

Vash1、Ki67、CD34 在声带白斑组织中的表达及临床意义

高志光 安 然 蒋杏丽 金 梦 焦 慧 李 峰 刘 铮 李明华

摘 要 目的 研究 Vash1、Ki67、CD34 在声带白斑组织中的表达情况,探讨其对声带白斑的诊断和预后的意义。方法 2018 年 1 月 ~ 2019 年 12 月在黑龙江省医院耳鼻喉科住院接受支撑喉镜下手术治疗的声带白斑、声带息肉确诊病例共 100 例,其中声带白斑和声带息肉各 50 例,并对其进行随访。应用免疫组织化学染色法,检测 Vash1、Ki67、CD34 在声带白斑和息肉组织中的表达情况,比较不同病变中的表达差异,同时比较三者有声带白斑复发组与未复发组、癌变组与未癌变组中的表达差异。**结果** 声带白斑组和声带息肉组间 Vash1 的表达比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.932, P = 0.334$),Ki67 和 CD34 的表达比较,差异有统计学意义(Ki67: $\chi^2 = 8.208, P = 0.004$; CD34: $P = 0.000$)。声带白斑非异型增生组和异型增生组间 Vash1 的表达比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.709, P = 0.400$),Ki67 和 CD34 的表达比较,差异有统计学意义(Ki67: $\chi^2 = 4.303, P = 0.038$; CD34: $P = 0.000$)。Ki67 与 CD34 在声带白斑组织中的表达呈正相关($r = 0.526, P = 0.000$),Vash1 与 Ki67 的表达呈正相关($r = 0.378, P = 0.007$),Vash1 与 CD34 的表达不相关($r = 0.259, P = 0.069$)。在声带白斑复发组和未复发组间,Vash1 的表达比较,差异无统计学意义($P = 0.075$),Ki67 和 CD34 的表达比较,差异有统计学意义(Ki67: $P = 0.000$; CD34: $P = 0.007$),Vash1 和 Ki67 在癌变组和未癌变间的表达比较,差异有统计学意义(Vash1: $P = 0.019$; Ki67: $P = 0.023$),CD34 在两组间的表达比较,差异无统计学意义($P = 0.085$)。与声带息肉组织比较,声带白斑组织中 Ki67、CD34 呈高表达,病理表现为异型增生的白斑病变较非异型增生病变,Ki67、CD34 呈高表达,Vash1 在不同病变中的表达比较,差异无统计学意义。**结论** Ki67 和 CD34 可能是声带白斑复发的预测指标,Vash1 和 Ki67 可能是声带白斑癌变的预测指标。

关键词 白斑 Vash1 Ki67 CD34

中图分类号 R76 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.11.021

Expression and Clinical Significance of Vash1, Ki67, CD34 in Vocal Cord Leukoplakia. Gao Zhiguang, An Ran, Jiang Xingli, et al. The Department of Otorhinolaryngology, Heilongjiang Provincial Hospital, Heilongjiang 150030, China

Abstract Objective To study the expressions and to investigate the significance of diagnosis and prognosis of Vash1, Ki67 and CD34 in the tissues of vocal cord leukoplakia. **Methods** This study included a total of 100 confirmed cases of vocal cord leukoplakia and vocal cord polyp, including 50 cases of vocal cord leukoplakia and 50 cases of vocal cord polyp, removed under laryngoscope from January 2018 to December 2019, in Heilongjiang Provincial Hospital, the Department of Otolaryngology, which were clinical followed up. The expressions of Vash1, Ki67, CD34 in vocal cord leukoplakia and polyp tissues were detected by immunohistochemical staining, whose expression differences were compared in different lesions. At the same time, the expression differences of the three proteins between recurrence group and non-recurrence group, canceration group and non-canceration group were compared. **Results** There were no significant differences in the expression of Vash1 between vocal cord leukoplakia group and vocal cord polyp group ($\chi^2 = 0.932, P = 0.334$), but the expression differences of Ki67 and CD34 showed significances statistically (Ki67: $\chi^2 = 8.208, P = 0.004$; CD34: $P = 0.000$). The expression differences of Vash1 between the non-hyperplasia group and the dysplasia group in the vocal cord leukoplakia group did not show significant differences statistically ($\chi^2 = 0.709, P = 0.400$), but the expressions of Ki67 and CD34 was statistically different (Ki67: $\chi^2 = 4.303, P = 0.038$; CD34: $P = 0.000$). There was a positive correlation between the expressions of Ki67 and CD34 in vocal cord leukoplakia ($r = 0.526, P = 0.000$), so did the expressions of Vash1 and Ki67 ($r = 0.378, P = 0.007$). But the expressions of Vash1 and CD34 had no correlation statistically ($r = 0.259, P = 0.069$). The expression differences of Vash1 was not statistically significant between recurrence group and non-recurrence group in vocal cord leukoplakia ($P = 0.075$), but the expression differences of Ki67 and CD34 showed statistically significance (Ki67: $P = 0.000$; CD34: $P = 0.007$). The expression differences of Vash1 and Ki67 was statistically

