测和联合检测对胃癌淋巴结转移的预测价值^[6,7],Z 检验分析显著性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

3 组患者胃组织标本 Ki67 和 E-Cad 的表达 Ki67 在浅表性胃炎组织,部分上皮细胞核和细胞质呈现深褐色着色;萎缩性胃炎,黏膜上皮细胞中深褐色着色,细胞较浅表性胃炎明显增多;胃癌,癌细胞中遍布深褐色着色的细胞,Ki67 在 3 种组织中的表达逐次升高。E-cad 在浅表性胃炎组织,大部分上皮细胞膜和细胞质呈现深褐色着色;萎缩性胃炎,黏膜上皮细胞中深褐色着色细胞较浅表性胃炎明显减少;胃癌,癌细胞多呈浅棕色着色,E-cad 在 3 种组织中的表达逐次降低,见图 1。

胃癌组 Ki67 阳性表达率显著高于浅表性胃炎和萎缩性胃炎组(P 均 <0.01),萎缩性胃炎与浅表性胃炎比较,差异无统计学意义($P = 0.092$)。而 E-Cad 在胃癌组的阳性表达率显著低于浅表性胃炎和萎缩性胃炎组(P 均 <0.01),萎缩性胃炎与浅表性胃炎比较,差异无统计学意义($P = 0.094$),见表 1。

Ki67 蛋白在不同病理分期胃癌患者中的表达差异 有淋巴结转移的 Ki67 蛋白阳性表达率高于无淋巴结转移,低分化的阳性表达率高于中、高分化

(P 均 <0.05)。Ki67 蛋白的表达在 TNM 分期、组织浸润深度等病理特征分组中未见显著差异(P 均 >0.05),见表 2。

E-Cad 蛋白在不同病理分期胃癌患者中的表达差异 有淋巴结转移的 E-Cad 蛋白阴性表达率高于无淋巴结转移; TNM 分期Ⅲ + Ⅳ期 E-Cad 蛋白阴性表达率高于 I + Ⅱ期;肿瘤浸润至浆膜层和肌层的 E-Cad 蛋白阴性表达率高于浸润至黏膜层(P 均 <0.05)。E-Cad 蛋白表达在组织分化等病理特征分组比较,差异无统计学意义(P 均 >0.05),见表 3。

Ki67 和 E-Cad 联合检测对胃癌淋巴结转移的预测效能和临床价值 采用 Ki67 阳性、E-Cad 阴性作为预测有淋巴结转移的标准,分别统计有无淋巴结转移的 2 组患者,单独采用 Ki67 或 E-Cad 的预测值和联合采用 Ki67 和 E-Cad 的预测值,Spearman 相关系数分析显示,Ki67 和 E-Cad 联合预测的预测值与实际值呈现强相关($r = 0.707$),而两指标单独预测的预测值与实际值呈现弱相关($r = 0.246$ 或 0.211),见表 4。联合检测在准确度、灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、假阳性率、假阴性率等方面皆优于单独检测(P 均 <0.05),见表 5。

将 Ki67 阳性、E-Cad 阴性作为检验变量,将有淋巴结转移作为状态变量(1 = 有转移,0 = 无转移),绘制 ROC 曲线。结果显示,联合检测的曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.832,表现出较好的临床价值,而且联合检测 AUC 较单独检测差异显著(P 均 <0.05),见表 6、图 2。

讨 论

Ki67 被认为是目前反映细胞增殖活性最为准确可靠的抗原,其表达水平与细胞增殖呈正相关^[8]。最初是由 L428 细胞系中获得的位于 10 号染色体上的单克隆抗体。研究发现,Ki67 在细胞周期的 G0 期不表达,而在 G1 后期、S 期、G2 期、M 期中表达,特别是高度表达于 G2 期,随着恶性肿瘤细胞的快速增殖,Ki67 阳性细胞增加,而随着肿瘤分期的增高,分化程度降低,细胞增殖更快,Ki67 的表达更高^[9,10]。E-Cad 是一种钙依赖性细胞黏附分子,广泛分布于上皮组织,主要介导同种亲和性细胞-细胞间黏附,并维持上皮细胞的形态,其表达下降时细胞黏附作用减弱,使肿瘤细胞易于脱离原发灶,从而发生浸润及转移^[11,12]。

