

# 胃癌中 $\beta$ -catenin、ki67 与 Her-2/Neu 的关系及临床意义

侯宝洲<sup>1</sup>, 孙剑经<sup>2</sup>, 赵秀芳<sup>3</sup>, 白睿<sup>3</sup>, 韩世强<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 的蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系,探讨分析  $\beta$ -catenin、ki67 与 Her-2/Neu 蛋白表达、基因状态的相关性。方法 采用免疫组化(SP)法检测 101 例胃癌标本中  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 的蛋白表达,同时采用荧光原位杂交(FISH)技术对 Her-2/Neu 基因状态进行检测。结果  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 的蛋白表达与胃癌临床病理特征关系密切: $\beta$ -catenin、ki67 与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移具有显著相关性( $P < 0.05$ ); ki67 与胃癌 TNM 分期具有显著相关性( $P < 0.05$ ); Her-2/Neu 与胃癌的分化程度、TNM 分期具有显著相关性( $P < 0.05$ ),而与胃癌的浸润深度、淋巴结转移无显著相关性。ki67 蛋白表达与 Her-2/Neu 蛋白表达及基因扩增状态具有显著相关性( $r_{\text{蛋白}} = 0.567, P < 0.05$ ;  $r_{\text{基因}} = 0.304, P < 0.05$ )。结论 联合检测  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 可作为了解胃癌生物学行为、胃癌诊断、判断预后的可靠指标。ki67 可作为初筛 Her-2/Neu 基因状态的另一参考条件,对提高 Her-2/Neu 基因扩增检测效率、减少医用检测材料的浪费、指导临床靶向治疗可能有一定的意义。

**关键词** 胃癌;  $\beta$ -catenin; ki67; Her-2/Neu; 免疫组化; 荧光原位杂交; 肿瘤标志物

中图分类号 R 573.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0258-04

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,以侵袭、转移等为其重要特征,是导致患者死亡重要原因<sup>[2]</sup>。ki67 的功能与染色质关系密切,是目前应用最广的细胞增殖标志物之一; $\beta$ -catenin 在 Wnt 通路中具有信号转导和细胞黏附双重作用; Her-2/Neu 基因的扩增状态是分子靶向治疗药物有无疗效的关键。该研究旨在探讨  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 蛋白表达与胃癌的发生、发展、生物学行为及病理特征的关系;分析  $\beta$ -catenin、ki67 与 Her-2/Neu 蛋白表达、基

因状态的关系,以期作为筛查 Her-2/Neu 基因状态找到较为可靠的参考指标。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取 2012 年 3 月~2013 年 5 月在河北北方学院附属第一医院住院行手术切除的 101 例胃癌患者,同时选取病理证实切端无癌变的正常胃黏膜的新鲜组织 76 例作为对照组。入选病例手术前未进行任何抗肿瘤治疗且病历资料完整,由两位副主任医师读片。所有切片均经 HE 染色观察确诊为腺癌,其中男 52 例,女 49 例,年龄 34~80 岁,平均 57 岁,肿瘤  $\phi \geq 5$  cm 70 例,  $< 5$  cm 31 例。101 例观察样本中的肿瘤细胞分化程度按 WHO 标准划分为高-中分化组腺癌 51 例,低分化组腺癌 50 例;按美国癌症联合委员会(American joint committee on cancer, AJCC)病理学分期(pathological TNM classification, pTNM): I~II 期 58 例, III~IV 期 43 例;按肿瘤浸润深度分为浸润至浆膜以内 57 例,浸润至浆膜及以外 44 例;根据有无淋巴结转移分为有淋巴结转移 68 例,无淋巴结转移 33 例。

**1.2 主要仪器与试剂** 实验所需仪器由河北北方学院附属第一医院病理科提供: LEICA BM2135 型石蜡切片机(美国 AO 公司); BX-50 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); 恒温烤箱(上海跃进医疗器械厂); 原位杂交仪 ThermoBrite™(美国雅培公司)等。免疫组化相关试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司); Her-2/Neu 荧光原位杂交(FISH)技术检测试剂盒及试剂(北京金菩嘉医疗科技有限公司)。

**1.3 方法** 免疫组化染色方法:采用 SP 法进行染色,并按照 SP 试剂盒说明书操作,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。Her-2/Neu FISH 检测方法:标本处理及 FISH 检测严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.4 结果判定** 免疫组化染色结果判定:  $\beta$ -catenin 与 ki-67 阳性细胞计数是指在光镜下每张切片随机选择 5 个视野,采用双评分法,阳性细胞百分率评分  $\leq 10\%$  为 0 分,  $11\% \sim 50\%$  为 1 分,  $51\% \sim 75\%$  为 2 分,  $> 75\%$  为 3 分;染色强度评分:无显色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将上

