细胞周期蛋白依赖性激酶 2 在上皮性卵巢癌中的表达及意义*

任 婕[1]，彭芝兰[2]
(1. 贵阳医学院附院 妇产科，贵州 贵阳 550004；2. 四川大学华西第二医院 妇产科，四川 成都 610041)

[摘 要] **目的**：检测上皮性卵巢癌、卵巢交界性肿瘤及正常卵巢组织中细胞周期蛋白依赖性激酶 2(P34^{cdc2}激酶)的表达，探讨其与临床病理因素之间的关系。**方法**：采用免疫组织化学 SP 法检测 30 例上皮性卵巢癌、14 例交界性肿瘤及 20 例正常卵巢组织中 P34^{cdc2}激酶的表达，应用 BioMias 图像分析系统计算阳性指数(positive index，*PI*)并结合临床资料，分析 P34^{cdc2}激酶与各临床病理因素的关系。**结果**：P34^{cdc2}激酶在正常卵巢组织、卵巢交界性肿瘤及上皮性卵巢癌组织中的 *PI* 呈递增趋势，每两组间比较差异有统计学意义；P34^{cdc2}在分期晚、组织分化差或伴有淋巴结转移时表达强度高，差异有统计学意义($P<0.05$)；在不同年龄组、不同病理类型间的 P34^{cdc2}激酶表达差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**：P34^{cdc2}激酶过度表达可能促进上皮性卵巢癌的发生、发展，高表达可能提示预后不良。

[关键词] 癌；卵巢；细胞周期蛋白依赖性激酶 2；细胞周期；预后
[中图分类号] R737.31 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2014)02-0167-04

The Expression of P34^{cdc2} in Epithelial Ovarian Carcinoma Tissues and Its Significance

REN Jie[1], PENG Zhilan[2]
(*1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Hospital of West China Medical Center of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To detect the expression of cyclin dependent kinase 2 (P34^{cdc2}) in epithelial ovarian carcinoma, borderline ovarian tumor and normal ovarian tissues, and to explore its relationship with clinical and pathological factors. **Methods**: The expression of P34^{cdc2} protein in 30 cases of epithelial ovarian carcinoma, 14 cases of borderline ovarian tumor and 20 cases of normal ovarian tissues were detected by using immunohistochemistry SP method. BioMias image analysis system was used to calculate the positive index (PI). The relationship between P34^{cdc2} expression and clinical pathological factors of ovarian cancer was analyzed. **Results**: PI showed an increasing trend from epithelial ovarian carcinoma, borderline ovarian tumor to normal ovarian tissues, and the differences between any two groups were significant. In epithelial ovarian carcinoma, the expression of P34^{cdc2} was intensive in patients in late stages, with poor tumor cell differentiation and lymphnode metastasis ($P<0.05$). The expression of P34^{cdc2} was not related to age and pathological types ($P>0.05$). **Conclusions**: P34^{cdc2} excessive expression may promote the occurrence and development of epithelial ovarian carcinoma. Its high expression may indicate poor prognosis.

[**Key words**] carcinoma; ovary; cyclin dependent kinase 2; cell cycle; prognosis

*[基金项目]贵州省科技厅资助项目(项目编号：E2009－39)
网络出版时间：2014－04－25 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140425.2002.020.html

卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤,发病率有逐渐增多趋势,其病因和发病机制迄今尚未完全阐明。目前普遍认为恶性肿瘤的发生是一个长期的、多阶段的、多基因改变累积的过程,细胞周期紊乱是所有肿瘤发生机制的基础[1]。细胞周期蛋白依赖性激酶2(P34^{cdc2}激酶)调控细胞周期 G_2 至 M 期。P34^{cdc2}激酶的过度表达,可使细胞周期进程发生紊乱,导致细胞恶性增殖,形成肿瘤[2-3]。人类多种常见肿瘤均有 P34^{cdc2}激酶的过度表达,提示该基因可能在肿瘤的发生和发展中起着重要作用[4-6]。关于 P34^{cdc2}在卵巢癌中的表达及机制的研究,目前国内外报道较少。本文采用免疫组化 SP 法检测上皮性卵巢癌、卵巢交界性肿瘤及正常卵巢组织中 P34^{cdc2}的表达,分析 P34^{cdc2}激酶与临床病理因素的关系,探讨其与卵巢癌发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 临床资料与主要试剂 30 例标本来自四川大学华西第二医院 2007 - 2008 年手术切除后卵巢癌组织病理标本。浆液性腺癌 22 例,黏液性腺癌 6 例,内膜样腺癌 2 例,年龄 39 ~ 79 岁,中位年龄 56 岁。按照国际妇产科联盟(FIGO)2013 年指定的手术及病理分期标准核准分期[7],Ⅰ期 6 例,Ⅱ期 4 例,Ⅲ期 19 例,Ⅳ期 1 例。组织学分级:高 - 中分化 6 例,低分化 24 例。14 例交界性肿瘤患者中黏液性肿瘤 5 例,浆液性肿瘤 9 例,Ⅰ期 7 例,Ⅱ期 6 例,Ⅲ期 1 例,年龄 29 ~ 58 岁,中位年龄为 41 岁。20 例正常卵巢组织来源于因子宫腺肌症等原因行附件切除或术中卵巢活检的正常标本。所有病例术前均未行放化疗和免疫治疗。鼠抗人 P34^{cdc2}单克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司,SP 试剂盒购于北京中山生物科技有限公司。