基金项目:黑龙江省卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(2018021)

作者单位:150030 哈尔滨,黑龙江省医院耳鼻咽喉科

significant between canceration group and non - canceration group (Vash1: $P = 0.019$; Ki67: $P = 0.023$), however the expression differences of CD34 between both of these groups were not statistically significant ($P = 0.085$). Compared with the vocal cord polyp tissues, Ki67 and CD34 showed high expressions in vocal cord leukoplakia tissues; Ki67 and CD34 were higher expressed in dysplasia group than non - hypoplasia group, but the expression of Vash1 has no statistically differences in different lesions. **Conclusion** Ki67 and CD34 might be predictors of the recurrence in vocal cord leukoplakia, and Vash1 and Ki67 might be predictors of vocal cord leukoplakia canceration.

Key words Leukoplakia; Vash1; Ki67; CD34

声带白斑(vocal cord leukoplakia)是临床中的描述性诊断,是指在宏观检查中发现黏膜表面的白色斑块。声带白斑包括多种病理变化,如过度角化、异型增生、原位癌和浸润癌^[1]。研究表明,临床诊断为声带白斑的病例中有 6% ~ 7% 的患者可能进一步发展为癌症^[2]。相比于诊断为非异型增生的白斑,诊断为异型增生的白斑是潜在的癌前病变^[3]。在头颈部鳞状细胞癌患者中,血管生成抑制蛋白 VASH1(vasohibin - 1)高表达的患者比低表达的患者无病生存期明显缩短,VASH1 的表达与肿瘤的进展有关,可能是头颈部鳞状细胞癌的预后指标^[4]。Ki - 67 在喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)组织中的表达明显高于癌旁组织,高表达的 Ki - 67 可能是 LSCC 预后的预测指标^[5]。在喉癌组织呈高表达的 CD34 可能成为喉癌早期诊断的指标^[6]。目前 Vash1、Ki67、CD34 对声带白斑的作用机制尚未明确。本研究应用免疫组织化学染色法,研究 Vash1、Ki67、CD34 在声带白斑中的表达,及其与声带白斑复发和癌变之间的关系。

材料与方法

1. 标本来源:选择 2018 年 1 月 ~ 2019 年 12 月在黑龙江省医院耳鼻喉科住院接受支撑喉镜下声带白斑切除术、支撑喉镜下声带息肉切除术患者共 100 例,其中声带白斑 50 例,声带息肉 50 例。所有患者术前均无头颈部放疗、化疗及免疫治疗史,无气管插管、喉部手术史、外伤史,无全身其他部位恶性肿瘤,术后病理结果均由病理医师严格确诊。

2. 方法:术中切除的病变标本常规用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,给予连续切片,厚度 4 μm 。抗体包括兔抗人 Vash1 多克隆抗体、鼠抗人 CD34 单克隆抗体、鼠抗人 Ki67 单克隆抗体。应用链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化物酶(streptavidin - peroxidase, S - P)免疫组织化学染色法,检测声带白斑和声带息肉组织中 Vash1、Ki67、CD34 蛋白的表达。根据病理表现,将声带白斑组和声带息肉组分为两个亚组,即非异型增生组和异型增生组,分析两亚组间 Vash1、Ki67、CD34 的表达情况。

