论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2054-03

乙酰肝素酶在卵巢癌组织中的表达及其临床意义

韩 静,杨 鹰,阎 萍,连 艳 (第三军医大学新桥医院妇产科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨乙酰肝素酶在卵巢癌组织中的表达及其与患者年龄、临床病理特征及预后的关系。**方法** 采用免疫组化S-P法检测41例卵巢癌组织及10例正常卵巢组织中乙酰肝素酶蛋白的表达,并结合卵巢癌的组织类型、分化程度、临床分期及预后进行分析。**结果** ①乙酰肝素酶蛋白在卵巢癌组织中的阳性表达率为80.48%,在正常卵巢组织中为10.00%($P<0.05$)。②临床Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌中乙酰肝素酶蛋白的表达高于Ⅰ~Ⅱ期($P<0.01$);低分化程度的卵巢癌中乙酰肝素酶蛋白的表达高于高-中分化者($P<0.05$)。③各组织类型卵巢癌中乙酰肝素酶蛋白的表达无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 乙酰肝素酶在卵巢癌发展过程中起重要作用,检测乙酰肝素酶蛋白的表达有望成为判断卵巢癌预后的标志。

关键词: 卵巢癌;免疫组化;乙酰肝素酶;预后

中图法分类号: R345;R730.23;R737.31 **文献标识码:** A

Expression of heparanase in ovarian cancer and its clinical significance

HAN Jing, YANG Ying, YAN Ping, LIAN Yan (Department of Gynecology and Obstetrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To examine the relationship of heparanase expression and age, clinicopathological features and prognosis of ovarian cancer patients. Methods Forty-one ovarian cancer specimens, from the patients admitted to the 3 hospitals of our university during the period of Jan 2003 to Nov 2005, were of serous carcinoma (22 cases) and mucous carcinoma (10 cases) and other types (9 cases), of which 16 were well and moderately differentiated and 25 poorly differentiated. Ten specimens of normal ovarian tissues were taken as normal controls. The heparanase expression was detected in all specimens and its relationship with histologic type, differentiation, FIGO stage and prognosis of the ovarian cancer was analyzed. Results The positive rate of heparanase expression was 80.48% in ovarian cancer tissues and 10.00% in normal ovarian tissues ($P<0.05$). The heparanase expression was significantly higher in FIGO stage Ⅲ and Ⅳ than in Ⅰ and Ⅱ, and was significantly higher in poorly differentiated ovarian cancer tissues than in moderately and well-differentiated tissues. There was no significant difference in heparanase expression among ovarian cancer tissues of various histologic types. Conclusion Heparanase plays a crucial role in the carcinogenesis of ovarian cancer and it may be used as a marker for prognosis in future.

Key words: ovarian cancer; immunohistochemistry; heparanase; prognosis

卵巢癌是目前威胁女性生命最严重的恶性肿瘤之一,具有早转移、恶性程度高、隐匿性强的特点,临床明确诊断时多数已发生转移,其5年生存率在30%左右。乙酰肝素酶(Heparanase, HPA)是近年来发现并克隆成功的一种β-D-葡萄糖醛酸内切酶,与肿瘤侵袭和转移密切相关,能够在体内降解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparin sulphate proteoglycan,HSPG)。通过在特定部位裂解HSPG,HPA代替下同促进恶性肿瘤的侵袭和转移[1]。本研究采用免疫组化S-P法检测了卵巢癌组织中HPA蛋白的表达情况,分析HPA蛋白的表达与卵巢癌临床病理特征及预后的关系。

作者简介:韩 静(1975-),女,河北省唐山市人,硕士研究生,医师,主要从事妇科肿瘤发生机制方面的研究。电话:13883929713

通讯作者:杨 鹰,电话:(023)68774212

收稿日期:2006-04-18;修回日期:2006-05-24

1　材料与方法

1.1　临床资料

选取 2003 年 1 月至 2005 年 11 月在第三军医大学西南医院、新桥医院、大坪医院手术切除的卵巢癌组织标本 41 例，所有病例均经病理学确诊，手术前均未接受化疗及放疗。年龄 29～73 岁，平均(50 ± 10)岁。其中浆液性癌 22 例，黏液性癌 10 例，其他类型 9 例。其中有盆腔外淋巴结转移者 34 例，无盆腔外淋巴结转移者 7 例；高、中分化 16 例，低分化 25 例；按照 FIGO(2000)手术病理分期标准，Ⅰ、Ⅱ期 7 例，Ⅲ、Ⅳ期 34 例。选取同期正常卵巢组织(取自卵巢浆液性囊肿周边的正常卵巢组织)10 例作为对照。

1.2　实验材料

山羊抗人 HPA 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。免疫组化试剂盒 S-P9002 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3　方法

