NDPK/nm23及 CDKN2/P16蛋白在卵巢癌中的表达

杨 鹰* 杜保琳 刘禹莲 (第三军医大学附属新桥医院妇产科) 重庆, 400037

提 要 目的: 探讨抑癌基因 P16及转移抑制基因 nm23与卵巢上皮性肿瘤的发生、发展及淋巴结转移的关系。方法: 免疫组化 S-P法检测 12例正常卵巢, 14例卵巢上皮性良性肿瘤及 52例卵巢癌组织中 P16蛋白和 nm23蛋白的表达。结果: nm23蛋白在卵巢癌组织中阳性率为 67.3%, 明显高于正常卵巢及良性肿瘤组织中的表达率(41.7%, 42.8%), $P < 0.05$。在浆液性癌(82.1%)和粘液性癌(50.0%)中的阳性率也有显著差异, $P < 0.05$, 特别是在有淋巴结转移(39.1%)和无淋巴结转移(89.7%)的卵巢癌中检出率相差非常显著, $P < 0.01$。nm23蛋白阳性率与 OEC的临床分期及病理分级相关不显著。P16蛋白在卵巢癌中检出率为 28.8%, 明显低于正常卵巢(75%)和良性上皮性肿瘤(57.1%), $P < 0.01$, 在晚期肿瘤中的表达率(22.2%)也远低于早期肿瘤(71.4%), 而且在高度恶性组织中表达水平(17.0%)与中低度恶性组织的表达水平(44%)之间也有显著差异, $P < 0.05$。二者均与患者年龄无关。结论: nm23、P16基因与 OEC的发生、发展密切相关, nm23基因在 OEC的淋巴结转移过程中起重要调控作用, P16基因可作为临床判断预后的重要指标之一。

关键词 卵巢癌; P16基因; nm23基因; 抑癌基因; 免疫组化
中图法分类号 R737.31

抑癌基因 P16及转移抑制基因 nm23是近年发现的与卵巢癌相关的重要抑癌基因, 并逐渐为人们所关注。本研究利用免疫组织化学方法检测卵巢上皮性癌(Ovarian epithelial carcinoma, OEC)组织中 P16、nm23基因产物的表达, 探讨其与卵巢上皮性癌临床生物学行为的关系。

1 材料与方法

1.1 标本收集

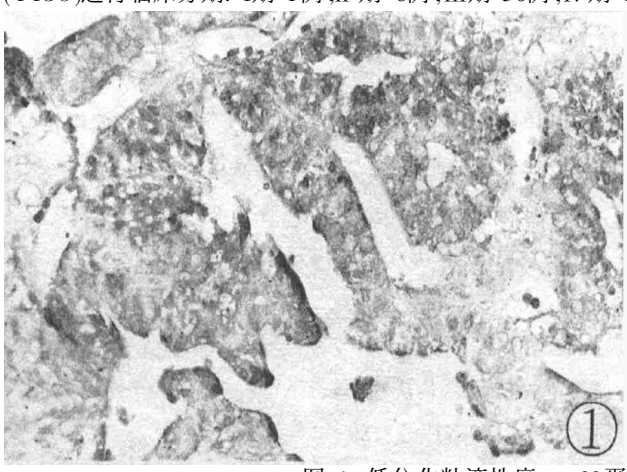
将研究对象共分 3个组。实验组: 选择我院 1988年 1月至 1995年 12月, 手术行全子宫、双附件、阑尾及大网膜切除, 盆腔淋巴结清除术, 术后病理证实为卵巢上皮性癌(OEC)病例 52例; 患者年龄 21~70岁, 平均 50.3岁, 其中 20~29岁组 2例, 30~39岁组 4例, 40~49岁组 20例, 50~49岁组 17例, 60~69岁组 8例, 70岁以上 1例; 52例 OEC浆液性癌 28例, 粘液性癌 22例, 子宫内膜样癌 2例。根据 1974.7国际妇产科联盟(FIGO)进行临床分期: Ⅰ期 1例, Ⅱ期 6例, Ⅲ期 30例, Ⅳ期 15例, 淋巴结转移率为 23/52。由病理学专家对 52例 OEC标本切片进行组织分级, 其中Ⅰ级(高分化) 4例, Ⅱ级(中分化) 21例, Ⅲ级(低分化) 27例。良性上皮性肿瘤组 14例, 其浆液性、粘液性各 7例。正常卵巢组 12例。