3. 结果判定:在声带白斑和声带息肉组织中,Vash1 阳性细胞表现为细胞质呈棕黄色颗粒状着色,Ki67 阳性细胞表现为细胞核呈棕黄色。选择细胞染色清晰的组织切片,在光学显微镜下,随机选取 5 个高倍镜($\times 400$)视野,在每个视野中计数阳性细胞,计算阳性细胞所占的百分率。根据阳性细胞在病变的上皮细胞总数中所占的比例,确定阳性范围:阳性细胞数 < 5% 为阴性(-),阳性细胞数 5% ~ 25% 为弱阳性(+),阳性细胞数 26% ~ 50% 为阳性(++),阳性细胞数 > 50% 为强阳性(+++) ^[7]。CD34 表达于血管内皮细胞,其胞质经染色后呈棕黄色则为 CD34 阳性。参照 Weidner^[8] 标准对微血管进行计数,在低倍镜($\times 100$)下,找到微血管分布集中处,选取 5 个不重复的高倍镜($\times 200$)视野,对微血管进行计数,取其平均值作为微血管密度值(microvessel density, MVD),即 CD34 - MVD 值。

4. 复查与随访:对 50 例声带白斑和 50 例声带息肉患者进行手术后复查和随访,时间为术后 1、3、6、12 个月,截止到 2019 年 12 月 30 日,复查时行电子喉镜检查,观察是否出现复发,复发患者再次住院手术治疗,切除标本送病理检查,观察是否出现癌变。

5. 统计学方法:采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析,不同组间 Vash1 和 Ki67 表达阳性率的比较采用 χ^2 检验,各组 CD34 - MVD 值使用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料的比较符合正态分布、方差齐则应用 t 检验,否则使用非参数 Mann - Whitney U 检验,相关性分析使用 Pearson 相关检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Vash1 在声带白斑和声带息肉组织中的表达: Vash1 在声带白斑和声带息肉组织中的阳性表达,均表现为细胞质呈棕黄色颗粒状染色,两组中的阳性表达率分别为 82.00% (41/50) 和 74.00% (37/50),差异无统计学意义($\chi^2 = 0.932, P = 0.334$),详见表 1。在声带白斑组内,非异型增生组与异型增生组间 Vash1 的表达比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.709, P = 0.400$),声带息肉组内,两亚组间 Vash1 的表达

比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.002,P=0.962$)。

表 1 Vash1 在声带白斑和声带息肉组织中的表达情况

组别	n	Vash1				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
声带白斑	50	9	14	16	11	82.00
非异型增生组	27	6	9	8	4	77.78
异型增生组	23	3	5	8	7	86.96
声带息肉	50	13	18	15	4	74.00
非异型增生组	46	12	17	15	2	73.91
异型增生组	4	1	1	0	2	75.00

$\chi^2=0.932,P=0.334$

2. Ki67 在声带白斑和声带息肉组织中的表达: Ki67 阳性细胞表现为细胞核呈棕黄色,在声带白斑和声带息肉组织中表达的阳性率分别为 84.00% (42/50) 和 58.00% (29/50), 差异有统计学意义 ($\chi^2=8.208,P=0.004$), 详见表 2。在声带白斑组内,非异型增生组与异型增生组间 Ki67 的表达比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.303,P=0.038$), 声带息肉组内, Ki67 在两亚组间表达比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.516,P=0.473$)。

表 2 Ki67 在声带白斑和声带息肉组织中的表达情况

组别	n	Ki67				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
声带白斑	50	8	38	3	1	84.00
非异型增生组	27	7	20	0	0	74.07
异型增生组	23	1	18	3	1	95.65
声带息肉	50	21	28	1	0	58.00
非异型增生组	46	20	26	0	0	56.52
异型增生组	4	1	2	1	0	75.00

$\chi^2=8.208,P=0.004$

3. CD34 在声带白斑和声带息肉组织中的表达: 声带白斑和声带息肉组织中, CD34 - MVD 值分别为 18.593 ± 4.455 和 10.089 ± 2.565 , 差异有统计学意义 ($t=11.697,P=0.000$, 表 3)。在声带白斑组内,非异型增生组和异型增生组 CD34 - MVD 值

表 3 CD34 在声带白斑和声带息肉组织中的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD34 - MVD 值
声带白斑	50	18.593 ± 4.455
非异型增生组	27	16.612 ± 2.267
异型增生组	23	20.919 ± 4.597
声带息肉	50	10.089 ± 2.565
非异型增生组	46	9.802 ± 2.348
异型增生组	4	13.388 ± 3.001

$t=11.697,P=0.000$

分别为 16.612 ± 2.267 和 20.919 ± 4.597 , 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。在声带息肉组内,非异型增生组和异型增生组 CD34 - MVD 值分别为 9.802 ± 2.348 和 13.388 ± 3.001 , 差异有统计学意义 ($P=0.029$)。