2013-09-27 接收

基金项目:河北省科学技术研究与发展指导计划项目(编号:072761261)

作者单位:<sup>1</sup>河北北方学院研究生部,张家口 075031

<sup>2</sup>河北北方学院附属第一医院<sup>2</sup> 消化内科、<sup>3</sup> 病理科,张家口 075061

作者简介:侯宝洲,男,硕士研究生;

孙剑经,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: sunjianjing50@aliyun.com

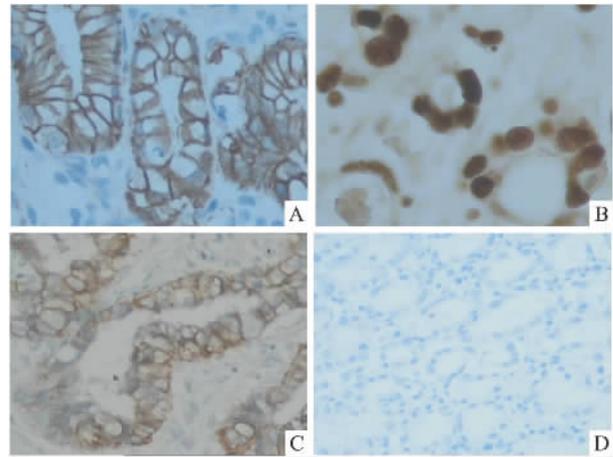
述 2 项得分相加: 1~2 分判为“1+” 3~4 分判为“2+” 5~6 分判为“3+”。最终分为以下等级: “-”为阴性, “1+~3+”合并为阳性。Her-2/Neu 评分参考 HercepTest 的标准<sup>[3]</sup>, 以细胞膜出现棕黄色染色为阳性。Her-2/Neu 基因 FISH 结果判定: 计数 30 个细胞, 统计 Ratio 值( Ratio 值 = 30 个细胞核中红信号总数/30 个细胞核中绿信号总数); 结果判断标准: ① Ratio < 1.8 为阴性结果, 提示该样本无 Her-2/Neu 基因扩增; ② Ratio > 2.2 为阳性结果, 提示样本中 Her-2/Neu 基因发生扩增; ③ Ratio 介于 1.8~2.2 时, 可以选择增加计数细胞至 100 个, 或重做 FISH 实验来判断最终结果。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 差异性检验用  $\chi^2$  检验及 Fisher 确切概率法; Spearman 相关系数检验分析指标之间的相关性。

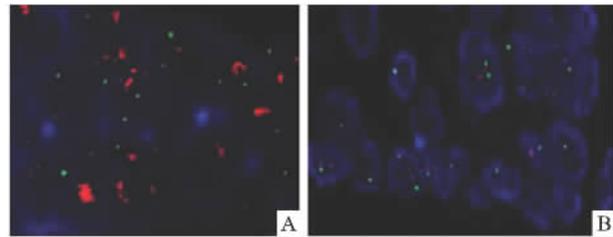
**2 结果**

**2.1  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 在胃癌组织中的表达**  $\beta$ -catenin、ki67 阳性表达定位于细胞核, Her-2/Neu 以细胞膜出现染色为阳性染色, 三者阳性表达显示为浅棕或深棕色, 见图 1。Her-2/Neu 基因 FISH 结果: Her-2/Neu 基因扩增者( 阳性) 红信号成簇状或弥散点状分布( Ratio 值 > 2.2 ), Her-2/Neu 基因未扩增者( 阴性) 呈点状分布( Ratio 值 < 1.8 ), 见图 2。101 例胃癌原发灶免疫组化染色结果显示:  $\beta$ -catenin 评分为 0、1+、2+ 及 3+ 的例数分别为 26 例( 25.7%)、4 例( 4%)、29 例( 28.7%)、42 例( 41.6%); ki67 评分为 0、1+、2+ 及 3+ 的例数分别为 20 例( 19.8%)、24 例( 23.8%)、15 例( 14.8%)、42 例( 41.6%); Her-2/Neu 蛋白 2+ 及 3+ 的例数分别为 6 例( 6%)、10 例( 10%); 三者的总阳性率分别为 74.3%( 75 例)、80.2%( 81 例)、15.8%( 16 例), 明显高于对照组 28 例( 36.8%)、19 例( 25%)、1 例( 1.3%), 观察组与对照组之间差异有统计学意义(  $P < 0.05$  )。