1.2 方法

1.2.1 试剂 兔抗人 P16多克隆抗体、鼠抗人 nm23单克隆抗体、链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶连接法应用试剂盒, 均购自福建迈新公司。

1.2.2 步骤 标本用 10%甲醛固定, 石蜡包埋, 蜡块以厚 5μm连续切片, 分别进行免疫组化(S-P法)和 HE染色。以药盒提供的阳性片为阳性对照, 用磷酸盐缓冲夜(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.2.3 结果判定 免疫组化阳性标记为棕黄色, nm23阳性标记主要位于细胞浆, 见图 1, 根据胞浆显色的有无和强弱分为: 阴性(-), 无显色; 弱阳性(+), 部分细胞显色; 强阳性(++), 所有细胞显色。P16阳性信号位于胞浆和胞膜上, 见图 2, 按显色有无和阳性细胞的多少分为三个等级: 阴性(-), 无显色; 阳性(+), 片中阳性细胞少于 50%且染色浅; 强阳性(++), 片中阳性细胞 50%以上或显色深。



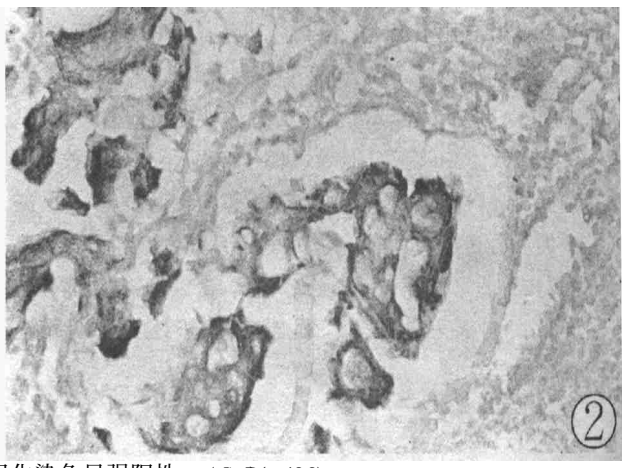


图 1 低分化粘液性癌 nm23蛋白免疫组化染色呈强阳性 (S-P× 400)
Fig 1 Mucinous cystadenoma of ovarian poorly differentiated. Strong reaction of nm23 protein stain (S-P× 400)
图 2 淋巴结转移灶 P16蛋白染色强阳性 (S-P× 400)
Fig 2 Strong reaction of P16 protein stain in metastatic focus of lymph node (S-P× 400)

* 杨 鹰, 男, 36岁, 主治医师, 讲师, 硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.4 统计学处理　　率的比较及相关性分析采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 正常组、良性组及恶性组 nm23蛋白与 P16蛋白的表达

nm23蛋白在 3组中阳性率比较 $\chi^2= 4.481$, $P> 0.05$差异不显著。但将正常卵巢组+良性上皮肿瘤组与恶性肿瘤组比较, $\chi^2= 4.478$, $P < 0.05$提示差异显著。

P16蛋白在 3组阳性检出率比较 $\chi^2= 64.677$, $P < 0.01$,提示差异非常显著,在恶性卵巢肿瘤中的表达率远低于正常卵巢及良性卵巢肿瘤的表达率,在正常卵巢中的阳性率(75%)高于在良性肿瘤中的阳性率(57.1%),但无统计学意义, $\chi^2= 0.910$,差异不显著,见表 1

