

MKI67在胰腺癌中的表达及临床意义

王虎¹, 尹艳梅¹, 杜昊轩¹, 陈浩¹, 马小鹏¹, 戴爱斌¹, 朱克祥^{1,2}

Expression and Clinical Significance of MKI67 in Pancreatic Cancer

WANG Hu¹, YIN Yanmei¹, DU Haoxuan¹, CHEN Hao¹, MA Xiaopeng¹, DAI Aibin¹, ZHU Kexiang^{1,2}

1. The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. Department of General Surgery, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Corresponding Author: ZHU Kexiang, E-mail: flexzhu69102020@163.com

Abstract: Objectives To explore the expression, biological function, and mechanism of MKI67 in pancreatic cancer and its clinical significance. **Methods** The expression level, diagnosis, and prognostic value of MKI67 in pancreatic cancer were analyzed using public databases. We also investigated the association between the MKI67 with immune cell infiltration and immune checkpoint molecules. We analyzed the functional pathway enrichment to uncover the possible molecular mechanisms. qRT-PCR and Western blot assay were used to verify the expression of MKI67 mRNA and protein. Immunohistochemistry staining was used to detect the expression of MKI67 in tissue protein. **Results** The high expression of MKI67 was significantly associated with high histological grades and poor outcomes in pancreatic cancer. High MKI67 expression was correlated with poor prognosis of pancreatic cancer patients ($P=0.009$). MKI67 was an independent risk factor for the patient outcome (95%CI: 1.084-1.743, $P<0.05$). The MKI67 expression was positively correlated with the helper T cell 2 levels but negatively correlated with plasmacytoid DC, NK cells, mast cells, the T follicular helper, immune DC, and CD8 T cells. **Conclusion** MKI67 may serve as a biomarker for the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer and the mechanism might be associated with immune escape or immunosuppression.

Key words: MKI67; Pancreatic cancer; Diagnosis; Clinical prognosis; Immunity

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 81960516)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 探讨MKI67在胰腺癌中的表达、生物学功能、潜在机制及其临床意义。方法 利用公共数据库分析MKI67在胰腺癌中的表达水平、诊断和预后价值, 研究MKI67与免疫细胞浸润和免疫检查点分子之间的关系, 并通过功能通路的富集分析揭示其可能的分子机制。采用qRT-PCR和Western blot法验证MKI67在mRNA和蛋白质水平的表达, 采用免疫组织化学染色对MKI67在组织蛋白的表达水平进行检测。结果 MKI67的高表达与胰腺癌较高的组织学分级和较差的预后显著相关。MKI67表达升高与胰腺癌患者不良预后相关 ($P=0.009$), 是影响患者预后的独立危险因素 (95%CI: 1.084-1.743, $P<0.05$)。MKI67的表达与Th2细胞水平呈正相关, 而与pDC细胞、NK细胞、肥大细胞、T滤泡辅助细胞、免疫DC和CD8⁺T细胞呈负相关。结论 MKI67可能作为胰腺癌的诊断和预后生物标志物, 其机制可能与免疫逃逸或免疫抑制相关。

关键词: MKI67; 胰腺癌; 诊断; 临床预后; 免疫力

中图分类号: R735.9

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 是一种具有高度侵袭性和致命性的消化系统恶性肿瘤^[1], 因其缺乏早期诊断的特异性标志物, 发现时患者常处于晚期阶段, 只有15%~20%的患者可接受手术治疗。但即使经过根治性R0切除, 胰腺癌的复发率也很高^[2-3]。因此, 找到一种能够精确诊断胰腺癌并协助预后评估的生物标志物显得至关重要。

收稿日期: 2023-07-14; 修回日期: 2023-09-14

基金项目: 国家自然科学基金 (81960516)

作者单位: 1. 730000 兰州, 兰州大学第一临床医学院; 2. 730000 兰州, 兰州大学第一医院普外科

通信作者: 朱克祥 (1969-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事消化道肿瘤的基础及临床研究, E-mail: flexzhu69102020@163.com, ORCID: 0000-0003-4272-5221

作者简介: 王虎 (1992-), 男, 硕士, 主要从事肝胆胰外科的基础及临床研究, ORCID: 0009-0005-4376-5526

MKI67广泛表达于增殖期细胞,与有丝分裂密切相关,是细胞增殖中不可或缺的核蛋白基因^[4]。现阶段研究表明,在胃癌、结直肠癌和卵巢癌中,高表达的MKI67与肿瘤的快速进展与不良预后密切相关,可能作为肿瘤基因治疗的新靶点,但在胰腺癌中未见相关研究^[5-8]。本研究中,我们利用公共数据库和临床数据库分析MKI67在胰腺癌中的表达及预测诊断和预后价值,并进一步探讨MKI67在胰腺癌中潜在的作用机制。

1 资料与方法

1.1 基因表达数据下载

从GTEX数据库中提取167例正常胰腺组织的基因表达数据。从TCGA数据库中提取178例胰腺癌组织和4例正常胰腺组织的基因表达数据。合并TCGA和GTEX的数据用于基因的差异表达分析。基于数据集GSE16515验证MKI67在胰腺癌中的表达,基于UALCAN^[9-10]数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/>)中CPTAC^[11-12]模块,分析MKI67在胰腺癌中的蛋白表达水平。