表 1 3 组胃镜活检组织中 Ki67 及 E-Cad 的表达差异

组别	例	Ki67				E-Cad			
		-	+	++	阳性表达率 (%)	-	+	++	阳性表达率 (%)
浅表性胃炎组	60	49	7	4	18.3 *	1	3	56	98.3 *
萎缩性胃炎组	60	41	15	4	31.7 *	5	12	43	84.6 *
胃癌组	180	41	25	114	77.2	112	33	35	37.8

注:与胃癌组比较, $P < 0.01$

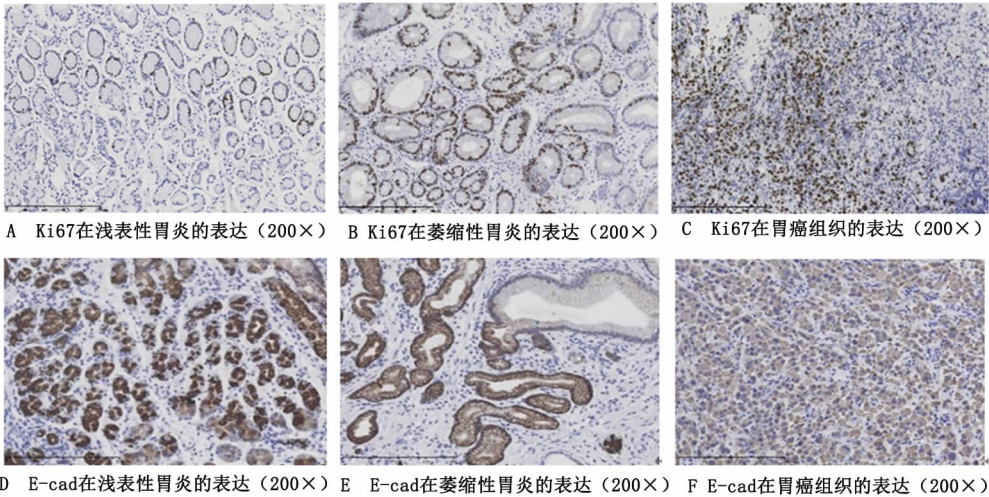


图 1 3 组胃镜活检组织中 Ki67 及 E-Cad 的表达

表 2 Ki67 蛋白的表达在胃癌患者不同临床病理特征分组中的差异[例(%)]

病理特征	例	Ki67		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
淋巴结转移				10.909	0.001
有	106	91(85.8) *	15(14.2)		
无	74	48(64.9)	26(35.1)		
组织分化				13.008	0.00
低分化	54	51(94.4) #	3(5.6)		
中、高分化	126	88(69.8)	38(30.2)		
TNM 分期				0.298	0.585
Ⅰ + Ⅱ 期	111	85(76.6)	26(23.4)		
Ⅲ + Ⅳ 期	69	54(78.3)	15(21.7)		
浸润深度				0.088	0.957
黏膜层	87	68(78.2)	19(21.8)		
肌层	46	35(76.1)	11(23.9)		
浆膜层	47	36(76.6)	11(23.4)		

注:与无淋巴结转移比较,* $P<0.01$;与中、高分化比较,# $P<0.01$

表 3 E-Cad 蛋白的表达在胃癌患者不同临床病理特征分组中的差异[例(%)]

病理特征	例	E-Cad		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
淋巴结转移				7.978	0.005
有	106	31(29.2)	73(70.8) *		
无	74	37 (50.0)	37 (50.0)		
组织分化				0.761	0.383
低分化	54	23(42.6)	31(57.4)		
中、高分化	126	45(35.7)	81(64.3)		
TNM 分期				19.783	0.00
Ⅰ + Ⅱ 期	111	56(50.5)	55(49.5)		
Ⅲ + Ⅳ 期	69	12(17.4)	57(82.6) #		
浸润深度				20.290	0.00
黏膜层	87	48(55.2)	39(44.8)		
肌层	46	8(17.4)	38(82.6) Δ		
浆膜层	47	14(29.8)	33(70.2) Δ		

