

网络出版时间: 2018-9-25 14:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.024.html>

## 上皮性卵巢癌中 V-ATPase 与 Ki-67 的表达及其临床意义

李泽莲 杨媛媛 韦雯雯 何 静 颜士杰 肖 兰

**摘要** 目的 探讨液泡膜-ATP 酶(V-ATPase)及 Ki-67 在上皮性卵巢癌(EOC)的表达、临床意义及二者的相关性。方法 免疫组织化学染色法检测 EOC 及正常卵巢上皮组织中 V-ATPase 及 Ki-67 蛋白的表达,分析两者相关性及 V-ATPase 与 EOC 临床病理特征、肿瘤发展的关系。结果 V-ATPase 蛋白在 EOC 组织阳性表达率与正常卵巢上皮细胞组织阳性表达率相比(61.3% vs 12.5%),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。V-ATPase 表达与 EOC 患者的年龄、病理类型、脉管浸润无明显相关性( $P > 0.05$ ),而与卵巢癌 FIGO 分期( $P = 0.002$ )、病理分级( $P = 0.001$ )、淋巴结转移( $P = 0.020$ )以及肿瘤大小( $P = 0.015$ )有明显相关性( $P < 0.05$ )。且在 EOC 中,V-ATPase 和 Ki-67 阳性表达呈正相关性( $r_s = 0.238, P < 0.05$ )。结论 V-ATPase 在 EOC 组织中高表达。V-ATPase 和 Ki-67 可能共同参与 EOC 肿瘤的发生发展,二者结合检测有可能对卵巢恶性肿瘤的临床诊断和治疗有一定价值。

**关键词** 上皮性卵巢癌; V-ATPase; Ki-67

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1771-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.024

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)病死率高居女性生殖系统肿瘤首位,确诊时多处于晚期,相对其他妇科肿瘤,恶性程度高,III 期 EOC 患者其 5 年生存率为 23%~41%,对于 IV 期癌症患者仅为 11%<sup>[1]</sup>。卵巢癌化疗耐药是制约其临床疗效、导致其远期生存率低的关键<sup>[2]</sup>。肿瘤微环境变化与肿瘤侵袭、进展和耐药密切相关,而肿瘤组织中液泡膜-ATP 酶(vacuolar membrane-ATPase, V-ATPase)表达过量或活性增高是形成肿瘤酸性微环境重要原因之一<sup>[3]</sup>。Ki-67 是与增殖细胞相关的核抗原,有研究<sup>[4]</sup>显示淋巴结转移患者卵巢癌组织中 Ki-67 表达水平明显高于未发生淋巴结转移的患者,且阳性率高, Ki-67 表达越高,患者体内的肿瘤细胞增殖速率越快,更易侵袭而发生淋巴结转移。目前 V-ATPase 在 EOC 中表达的临床意义以及与 Ki-67 表达相关性尚未见报道。该研究通过免疫组化方法

2018-07-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81603138);安徽省中央引导地方科技发展专项项目(编号:2017070802d149)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

作者简介:李泽莲,女,硕士,住院医师;

肖 兰,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: emma\_02000@163.com

global radial strain (GRS) as well as serum Hs-cTnT test was performed at baseline, at the end of the third and sixth chemotherapy cycles, respectively. **Results** From baseline to the sixth chemotherapy cycles, serum Hs-cTnT concentrations were markedly increased in turn although they were still within the normal reference range, and GAS, GCS, GLS, E/A ratio were all slightly reduced in turn, too. While, LVESV, LVEDV, LVEF and GRS were not significantly changed after chemotherapy. The Pearson correlation analysis showed that only GAS correlated significantly with Hs-cTnT ( $r = -0.34, P < 0.0001$ ). No matter discriminating between before and after anthracycline chemotherapy or predicting a twice serum Hs-cTnT level as much as baseline, the areas under receiver operating characteristic curve (AUC) for GAS were all maximal (0.93 and 0.74, respectively). The cutoff value with -30.5% of GAS had sensitivity of 85.7%, specificity of 89.2% and accuracy of 87.6% for differentiating patients after therapy from baselines, and had sensitivity of 75.1%, specificity of 62.9% and accuracy of 70.3% for predicting a twice serum Hs-cTnT level as much as baseline. **Conclusion** 3D STE derived GAS is a good predictor of increased serum high-sensitivity cardiac troponin T concentrations even within the normal reference range in patients with breast cancer during the anthracycline chemotherapy cycles, which holds considerable clinical promise for detecting subclinical chemotherapy-related cardiotoxicity, and for initiating cardioprotective therapy without delay.