表 1　正常组、良性组及恶性组 NDPK/nm23与 CDKN2/P16蛋白的表达情况

Tab 1　Expression of nm23 and p16 protein in normal ovarian, benign and malignant ovarian tumor

	n	NDPK/nm23			positive(%)	CDKN2/P16			positive(%)
		-	+	++		-	+	++	
Normal	12	7	4	1	41.7%	3	7	2	75%
Benign	14	8	5	1	42.8%	6	8	0	57.1%
Malignant	52	17	30	5	67.3%	37	11	4	28.8%

2.2 OEC组织分型与 nm23蛋白及 P16蛋白表达的关系

nm23蛋白: $\chi^2= 5.850$, $P < 0.05$, P16蛋白: $\chi^2= 1.878$, $P > 0.05$,说明组织类型与 nm23表达相关,而与 P16蛋白表达相关不显著,见表 2

2.3 nm23与 P16蛋白在临床各分期中的表达

临床早期(Ⅰ~Ⅱ期)的卵巢癌 nm23蛋白阳性率为 71.4% ,晚期卵巢癌(Ⅲ~Ⅳ期)为 66.7% ,两者差异不显著($\chi^2= 0.062$, $P> 0.05$)。而早期卵巢癌 P16蛋白阳性率为 71.4% ,明显高于晚期卵巢癌的阳性率 22.2% ($\chi^2= 7.146$, $P < 0.01$),差异非常显著,见表 3

表 2　OEC组织分型与 NDPK/nm23及 CDKN2/P16蛋白表达的关系

Tab 2　Expression of nm23 and p16 protein in different histological type of OEC

Histological type	n	NDPK/nm23			positive(%)	CDKN2/P16			positive(%)
		-	+	++		-	+	++	
Serous	28	5	20	3	82.4%	18	8	2	35.7%
Mucous	22	11	9	2	50.0%	18	3	1	18.2%

表 3　NDPK/nm23及 CDKN2/P16蛋白在临床各分期中的表达

Tab 3　Expressions of nm23 and p16 in different clinical stage of OEC

Stage	n	NDPK/nm23			positive(%)	CDKN2/P16			positive(%)
		-	+	++		-	+	++	
Ⅰ~Ⅱ	7	2	5	0	71.4%	2	5	0	71.4%
Ⅲ~Ⅳ	45	15	25	5	66.7%	35	6	3	22.2%

2.4 nm23蛋白及 P16蛋白在 OEC不同程度组织分化中的表达

nm23蛋白阳性率与组织分化程度无关($\chi^2= 0.239$, $P> 0.05$); P16蛋白在高、中分化组的阳性率为 44% ,明显高于低分化组阳性率 17.0% ($\chi^2= 5.387$, $P < 0.05$),见表 4

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 4 NDPK/nm23及 CDKN2/P16蛋白在 OEC不同程度组织分化中的表达

Tab 4 Expressions of nm23 or p16 in different degree of differentiation of OEC

Degree of differentiation	n	NDPK/nm23			positive(%)	CDKN2/P16			positive(%)
		-	+	++		-	+	++	
Ⅰ~Ⅱ	25	9	14	2	56.0%	14	8	3	44.0%
Ⅲ	27	8	16	3	70.4%	23	3	1	17.0%

2.5 OEC淋巴结转移与 nm23蛋白及 P16蛋白表达的关系

nm23蛋白表达在无淋巴结转移组中阳性率为 89.7%,而在有淋巴结转移组中表达率明显下降为 39.1% (χ^2= 14.881, P < 0.01),提示 OEC淋巴结转移与 nm23表达降低明显相关;P16蛋白表达在无淋巴结转移组中为 34.5%,在有淋巴结转移病例组中阳性率下降为 21.7%,两组比较 χ^2= 1.015, P > 0.05,说明 P16蛋白阳性率与淋巴结转移无明显相关,见表 5

表 5 OEC淋巴结转移与 NDPK/nm23及 CDKN2/P16蛋白表达的关系

Tab 5 The relationship between nm23 and p16 expressions and lymph node metastasis