1.2 临床数据的下载

从TCGA数据库中提取所有胰腺癌患者的临床资料,选取其中临床数据和生存信息完整的165例样本用于分析MKI67表达与临床指标的相关性。将收集的临床基线资料均转换为等级资料,包括年龄(≥ 65 岁 vs. < 65 岁)、性别、慢性胰腺炎病史、恶性肿瘤病史、组织学分级、TNM分期、病理分期、治疗结果、手术方式和生存状态。收集患者的随访时间和随访状态用于生存相关的分析。

1.3 诊断价值分析

在仙桃数据库(<https://www.xiantao.love/>)中,用“pROC”包(1.17.0.1)进行受试者工作特征曲线(ROC)分析并用“ggplot2”包进行可视化,ROC曲线评价基因诊断胰腺癌的敏感度和特异性。横坐标代表假阳性率(false positive rate, FPR),纵坐标代表真阳性率(true positive rate, TPR)。ROC曲线下面积(AUC)介于0.5和1之间。AUC值越接近1,诊断效果越好。AUC在0.5~0.7表示准确度低,AUC在0.7~0.9表示有一定的准确度,高于0.9表示准确度高。

1.4 生存和预后分析

通过Kaplan-Meier对MKI67在PAAD中的预后进行分析评估,包括总生存期(overall survival, OS)、疾病特异性生存期(disease-specific survival, DSS)和无进展生存期(progression-free sur-

vival, PFS)。根据TCGA数据库中PAAD RNA-seq表达和临床数据,排除临床信息不完整的样本,提取患者信息和MKI67 mRNA的表达水平构建单因素和多因素Cox回归模型。

1.5 细胞和试剂

HPNE、MIA PaCa-2、PANC-1、AsPC-1和SW-1990细胞株购自中国科学院典藏细胞库(上海),TRIzol试剂、反转录试剂盒和PCR扩增试剂盒购自北京TaKaRa公司,MKI67抗体购自美国ThermoFisher公司,蛋白提取试剂盒、蛋白定量试剂盒购自索莱宝公司,5×蛋白上样缓冲液、电泳液、转膜液购自武汉Servicebio公司,PVDF膜购自美国Millipore公司,SP试剂盒、防脱片剂、DBA显色试剂盒均购自北京中杉金桥公司。

1.6 细胞培养

人正常胰腺细胞株(HPNE)和人胰腺癌细胞株(SW-1990、MIA PaCa-2、PANC-1)用含10%胎牛血清的DMEM培养基,胰腺癌细胞株(AsPC-1)用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基。所有细胞株均置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中进行培养。

1.7 qRT-PCR检测正常胰腺细胞与胰腺癌细胞中MKI67的mRNA表达水平

实验步骤:(1)用TRIzol提取细胞中总RNA;(2)根据反转录试剂盒合成cDNA;(3)以获得的cDNA为模板,用TaKaRa qPCR Master Mix试剂盒对目的基因进行PCR扩增,引物序列:MKI67(F):5'-CCACACTGTGTC-GTCGTTT-3'和MKI67(R):5'-CCGTGCGCT-TATCCATTCA-3';GAPDH(F):5'-GGGAGC-CAAAAGGGTTCAT-3'和GAPDH(R):5'-GAGTCCTTCCACGATAACCAA-3';(4)记录每个标本的目的基因Ct值和内参照Ct值,计算目的基因的相对倍数。

1.8 Western blot法检测正常胰腺细胞与胰腺癌细胞中MKI67在蛋白水平的表达

实验步骤:收集各组细胞;加入RIPA细胞裂解液;提取细胞总蛋白进行SDS-PAGE电泳;将蛋白湿转至PVDF膜上;5%BSA封闭2h;加入一抗,4℃孵育过夜;TBST洗三次,每次8min;加入二抗,室温孵育1h;TBST洗三次,每次8min;ECL发光试剂显影。

1.9 临床样本收集

从生物样本库中获取2020年9月至2022年8月在兰州大学第一医院接受胰腺癌手术治疗的50例肿瘤组织样本和50例配对癌旁组织石蜡包埋组织。所

有患者术后病理确诊为胰腺导管细胞癌，均未接受化疗和放疗。所有患者签署了书面知情同意书，方案由兰州大学第一医院伦理委员会批准。

1.10 免疫组织化学染色检测MKI67在组织蛋白表达水平

实验步骤：收集病理标本（石蜡玻片）；进行脱蜡、水化、修复；一抗孵育；显色、对比染色；结果观察及分析：在显微镜下随机选取三个视野进行拍照，用Image Pro Plus软件进行分析，读取图片中蛋白表达的累计光密度值（IOD）和面积（Area），并进行计算，得到平均光密度值。

1.11 MKI67与免疫细胞浸润及免疫检查点相关性分析

基于TCGA数据库，用仙桃在线工具分析了MKI67与肿瘤微环境中免疫细胞浸润的相关性，统计学方法为Spearman相关分析；TISIDB^[13]（<http://cis.hku.hk/TISIDB/index.php>）是一个包含了肿瘤免疫相关数据的在线网络资源，主要研究基因和肿瘤免疫的相互作用。用TISIDB研究MKI67和免疫检查点分子之间的相关性。

1.12 基因富集分析

基因本体论（gene ontology, GO）可以提取基因集的显著生物学功能。生物过程、细胞成分和分子功能是GO分析最重要的三个组成。京都基因和基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）可以评估基因组所参与的生物学过程和细胞通路。通过ClusterProfiler R包进行MKI67关联基因的GO分析和KEGG分析，ggplot2 R包用于结果的可视化。