**Key words** anthracycline; chemotherapy; cardiotoxicity; breast cancer; three-dimensional echocardiography; speckle tracking imaging; left ventricular systolic function; serum high-sensitivity cardiac troponin T

分析 V-ATPase 和 Ki-67 在 EOC 中表达及其与临床病理特征的关系,旨在探讨两者在卵巢上皮性肿瘤中的表达和意义。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取 2015 年 1 月~2016 年 12 月在安徽医科大学第一附属医院进行手术切除的 75 例 EOC 患者的病理标本(术前均未行放疗或生物治疗)。经病理科确诊后收集其完整的临床病理资料。实验组:年龄( $54.15 \pm 8.03$ )岁,卵巢肿瘤按照 FIGO 的分期标准分为:Ⅰ~Ⅱ期 15 例,Ⅲ~Ⅳ期 60 例。卵巢肿瘤按照 WHO 组织学分级标准分为:浆液性腺癌 32 例,黏液性腺癌 38 例,其他类型 5 例。并同期收取非卵巢疾病患者手术切除的正常卵巢组织 40 例,年龄( $52.09 \pm 7.32$ )岁。标本的收集均获得患者的知情并签订知情同意书。有完整的随访资料。

**1.2 方法** 将患者的临床病理资料,如年龄、病理类型、临床分期、肿瘤分级、淋巴转移、脉管浸润、肿瘤大小与 V-ATPase 表达进行比较。并选用 Ki-67 作为肿瘤细胞标志物,采用免疫组织化学进行检测。石蜡块标本连续切片,切片厚  $4 \mu\text{m}$ ,切片进行抗原修复,经过脱蜡、脱二甲苯、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  封闭和枸橼酸修复液微波修复后,一抗 V-ATPase-D1(1:500)、Ki-67(1:600)(美国 Santa Cruz 公司)孵育 4℃ 过夜,次日复温后,抗兔二抗(1:2000) 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,显微镜下加 DAB(5%)显色。经苏木精复染、乙醇化、脱水和中性树脂封片,并在室温风干后光镜下观察。以在细胞质、细胞膜中出现棕褐色细颗粒状为阳性。免疫组织化学结果依据细胞质或细胞膜中出现棕黄色颗粒为 V-ATPase 蛋白表达阳性细胞,对于每例均随机观察 10 个高倍视野( $\times 200$ ),镜下未观察到阳性细胞为阴性(-),镜下阳性细胞数  $< 5\%$  为弱阳性(1+),镜下阳性细胞数  $5\% \sim 25\%$  为阳性(2+),镜下阳性细胞数  $> 25\%$  为强阳性(3+)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。计数资料采用率(%)表示,采用  $\chi^2$  检验或者 Fish-

er's 确切概率法进行比较,V-ATPase 与 Ki-67 关系应用 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EOC 组织过表达 V-ATPase** 如图 1 所示,EOC 组织的胞膜及胞质中均有 V-ATPase 阳性染色,见棕黄色染色,且着色明显。但在正常卵巢上皮组织中,V-ATPase 蛋白阳性着色淡,主要位于细胞质中,细胞膜不表达。EOC 组织阳性表达率与正常卵巢上皮组织 V-ATPase 蛋白阳性表达率相比( $61.3\% \text{ vs } 12.5\%$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。相应标记肿瘤细胞标记抗原 Ki-67 表达与 V-ATPase 表达呈一致性(图 2)。

