

HER2/neu、HIF-1 α 与 ki-67 在胃腺癌中的表达及临床意义

卫拴昱¹, 肖虹², 郑绘霞², 白瑞兵², 史江波²(山西医科大学 1.第一临床医学院; 2.第一医院病理科, 山西太原 030001)

【摘要】 目的 探讨表皮生长因子受体 2(HER2)、缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)与 ki-67 在胃腺癌的表达及其临床意义。方法 利用免疫组织化学法(IHC)和荧光原位杂交技术(FISH)检测 118 例手术切除并经病理确诊的胃腺癌中 HER2/neu、HIF-1 α 和 ki-67 表达水平, 并对结果进行统计学分析。结果 HER2、HIF-1 α 和 ki-67 在胃腺癌中的阳性率分别为 13.56%、44.91%、79.66%; HER2 阳性与 Lauren's 分型和淋巴结转移相关($P<0.05$), 与年龄、性别、肿瘤部位、浸润深度、TNM 分期不相关($P>0.05$); HIF-1 α 高表达与淋巴结转移和 TNM 分期有关($P<0.05$), 与性别、年龄、肿瘤部位、Lauren's 分型浸润深度无关($P>0.05$); ki-67 高表达与 Lauren's 分型、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期相关($P<0.05$), 与年龄、性别、肿瘤部位不相关($P>0.05$); ki-67 高表达与 HER2 阳性、HIF-1 α 阳性均呈正相关, HER2 阳性与 HIF-1 α 呈正相关($P<0.05$)。结论 在缺氧环境下, HER2 阳性的胃癌细胞可能有更高的增殖活性, HER2、HIF-1 α 、ki-67 高表达的胃腺癌较低表达者有更差的生物学行为, 可能通过某些通路共同促进胃癌的发生和发展, 为未来寻找新靶点提供临床依据。

【关键词】 胃腺癌; 表皮生长因子受体 2; 缺氧诱导因子 1 α ; ki-67; 相关性

Expression and clinical significance of HER2/neu, HIF-1 α and ki-67 in gastric adenocarcinoma

WEI Shuan-yu¹, XIAO Hong², ZHENG Hui-xia², BAI Rui-bing², SHI Jiang-bo². 1. First Clinical Medical College; 2. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of epidermal growth factor receptor 2 (HER2), hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and ki-67 in gastric adenocarcinoma and its clinical significance. **Methods** Immunohistochemical (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) were used to detect the expression of HER2/neu, HIF-1 α and ki-67 in 118 cases of gastric adenocarcinoma. **Results** The positive rates of HER2, HIF-1 α and ki-67 in gastric adenocarcinoma were 13.56%、44.91%、79.66%; Overexpression/amplification of HER2/neu was associated with Lauren's classification and lymph node metastasis ($P<0.05$), but not with age, sex, tumor location, depth of invasion and TNM stage ($P>0.05$). The high expression of HIF-1 α was related to lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$), but not to sex, age, tumor location, depth of invasion and Lauren's classification ($P>0.05$). The high expression of ki-67 was correlated with Lauren's classification, depth of invasion, lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$). There was no correlation between age, sex and tumor site ($P>0.05$). The high expression of ki-67 was positively correlated with HER2 and HIF-1 α , and HER2 was positively correlated with HIF-1 α ($P<0.05$). **Conclusion** In anoxic environment, HER2 positive gastric cancer cells may have higher value-added activity. The expression of HER2, HIF-1 α and ki-67 in gastric adenocarcinoma has worse biological behavior than that in low expression, which may promote the occurrence and development of gastric cancer through some pathways. In the future, it may become a new target of targeted therapy in gastric cancer.

【Key words】 Gastric adenocarcinoma; Epidermal growth factor receptor 2; Hypoxia inducible factor-1 α ; ki-67; Correlation