**2.2  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 的表达与胃癌临床病理特征的关系**  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 均与胃癌的性别、年龄、肿瘤直径无显著相关性;  $\beta$ -catenin、ki67 与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移有显著相关性(  $P < 0.05$  ),  $\beta$ -catenin 与胃癌 TNM 分期无显著相关性, ki67 与胃癌 TNM 分期有显著相关性(  $P < 0.05$  ); Her-2/Neu 与胃癌的分化程度、TNM 分期有显著相关性(  $P < 0.05$  ), 与胃癌的浸润深度、淋巴结转移无显著相关性, 见表 1。



**图 1  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 在胃癌组织中的表达**  
A:  $\beta$ -catenin 蛋白阳性表达( 3+ )  $\times 400$ ; B: ki67 蛋白阳性表达( 3+ )  $\times 400$ ; C: Her-2/Neu 蛋白阳性表达( 2+ )  $\times 400$ ; D: Her-2/Neu 蛋白阴性表达  $\times 100$



**图 2 Her-2/Neu 基因 FISH 检测  $\times 200$**   
A: Her-2/Neu 基因扩增( Ratio > 2.2 ); B: Her-2/Neu 基因未扩增( Ratio < 1.8 ); 红信号: Her-2/Neu 基因; 绿信号: 17 号染色体

**表 1  $\beta$ -catenin、ki67 及 Her-2/Neu 与胃癌临床病理特征的关系**

项目	n	$\beta$ -catenin		ki67		Her-2/Neu	
		阳性	$\chi^2$ 值 P 值	阳性	$\chi^2$ 值 P 值	阳性	$\chi^2$ 值 P 值
性别		0.540	0.502	0.920	0.445	0.173	0.444
男	52	37		44		9	
女	49	38		37		7	
年龄(岁)		0.107	0.744	0.304	0.616	0.555	0.581
$\geq 60$	40	29		31		5	
< 60	61	46		50		11	
肿瘤直径		0.234	0.806	0.217	0.787	0.290	0.770
$\geq 5$	70	51		57		12	
< 5	31	24		24		4	
分化程度		9.783	0.003	5.991	0.023	4.944	0.031
高中分化	51	31		36		4	
低分化	50	44		45		12	
浸润深度		5.978	0.021	5.632	0.018	0.320	0.594
未侵及浆膜	57	37		41		8	
侵及浆膜	44	38		40		8	
淋巴结转移		4.778	0.033	5.561	0.031	0.201	0.772
有	68	55		59		10	
无	33	20		22		6	
TNM 分期		1.820	0.250	5.198	0.023	5.328	0.028
I + II	58	46		42		5	
III + IV	43	29		39		11	

**2.3 β-catenin、ki67 蛋白表达与 Her-2/Neu 蛋白表达及基因状态的关系** ki67 蛋白表达与 Her-2/Neu 蛋白表达具有显著相关性 ( $r = 0.567, P < 0.05$ ), 与 Her-2/Neu 基因状态具有相关性 ( $r = 0.304, P < 0.05$ ), 且均呈正相关, 免疫组化染色检测中 ki67(3+) Her-2/Neu(3+) 9 例肿瘤患者 Her-2/Neu 阳性率为 21.4%, 明显高于其他分组类型。见表 2。而 β-catenin 蛋白表达与 Her-2/Neu 的蛋白表达及 Her-2/Neu 基因状态无相关性 ( $r = 0.478, P = 0.116; r = -0.079, P = 0.514$ )。

表 2 ki67 蛋白表达与 Her-2/Neu 蛋白表达及基因状态的关系

ki67 蛋白 表达	Her-2/Neu 蛋白表达		r 值	P 值	Her-2/Neu 基因扩增		r 值	P 值
	2+	3+			扩增	无扩增		
2+	2	1	0.567	0.043	3	12	0.304	0.022
3+	1	9			2	40		

**2.4 Her-2/Neu 蛋白表达与 Her-2/Neu 基因状态分析** FISH 检测 Her-2/Neu 基因扩增 14 例, 无扩增 87 例, 扩增率为 13.9%。将 Her-2/Neu 蛋白表达分 2 组, 即 Her-2/Neu (2+/3+)、Her-2/Neu (-/+), 与 FISH 检测结果进行比较, 免疫组化染色中 Her-2/Neu (2+/3+) 与 FISH 检测 Her-2/Neu 基因扩增符合率 87.5%, Her-2/Neu (-/1+) 标本中 Her-2/Neu 基因无扩增。见表 3。