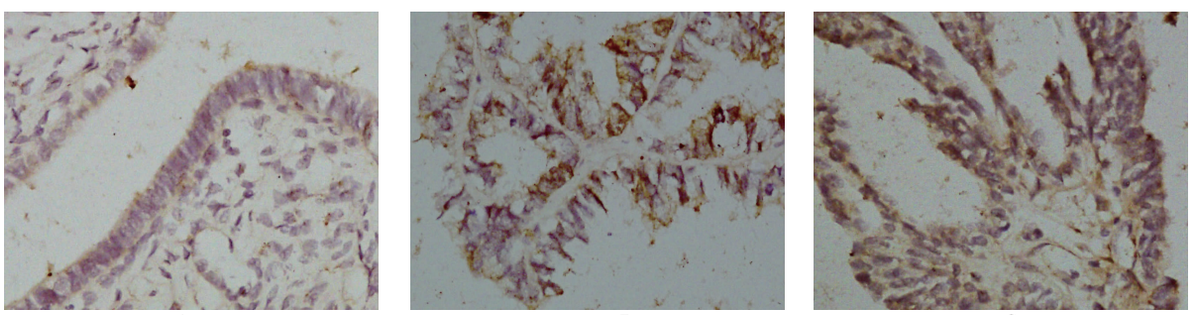
1.2 P34^{cdc2}激酶检测 实验步骤严格按试剂盒说明书进行,切片脱蜡后用 3% 双氧水封闭内源性过氧化物酶 10 min,经微波炉修复抗原,羊血清封闭后滴加稀释的鼠抗人 P34^{cdc2}单克隆抗体(1∶200),湿盒内 4 ℃过夜,滴加生物素标记的二抗,37 ℃放置 30 min,滴加辣根酶标记链霉亲和素,37 ℃放置 10 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,封片备检。所有标本均在同一条件下进行染色,以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知染色阳性的肝癌组织切片作阳性对照。

1.3 结果判断 P34^{cdc2}主要定位于细胞浆,以细胞浆出现淡黄至棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片在放大 400 倍镜下随机读取 500 个细胞,阳性细胞 >5% 为阳性表达。每张切片随机挑选不相重叠的 5 个视野(×200),用笔式鼠标描绘出所测上皮的外周轮廓后进行自动测量,获得测定面积、阳性反应面积及相应的灰度值;按公式计算阳性指数(positive index,*PI*),*PI* = 阳性灰度值 × 阳性反应面积/测定面积,取平均值获得阳性表达的量化指标,*PI* 越大,视为表达强度越高。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两个独立样本均数比较及多个样本之间的两两比较采用单因素方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P34^{cdc2}表达 P34^{cdc2}在卵巢组织中的表达均定位于胞浆,为浅黄色至棕黄色,而细胞核无着色(图 1)。上皮性卵巢癌中 P34^{cdc2}阳性表达率为 76.7%(23/30),交界性肿瘤中为 42.9%(6/14),



A B C

注:A 为正常卵巢组织,B 为交界性卵巢肿瘤组织,C 为卵巢癌。

图 1 P34^{cdc2}在卵巢组织中的表达(S - P,×400)

Fig. 1 The expressions of P34^{cdc2} in ovarian tissues

而正常卵巢组织中仅为 10%(2/20)。图像分析显示 P34^{cdc2}在正常卵巢组织、交界性肿瘤至上皮性卵巢癌组织中的 *PI* 呈递增趋势,每两组间比较差异有统计学意义(P(0.05)。见表 1。

表 1　P34 ^{cdc2}在不同卵巢组织的表达

Tab. 1　The expression of P34^{cdc2} in different ovarian tissues

卵巢组织	n	$PI(\bar{x}\pm s)$
上皮性卵巢癌	30	101.3 ± 10.2$^{(1)(2)}$
交界性肿瘤	14	58.6 ± 8.69$^{(1)}$
正常卵巢	20	35.6 ± 4.3