作者简介: 卫拴昱, 医学硕士, E-mail: 1577848550@qq.com。

通讯作者: 肖虹, 教授, 硕士生导师, E-mail: xiaoh9999@163.com

1 前言

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,据2018版全球癌症统计报告^[1]显示,胃癌的死亡率为8.2%,仅次于肺癌(18.4%)和结直肠癌(10.2%)。近年来,癌基因人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)和缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)被发现存在于胃癌等多种恶性肿瘤组织中,有研究^[2-3]证明HER2阳性与缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)的表达增加有关,但二者在胃癌侵袭性中的临床意义和相互作用并未明确。ki-67是一种细胞增殖标记,在许多恶性肿瘤中高表达,可作为预后差的预测指标;最近有研究^[4]指出,ki-67在细胞周期中的表达是受某些通路调控的,这意味着ki-67未来可能会作为新的靶点参与肿瘤的综合治疗。本研究将通过测定胃腺癌中HER2、HIF-1 α 和ki-67的表达水平,并分析HER2、HIF-1 α 和ki-67与胃腺癌的临床病理特征的关系及三者之间的相关性,为HER2、HIF-1 α 与ki-67在胃癌的预后判断及潜在的综合治疗提供一定的临床依据。

2 材料与方法

2.1 一般资料 收集2013年1月~2016年12月间我院手术切除经病理证实的胃腺癌患者的标本共118例,男42例,女76例;年龄38~82岁,平均年龄60岁,60岁以下36例;发生于贲门、胃底的29例,发生于胃角、胃体的34例,发生于幽门、胃窦的55例;病理分期T1期为26例,T2期为17例,T3+T4期75例;根据Lauren's分型,79例为肠型,18例为弥漫型,21例为混合型;淋巴结转移者83例,无淋巴结转移者35例;按照2010版胃癌TNM分期^[5]进行临床分期,I期的为11例,II期的为15例,III期+IV期的为92例(其中IV期定义为胃腺癌转移至腹膜、肝脏、卵巢)。所有研究对象对本研究知情同意,本研究获得山西医科大学第一医院伦理委员会批准。

2.2 研究方法

2.2.1 免疫组织化学染色(IHC)和荧光原位杂交法(FISH) 所有组织标本经10%中性福尔马林固定,常规脱水、石蜡包埋切片,行HE染色,光镜观察。免疫组织化学法采用EnVision两步法;一抗HER2/neu鼠单克隆抗体(ZM-0045)、ki-67鼠抗

人单克隆抗体(ZM-0166)、二抗工作液和DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;HIF-1 α 鼠抗人单克隆抗体(MAB-0635)购自福州迈新生物技术开发有限公司。FISH具体操作步骤参照试剂盒说明书进行,在OLYMPUS BX51荧光显微镜的DAPI/FITC/TRITC三色滤光镜激发下观察细胞荧光杂交信号;HER2/neu双探针FISH检测试剂盒购自北京金菩嘉医疗科技有限公司。

采用已被证实为HER2 3+的胃癌组织和HIF-1 α 阳性的皮肤鳞癌组织作为阳性对照,以被检测切片中的癌旁正常组织作为阴性对照,以PBS缓冲液代替一抗作为空白对照。由病理科两位主任医师对每张切片选取具有代表性的区域进行HER2、HIF-1 α 和ki-67表达状态的判断。

HER2的免疫组化和FISH结果采用《2016版胃癌HER2检测指南》中^[6]评分系统进行判读:(1)免疫组织化学法结果判读(图1-2):无反应或<10%的肿瘤细胞膜染色为0; \geq 10%肿瘤细胞微弱或隐约可见膜染色,仅有部分细胞膜染色为1+; \geq 10%肿瘤细胞弱到中度的基底侧膜、侧膜或完全性膜染色为2+; \geq 10%肿瘤细胞基底侧膜、侧膜或完全性膜强染色为3+。其中0~1+判定为HER2,3+判定为HER2阳性;2+为不确定,通过FISH检测明确。(2)FISH结果判读(图3-4):选择扩增程度最高的区域,对至少20个连续肿瘤细胞核进行HER2/neu信号总数与CEP17信号总数的

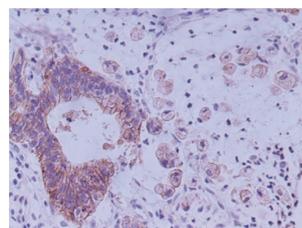


图1 胃癌中HER2免疫组织化学法结果为2+(Envision法×200倍)

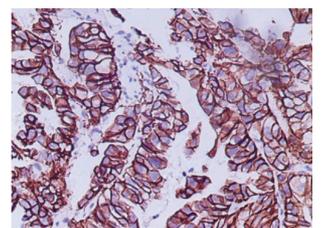


图2 胃癌中HER2免疫组织化学法结果为3+(Envision法×200倍)