4. Vash1、Ki67、CD34 之间表达的相关性分析: 在声带白斑病例组中, Ki67 阳性率和 CD34 - MVD 值之间呈正相关 ($r=0.526,P=0.000$), Vash1 和 Ki67 阳性率之间呈低等程度正相关 ($r=0.378,P=0.007$), Vash1 阳性率和 CD34 - MVD 值之间不相关 ($r=0.259,P=0.069$)。

5. Vash1、Ki67、CD34 在声带白斑复发和癌变病例中的表达: 50 例声带白斑病例的随访中, 有 2 例 (4.00%) 在随访第 12 个月时因电话停机失访, 2 例 (4.00%) 随访时间不足 12 个月, 在随访期内未出现复发和癌变。46 例声带白斑病例中, 共 11 例 (23.91%) 在随访期间复发, 随访第 3 个月复发 1 例 (2.17%), 第 6 个月复发 3 例 (6.52%), 第 12 个月复发 7 例 (15.22%)。按照是否复发, 将 46 例声带白斑患者分为复发组和未复发组, 两组间 Vash1 的表达比较, 差异无统计学意义 ($P=0.075$), Ki67 在两组间的表达比较, 差异有统计学意义 ($P=0.000$), CD34 - MVD 值在两组间的表达比较, 差异有统计学意义 ($P=0.007$)。46 例声带白斑病例中, 2 例 (4.35%) 在随访第 12 个月时出现癌变, 以是否出现癌变将 46 例声带白斑患者分为癌变组和未癌变组, Vash1 在两组间的表达比较, 差异有统计学意义 ($P=0.019$), Ki67 在两组间的表达比较, 差异有统计学意义 ($P=0.023$), CD34 - MVD 值在两组间的表达比较, 差异无统计学意义 ($P=0.085$)。

讨 论

声带白斑的病理表现呈多样性, 按照 2005 年世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 修订的头颈部肿瘤分类标准, 具体病理分类为非异型增生、轻度异型增生、中度异型增、重度异型增生、癌症, 2017 年 WHO 蓝皮书中引入了两级分类, 如“无/轻度异型增生”为低风险, “中度或重度异型增生”为高风险^[9]。Vash1 主要表达于血管内皮细胞中, 并起到终止血管生成的作用, 由血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF - 2) 等血管生成刺激因子诱导^[10]。在喉癌组织中的 VEGF 的表达明显高于癌旁组织和正常喉黏膜组织^[11]。在癌症组织

中,Vash1 的表达强度与 VEGF 的表达强度呈正相关^[10]。高表达的 Vash1 与头颈部鳞状细胞癌、卵巢癌、前列腺癌、肾细胞癌、食管鳞状细胞癌等恶性肿瘤的预后不良有关^[4,10,12-14]。Ki67 是一种脱氧核糖核酸(deoxyribo nucleic acid, DNA)结合蛋白,主要位于细胞核,与细胞增殖密切相关。Ki67 可能参与喉癌的癌变过程,在 LSCC 组织中的表达明显高于邻近非肿瘤组织,它可能是预测 LSCC 预后有价值的指标^[5]。CD34 是一种单链高度糖基化型跨膜蛋白,存在于微血管内皮细胞,能促进新生血管的形成^[15]。一项对 72 例 LSCC 患者的研究表明,CD34 在 LSCC 组织中高表达,对 LSCC 的早期诊断和预后的判断有重要意义^[6]。