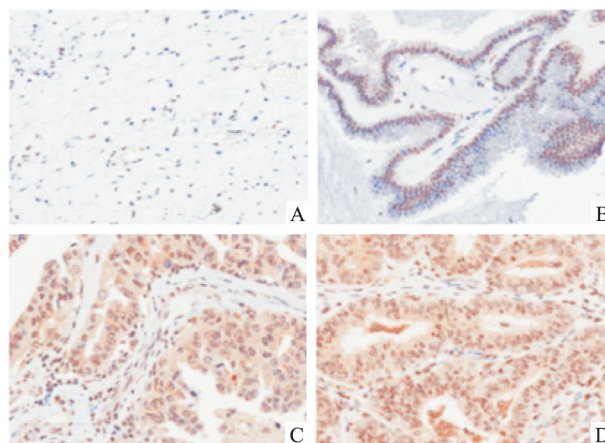


图 1 V-ATPase 表达  $\times 200$

A: V-ATPase 在正常卵巢上皮细胞中的表达为(-); B~D: V-ATPase 在 EOC 中的表达程度分别为弱阳性(1+)、阳性(2+)、强阳性(3+)

**2.2 V-ATPase 表达与 EOC 临床病理的关系** V-ATPase 表达与 EOC 患者的年龄、病理类型、脉管浸润无明显相关性( $P > 0.05$ ),而与 EOC FIGO 分期( $P = 0.002$ )、病理分级( $P = 0.001$ )、淋巴结转移( $P = 0.020$ )以及肿瘤大小( $P = 0.015$ )有明显相关性( $P < 0.05$ ),见表 2。

**2.3 EOC 中 V-ATPase 和 Ki-67 的相关性分析** 经 Spearman 等级相关分析显示,V-ATPase 与 Ki-67

表 1 正常卵巢上皮及 EOC 组织中 V-ATPase 及 Ki-67 阳性表达率比较(n)

组别	V-ATPase 蛋白表达				Ki-67 蛋白表达			
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
正常卵巢组(n=40)	35	5	0	0	36	4	0	0
卵巢癌组织(n=75)	29	10	21	15	12	18	23	22

蛋白在 EOC 中呈正相关性 ( $r_s = 0.238, P < 0.05$ ), 见表 3。

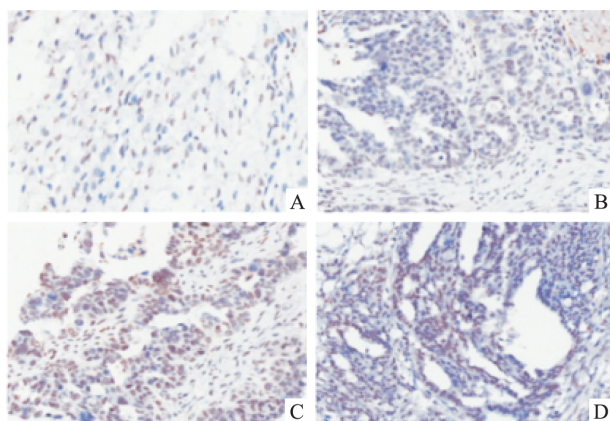


图2 Ki-67 表达  $\times 200$

A: Ki-67 在正常卵巢上皮细胞中的表达为(-); B~D: Ki-67 在 EOC 中分别为弱阳性(1+)、阳性(2+)、强阳性(3+)

表2 V-ATPase 的表达与 EOC 临床病理参数的关系

影响因素	n	V-ATPase 表达		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性( n = 46)	阴性( n = 29)		
年龄(岁)					
>54	39	25	14	0.263	0.608
≤54	36	21	15		
FIGO 分期					
I ~ II 期	15	4	11	9.501	0.002
III ~ IV 期	60	42	18		
淋巴结转移					
有	46	33	13	5.432	0.020
无	29	13	16		
脉管浸润					
有	45	31	14	2.708	0.098
无	30	15	15		
病理类型					
黏液性	38	23	15	0.921	0.665
浆液性	32	20	12		
其他	5	2	3		
分化程度					
G1	10	2	8	14.853	0.001
G2	34	18	16		
G3	31	26	5		
肿瘤大小( cm)					
<10	59	32	27	5.872	0.015
≥10	16	14	2		