1.13 统计学方法

利用SPSS22.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料使用t检验进行比较；分类变量的组间比较使用卡方检验；Spearman分析用于临床变量和MKI67表达量的相关性分析；Cox回归模型用于分析临床变量和MKI67对胰腺癌患者的预后意义；Kaplan-Meier生存曲线用于分析MKI67与患者总生存期的关系。使用R4.2.0软件进行图形绘制。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MKI67在胰腺癌中表达升高

首先分析MKI67在TCGA中33种癌症中的表达。与相应的正常组织相比，22种癌症类型的MKI67显著上调，包括膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润性癌等，见图1A。与正常组织相比，MKI67

在胰腺癌组织中的表达水平明显高于正常组（ $P < 0.05$ ），见图1B。并在GSE16515数据集中同样发现胰腺癌组织中MKI67表达上调，见图1C。除此之外MKI67蛋白在胰腺癌中表达水平明显高于正常组织，见图1D。为了验证MKI67在体外胰腺癌细胞中的表达，正常胰腺细胞与四株胰腺癌细胞进行比较，qRT-PCR和Western blot结果显示MKI67在胰腺癌细胞系中表达显著升高，见图1E~F）。进一步研究MKI67在胰腺癌中的表达特征，用50例胰腺癌患者临床手术标本及配对癌旁组织进行免疫组织化学染色，结果显示，MKI67在胰腺癌组织中的表达明显高于配对癌旁组织，见图1G。

2.2 MKI67表达与临床诊断的相关性

在TCGA数据库中，对MKI67在胰腺癌的诊断价值进行了预测。ROC曲线用于评估MKI67的诊断敏感度和特异性，见图2，AUC=0.985（95%CI: 0.974~0.997），表明MKI67具有一定的诊断价值。

2.3 MKI67表达与临床特征的相关性

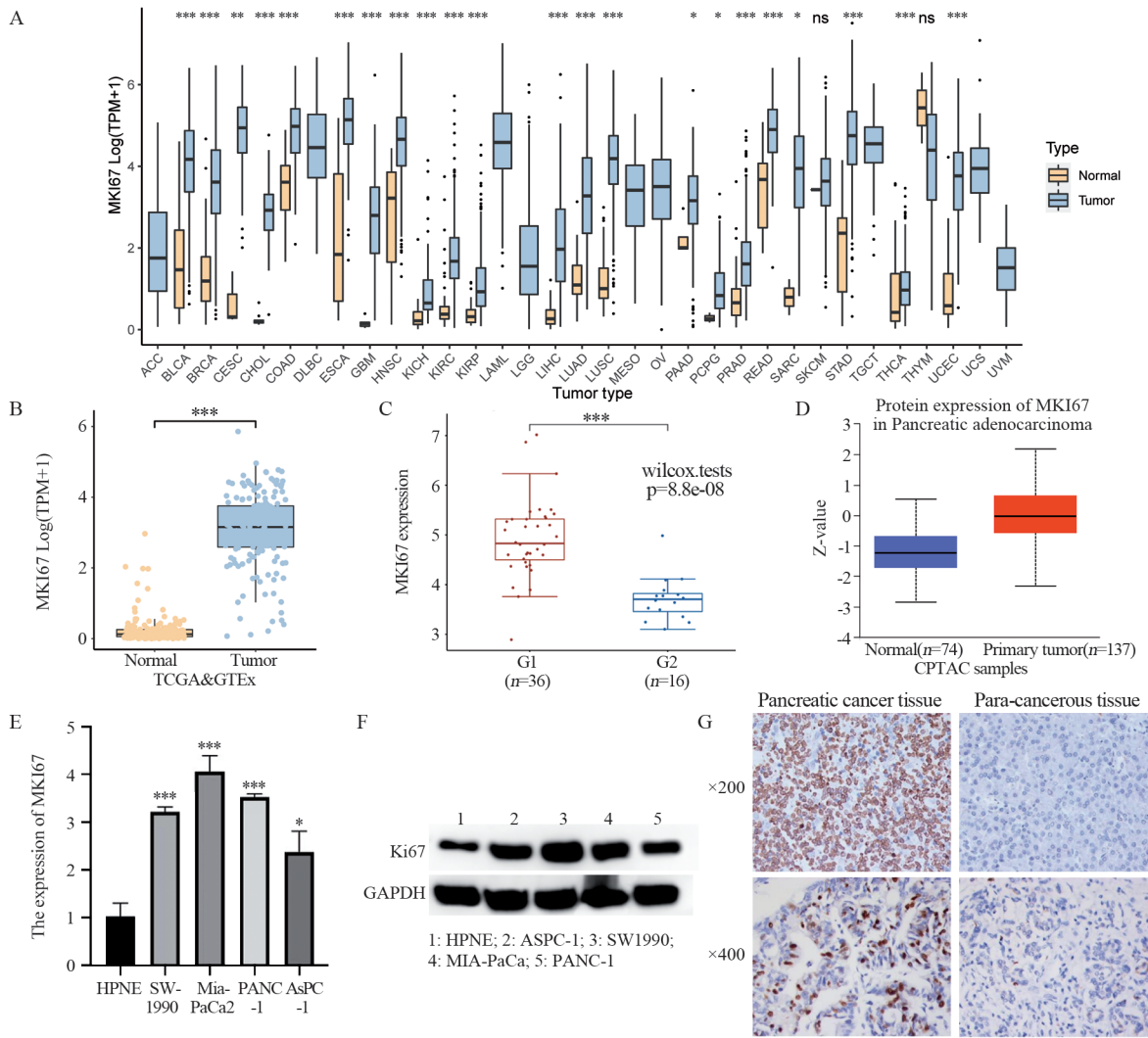
TCGA数据库中具有不同临床特征的胰腺癌患者中MKI67的mRNA表达，见图3。在胰腺癌患者中，MKI67表达与慢性胰腺炎、组织学分级和生存状态显著相关；在慢性胰腺炎（图3B）、G3患者（图3D）和不良结局患者（图3I）中，MKI67表达更高。