本研究发现,Ki67 和 CD34 在声带白斑组织中高表达,其中异型增生组比非异型增生组的表达更高,Ki67 和 CD34 可能是声带白斑和癌前病变诊断的预测指标。Vash1 在声带白斑和声带息肉在两组表达比较,差异无统计学意义,同时,在声带白斑组内,非异型增生和异型增生组间的表达比较,差异无统计学意义,在声带息肉组内两亚组间出现相同的结果,Vash1 在声带白斑和癌前病变的诊断中可能无法起到明显的提示作用。相关性分析发现,Ki67 和 CD34 的表达呈正相关($r = 0.526, P = 0.000$),Vash1 和 Ki67 的表达也呈正相关,但二者之间的相关关系较弱($r = 0.378, P = 0.007$),Vash1 和 CD34 的表达不相关($r = 0.259, P = 0.069$)。在声带白斑癌变病例的分析中发现,Vash1 和 Ki67 的表达两组间比较,差异有统计学意义(Vash1: $P = 0.019$; Ki67: $P = 0.023$),CD34 的表达在两组比较,差异无统计学意义($P = 0.085$),可能与样本量过小有关。CD34 - MVD 值反映的是血管新生的能力,Vash1 抑制微血管生成的作用由血管生成刺激因子(如 VEGF 等)诱导产生。因此可以推测,只有血管生成刺激因子的表达量升高到一定程度时,才会诱导 Vash1 的表达升高,因此也就可以认为在声带白斑组织中 Vash1 表达尚未出现明显升高,发展到喉癌才出现明显高表达。声带白斑复发病例的分析表明,Ki67 和 CD34 在白斑复发的发生中起到重要作用,Ki67 和 CD34 可能是声带白斑复发的预测指标。然而,本研究也存在局限性,研究中仅应用了免疫组织化学染色法,今后仍需要开展更大样本量、更长的随访时间以及核酸水平上的实验进行进一步验证。

综上所述,本研究认为 Ki67 和 CD34 在白斑发

生、复发的过程中起重要作用,可能是预测声带白斑发生、癌前病变诊断、复发的重要标志物。Vash1 和 Ki67 在声带白斑癌变的预测中可能也有重要作用。本研究为声带白斑及癌前病变的病理学诊断提供了理论支持,为预测其复发和癌变提供了潜在的生物学标志物,同时为进一步开展实验研究提供了研究基础。

参考文献

- Lim JY, Park YM, Kang M, *et al.* Angiolytic laser stripping versus CO₂ laser microflap excision for vocal fold leukoplakia: long - term disease control and voice outcomes[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): 689 - 693
- Cui WX, Xu W, Yang QW, *et al.* Clinicopathological parameters associated with histological background and recurrence after surgical intervention of vocal cord leukoplakia [J]. *Medicine*: Baltimore, 2017, 96(22): e7033
- Chen M, Cheng L, Li CJ, *et al.* Nonsurgical treatment for vocal fold leukoplakia: an analysis of 178 cases[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 6958250
- Torii C, Hida Y, Shindoh M, *et al.* Vasohibin - 1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(3): 1219 - 1225
- Bai Y, Shao Y, Li H, *et al.* Ki - 67 is overexpressed in human laryngeal carcinoma and contributes to the proliferation of Hep2 cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2641 - 2647
- 高英恺, 仲云, 杨凡, 等. p63 与 CD34 在喉鳞状细胞癌早期诊断中的意义[J]. *中外医疗*, 2018, 37(18): 31 - 33
- 崔卫新, 徐文, 杨庆文, 等. 声带白斑临床病理特征及复发癌变的影响因素[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 30(24): 1926 - 1931
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, *et al.* Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1 - 8
- Chen M, Li C, Yang Y, *et al.* A morphological classification for vocal fold leukoplakia [J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2019, 85(5): 588 - 596
- Ninomiya Y, Ozawa S, Oguma J, *et al.* Expression of vasohibin - 1 and - 2 predicts poor prognosis among patients with squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 5265 - 5274
- 杨颖, 李智, 王骏, 等. MMP - 2、Fhit、RECK、VEGF 在喉癌组织中的表达及相关性分析[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(17): 3306 - 3309, 3314
- Sano R, Kanomata N, Suzuki S, *et al.* Vasohibin - 1 is a poor prognostic factor of ovarian carcinoma[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017, 243(2): 107 - 114
- Kosaka T, Miyazaki Y, Miyajima A, *et al.* The prognostic significance of vasohibin - 1 expression in patients with prostate cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(10): 2123 - 2129
- Mikami S, Oya M, Kosaka T, *et al.* Increased vasohibin - 1 expression is associated with metastasis and poor prognosis of renal cell carcinoma patients[J]. *Lab Invest*, 2017, 97(7): 854 - 862
- 徐宪伟, 徐小艳, 王娜, 等. 乳腺非特殊型浸润性癌组织中 CD34 和 Ki67 的表达及相关性[J]. *实用医药杂志*, 2020, 37(2): 144 - 147, 193

(收稿日期: 2020 - 06 - 05)

(修回日期: 2020 - 06 - 16)