表3 EOC 组织 V-ATPase 与 Ki-67 蛋白的关系( n)

Ki-67 蛋白	V-ATPase 蛋白				$r_s$ 值	P 值
	-	+	++	+++		
-	9	1	1	1	0.238	0.04
+	4	7	4	3		
++	7	1	13	2		
+++	9	1	3	9		

### 3 讨论

目前,卵巢癌仍是威胁女性生殖健康的主要恶性疾病,其发病率有逐年上升趋势,虽然卵巢癌临床治疗技术已显著提高,但由于不能早期诊断及术后化疗耐药,总的5年生存率仍无明显改善。因此,从分子水平上研究卵巢癌发生、发展机制,寻找合理有效的治疗靶点,是提高卵巢癌生存率、延长生存期、改善生活质量的关键。

V-ATPase 位于肿瘤细胞小泡的膜,如溶酶体膜、高尔基体的囊泡膜以及植物液泡膜上,主要参与调节细胞内外的 pH 值,将肿瘤细胞糖酵解产生的大量  $H^+$  泵出细胞外,维持肿瘤细胞的生存及其酸性微环境。研究<sup>[5-6]</sup>表明肿瘤微环境影响微血管形成、肿瘤的生长、侵袭和转移,影响肿瘤细胞对放疗、化疗的敏感性,尤其是酸性微环境与肿瘤增殖、转移和化疗耐药都有关。

本研究中 75 例 EOC 组织中 V-ATPase 阳性表达率为 61.3%,在肿瘤细胞膜及细胞质中均表达,同期正常卵巢上皮组织中阳性表达仅为 12.5%,故推测 V-ATPase 高表达与 EOC 发生有关。分析 V-ATPase 表达与 EOC 临床病理特征的关系,显示 V-ATPase 表达与 EOC 患者年龄、病理类型无明显相关,而与肿瘤 FIGO 分期相关(V-ATPase 阳性表达率 I ~ II 期为 26.7% vs III ~ IV 期为 70%) 提示 EOC 分期越晚, V-ATPase 阳性表达率越高, V-ATPase 过表达亦与 EOC 的发展呈正相关性。本研究中 V-ATPase 表达与 EOC 的淋巴结转移、肿瘤组织的分化程度以及肿瘤大小均显示显著相关,提示 EOC V-ATPase 高表达的肿瘤增殖较快,较容易发生淋巴结转移。有动物研究<sup>[6]</sup>提示,在无胸腺的小鼠腹腔里种植卵巢癌细胞,紫杉醇加奥美拉唑联合治疗相比单用紫杉醇,肿瘤体积明显降低;另有研究<sup>[7]</sup>表明抑制 V-ATPase 可诱导 Bnip3 依赖的肿瘤细胞死亡,从而降低肿瘤负荷和转移。本研究及以上结论均表明 V-ATPase 高表达与瘤体体积相关。卵巢肿瘤病灶体积 <5 cm 直径时 CA125 不易被检测到,因而推论 V-ATPase 比 CA125 具有更强的灵敏性和特异性。最近的研究<sup>[8-10]</sup>提示 V-ATPase 在乳腺癌及胃肠道恶性肿瘤的生长、转移及侵袭起着重要作用。Ki-67 是一种与细胞增殖相关的核抗原,是反映恶性肿瘤细胞增殖活性的重要分子标志物,几乎表达于所有增殖细胞,与肿瘤增殖、浸润转移及预后关系密切。本研究显示, V-ATPase 过表达病例中 Ki-67

指数亦呈增高趋势, V-ATPase 和 Ki-67 抗原表达呈明显正相关性, 即 V-ATPase 表达水平越高, 肿瘤细胞增殖越活跃。V-ATPase 导致肿瘤酸性微环境形成, 该环境促进 EOC 细胞异常增殖和恶性转化。故认为 Ki-67 可能是 V-ATPase 调控肿瘤酸性微环境形成, 肿瘤细胞过度增殖标志之一。