Lymph node metastasis	n	NDPK/nm23			positive(%)	CDKN2/P16			positive(%)
		-	+	++		-	+	++	
+	23	14	9	0	39.1%	18	4	1	21.7%
-	29	3	21	5	89.7%	19	7	3	34.5%

3 讨论

3.1 OEC组织中 NDPK/nm23基因的异常表达

NDPK/nm23基因是采用差别克隆杂交技术从高转移和低转移鼠 K-1735黑色素瘤细胞系 cDNA文库中分离出来的一种基因,在肿瘤转移过程中发挥负性调节作用[1]。小鼠和人类 nm23基因的完整 cDNA均已克隆成功,它们都是编码分子量为 17KD的蛋白质。nm23蛋白产物与多种细胞中核苷二磷酸激酶 NDPK(Nucleoside Diphosphate kinase)具有高度同源性[2],从细菌中提取的 nm23蛋白已证实具有 NDPK活性。因此,nm23蛋白很可能通过与 NDPK一致或相似的途径在调节细胞的信号传递,细胞分化等过程中发挥作用。已有的资料显示 nm23特别是 nm23-H1的表达与卵巢癌淋巴结转移呈负相关[3]。本研究结果显示:nm23阳性率在正常组,良性组,恶性组中的表达率分别为:41.7%、42.8%、67.3%,恶性组中的表达率明显高于正常组和良性组(P < 0.05),与 Mardai在 mRNA表达水平的研究结果相一致[4],说明 nm23可能参与 OEC的形成[5]。在浆液性癌组织中的阳性率(82.1%)高于粘液性癌的阳性率(50.0%),统计学处理有显著差异(P < 0.05),提示,nm23基因可能与卵巢癌某些类型的形成关系更为密切,但由于低分化 OEC组织病理分类容易发生误差,因此该结论尚需进一步研究证实。从表 5可见 nm23表达水平在有淋巴结转移的 OEC中明显降低(P < 0.01),5例 nm23表达强阳性病例无一例出现淋巴结转移,其表达水平与淋巴结转移率呈明显负相关,说明 nm23基因参与 OEC淋巴结转移过程的调节。

3.2 OEC中 CDKN2/P16基因的异常表达

P16 cDNA由 Sorrano于 1993年成功克隆[6]。Kamb等[7]用 STS-PCR方法研究了 100个黑色素瘤细胞系,其高缺失率部分 DNA测序结果发现,在人第 9号染色体短臂(9P21)区域存在两个与 Serrano等报道的序列相近的区域,分别命名为多发性肿瘤抑制因子 1(Mutiple Tumor Suppressor MTS1)和多发性肿瘤抑制因子 2(MTS2)。其中 MTS1与曾经报道的 P16序列完全吻合。P16基因全长 8.5Kb 由 3个外显子(exon1-126bp, exon2-307bp, exon3-11bp)和 2个内含子组成,其中 exon2-307bp编码一个 15.84KD的单链多肽 P16蛋白,它是细胞周期素依赖性激酶(CDK4)的抑制因子。HUGO(Human Genome Organization)正式命名为 CDKN2(Cyclin dependent kinase inhibitor 2)。多数学者认为 P16基因变异与 OEC进展相关,但对其变异机制有争议[8]。本研究中 P16蛋白在正常卵巢(75%)和良性上皮性肿瘤(57.1%)中的阳性表达率明显高于恶性上皮性肿瘤中的阳性率(28.8%),各组间差异非常显著(P < 0.01),而且与 OEC的恶性程度呈负相关(P < 0.05)。说明 P16基因在卵巢癌发生发展过程中起重要作用。西京医院杨红

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

等[9]有类似报道。Milde等[10]的研究发现在卵巢子宫内膜样癌和粘液性癌中 P16变异频率高达 71%~79%,而在浆液性癌中却只有 10%,认为 P16基因变异是某些特殊类型卵巢癌的典型表现,本研究认为这一推断首先应基于对卵巢癌组织学类型的准确划分,而在卵巢癌病例中高度恶性的病例所占比例较大(本组为 27/52),低分化组织分类非常困难,所以卵巢癌不同组织类型 P16蛋白表达率的差别意义不大。