$^{(1)}$与正常卵巢比较 $P<0.05$,$^{(2)}$与交界性肿瘤比较$P<0.05$

2.2　P34^{cdc2}表达与临床病理特征的关系　上皮性卵巢癌组织中 P34^{cdc2}表达强度在不同年龄组、不同病理类型间的差异无统计学意义($P>0.05$),在分期晚、组织分化差或伴有淋巴结转移时表达强度高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2　上皮性卵巢癌 P34^{cdc2}表达与临床病理特征的关系

Tab. 2　The relationship between the expression of P34^{cdc2} and clinical pathological factors of epithelial ovarian cancer

指标	n	$PI(\bar{x}\pm s)$
年龄		
>56 岁	14	103.2 ± 8.9
<56 岁	16	99.6 ± 7.6
FIGO 分期		
Ⅰ期	6	63.4 ± 6.7$^{(1)(2)}$
Ⅱ期	4	82.7 ± 11.3$^{(1)}$
Ⅲ、Ⅳ期	20	116.4 ± 10.2
组织分化程度		
低分化组	24	106.1 ± 14.7$^{(3)}$
高 - 中分化组	6	82.2 ± 10.8
病理类型		
浆液性腺癌	22	100.9 ± 10.5
黏液性腺癌	6	103.6 ± 8.7
内膜样腺癌	2	98.8 ± 8.9
淋巴结转移		
有转移	20	112.5 ± 12.3
无转移	10	79.0 ± 10.7$^{(4)}$

$^{(1)}$与Ⅲ、Ⅳ期比较,$P<0.05$,$^{(2)}$与Ⅱ期比较,$P<0.05$;$^{(3)}$与高 - 中分化比较,$P<0.05$;$^{(4)}$与有淋巴结转移组比较,$P<0.05$

3　讨论

卵巢癌在妇科恶性肿瘤中发病率占第三位,而死亡率居第一位,其确切的病因至今仍不明了[8]。随着对细胞周期及其调控机制的深入研究,学者们提出了“癌症可能是一类细胞周期异常性疾病”的观点[3]。绝大多数肿瘤细胞都存在若干细胞周期调控机制的改变,调控机制的异常可导致细胞的持续性增殖,这是肿瘤发生的生物学基础。细胞周期调控机制的核心是细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的时相性激活。CDKs 是细胞周期调节过程中最为重要的分子类型,处于细胞周期的中心环节。细胞周期蛋白依赖性激酶 2(cell division cycle2, cdc2),是由 cdc2 基因编码的分子量为 34kD 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞周期中调控 G_2 至 M 期[9]。在 G_2 后期,P34^{cdc2}与周期蛋白 B1(cyclin B1)结合形成 P34^{cdc2}-cyclin B1 复合物也称 M 期促进因子(maturation promoting factor, MPF),通过催化作用可使细胞进入和走出 M 期。在恶性分裂细胞中过表达的 P34^{cdc2}与 cyclin B1 形成过多的 MPF,触发并通过恶性细胞有缺陷的 G_2/M 期检测点而引发核内重要蛋白结构的改变并进入 M 期,使遗传不稳定性固定在增殖的细胞中[2]。研究发现,P34^{cdc2}的过表达见于人类的许多种恶性肿瘤,并与肿瘤的分级、分期、浸润和转移密切相关[10-13]。Kim SJ 等[10]研究发现,P34^{cdc2}的过表达与乳腺癌的进展和分化差有关。Senju[11]等报道,P34^{cdc2}在肺癌中呈过表达,且 P34^{cdc2}表达与病变程度密切相关。本文研究发现,P34^{cdc2}在正常卵巢组织、卵巢交界性肿瘤及上皮性卵巢癌组织中的表达呈递增趋势,每两组间比较差异有统计学意义,提示 P34^{cdc2}过表达可能与卵巢癌病变程度密切相关,并在卵巢肿瘤恶变的过程中起促进作用。

进一步分析 P34^{cdc2}的表达与上皮性卵巢癌患者临床病理特征的关系发现,P34^{cdc2}的过表达强度在不同分化程度、FIGO 分期及有无淋巴结转移之间差异有统计学意义($P<0.05$),提示 P34^{cdc2}的过表达可能促进卵巢癌的进展,其表达水平能够提示病变的进展程度,P34^{cdc2}亦可能作为卵巢癌预后差的危险因素之一。

综上所述,卵巢癌的发生及发展过程中存在细胞周期调控蛋白 P34^{cdc2}的表达异常,P34^{cdc2}过表达

可能与其预后相关,并有望成为卵巢癌基因治疗的一个重要靶点。

4 参考文献

[1] 吕有勇. 从生物多样性和基因多态性认识肿瘤生物学行为及基因改变的异质性[J]. 世界华人消化杂志, 2002(6):690 - 692.