2.4 MKI67表达与生存状态及预后的相关性

Kaplan-Meier生存曲线用于评估MKI67高、低表达组之间患者与OS、DSS和PFS的差异，结果显示高表达组患者的预后显著低于低表达组，见图4A~C。对TCGA数据库中获取临床信息完整的165例胰腺癌样本进行分析，按照MKI67表达量的均值将所有样本分为MKI67高表达组和低表达组。通过比较两组间的临床基线资料发现，高表达组患者的肿瘤组织分期高于低表达组，且生存状态低于低表达组。而其他临床变量的组间差异无统计学意义，见表1。表明MKI67表达与胰腺癌患者的不良预后相关。

2.5 MKI67表达与免疫浸润及免疫检查点分子之间的相关性

Spearman相关分析显示MKI67在胰腺癌微环境中与Th2细胞显著正相关（ $P < 0.05$ ），与pDC、NK、Mast、TFH、iDC、CD8⁺T等14种免疫细胞呈负相关（ $P < 0.05$ ），见图5A。此外，MKI67表达与免疫检查点分子CD274、IL10RB、LGALS9和PVRL2呈正相关，见图5B~E。



A: expression of MKI67 in the 33 types of tumors included in the TCGA database; B: expression of MKI67 in normal pancreatic tissue and pancreatic cancer tissue in TCGA and GTEx databases; C: expression of MKI67 in pancreatic cancer and adjacent tissues in the GSE16515 data set; D: expression of the MKI67 protein in pancreatic cancer and adjacent tissues in UALCAN database; E-F: expression levels of MKI67 RNA and protein in pancreatic cells and pancreatic cancer cells; G: expression of MKI67 in pancreatic cancer tissues and paired paracancerous tissues. ns: $P \geq 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