1.3.1　免疫组化方法　　HPA 蛋白的检测采用免疫组化 S-P 法，实验步骤按试剂盒说明书进行：切片常规脱蜡至水，3% H_2O_2 封闭，0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中微波修复 20 min，HPA 多克隆抗体按 1∶50 稀释孵育，4 ℃过夜；DAB 显色，苏木精复染，中性树胶封片。恶性黑色素瘤(胆囊)标本作为阳性对照。PBS 替代一抗作空白对照。

1.3.2　判断方法　　HPA 阳性判断标准：免疫组化结果以细胞膜和/或细胞质中出现棕黄色颗粒为肝素酶阳性显色，以染色强度和阳性细胞比例评定阳性表达。光镜下每张切片在诊断确实的卵巢癌组织中随机选取 5 个高倍视野，每个视野染色强度分级如下：无着色为 0，淡黄色为 1，黄色及更深颜色为 2；阳性细胞数分级为：阳性细胞数≤50% 为 0，51% ～75% 为 1，≥76% 为 2。两项得分相乘结果≥2 为阳性表达病例。

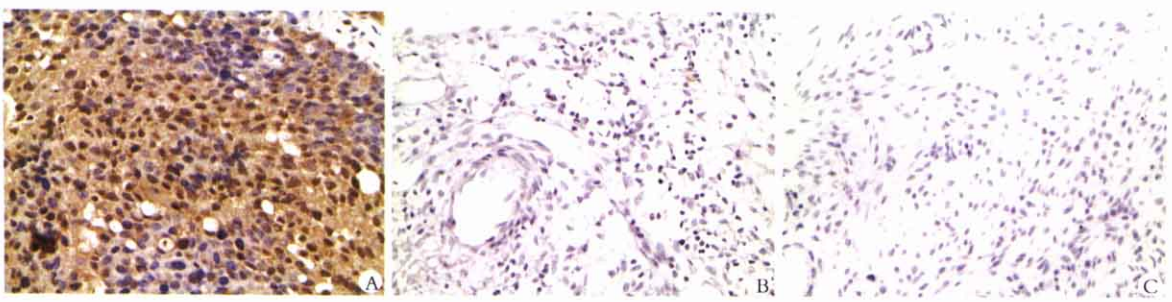
1.4　统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　免疫组化结果

HPA 主要在卵巢癌细胞的细胞质内表达，在部分血管内皮细胞内也有表达(图 1)。41 例患者中 HPA 蛋白表达呈阳性者 33 例，呈阴性者 8 例，阳性率为 80.48%。有无盆腔外淋巴结转移的卵巢癌标本分组相比较，发生盆腔外淋巴结转移的组织标本中，HPA 蛋白表达明显升高，具有显著性差异($P<0.01$)；FIGO(2000)分期组中，临床晚期标本(Ⅲ～Ⅳ期)中的 HPA 蛋白表达明显高于临床早期(Ⅰ～Ⅱ期)($P<0.01$)；高-中分化腺癌与低分化腺癌分组中，HPA 蛋白表达阳性率相比较，差异具有显著性($P<0.05$)；而在组织学类型及年龄分组中 HPA 蛋白表达无显著性差异($P>0.05$)。结果见表 1。在 10 例正常卵巢组织中只有 1 例呈弱阳性表达，主要表达在血管内皮细胞的细胞质中，阳性率为 10.00%。HPA 在卵巢癌和正常卵巢组织中的表达有显著性差异($P<0.01$)。



A：HPA 表达阳性的低分化期卵巢癌组织；B：HPA 表达阴性的高分化卵巢癌组织；C：HPA 表达阴性的正常的卵巢组织

图 1　HPA 在卵巢癌组织和正常的卵巢组织中的表达　(S-P×400)

2.2　寿命表法计算生存率

收集病例 41 例均经随访其中 4 例失访。随访时间截止到 2005 年 12 月，最长随访时间为 1 081 d，最短 90 d。采用寿命表法计算生存率，HPA 表达阳性组的 1 年生存率为 70.75%，HPA 表达阴性组为 71.43%，二者比较无显著性差异($P>0.05$)。而预算其 2 年生存率前者为 16.51%，后者则保持在 71.43%。绘制生存曲线如图 2。由于本实验的时间有限，随访的 1 年生存率无统计学意义，但从寿命法计算的 2 年生存率及绘制的生存曲线可以看到 HPA 对卵巢癌的预后有重要的影响，有待进一步证实(图 2)。