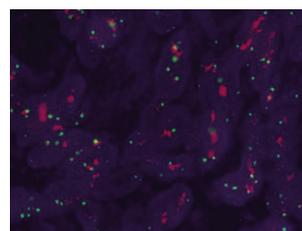


图3 胃癌HER2/neu基因扩增

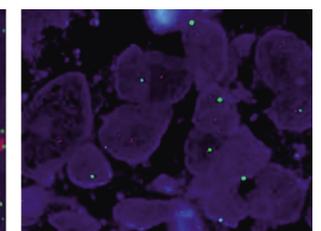


图4 胃癌HER2/neu基因无扩增

计数和比值(即 Ratio 值),Ratio 值 ≥ 2.2 或众多信号连接成簇,判断为原位杂交阳性;Ratio 值 < 1.8 ,判断为原位杂交阴性;Ratio 值在 1.8-2.2 之间时,再计数 20 个细胞的信号或由另一位医师计数,若比值 ≥ 2.0 判断为原位杂交阳性;比值 < 2.0 判断为原位杂交阴性。每个肿瘤细胞中 CEP17 信号数平均值 ≥ 3 ,定义为 17 号染色体多体。将 HER2 蛋白过表达(免疫组织化学法结果为 3+)和免疫组织化学法 2+且 FISH 阳性者定义为 HER2 阳性,HER2 蛋白未表达或低表达和免疫组织化学法 2+

且 FISH 阴性者定义为 HER2 阴性。

HIF-1 α 阳性评判标准(图 5-6):细胞核和细胞质着色,阳性细胞数占总肿瘤细胞区域的比例 $< 10\%$ 为阴性, $\geq 10\%$ 为阳性。

ki-67 阳性评判标准(图 7-8):细胞核着色,表达阳性的细胞染色强度均呈中等以上强度,故用阳性肿瘤细胞占所观察肿瘤细胞总区域的百分比做为评价指标,对阳性细胞百分比进行评分: $< 10\%$ 为低增殖活性,10%~40%为中度增殖活性,40%以上为高增殖活性^[5]。低增殖活性定义为阴

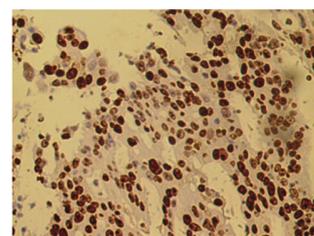
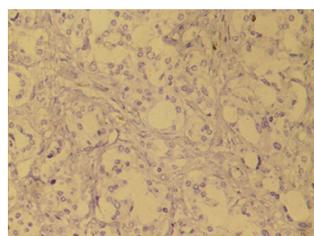
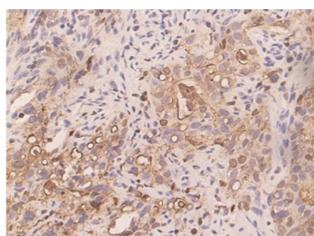
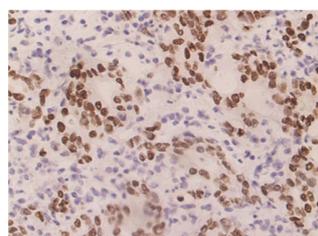