表 3 Her-2/Neu 蛋白表达与 Her-2/Neu 基因状态的关系

Her-2/Neu 蛋白表达	n	Her-2/Neu 基因扩增		
		扩增	无扩增	基因扩增率 (%)
3+	10	9	1	90.0
2+	6	5	1	83.3
1+	33	0	33	0.0
-	52	0	52	0.0
合计	101	14	87	13.9

### 3 讨论

β-catenin 结构异常或表达上调会导致疾病的发生<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5]</sup>表明 β-catenin 能够影响肿瘤干细胞(TSC)的生物学行为, 下调 β-catenin 可以改善细胞的亚显微结构, 促进凋亡, 抑制细胞增殖等作用<sup>[6]</sup>。本研究中 β-catenin 与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移具有显著相关性, 提示胃癌组织中 β-catenin 异常表达可能导致胃癌细胞获得较强的侵袭能力。

目前 ki67 已被认为是评估肿瘤细胞增殖活性、

恶性潜能、预测复发最可靠的指标<sup>[7]</sup>, 其表达量的高低对肿瘤的治疗及转移有着重要的临床意义<sup>[8]</sup>。另外有研究<sup>[9]</sup>证实 ki67 在辅助化疗中有很好的预测价值。本研究结果显示 ki67 在高-中分化胃癌和低分化胃癌中阳性表达率分别为 70.6% 和 90.0%, 在未浸润浆膜层组和浸润浆膜层组的表达率分别为 68.6% 和 90.9%, 提示增殖活性的改变与癌变的进展有关。

Her-2/Neu(又称 C-erbB-2) 功能与 ki67 相近, 都能促进细胞有丝分裂。本研究中 Her-2/Neu 蛋白阳性表达率为 15.8%, 与已往研究<sup>[10]</sup>一致; Her-2/Neu 在高-中分化和低分化组织中阳性表达率分别为 3.4% 和 8.8%, 表明 Her-2/Neu 的高表达预示着胃癌恶性程度, 可作为胃癌诊断的指标<sup>[11]</sup>。该研究结果显示随评分级别上升, Her-2/Neu 基因扩增率也随之升高, 预示着 Her-2/Neu 基因状态及结构可能随胃癌恶性程度增加而越发的不稳定。近年来针对 Her-2/Neu 单克隆抗体 Her-ceptin 能否应用于胃癌已成为研究热点之一, 其对作用靶点选择性较高, 仅在 Her-2/Neu 基因扩增的肿瘤患者中疗效显著<sup>[12]</sup>, 因此明确 Her-2/Neu 的基因状态是预测治疗效的关键。已往文献<sup>[13]</sup>报道以 Her-2/Neu(2+) 作为 Her-2/Neu 基因 FISH 检测的初筛参考条件, 但有时一致性较差<sup>[14]</sup>。因此, 为了更简便准确的预测肿瘤患者 Her-2/Neu 的基因状态, 本研究通过对实验结果统计分析发现 ki67 蛋白表达与 Her-2/Neu 蛋白表达、基因扩增状态具有显著相关性 ( $r_{\text{蛋白}} = 0.567, r_{\text{基因}} = 0.304$ ); Her-2/Neu 基因 FISH 检测与免疫组化染色检测一致性分析得出 Kappa = 0.879, 表明 Her-2/Neu 蛋白表达及基因状态有较好的一致性。以上结果分析表明 Her-2/Neu 蛋白表达及其基因扩增与 ki67 蛋白表达可能存在的密切联系: 参阅文献<sup>[15]</sup>总结发现 Her-2/neu 并非独立存在, 与其他因子存在一定的协同及抑制等作用。肿瘤细胞的增殖活性是否促进 Her-2/neu 基因的扩增, ki67 与 Her-2/neu 之间是否存在调控关系有待进一步探讨与明确。

### 参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin 2009, 59(4): 225-49.
- [2] Hu S L, Kong X Y, Cheng Z D et al. Promoter methylation of p16, Runx3, DAPK and CHFR genes is frequent in gastric carcinoma [J]. Tumori 2010, 96(5): 726-33.
- [3] Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 sco-