图1 MKI67在胰腺癌中的表达水平

Figure 1 Expression levels of MKI67 in pancreatic cancer

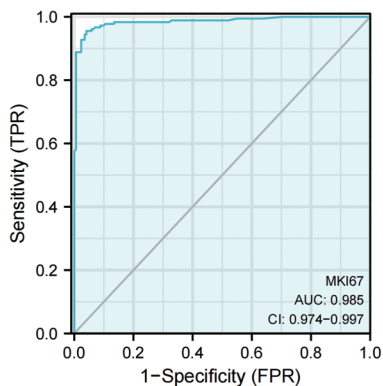


图2 MKI67的ROC曲线分析

Figure 2 ROC curve analysis of MKI67

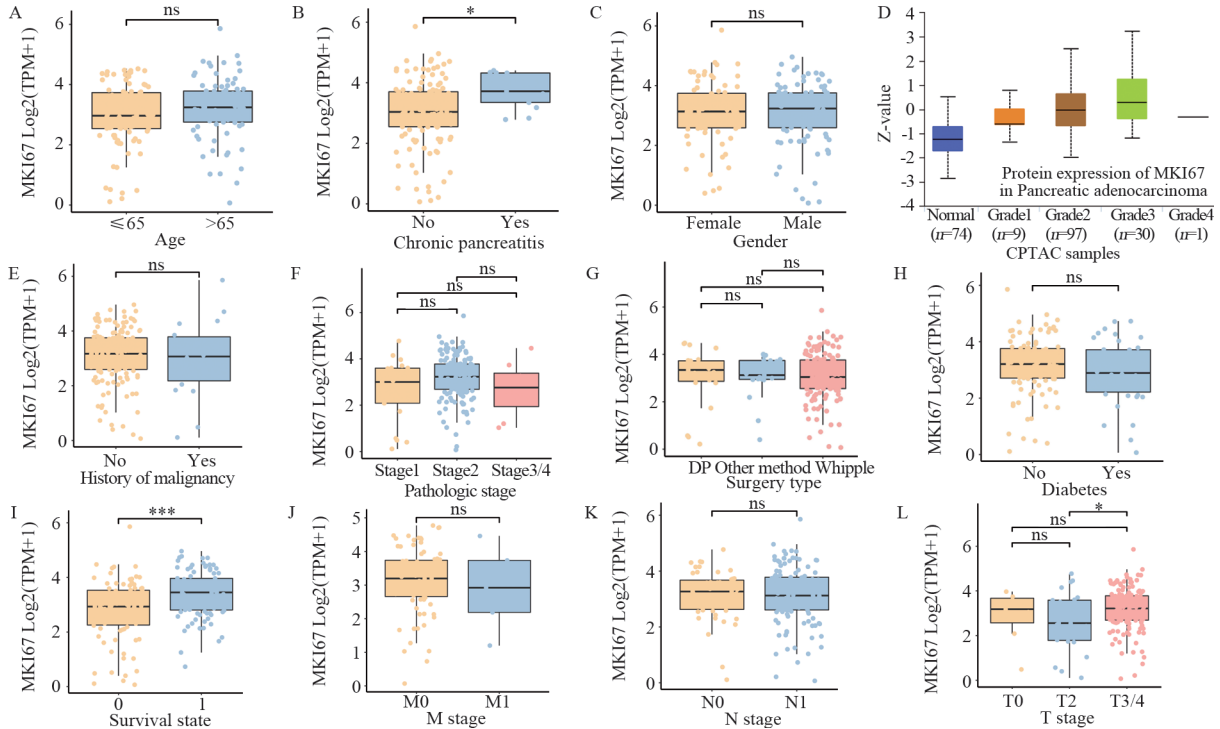
2.6 MKI67相关富集分析

对TCGA数据库的胰腺癌样本的基因表达进行分析，共获得1 019个DEGs，对其进行GO富集分析，结果显示MKI67基因参与了：（1）生物过程（biological process, BP），包括细胞器裂变、核分裂、染色体分离等；（2）细胞成分（cellular component, CC），MKI67构成了染色体区域等；（3）分子功能（molecular function, MF），MKI67可能参与调节微管蛋白结合等功能，见图6A。对其进行KEGG通路分析，结果显示：MKI67主要参与细胞周期、DNA复制、卵母细胞减数分裂等功能，见图6B。

3 讨论

胰腺癌是一种高度致命的恶性肿瘤，早期症状不明显，易发生远处转移，预后差。尽管在临床实践中有各种早期诊断的生物标志物，但开发新

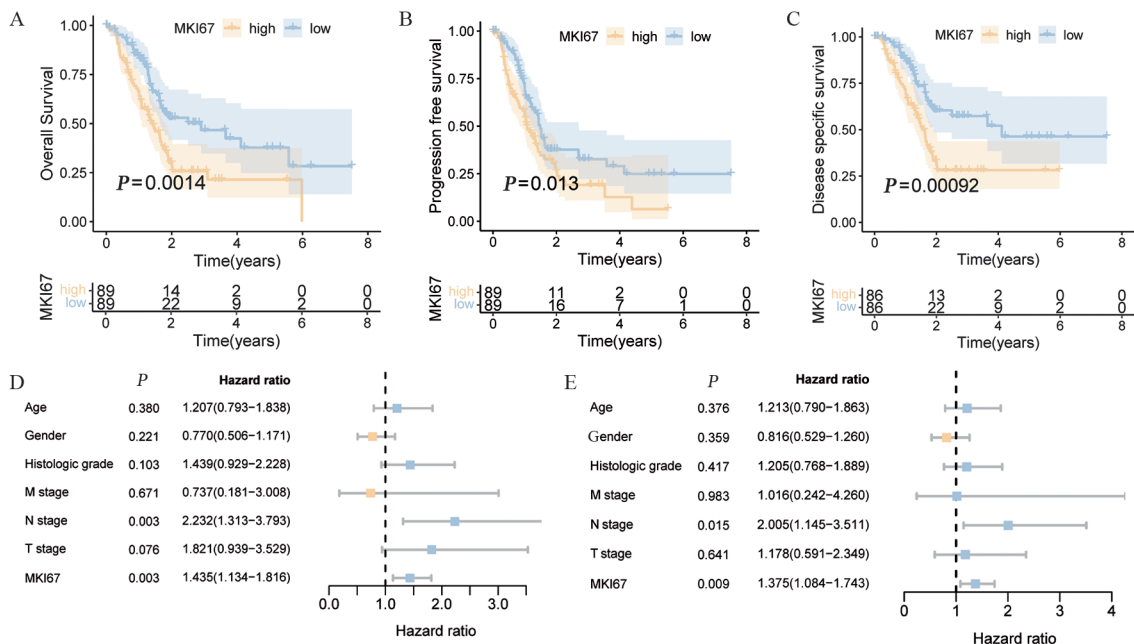
的、更敏感的肿瘤标志物仍是必要的^[14]。MKI67主要分布在核仁中，MKI67位于10q25ter染色体上，编码两个大小分别为345和395 kDa的同工异构体。MKI67的表达在G₁期至有丝分裂时升高，并在有丝



A: age; B: chronic pancreatitis; C: gender; D: histopathological grade; E: history of malignancy; F: pathologic stage; G: surgery type; H: diabetes; I: survival state, 0: survival; 1: death; J-L: metastasis, lymph node, tumor stage; DP: distal pancreatectomy; ns: $P \geq 0.05$; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

图3 胰腺癌中MKI67与不同临床参数的关系

Figure 3 Relationship between MKI67 and various clinical parameters of pancreatic cancer



A-C: Kaplan-Meier survival curves for the OS, PFS, and DSS; D-E: univariate and multivariate Cox regression analysis of the PFS in patients with pancreatic cancer.

图4 MKI67表达与胰腺癌患者的预后关系

Figure 4 Association of MKI67 expression and prognosis of pancreatic cancer patients

表1 TCGA数据库中165例胰腺癌患者的临床特征
Table 1 Clinical characteristics of 165 pancreatic patients in TCGA database