图 5 HIF-1 α 肿瘤细胞胞核阳性 Envision 法 $\times 200$

图 6 HIF-1 α 肿瘤细胞胞浆阳性 Envision 法 $\times 200$

图 7 7 ki-67 呈低增殖活性 Envision 法 $\times 200$

图 8 ki-67 呈高增殖活性(肿瘤的阳性细胞约 90%) Envision 法 $\times 200$

表 1 HER2、HIF-1 α 和 ki-67 与胃腺癌临床病理特征之间的关系

临床病理特征	n	HER2/neu		P 值	ki-67		P 值	HIF-1 α		P 值
		阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
性别				0.152			0.487			0.702
男性	42	5	37		35	7		20	22	
女性	76	11	65		59	17		33	43	
年龄				0.577			0.457			0.691
< 60 岁	36	5	31		28	8		15	21	
≥ 60 岁	82	11	71		66	16		38	44	
肿瘤部位				0.459			0.607			0.200
贲门、胃底	29	6	23		22	7		17	12	
胃体、胃角	34	4	30		29	5		15	19	
幽门、胃窦	55	6	49		43	12		21	34	
Lauren's 分型				0.026			0.035			0.065
肠型	79	14	65		68	11		30	49	
弥漫型	18	2	16		13	5		12	6	
混合型	21	0	21		13	8		11	10	
浸润深度				0.939			0.041			0.289
T1	26	4	22		17	9		15	11	
T2	17	2	15		12	5		8	9	
T3+T4	75	11	64		65	10		30	45	
淋巴结转移				0.037			0.023			0.000
有	83	15	68		71	12		46	37	
无	35	1	34		23	12		7	28	
TNM 分期				0.902			0.000			0.013
I	11	2	9		5	6		4	7	
II	15	2	13		8	7		2	13	
III+IV	92	12	80		81	11		47	45	

χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义

性,中度和高增值活性定义为阳性。

2.2.2 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行统计学分析,比较胃腺癌中 HER2/neu、HIF-1 α 和 ki-67 的表达和临床病理特征之间的关系采用 χ^2 检验;HER2/neu、HIF-1 α 与 ki-67 的相关性采用 Spearman 相关性分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 HER2、HIF-1 α 与 ki-67 在胃癌中的表达情况 118 例胃腺癌中,HER2 蛋白表达为 0~1+ 的为 93 例,2+ 的为 16 例(图 1),3+ 的为 9 例(图 2);HER2/neu 基因扩增的 14 例(图 3),未扩增的为 104 例(图 4),总阳性率为 13.56%。HIF-1 α 阳性的有 53 例(44.91%)(图 5),阴性的有 67 例(56.78%)(图 6),阳性率为 44.91%。ki-67 为低度增值活性的有 24 例(20.34%)(图 7),中度增值活性的有 31 例(26.27%),高度增值活性的有 63 例(53.39%)(图 8),总阳性率为 79.66%。

3.2 HER2、HIF-1 α 和 ki-67 与胃腺癌的临床病理特征的相关性分析 胃腺癌中 HER2、HIF-1 α 和 ki-67 的高表达与部分临床病理特征相关(表 1)。HER2 阳性表达与 Lauren's 分型及淋巴结转移有显著相关性($P<0.05$);与性别、年龄、肿瘤发生部位、浸润深度、TNM 分期无关($P>0.05$)。HIF-1 α 阳性表达与淋巴结转移和 TNM 分期有关($P<0.05$),与性别、年龄、肿瘤部位、Lauren's 分型浸润深度无关($P>0.05$)。ki-67 高表达与 Lauren's 分型、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期相关($P<0.05$),与年龄、性别、肿瘤部位不相关($P>0.05$)。

3.3 胃腺癌中 HER2、HIF-1 α 与 ki-67 表达的相关性分析(表 2) Spearman 等级相关分析显示,HIF-1 α 的表达与 ki-67、HER2 的表达均呈正相关($P<0.05$)。

4 讨论

胃癌是一种由环境因素、遗传及许多表观因素综合作用的恶性肿瘤,据 2018 版全球癌症统计报告^[1]显示,胃癌死亡比例为 8.2%,仅次于肺癌(11.6%)和结直肠癌(9.2%)。胃癌主要以腺癌多见,目前治疗方式多为外科手术联合放化疗,但胃癌预后并未明显改善。近些年来,分子生物检测技术在胃癌领域中逐渐成为研究热点,这对于胃癌的预后和靶向治疗具有重要作用。

人类表皮生长因子受体 2 (Human epidermal growth factor receptor 2, HER2/neu) 是一种原癌基因,定位于 17 q11-21,由 Weinberg 于 1979 年发现并报道^[7];HER2 属于表皮生长因子受体家族中的一员,它与家族的其他成员 HER-1 (EGFR)、HER-3、HER-4 共同调节复杂的信号传导系统,促进肿瘤细胞的快速增殖,增加肿瘤的侵袭性。2005 年以后的多项体外试验显示 HER2 抑制剂可抑制胃癌细胞株的增殖^[8,9]。ToGA 试验首次证明了以 HER2/neu 为靶点的靶向药物曲妥珠单抗在胃癌中的临床意义^[10],2016 年胃癌 HER2 检测指南^[6]中指出,所有经病理确诊的胃癌患者均应进行 HER2/neu 检测,经查阅多篇文献^[11-13]显示,胃癌中 HER2 阳性率报道不一致,但基本波动于 10%~40%。本研究中,HER2 阳性率为 13.6%,这与文献报道相一致;本研究中,HER2 的状态与 Lauren's 分型和淋巴结转移有关($P<0.05$),这与姜雷^[14]、雷瑞雪^[15]等人的研究结果比较一致。