V-ATPase 异常表达使得肿瘤酸性微环境得以产生及维持, 目前以 V-ATPase 为靶点, 纠正肿瘤酸性微环境已成为克服肿瘤耐药的一种极具潜力的治疗手段。Ki-67 是一种判断细胞增殖状态的指标, 将两者结合起来, 对于判断 EOC 的预后和肿瘤靶向治疗的效果极有意义。

### 参考文献

- [1] Peppicelli S, Andreucci E, Ruzzolini J, et al. The acidic micro-environment as a possible niche of dormant tumor cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74( 15): 2761–71.
- [2] Luciani F, Spada M, De Milito A, et al. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96 ( 22): 1702–13.
- [3] Huber V, De Milito A, Harguindey S, et al. Proton dynamics in cancer [J]. *J Transl Med*, 2010, 8: 57.
- [4] 张彩霞, 王丽萍, 武建军, 等. ILT4 与 Ki67 在上皮性卵巢癌淋巴结转移患者中的表达情况 [J]. *癌症进展*, 2016, 14( 6): 591–3.
- [5] Kulshrestha A, Katara G K, Ginter J, et al. Selective inhibition of tumor cell-associated Vacuolar-ATPase 'a2' isoform overcomes cis-platin resistance in ovarian cancer cells [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10 ( 6): 789–805.
- [6] Lee Y Y, Jeon H K, Hong J E, et al. Proton pump inhibitors enhance the effects of cytotoxic agents in chemoresistant epithelial ovarian carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 ( 33): 35040–50.
- [7] Graham R M, Thompson J W, Webster K A. Inhibition of the vacuolar ATPase induces Bnip3-dependent death of cancer cells and a reduction in tumor burden and metastasis [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 ( 5): 1162–73.
- [8] Zeng X, Liu L, Zheng M, et al. Pantoprazole, an FDA-approved proton-pump inhibitor, suppresses colorectal cancer growth by targeting T-cell-originated protein kinase [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 ( 16): 22460–73.
- [9] Hendrix A, Sormunen R, Westbroek W, et al. Vacuolar H<sup>+</sup> ATPase expression and activity is required for Rab27B-dependent invasive growth and metastasis of breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133( 4): 843–5.
- [10] 赵加应, 蔡元坤, 李小静, 等. 液泡膜-ATP 酶与 P-糖蛋白在结肠癌组织中的表达及临床意义 [J]. *中华普通外科杂志*, 2014, 29( 10): 771–4.

## Expression levels of V – ATPase and Ki – 67 in epithelial ovarian carcinoma and its clinical significance

Li Zelian, Yang Yuanyuan, Wei Wenwen, et al

( Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the expression and clinical significance of vacuolar membrane-ATPase ( V-ATPase ) and Ki-67 in epithelial ovarian cancer ( EOC ). **Methods** The expression of V-ATPase and Ki-67 protein in EOC and epithelial ovarian tissues were detected by immunohistochemistry method, their relationship was evaluated, and the correlation between V-ATPase and clinicopathological features and tumor progression were analyzed. **Results** The positive expression of V-ATPase was 61.3% in patients with EOC, significant higher than that in epithelial ovarian tissues ( 12.5% ). There was no significant correlation between V-ATPase expression and age, pathological type, and vascular invasion in patients with epithelial ovarian cancer (  $P > 0.05$  ). Expression of V-ATPase was significant associated with clinical stage (  $P = 0.002$  ), tumor grade (  $P = 0.001$  ), lymph node metastasis (  $P = 0.020$  ) and tumor size (  $P = 0.015$  ). In EOC, the positive expression of V-ATPase was closely related with Ki-67 (  $r_s = 0.238$ ,  $P < 0.05$  ). There was a positive correlation between the expression of V-ATPase and Ki-67 (  $r_s = 0.238$ ,  $P < 0.05$  ). **Conclusion** The expression of V-ATPase is up-regulated in EOC tissues. V-ATPase and Ki-67 may be involved in the evolution and progression of EOC. Combination detection of V-ATPase and Ki-67 may play an important role in the clinical diagnosis and treatment of malignant EOC.

**Key words** epithelial ovarian cancer; V-ATPase; Ki-67