Characteristic	Group	MKI67 expression (n(%))		P
		High	Low	
Age (years)	≤65	42(47.19)	51(57.30)	0.2300
	>65	47(52.81)	38(42.70)	
Gender	Female	38(42.7)	42(47.19)	0.6512
	Male	51(57.3)	47(52.81)	
Chronic pancreatitis	No	60(84.51)	68(97.14)	0.0213
	Yes	11(15.49)	2(2.86)	
History of malignancy	No	81(91.01)	79(88.76)	0.8037
	Yes	8(8.99)	10(11.24)	
Histologic grade	G1	6(6.82)	25(28.41)	0.0005
	G2	51(57.95)	44(50.00)	
	G3/4	31(35.23)	19(21.59)	
T stage	T1	4(4.49)	3(3.45)	0.6190
	T2	10(11.24)	14(16.09)	
	T3/4	75(84.27)	70(80.46)	
N stage	N0	29(32.95)	21(24.71)	0.3036
	N1	59(67.05)	64(75.29)	
M stage	M0	40(95.24)	39(92.86%)	>0.999
	M1	2(4.76)	3(7.14)	
Pathologic stage	Stage 1	9(10.23)	12(13.79)	0.5573
	Stage2	76(86.36)	70(80.46)	
	Stage 3/4	3(3.41)	5(5.75)	
Therapy outcome	CR	30(50.85)	28(52.83)	0.3444
	PD	23(38.98)	17(32.08)	
	PR	2(3.39)	6(11.32%)	
	SD	4(6.78)	2(3.77)	
Surgery type	DP	15(16.85)	8(8.99)	0.2941
	Whipple	65(73.03)	71(79.78)	
	Other method	9(10.11)	10(11.24)	
Survival state	Alive	33(37.08)	53(59.55)	0.0044
	Death	56(62.92)	36(40.45)	

分裂后降低。该蛋白在G₀期不表达，但在有丝分裂、S期、G₁和G₂期显著表达^[15-16]。因此，MKI67的表达能表明细胞的增殖状态。在癌细胞中，MKI67表达升高可作为癌症预后的预测因子。

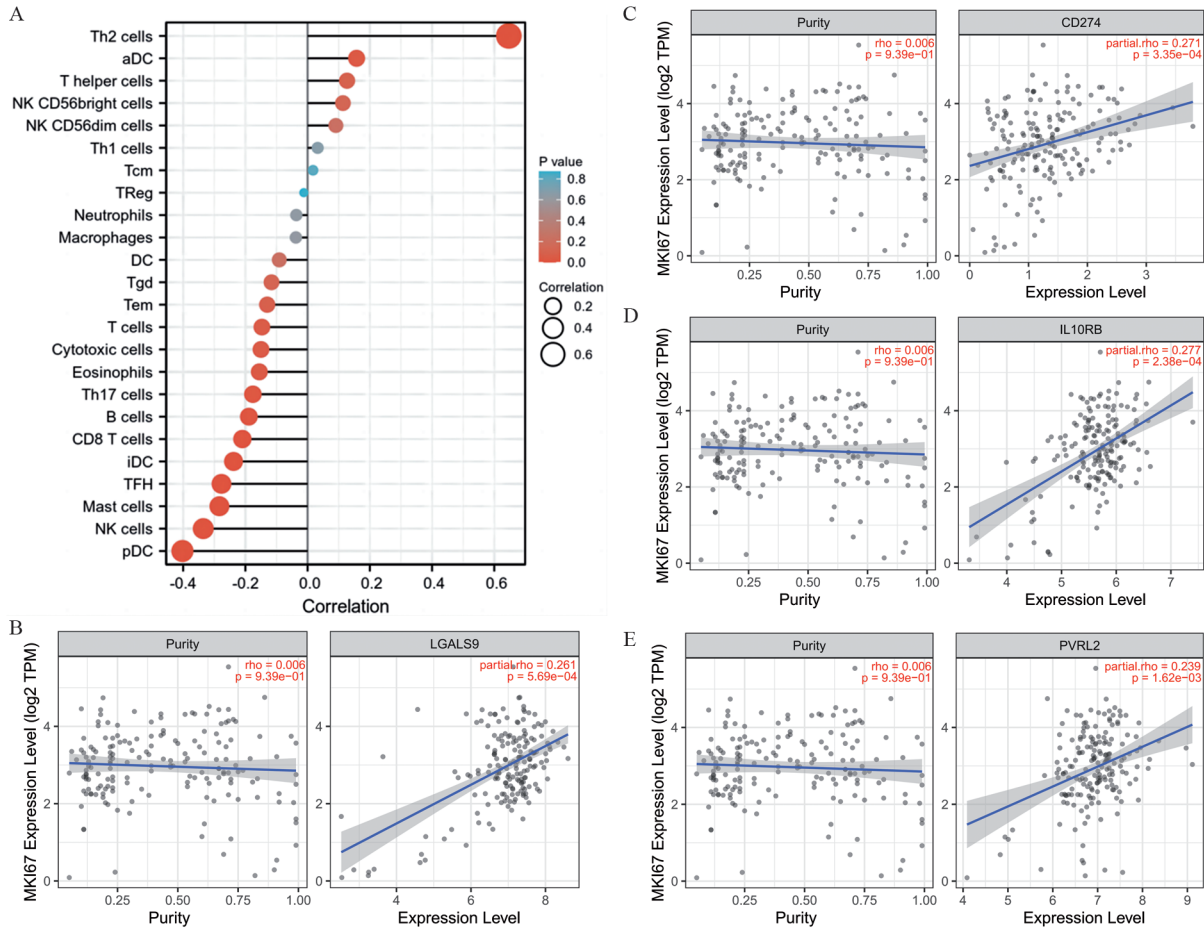
本研究公共数据库分析显示，MKI67 mRNA和蛋白表达水平在胰腺癌细胞和组织中均升高，这与结直肠癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌和原发性pT1尿路上皮癌的观察结果一致^[17-20]。在ROC曲线分析中，MKI67对胰腺癌具有较高的诊断价值，提示其具有成为胰腺癌诊断性生物标志物的潜力。临床特征关联分析显示，MKI67在G₃期肿瘤中表达高于G₁/G₂期，在死亡患者中表达高于幸存者，表明MKI67是胰腺癌进展的危险因素。在胰腺癌患者中，MKI67高表达组的OS、DSS和PFS均明显低于低表达组，这与在子宫平滑肌瘤中的结果一致^[21]。Cox单因素和多因素分析发现肿瘤N分期和MKI67表达水平是胰腺癌的独立预后因素，突出了MKI67作为预后生物