缺氧诱导因子 1 (Hypoxia inducible factor 1, HIF-1) 是低氧条件下存在的一种重要转录因子,由 HIF-1 α 和 HIF 1 β 两个亚单位组成,其中 HIF-1 α 是控制 HIF-1 蛋白稳定和转活的主要转录因子,位于第 14 号染色体 q21~24 区,主要定位于细胞核,少数位于细胞浆^[16];在缺氧环境下,HIF-1 α 通过参与 PI3K/Akt/mTOR 通路和 COX2/PKM2 通路等多种机制来促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[17,18]。HIF-1 α 广泛存在于乳腺癌^[19]、贲门癌^[20]等多种恶性肿瘤中。笔者通过分析之前的文献报道^[21,22]发现,HIF-1 α 在胃癌中的表达率波动范围较大,为 29%~70%,HIF-1 α 阳性与胃癌的组织学分型、淋巴结转移、浸润深度和 TNM 分期等临床病理特征相关^[20,21,23]。本研究中,HIF-1 α 阳性率为 44.91%,HIF-1 α 阳性表达与淋巴结转移和 TNM 分期有关,有淋巴结转移者的 HIF-1 α 阳性率远高于无淋巴结转移,Ⅲ期+Ⅳ期的 HIF-1 α 阳性率显著高于 I 期和 II 期,这与多数研究结果一致,暗示 HIF-1 α 阳性的胃癌可能预后更差。但侯绍章^[22]等人研究结果显示,HIF-1 α 表达与胃腺癌的临床病理特征均无相关性,这可能与样本选择、地区差异和实验过程的主观因素等有关。

Feldser^[24]等人研究表明,HER2 可激活下游通路 PI3K/AKT 和 MAPK 通路来调控细胞增殖及存活能力;顾晓萌^[25]的研究显示 HIF-1 位于肿瘤细

胞中 EGFR 和 PI3K-AKT 信号的下游和 VEGF 表达的上游,活化的 AKT 可促进位于下游的 HIF-1 α 活化及磷酸化,从而增加 HIF-1 α 的稳定性,并激活 VEGF 等相关靶分子,最终导致肿瘤发生;许多体外试验^[2,26,27]支持 HER2 过表达诱导 VEGF 的激活与 HIF-1 α 的表达密切相关这一观点。有研究认为 HER2 信号通过抑制 HIF-1 α 的泛素化和蛋白酶体降解而诱导 HIF-1 α 的表达^[28];但 Laughner^[2] 等人研究结果显示,HER2 信号转导通过诱导 HIF-1 α 蛋白的合成,而不是抑制其降解,来调节 HIF-1 和 VEGF 的表达,这可能是一种新的诱导机制。本研究中,HER2 与 HIF-1 α 的高表达之间具有正相关性(r 值为 0.289, $P < 0.05$),与之前的研究一致,因此我们认为,HER2 可通过某些机制促进 HIF-1 α 的表达,从而提高肿瘤细胞对缺氧环境的适应能力。此外,kakashev^[29] 等人最近的一项研究表明,HIF-1 α 的表达可通过下调双特异性磷酸酶 2(DUSP2),诱导 HER2 高表达的肿瘤细胞产生耐药。因此,探究 HER2 和 HIF-1 α 在胃癌中的关系对于寻求潜在的靶点和 HER2 靶向药物的耐药机制十分重要。