注:与无淋巴结转移比较,* $P<0.01$;与Ⅰ + Ⅱ 期比较,# $P<0.01$;与黏膜层比较, $\Delta P<0.01$

表 4 单独与联合 Ki67 和 E-Cad 检测预测淋巴结转移值的预测值比较

淋巴结转移	例	Ki67		E-Cad		Ki67 + E-Cad	
		预测有	预测无	预测有	预测无	预测有	预测无
有	106	91	15	75	31	102	5
无	74	48	26	37	37	22	52
r 值		0.246		0.211		0.707	
P 值		0.001		0.005		0.00	

表 5 Ki67 和 E-Cad 单独和联合预测胃癌淋巴结转移的效能(%)

指标	准确度	灵敏度	特异性	阴性预测值	阳性预测值	假阳性率	假阴性率
Ki67 阳性	65(117/180)	85.8(91/106)	35.1(26/74)	63.4(26/41)	65.5(91/139)	64.9(48/74)	14.2(15/106)
E-Cad 阴性	62.2(112/180)	70.8(75/106)	50.0(37/74)	54.4(37/68)	67.0(75/112)	50.0(37/74)	29.2(31/106)
Ki67 + E-Cad	85.6(154/180) **	96.2(102/106) **	70.3(52/74) **	92.9(52/56) **	82.3(102/124) **	29.7(22/74) **	3.8(4/106) **

注:与 Ki67 阳性比较,* $P<0.05$;与 E-Cad 阴性比较,# $P<0.05$

表 6 Ki67 和 E-Cad 联合检测与单独检测预测胃癌淋巴结转移 ROC 曲线的 AUC 比较

指标	AUC	S. E. 值	95% 置信区间	Z 值	P 值
Ki67	0.605	0.044	0.519 ~ 0.691	4.087	0.00
E-Cad	0.604	0.043	0.519 ~ 0.689	4.135	0.00
Ki67 + E-Cad	0.832	0.034	0.765 ~ 0.900		