标志物的潜力。癌症是一种复杂的疾病，涉及免疫系统并与其相互作用^[22]。免疫微环境与肿瘤之间也存在着复杂的关系。我们分析了28种不同免疫细胞类型（免疫组）的时空动态。发现免疫浸润成分在每个肿瘤阶段都发生变化，特异性细胞对生存有显著影响^[23]。

MKI67与Th2细胞正相关。在人体中，Th1/Th2之间存在平衡，但Th2细胞往往占主导地位，这可能与肿瘤的免疫逃逸有关^[24]。已知由Th2细胞分泌的细胞因子，即TGF- β 、IL-10和IL-4，能够使癌细胞在不同类型的肿瘤中扩散和转移。IL-4与存在于免疫细胞上的受体之间相互作用，包括STAT6的磷酸化、核迁移和GATA3转录因子的表达^[25-26]。这一系列的作用最终导致Th2细胞因子的分泌，进而导致肿瘤生长和转移扩散。同时，MKI67与抗肿瘤免疫细胞呈负相关，包括肥大细胞、pDC、TFH、NK细胞和CD8⁺T细胞等。由此可知，MKI67可能与免疫逃避或免疫抑制有关。免疫检查点分析也显示MKI67表达与CD274呈正相关。CD274在癌症中表观遗传失调，并通过启动子区域甲基化发挥调节作用^[27]。GO分析显示MKI67主要参与核分裂、染色体分离、细胞器裂变、染色体区域构成、微管蛋白结合调节等功能，KEGG分析显示MKI67参与DNA复制、细胞周期、卵母细胞减数分裂、Fanconi贫血途径等功能。

我们通过qRT-PCR、Western blot和免疫组织化学染色比较了MKI67在胰腺癌细胞中的体外表达水平，发现组织间MKI67表达水平显著上调，这与我们使用TCGA和GTEx数据库进行的数据挖掘研究一致。研究中我们还发现，与正常组织相比，22种癌症中MKI67的表达显著上调，包括胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、肝细胞肝癌。在Wu等的研究中，也发现MKI67在肝细胞肝癌中表达上调，可以作为其预后生物标志物^[28]。

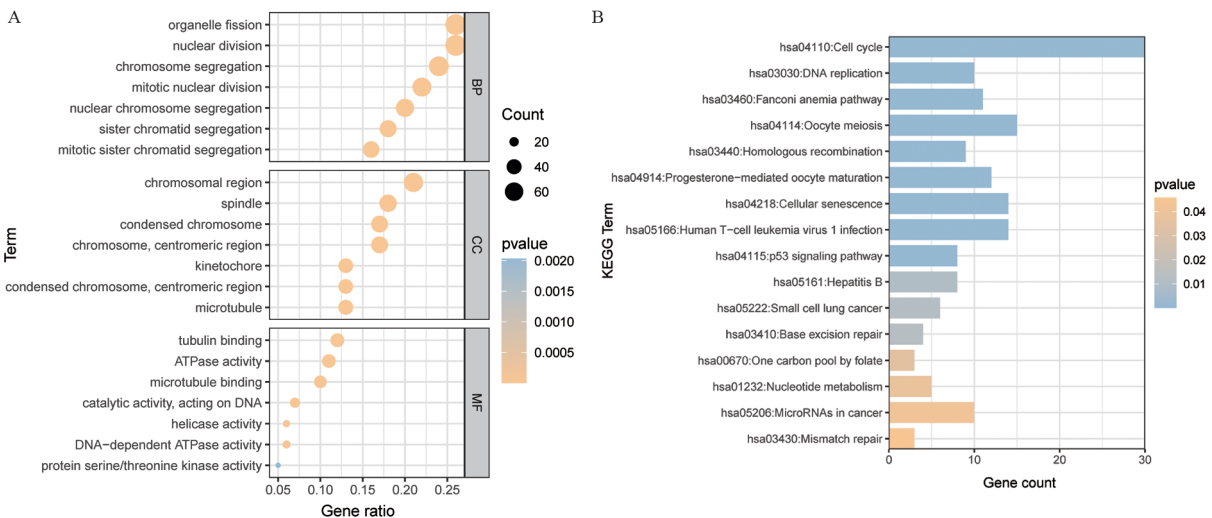
本研究也具有局限性。首先本研究主要基于生物信息学分析和部分基础实验，未对表型和机制进行深入探索，而且所基于数据库的生物信息学数据完整性不足，使得样本中正常胰腺组织数目较少且无法保障避免胰腺肿瘤微环境基质中遗传信息的干扰，因此分析结果的可靠性和准确性略有欠缺。其次，我们基于数据库研究了MKI67与免疫浸润之间的相关性，没有建立基于MKI67的预后预测模型来更准确地预测患者预后，验证其准确性，MKI67与免疫浸润之间相互影响的潜在途径有待进一步研究。此外，MKI67在胰腺癌中的确切分子作



A: Correlation of MKI67 with immune cells in the pancreatic cancer microenvironment; B-E: Correlation of MKI67 with CD274, IL10RB, LGALS9, and PVRL2 in the pancreatic cancer microenvironment.

图5 MKI67表达与免疫浸润和免疫检查点分子的相关性

Figure 5 Correlation of MKI67 expression with immune infiltration and immune checkpoint molecules



A: GO enrichment analysis of MKI67; B: KEGG pathway analysis of MKI67.