ki-67 是一个细胞增殖指数,定位于第 10 号染色体长臂上,可以识别除 G0 以外的 G1、S、G2 和 M 期的细胞。Lazarev^[30] 等人研究胃癌中 ki-67 的表达状态得出结论,ki-67 可成为决定肿瘤增殖潜能的一个有效的指标。有研究^[31]指出,胃癌中 ki-67 的表达率为 70%~76%,许多研究表明 ki-67 可能与胃癌的分化程度、浸润和淋巴结转移密切相关,但需要说明的是,由于国际上对于 ki-67 高表达并没有明确的定义,而是以阳性细胞百分比来作为 ki-67 的结果,各个研究中应用 ki-67 高表达的判断标准并不相同。Ahmed^[32] 等人以 10%和 40%为界限将 ki-67 增殖活性分为 3 个等级,阳性细胞数 < 10% 为低表达,10%~40% 和 > 40% 为高表达,结果显示 ki-67 高表达与胃癌的病理分级、淋巴结转移、神经侵犯具有明显相关性。夏加增等^[33] 把阳性细胞 > 10% 定义为 ki-67 高表达,发现 ki-67 高表达与胃癌的 Lauren's 分型、淋巴结转移及 pTNM 分期相关;叶海主^[34] 等人则将 ki-67 阳性细胞 > 25% 判定为高表达,发现 ki-67 高表达与胃癌的分化程度、TNM 分期、浸润深度、淋巴结转移和脉管癌栓有关。Lazar^[35] 等把阳性细胞 > 45% 定义为 ki-67 高表达,发现 ki-67 高表达和胃癌分化程度

相关。王永辉^[36] 等人把阳性细胞 $\geq 50%$ 定义为 ki-67 高表达,发现 ki-67 高表达和胃癌病理类型是否为腺癌和 Lauren's 分型具有显著的相关性。而 2010 年,Yerushalmi^[37] 对乳腺癌中的 ki-67 状态研究表明,10%~14% 以上的肿瘤细胞 ki-67 阳性率意味着高风险组的预后,所以本研究认为采用阳性细胞数 > 10% 判定为 ki-67 阳性的判定标准更为合理,结果显示 ki-67 阳性率为 79.66%,其高表达与 Lauren's 分型、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有显著相关性($P < 0.05$),与年龄、性别、部位等无关($P > 0.05$),这与上述研究结果一致。由于淋巴结转移、高的病理分级、高 TNM 分期均预示着更差的预后,所以我们有理由认为 ki-67 高表达可作为胃癌预后不良的指标。Luo^[38] 等人对胃癌 ki-67 状态的 29 项研究进行了荟萃分析,结果显示 ki-67 高表达可作为胃癌患者预后不良的一项预测指标,这一结论支持我们的观点。Raquel^[4] 的研究中发现,细胞周期中 Ki-67 的总体水平受不同聚合机制的调控,一种调控是在转录水平上:编码 ki-67 基因的启动子含有转录因子 G1-调节型 E2F 家族的结合位点,另一种调控发生在蛋白水平上,ki-67 蛋白在 G1 期通过泛素蛋白酶体复合物 APC/C-Cdh1 降解,这取决于 CDK 4/6 对 Rb 的灭活。这两种相反的机制 ki-67 促成了这种蛋白质在整个细胞中的最终平衡和循环周期。这意味着 ki-67 可能成为抑制肿瘤细胞增殖转移的潜在靶点,但其机制和潜在临床意义仍需更多的试验探索。HER2/neu、HIF-1 α 与 ki-67 在结直肠癌^[39,40]、乳腺癌^[41,42]、胃癌^[32,43] 等恶性肿瘤中都呈显著的相关性,在本研究中,HER2、HIF-1 α 与 ki-67 高表达之间存在同向相关性(r 值分别为 0.196、0.287),具有统计学意义($P < 0.05$),与之前的文献比较符合,提示 HER2 和 HIF-1 α 阳性的肿瘤细胞可能具有更高的增殖活性和侵袭性。

本研究没有就 HER2、HIF-1 α 和 ki-67 的表达情况做生存分析,所以无法直接判断三者是否是胃癌的直接独立预后因素。但从三者与胃腺癌的临床病理特征的相关性分析来看,三者的过表达均预示着胃腺癌的预后更差。HER2 与 HIF-1 α 、ki-67 的高表达之间存在相关性,提示我们,在缺氧环境下,HER2 阳性的胃癌细胞可能有更高的增殖活性,HER2、HIF-1 α 和 ki-67 可能通过某些通路共同促进胃癌的发生和发展。因此我们可以同