[2] 刘晓红,易亮,陈冷昕,等. 雌激素对人乳腺癌细胞周期蛋白 E 表达及血清饥饿时细胞存活力的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2011(6):551 - 553.

[3] 蔡扬,柳咏发,李世灵,等. 口腔鳞状细胞癌细胞周期蛋白 E 表达与中心体扩增相关性[J]. 贵阳医学院学报, 2007(6):375 - 378.

[4] Chae SW, Sohn JH, Kim DH, et al. Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications[J]. Yonsei Med J, 2011(3):445 - 453.

[5] Kim S, Lee HS, Lee SK, et al. 12 - O - Tetradecanoyl phorbol - 13 - acetate (TPA) - induced growth arrest is increased by silibinin by the down - regulation of cyclin B1 and cdc2 and the up - regulation of p21 expression in MDA - MB231 human breast cancer cells[J]. Am J Surg Pathol, 2010(14):1127 - 1132.

[6] 马沛卿,薛丽燕,谢永强,等. CDC2 在食管鳞状细胞癌及癌前病变中的表达与临床意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2011(2):102 - 105.

[7] Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum[J]. Int J Gynecol Obstet, 2014(1):1 - 5.

[8] 韩淑霞. 卵巢癌的放射治疗[J]. 中华健康文摘, 2011(5):183 - 184.

[9] Kase S, Yoshida K, Ohgami K, et al. Expression of cdc2 and p27 (KIP1) phosphorylation in mitotic cells of the human retinoblastoma[J]. Int J Mol Med, 2006(3): 465 - 468.

[10] Kim SJ, Nakayama S, Miyoshi Y, et al. Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer[J]. Ann Oncol, 2008(1): 68 - 72.

[11] Senju M, Sueoka N, Sato A, et al. Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of CDC25C and Cdc2 in lung cancer cell lines[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2006 (3): 150 - 158.

[12] Kim DH. Prognostic implications of cyclin B1, p34cdc2, p27 (Kip1) and p53 expression in gastric cancer[J]. Yonsei Med J, 2007(4): 694 - 700.

[13] 李波,阙祥勇,李意, 等. cdc2 基因在多种人类肿瘤细胞中的表达及意义[J]. 广东医学, 2012(14): 2035 - 2037.

(2014-01-05 收稿,2014-02-23 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周　凌

·文摘·

贵州省侗族、汉族人群乙型肝炎病毒感染结局与趋化因子 *RANTES* 基因 -403G/A 及 -28C/G 位点多态性研究

张　婵[1], 单可人[1], 何　燕[1], 王婵娟[1], 张　婷[1], 李　毅[1], 邓　婕[1], 李林洁[1], 欧阳凯[1], 官志忠[1,2]
(1. 贵阳医学院 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳　550004; 2. 贵阳医学院 病理学教研室, 贵州 贵阳　550004)

目的: 探讨贵州省世居侗族和汉族人群趋化因子 *RANTES* 基因(regulated uponactivation normal T cell expressed and secreted) -403G/A 和 -28C/G 位点多态性与乙型肝炎病毒(HBV)感染后结局的相关性。**方法:** 采取病例对照方法,募集侗族和汉族共计 229 例 HBV 持续感染者、161 例 HBV 清除者作为研究对象,同时选取 200 例正常者作为对照组;应用 TaqMan-MGB 探针实时荧光聚合酶链反应 SNP 分型技术对趋化因子 *RANTES* 基因 -403G/A 和 -28C/G 位点进行分型测定。**结果:** 趋化因子 *RANTES* 基因 -403G/A 和 -28C/G 基因型频率在侗族汉族 HBV 持续感染组、HBV 清除组和正常对照组间差异无统计学意义($P>0.05$),单因素分析发现 -403AG 和 -28GG 增加 HBV 持续感染的危险度($OR=1.292$, $OR=1.151$);趋化因子 *RANTES* -28*C/G* 基因型频率在侗族和汉族 HBV 持续感染组分布差异有统计学意义($P<0.05$),而 *RANTES*-403G/A 各基因型在两族人群中分布的差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:** 携带趋化因子 *RANTES*-403AG 和 -28GG 基因型 HBV 持续感染风险性高,*RANTES*-403A 有助于 HBV 清除。

摘自《中华流行病学杂志》2012(12):1279