图6 MKI67功能富集分析

Figure 6 Functional enrichment analysis of MKI67

用仍有待进一步研究。

本研究表明, MKI67作为胰腺癌的免疫、诊断和预后指标具有潜在的效用, 为早期诊断和干

预提供了新的可能性。

利益冲突声明:

本文作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Cai J, Chen H, Lu M, *et al.* Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 520: 1-11.
- [2] Noe M, Hong SM, Wood LD, *et al.* Pancreatic cancer pathology viewed in the light of evolution[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2021, 40(3): 661-674.
- [3] Grossberg AJ, Chu LC, Deig CR, *et al.* Multidisciplinary standards of care and recent progress in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(5): 375-403.
- [4] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3): 311-322.
- [5] Xiong DD, Zeng CM, Jiang L, *et al.* Ki-67/MKI67 as a Predictive Biomarker for Clinical Outcome in Gastric Cancer Patients: an Updated Meta-analysis and Systematic Review involving 53 Studies and 7078 Patients[J]. *J Cancer*, 2019, 10(22): 5339-5354.
- [6] Klose J, Schmitt A, Pernthaler J, *et al.* Still proliferating CD44(+)/Ki67(+) tumor cells after neoadjuvant radiochemotherapy identify rectal cancer patients with poor survival[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2021, 47(8): 2078-2086.
- [7] Guadagno E, Pignatiello S, Borrelli G, *et al.* Ovarian borderline tumors, a subtype of neoplasm with controversial behavior. Role of Ki67 as a prognostic factor[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(11): 152633.
- [8] Mondal SK, Basak B, Bhattacharya S, *et al.* Role of WT1, B-cell lymphoma 2, Ki-67 (Mib1), and Her2/Neu as diagnostic and prognostic immunomarkers in ovarian serous and endometrioid carcinoma[J]. *J Cancer Res Ther*, 2021, 17(1): 164-169.
- [9] Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, *et al.* UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform[J]. *Neoplasia*, 2022, 25: 18-27.
- [10] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SaH, *et al.* UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-658.
- [11] Chen F, Chandrashekar DS, Varambally S, *et al.* Pan-cancer molecular subtypes revealed by mass-spectrometry-based proteomic characterization of more than 500 human cancers[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5679.
- [12] Zhang Y, Chen F, Chandrashekar DS, *et al.* Proteogenomic characterization of 2002 human cancers reveals pan-cancer molecular subtypes and associated pathways[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2669.
- [13] Ru B, Wong CN, Tong Y, *et al.* TISIDB: an integrated repository portal for tumor-immune system interactions[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(20): 4200-4202.
- [14] Luo G, Jin K, Deng S, *et al.* Roles of CA19-9 in pancreatic cancer: Biomarker, predictor and promoter[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2): 188409.
- [15] Li LT, Jiang G, Chen Q, *et al.* Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review)[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(3): 1566-1572.
- [16] Remnant L, Kochanova NY, Reid C, *et al.* The intrinsically disorderly story of Ki67[J]. *OpenBiol*, 2021, 11(8): 210120.
- [17] Grant L, Banerji S, Murphy L, *et al.* Androgen Receptor and Ki67 Expression and Survival Outcomes in Non-small Cell Lung Cancer[J]. *Horm Cancer*, 2018, 9(4): 288-294.
- [18] Kammerer-Jacquet SF, Ahmad A, Moller H, *et al.* Ki-67 is an independent predictor of prostate cancer death in routine needle biopsy samples: proving utility for routine assessments[J]. *Mod Pathol*, 2019, 32(9): 1303-1309.
- [19] van den Berg EJ, Duarte R, Dickens C, *et al.* Ki67 Immunohistochemistry Quantification in Breast Carcinoma: A Comparison of Visual Estimation, Counting, and ImmunoRatio[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2021, 29(2): 105-111.
- [20] Culpan M, Turan T, Ozkanli SS, *et al.* Prognostic and clinicopathologic value of ki-67 and profilin 1 immunohistochemical expression in primary pT1 urothelial bladder cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2021, 17(2): 434-442.
- [21] Hu X, Zhang H, Zheng X, *et al.* STMN1 and MKI67 Are Upregulated in Uterine Leiomyosarcoma and Are Potential Biomarkers for its Diagnosis[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e923749.
- [22] Finn OJ. Cancer immunology[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(25): 2704-2715.
- [23] Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, *et al.* Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. *Immunity*, 2013, 39(4): 782-795.
- [24] Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, *et al.* Cytokines in clinical cancer immunotherapy[J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(1): 6-15.
- [25] Maier E, Duschl A, Horejs-Hoeck J. STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(11): 2827-2833.
- [26] Mantovani A, Allavena P, Sica A, *et al.* Cancer-related inflammation[J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.
- [27] Fabrizio FP, Trombetta D, Rossi A, *et al.* Gene code CD274/PD-L1: from molecular basis toward cancer immunotherapy[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2018, 10: 1758835918815598.
- [28] Wu SY, Liao P, Yan LY, *et al.* Correlation of MKI67 with prognosis, immune infiltration, and T cell exhaustion in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Gastroenterol*, 2021, 21(1): 416.

[编辑: 邱颖慧; 校对: 安凤]

作者贡献:

王 虎: 文章的思路设计、基础实验验证及论文撰写
尹艳梅、杜昊轩: 生物信息学分析及文章撰写和修改
陈浩、马小鹏、戴爱斌: 文章修改和数据整理
朱克祥: 文章的设计指导、分析及撰写