时应用 HER2、HIF-1 α 和 ki-67 的状态来判断胃癌的预后及指导治疗;另外,关于 ki-67 在细胞周期中的表达和调节机制也正在研究中,这预示着 ki-67 可能成为胃癌治疗中一个潜在的靶点,仍需要更多的基础研究和临床试验提供证据,从而不断优化胃癌诊疗策略。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 0:1-31.
- [2] Laughner E, Taghavi P, Chiles K, et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) synthesis: Novel mechanism for HIF-1 mediated vascular endothelial growth factor expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21:3995-4004.
- [3] Bos R, vander Groep P, Greijer AE, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha in dependently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2003, 97:1573-1581.
- [4] Raquel Sales Gil, Vagnarelli RP. Ki-67: More Hidden behind a "Classic Proliferation Marker." [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2018, 43(10).
- [5] Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC) TNM classification of malignant tumours [M]. 7th edition. New York: Wiley-Liss, 2010:117-126.
- [6] 《胃癌 HER2 检测指南》专家组. 胃癌 HER2 检测指南(2016版) [J]. *中华病理学杂志*, 2016, 45(8):528-532.
- [7] Bazell R. Her-2: The making of herceptin, a revolutionary treatment for breast cancer [M]. Random House, 2011.
- [8] Rebeschung C, Barnoud R, Stéfani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer* 2005; 8: 249-252.
- [9] Park DI, Yun JW, Park JH, et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51: 1371-1379.
- [10] Bang YJ, Cutsem E, Feyereisla A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER/neu-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2010, 376 (9742):687-697.
- [11] Pei T, Meng Q, Han J, et al. Oleocanthol inhibits growth and metastasis by blocking activation of STAT3 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (28): 43475-43491.
- [12] Xu C, Liu Y, Jiang D, et al. Poor efficacy response to trastuzumab therapy in advanced gastric cancer with homogeneous HER2/neu positive and non-intestinal type [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (20):33185-33196.
- [13] Boku N. HER2/neu-positive Gastric cancer [J]. *Gastric cancer*, 2014, 17(1):1-12.
- [14] 姜雷, 孙慧慧, 关泉林, 等. 胃癌组织中 HER2 的表达及其临床意义 [J]. *肿瘤*, 2018, (3):222-228.
- [15] 雷瑞雪, 苗兰芳. HER2 阳性胃腺癌临床病理分析 [J]. *中国实用医刊*, 2018, 45(8):29-31.
- [16] Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, et al. Therapeutic strategy targeting the mTOR-IF-alpha-EGF pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma [J]. *Pathol int*, 2009, 59(1):19-27.
- [17] Huang W, Ding X, Ye H, et al. Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway [J]. *Neuroreport*, 2018, 12, 29 (18): 1578-1585.
- [18] Wang Q, Lu D, Fan L, et al. COX-2 induces apoptosis-resistance in hepatocellular carcinoma cells via the HIF-1 α /PKM2 pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1):475-488.
- [19] 杨伟强, 钟鸣, 陈跃宇, 等. HIF-1 α 在乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(21):4063-4066.
- [20] 薛英杰, 孟令新, 王郡甫. HIF-1 α 、VEGF-C 在贲门癌组织中的表达与临床意义 [J]. *实用癌症杂志*, 2011, 26(1):22-26.
- [21] 许凯, 宋莉莉, 卢红明, 等. 探究胃癌中葡萄糖转运蛋白 1、缺氧诱导因子-1 α 的表达及临床意义 [J]. *中国现代药物应用*, 2018, 12(16):30-31.
- [22] 侯绍章, 张婷, 李媛, 等. 胃腺癌中 ki-67、HER2、P53、CEA、HIF-1 α 、EGFR 和 VEGF 的表达及意义 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2017, 39(11):1267-1271.
- [23] 李小芳, 魏亚宁, 贾友超, 等. 低氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子在胃癌组织及癌旁组织中的表达情况及临床意义 [J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2014, 6(11):57-60.
- [24] Feldser D F, Agani N V, Iyer B, et al. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 a and insulin-like growth factor 2 [J]. *Cancer Res*, 1999, 59:3915-3918.
- [25] 顾晓萌, 卢雪峰, 王慧, 等. pAKT、HIF-1 α 在胃癌中的表达及与血管生成的关系 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2007, 10(3):219-223.
- [26] Whelan K A, Schwab L P, Karakashev S V, et al. The Oncogene HER2/neu (ERBB2) Requires the Hypoxia-inducible Factor HIF-1 for Mammary Tumor Growth and Anoikis Resistance [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(22):15865-15877.
- [27] Aghazadeh S, Yazdanparast R. Activation of STAT3/HIF-1 α /Hes-1 axis promotes trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells via down-regulation of PTEN [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2017, 1861(8):1970-1980.
- [28] Kallio P J, Wilson W J, Brien S O, et al. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor -1 a by the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Biol. Chem*, 1999, 274:6519-6525.
- [29] Karakashev S V, Reginato M J. Hypoxia/HIF1 α induces lapatinib