- ring system for gastric cancer: results from a validation study [J]. *Histopathology* 2008 52(7): 797–805.
- [4] Xu L, Jiang Y, Zheng J, et al. Aberrant expression of  $\beta$ -catenin and E-cadherin is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal cancer [J]. *Hum Pathol* 2013 44(7): 1357–64.
- [5] Ma L, Zhang G, Miao X B, et al. Cancer stem-like cell properties are regulated by EGFR/AKT/ $\beta$ -catenin signaling and preferentially inhibited by gefitinib in nasopharyngeal carcinoma [J]. *FEBS J*, 2013 280(9): 2027–41.
- [6] Gaujoux S, Hantel C, Launay P, et al. Silencing mutated  $\beta$ -catenin inhibits cell proliferation and stimulates apoptosis in the adrenocortical cancer cell line H295R [J]. *PLoS One* 2013 8(2): e55743.
- [7] Wang J X, Zhang Y Y, Yu X M, et al. Role of centromere protein H and Ki67 in relapse-free survival of patients after primary surgery for hypopharyngeal cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012 13(3): 821–5.
- [8] Delpech Y, Wu Y, Hess K R, et al. Ki67 expression in the primary tumor predicts for clinical benefit and time to progression on first-line endocrine therapy in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat* 2012 135(2): 619–27.
- [9] Viale G, Regan M M, Mastropasqua M G, et al. Predictive value of tumor Ki67 expression in randomized trials of adjuvant endocrine therapy for node-negative breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst* 2008 100(3): 207–12.
- [10] Meza-Junco J, Au H J, Sawyer M B. Trastuzumab for gastric cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther* 2009 9(12): 1543–51.
- [11] Roukos D H. Targeting gastric cancer with trastuzumab: new clinical practice and innovative developments to overcome resistance [J]. *Ann Surg Oncol* 2010 17(1): 14–7.
- [12] Park D I, Yun J W, Park J H, et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer [J]. *Dig Dis Sci* 2006 51(8): 1371–9.
- [13] Yan S Y, Hu Y, Fan J G, et al. Clinicopathologic significance of HER-2/neu protein expression and gene amplification in gastric carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2011 17(11): 1501–6.
- [14] Dean-Colomb W, Esteva F J. Her2-positive breast cancer herceptin and beyond [J]. *Eur J Cancer* 2008 44(18): 2806–12.
- [15] Wang J, Liu Y, Ji R, et al. Prognostic value of the X-linked inhibitor apoptosis for invasive ductal breast cancer with triple-negative phenotype [J]. *Hum Pathol* 2010 41(8): 1186–95.

## The correlation of $\beta$ -catenin, ki67 and Her-2/Neu in gastric cancer and the clinical significance

Hou Baozhou<sup>1</sup>, Sun Jianjing<sup>2</sup>, Zhao Xiufang<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Post-Graduate Dept Hebei North University Zhangjiakou 075031; <sup>2</sup>Dept of Gastroenterology,

<sup>3</sup>Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075061)

**Abstract Objective** To study the relationship between the protein expression of  $\beta$ -catenin, ki67 and Her-2/Neu with the clinical pathologic characteristics of gastric cancer and the correlation to  $\beta$ -catenin and ki67 of the protein expression and gene conditions of Her-2/Neu. **Methods** Detected the protein expression of  $\beta$ -catenin, ki67 and Her-2/Neu by immunohistochemistry (SP method) in 101 gastric cancer samples and the gene conditions of Her-2/Neu by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Results** The protein expression of  $\beta$ -catenin, ki67 and Her-2/Neu had close relationship with the clinical pathologic characteristics of gastric cancer.  $\beta$ -catenin and ki67 had obvious correlation to the differentiation, infiltration and lymphatic metastasis of the gastric cancer ( $P < 0.05$ ). ki67 had close relationship with the TNM staging of gastric cancer ( $P < 0.05$ ). Her-2/Neu had close relationship with the differentiation and TNM staging of gastric cancer ( $P < 0.05$ ), but had no relationship with the infiltration and lymphatic metastasis of the gastric cancer. The protein expression of ki67 had obvious positive correlation to the protein expression and gene amplification conditions of Her-2/Neu ( $r_{\text{protein}} = 0.567$ ,  $P < 0.05$ ;  $r_{\text{gene}} = 0.304$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Association detection of  $\beta$ -catenin, ki67 and Her-2/Neu can be used as the reliable indexes in the process of understanding the biological behavior of gastric cancer and gastric diagnosis and prognosis judgment and ki67 can be used as the reference in preliminary screening the gene amplification conditions of Her-2/Neu, which may have some significance in elevating the detection efficiency of Her-2/Neu gene amplification, reducing the detection material waste and guiding the clinical targeted therapy.

**Key words** gastric cancer;  $\beta$ -catenin; ki67; Her-2/Neu; immunohistochemistry; fluorescence in situ hybridization; tumor marker