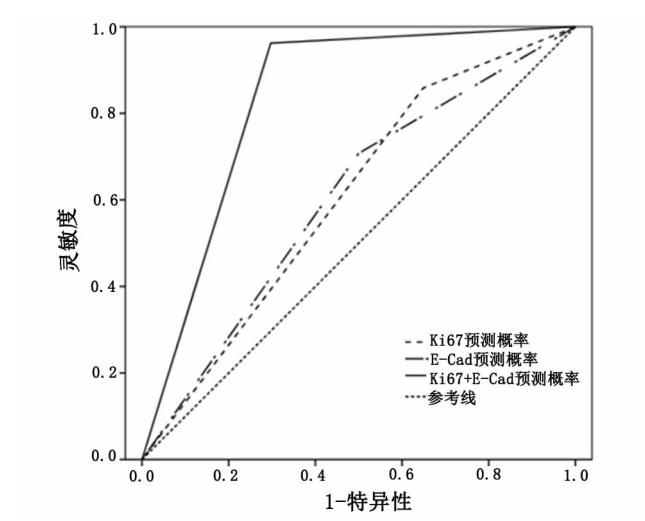


图 2 Ki67 和 E-Cad 联合检测与单独检测预测胃癌淋巴结转移的 ROC 曲线

本研究中 Ki67 和 E-Cad 表达水平在胃炎和胃癌患者之间均存在明显差异,表明胃癌的发展中这 2 种分子发生了明显变异,因此这 2 种与肿瘤增殖和侵袭相关的分子有可能成为早期预测胃癌的生物标志物,但是与血清标志物预测效能比较,灵敏度和特异性均无明显优势^[13,14]。通过分析胃癌不同临床病理特征患者的 Ki67 和 E-Cad 的表达水平发现 Ki67 和 E-Cad 阳性病例数在有无淋巴结转移的 2 组胃癌患者之间表达有明显差异 ($P < 0.05$),推测 Ki67 和 E-Cad 检测可能对预测胃癌的淋巴结转移具有临床价值,由于 Ki67 和 E-Cad 的表达量在胃癌组织中呈现相反趋势,因此采用 Ki67 阳性、E-Cad 阴性作为预测有淋巴结转移的标准,通过分析是否发生淋巴结转移的 2 组实际值与预测值之间的关联性发现联合预测的 Spearman 相关系数达到了 0.707,呈现强相关(通常认为系数处于 0.5~1 之间为强关联),而单独预测的关联系数分别为 0.246 和 0.211,表现为弱相关。本研究发现联合预测在准确度、灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、假阳性率、假阴性率等方面皆优于单独预测 (P 均 < 0.05),而且联合预测的 AUC 高于单一指标预测,表明 Ki67 和 E-Cad 联合检测对胃癌淋巴转移方面更具临床价值。

参考文献

- 1 Jiang P, Jia MZ, Hu J, et al. Prognostic value of Ki67 in patients with stage 1-2 endometrial cancer: validation of the cut-off value of Ki67 as a predictive factor[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 10841-10850.
- 2 Wang YH, Zong BG, Yu Y, et al. Ki67 index changes and tumor-infiltrating lymphocyte levels impact the prognosis of triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy [J]. Front Oncol, 2021, 11: 668610.
- 3 许华丽, 朱柯, 冯燕. 上皮特异性黏附分子在肿瘤中的表达研究进展[J]. 中外医学研究, 2020, 18 (16): 175-177.
- 4 Piccolo G, Zanghi A, Di Vita M, et al. The role of E-Cadherin expression in the treatment of western undifferentiated early gastric cancer: Can a biological factor predict lymph node metastasis? [J]. PLoS One, 2020, 15 (4): e0232429.
- 5 王海瑞, 王甄, 原翔, 等. 食管鳞癌患者癌性贫血的危险因素分析[J]. 内科急危重症杂志, 2021, 27 (1): 23-25.
- 6 肖倩, 何正光, 罗晓斌, 等. 血清癌胚抗原联合神经元特异性烯醇化酶可预测晚期肺腺癌患者酪氨酸激酶抑制剂治疗的疗效[J]. 内科急危重症杂志, 2021, 27 (5): 416-418.
- 7 化宝军, 汤嘉敏, 杨湛, 等. 腹膜透析患者腹透液中转化生长因子 $\beta 1$ 、血管内皮生长因子、结缔组织生长因子水平可预测远期腹膜溶质转运功能改变[J]. 内科急危重症杂志, 2022, 28 (1): 37-41.
- 8 Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, et al. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker[J]. Clinica Chimica Acta, 2019, 491: 39-45.
- 9 Yang C, Zhang J, Ding M, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy[J]. Clin Transl Oncol, 2018, 20 (5): 570-575.
- 10 卢林俊, 纪慧芹, 邓双. KIAA1199 和 Ki67 在胃癌组织中表达的相关性及其临床意义[J]. 医学分子生物学杂志, 2021, 18 (4): 316-320.
- 11 Rubtsova SN, Zhitnyak IY, Gloushankova NA. Dual role of E-cadherin in cancer cells[J]. Tissue Barriers, 2022, 10 (4): 2005420.
- 12 Gullo I, Carneiro F, Oliveira C, et al. Heterogeneity in gastric cancer: From pure morphology to molecular classifications[J]. Pathobiology, 2018, 85 (1-2): 50-63.
- 13 樊祥山, 陈杰, 薛卫成. 基于癌组织的生物标志物病理学检测有助于进展期胃癌患者个体化精准诊治[J]. 中华病理学杂志, 2021, 50 (2): 84-89.
- 14 李继斌, 王瑞, 汤水平. 血清肿瘤标志物和免疫组化指标与胃癌临床病理特征的相关性[J]. 医学临床研究, 2021, 38 (12): 12-14, 18.