- resistance in ERBB2-positive breast cancer cells via regulation of DUSP2[J].Oncotarget,2015,6: 1967-1980.
- [30] Lazarev A,Klimachev V,Avdalian A,et al.ki-67 and p53 expression in gastric dysplasias and cancer [J].Arkh Patol, 2005,68(3):6-10.
- [31] Zheng Y, Wang L, Zhang J P, et al. Expression of p53, c-erbB-2 and ki-67 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol,2010,16(3):339.
- [32] Ahmed A,Al-Tamimi DM. Incorporation of p-53 mutation status and ki-67 proliferating index in classifying HER2/neu positive gastric adenocarcinoma[J].Libyan Journal of Medicine, 2018,13(1):1-6.
- [33] 夏加增,李建平,李承龙,等.Survivin 和 PTEN 及 ki-67 蛋白在胃癌中的表达及其相关性 [J]. 中华实验外科杂志, 2008,25(10):1344.
- [34] 叶海主,何连君,袁倩倩,等.HER2 和 ki-67 在胃癌组织中的表达及其相关性研究.长治医学院学报.2017,31(2):93-97.
- [35] Lazar D,Taban S,Sporea I,et al.ki-67 expression in gastric cancer:Results from a prospective study with long-term follow-up[J].Rom J Morphol Embryol,2010,51(4):655.
- [36] 王永辉,毛卫波,楼建,等.CD44V6, HER2 及 ki-67 在胃癌和癌旁组织中的表达及相关性分析 [J]. 浙江实用医学, 2014,6(19):160-164.
- [37] Yerushalmi R,Woods R, Ravdin PM,et al.ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential, Lancet Oncol, 2010,11(2):174-183.
- [38] Luo G, Hu Y, Zhang Z, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of ki-67 expression in patients with gastric cancer:a meta-analysis[J].Oncotarget,2017,8(30):50273.
- [39] 孙旭凌,申婧,黄桂林,等.结直肠癌 HER2 及 ki-67 表达的关系及预后因素分析[J].重庆医学,2018,47(12):1610-1615.
- [40] 张蔚桐,姚宏亮,雷三林,等.细胞增殖核抗原 Ki-67、血管内皮生长因子与缺氧诱导因子-1 α 在结直肠腺癌组织中表达的临床意义 [J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(19): 1759-1762.
- [41] Maria A,El-Shebiny M,El-Saka A,et al.Expression of truncated HER2/neu and its prognostic value in HER2-positive breast cancer patients [J].Journal of the Egyptian National Cancer Institute,2018,30(2):49-55.
- [42] 范凤凤,杨华锋,唐鲁兵,等.缺氧诱导因子 1 α 和 Ki67 在三阴性乳腺癌中的表达及意义 [J]. 江苏医药,2015,41(03): 268-270.
- [43] Ieni A, Barresi V, Giuffrè G, et al. HER2/neu status in advanced gastric carcinoma: a retrospective multicentric analysis from Sicily[J]. Oncol Lett,2013,6(6):1591-1594.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对参考文献撰写的最新要求

针对多数作者来稿中参考文献书写不规范的情况,本刊在此将文稿书写要求刊登出来,烦请各位作者注意。本刊文稿引用参考文献时,必须与其原文核对无误,请按采用顺序编码著录,依照其在正文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。未发表的观察资料一般不作为参考文献,确定需要引用时,可将其在正文相应处注明。2次文献不适宜作为参考文献。尽量避免引用摘要作为参考文献。文献作者在3位以内者,姓名均予以列出;3位以上者,只列出前3位,后加“等”、“et al”(西文)、“他”(日文)、“и.т.д.”(俄文);作者姓名一律姓氏在前,名字在后。外国人名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点;日文汉字请按规定书写,勿与我国汉字及简化字混淆。不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”、“and”等连词。文献类型和电子文献载体标志代码参照 GB 3469《文献类型与文献载体代码》,题名后标注文献类型标志,电子文献必须标注著录项目。外文期刊名称用缩写,以美国国立医学图书馆编辑的 *Index Medicus* 格式为准。每条参考文献必须著录完整的起止页码。