参考文献

1 Steeg P S, Bebilacqua G, Kopper I, *et al*. Evidence for a novel gene associated with two tumor metastatic potential. J Natl Cancer Inst, 1988, 80(5): 200

2 Kimura N, Shimada N, Nomura K, *et al*. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding rat nucleoside diphosphate kinase. J Biol Chem, 1990, 265(26): 15744

3 Viel A, Dall Agnese L, *et al*. Suppression role of the metastasis-related nm23-H1 gene in human ovarian carcinomas: association of high messenger RNA expression with lack of lymph node metastasis. Cancer Res, 1995, 55(12): 2645

4 Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, *et al*. Expression of metaslasis-related nm23-H1 and nm23-H2 genes in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathology, EGTR, c-erb B2, and c-erbB-3 genes, and sex steroid receptor expression. Cancer Res, 1994, 54(7): 1825

5 姜彦多,戴晓淳,王永信. nm23基因产物在正常卵巢和卵巢上皮性肿瘤的表达.中华妇产科杂志, 1996, 31(4): 232

6 Serrano M. Hannon and David Beach. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature, 1994, 366(16): 704

7 Kamb A, Gruis N, Weaver-Feldhaus J, *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science, 1994, 264(15): 436

8 Ichikawa. Inactivation of P16/CDKN2 and p15/MTS2 genes in different histological types and clinical stages of primary ovarian tumors. Int J Cancer, 1996, 69(6): 466

9 杨　红,郑维国. P16抑癌基因在卵巢癌中的表达.肿瘤防治研究. 1998, 25(1): 20

10 Milde langosch K. P16/MTS1 inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hyper-methylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors. Int J carcer, 1998, 20(79l): 61

(收稿: 1999-05-05;修回: 1999-07-21)

(编辑　冷怀明)

The expression of NDPK/nm23 and CDKN2/P16 in epithelial ovarian carcinoma

Yang Ying, Du Baoling, Liu Yulian (Departament of Obstet Gynecol, Xing Qiao Hospital, Third Military University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To explore the relationship between the expressions of tumor metastasis suppressor gene NDPK/nm23 or tumor suppressor gene CDKN/P16 and the occurrence, development and lymph node metastasis of ovarian epithelial carcinoma. Methods: The expression of P16 protein and nm23 protein were detected by streptavidin peroxidase conjugated method in 78 cases of tissue samples including 12 normal ovary, 14 ovarian benign epithelioma and 52 OEC. Results: The positive rate of nm23-H1 expression was 67.3% in the tissues of OEC which was higher than that of the normal ovary (41.7%) and benign ovarian epithelioma (42.8%) ($P < 0.05$). Significant difference between the positive rates in serous carcinomas (82.1%) and mucinous carcinomas (50.0%) ($P < 0.05$) was observed. The positive expression rate of nm23-H1 in OEC was especially related to the lymph node metastasis rather than the clinical stage or the pathologyical grades. The positive expression rate of P16 in OEC was 28.8% significantly lower than that of normal ovary (75.0%) and benign ovarian epithelioma (57.1%) ($P < 0.01$). The positive expression rate of P16 in the advanced cases was 22.2%, markedly lower than that of the early cases (71.4%) and of the the rate in poorly differentiated cases was 17.0% significanqtly lower than that high grade cases (44%). No relationship was found between the expression of nm23 and P16 and the ages of the cases. Conclusion: Nm23 and P16 are closely associated with the occurrence and development of OEC and nm23 play a very important role in OEC lymph node metastasis. P16 protein may be an important marker for the prognosis of OEC.

Key words Ovarian epithelial carcinoma; p16 gene; nm23 gene; Tumor suppressor gene; Immunohistochemistory

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net