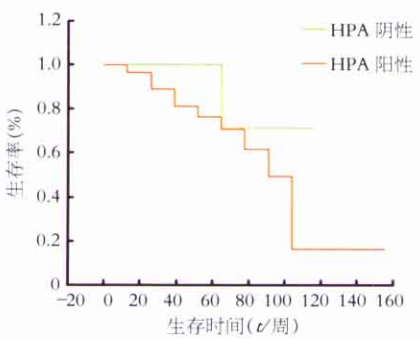


图 2　卵巢癌中 HPA 不同表达组的寿命表法生存曲线

表1 HPA的表达与卵巢癌临床病理特征的关系

临床病理因素	n	HPA表达阳性率(%)	P
组织学类型			
浆液性囊腺癌	22	86.36	>0.05
黏液性囊腺癌	10	70.00	
其他类型	9	77.78	
盆腔外淋巴结转移			
有	34	91.18	<0.01
无	7	28.57	
年龄			
<50岁	18	72.22	>0.05
≥50岁	23	86.96	
FIGO(2000)分期			
Ⅰ-Ⅱ期	7	28.57	<0.01
Ⅲ-Ⅳ期	34	91.18	
分化程度			
高-中分化	16	62.50	<0.05
低分化	25	92.00	

3 讨论

HPA是一种内切糖苷酶,负责切断HSPG的聚糖侧链。切断聚糖侧链以后引起的生物学反应可能有:①细胞外基质及基质膜的降解,破坏了防止癌细胞转移的屏障。②释放和活化肝素结合型的生长因子如碱性蛋白生长因子(bFGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)等,诱导内皮细胞、成纤维细胞及肿瘤细胞的增殖及迁移。③释放活化的尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)、组织型纤溶酶原激活物(tPA)及纤溶酶,并激活某些基质金属蛋白酶[2]。以上生物学效应均与肿瘤细胞的侵袭及转移密切相关。

目前研究表明,在人类多种恶性肿瘤(乳腺癌、肺癌等)中均可检测到HPA的表达,并与肿瘤的临床预后不良相关[3-8],但其表达率可能有所不同。Ginath等[5]利用免疫组化法研究卵巢癌组织时发现,HPA在良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织中仅有微弱表达,表达产物定位于癌细胞的细胞质中和毛细血管被覆的上皮细胞中。本研究中我们发现卵巢癌中HPA蛋白的表达明显较正常卵巢组织中高,表达产物定位于癌细胞的胞浆中和毛细血管被覆的上皮细胞中,这与Ginath的报道相似。Ginath等还报道HPA在卵巢黏液癌细胞中染色最强,子宫内膜癌和卵巢浆液癌中染色较浅,着色主要集中在细胞质。本研究中我们发现在已经发生盆腔外淋巴结转移的临床晚期(Ⅲ~Ⅳ期)组织标本中癌细胞的染色最强,着色主要集中在细胞质,与病理类型关系不大,这与Ginath等的报道不太符合。由于本组病例均为手术患者,病例的选择偏倚可能是造成这种结果的原因。

HPA表达强度与恶性肿瘤的预后有关。研究表明胰腺癌患者术后存活时间缩短与HPA表达水平的增加显著相关[5]。本研究提示HPA表达与卵巢癌的不良临床病理参数有重要关联。本组资料显示在有盆腔外淋巴结转移、FIGO(2000)分期在Ⅲ~Ⅳ期及分化程度为低分化的卵巢癌组织中HPA表达阳性率明显高于其对照组,差异显著($P<0.05$),说明HPA在促进肿瘤穿透细胞外基质和基底膜结构,实现其扩散和转移过程中发挥重要作用。由于本实验的时间有限,随访的1年生存率比较短,但从寿命法计算的2年生存率及绘制的生存曲线可以看到HPA对卵巢癌的预后有重要的影响。

综上所述,HPA在卵巢癌组织中表达增高,且表达程度与患者的预后有关,因此,监测术后HPA的表达水平将有望成为判断卵巢癌预后的一个新的指标。

参考文献:

[1] BREKKEN R A, PUOLAKKAINEN P, GRAVES D C, *et al*. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM[J]. J Clin Invest, 2003, 111(4): 487-495.

[2] KODAMA J, SHINYO Y, HASENGAOWA, *et al*. Loss of basement membrane heparan sulfate expression is associated with pelvic lymph node metastasis in invasive cervical cancer[J]. Oncol Rep, 2005, 14(1): 89-92.

[3] ENDO K, MAEJARA U, BABA H, *et al*. Heparanase gene expression and metastatic potential in human gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2001, 21(5): 3365-3369.

[4] MAXHIMER J B, QUIROS R M, STEWART R, *et al*. Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer[J]. Surgery, 2002, 132(2): 326-333.

[5] GINATH S, MENCZER J, FRIEDMANN Y, *et al*. Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer[J]. Int J Oncol, 2001, 18(6): 1133-1144.

[6] IKEGUCHI M, UETA T, YAMANE Y, *et al*. Quantitative analysis of heparanase messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2002, 81(3): 148-154.

[7] 张友磊,傅志仁,陈学云,等.乙酰肝素酶反义寡核苷酸对人乳腺癌细胞株侵袭力的抑制作用[J].中华实验外科杂志, 2004, 21(3): 367-369.

[8] NAOMOTO Y, TAKAOKA M, OKAWA T, *et al*. The role of heparanase in gastrointestinal cancer (Review)[J]. Oncol Rep, 2005, 14(1): 3-8.

(编辑 龙 亮)