

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 10. 010

卵巢浆液性肿瘤组织中 hk10 基因的表达

张晓霞¹, 费军伟¹, 张松灵¹, 倪劲松², 王蕊蕊³, 李荷莲⁴

Expression of hk10 in Ovary Cancer Tissues

ZHANG Xiao-xia¹, FEI Jun-wei¹, ZHANG Song-ling¹, NI Jin-Song², WANG Xin-rui³, LI He-lian⁴

1. Department of Obstetrics and Gynecology, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Key Laboratory of Pathobiology, Bethune Medical School, Jilin University; 3. Key Laboratory of Zoonoses, Institute of Zoonosis, Jilin University; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Hospital, Jilin University

Corresponding Author: LI He-lian, E-mail: znaghu@163.com

Abstract: Objective To study the expression of human kallikrein 10(hk10) in ovary cancer tissues and discuss the significances of hk10 gene in the early diagonosis of ovary cancer. **Methods** 1. RT-PCR method was used to investigate the level of hk10 mRNA in tissue samples of 10 ovary serous cystadenocarcinoma, 10 ovary serous cystadenoma and 10 normal ovaries. 2. The expressions of hk10 protein in 60 ovary serous cystadenocarcinoma, 24 ovary serous cystadenoma and 24 normol ovary tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** 1. The level of hk10 mRNA expression in ovary cancer tissues was significantly higher than in normal ovary and benign ovary tumor tissues($P<0.01$), and there was no difference between benign ovary tumor tissues and normal ovary tissues($P>0.05$). 2. The positive expression rate of hk10 protein in ovary cancer tissues was significantly higher than in normal ovary tissues and benign ovary tumor tissues($P<0.01$). The higher pathological grading of ovary cancer, the stronger positive expression of hk10 protein; the positive expression rate of hk10 protein was higher in II and IV ovary cancer than in I ovary cancer. **Conclusion** The expression of hk10 mRNA and protein in ovary cancer tissues was significantly increased; There was correlation between the expression intensity of hk10 protein, pathological grading and clinical stages. hk10 may plays an important role in the study of early diagonosis for ovary cancer.

Key words: Ovary cancer; hk10; RT-PCR; Immunohistochemistry

摘要:目的 研究卵巢癌组织中人激肽释放酶 10(hk10)的表达,探讨 hk10 在卵巢癌诊断中的意义。**方法** (1)应用 RT-PCR 检测 10 例卵巢浆液性囊腺癌组织、10 例卵巢浆液性囊腺瘤组织及 10 例正常卵巢组织中 hk10 mRNA 的表达。(2)应用免疫组织化学法检测 60 例卵巢浆液性囊腺癌、24 例卵巢浆液性囊腺瘤及 24 例正常卵巢组织中 hk10 蛋白的表达。**结果** (1)hk10 mRNA 在卵巢癌组的表达明显高于正常卵巢和卵巢良性肿瘤组($P<0.01$)。而卵巢良性肿瘤组和正常卵巢组的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)hk10 蛋白在卵巢癌组的阳性表达率明显高于正常卵巢组和卵巢良性肿瘤组($P<0.01$);随着卵巢癌病理级别的增加 hk10 的蛋白表达增强($P<0.01$);II 期和 IV 期卵巢癌 hk10 蛋白阳性表达率高于 I 期卵巢癌。**结论** hk10 mRNA 及蛋白在卵巢癌组织中表达显著增高,在卵巢癌组织中 hk10 蛋白表达程度与病理级别及临床分期相关,hk10 基因在卵巢癌早期诊断研究中意义重大。

关键词: 卵巢癌;人激肽释放酶 10;反转录-聚合酶链式反应;免疫组化

中图分类号:R737.31 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2009)10-0847-04

收稿日期:2008-07-17;修回日期:2009-04-30
基金项目:吉林省教育厅课题资助项目(吉教科合字[2005]第 132 号)
作者单位:1. 130021 长春,吉林大学第一医院妇产科;
2. 吉林大学白求恩医学院病理生物学教育部重点实验室;
3. 吉林大学人兽共患病研究所教育部重点实验室;4. 吉林大学第二医院妇产科
通信作者:李荷莲,E-mail: znaghu@163.com
作者简介:张晓霞(1962-),女,博士,主任医师,主要从事卵巢癌基因诊断与治疗的研究

0 引言

人激肽释放酶 10(hk10)是人激肽释放酶(hk)家族成员之一,通过与一些生长因子、激素或细胞外基质相结合,参与细胞凋亡、血管生成和肿瘤转移等过程^[1-2],目前国外研究报道 hk10 基因在卵巢癌组织中表达增强,卵巢癌患者血清 hk10 浓度增高。为探讨 hk10 基因在卵巢癌发生和发展中的作用,本研究应用 RT-PCR 及免疫组织化学染色方法,在

mRNA 和蛋白水平研究卵巢癌组织中 hk10 基因的表达情况,初步探讨 hk10 基因在卵巢癌早期诊断中的意义。

1 资料与方法

1.1 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

1.1.1 临床资料

收集 2007 年吉林大学第一医院妇产科收治的卵巢浆液性囊腺癌病例 10 例,手术切除标本离体后立即自卵巢原发病灶分离出肿瘤组织,迅速转至 -70℃ 冰箱保存备用,其余部分送病理检查。同法留取 10 例卵巢浆液性囊腺瘤及 10 例正常卵巢组织(子宫肌瘤手术时活检的正常卵巢组织)。

1.1.2 实验方法

采用 Trizol 法抽取总 RNA,紫外分光光度计检测检验 RNA 浓度及纯度,符合实验标准。hk10 上游引物 5'-GACCACCTGCTGCTTCTTC-3',下游引物 5'-GGCCCTTGTTGTACTTCACT-3'。扩增片段大小为 268 bp,内参 beta-actin 上游引物 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',扩增片段大小为 418 bp。反应条件为:(1)cDNA 预变性:94℃ 2 min;(2)PCR 扩增:94℃ 45 s,55℃ 30 s,72℃ 10 min 共 30 个循环;(3)循环完毕后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像处理系统对每一样品 PCR 产物扩增的特异性片段进行扫描,以 beta-actin 密度作为参考定量标准,目的基因 hk10 mRNA 的表达量以 hk10 与 beta-actin 吸光度之比来表示。

1.2 免疫组织化学染色

1.2.1 临床资料

收集吉林大学第一医院妇产科 2005~2007 年手术切除和病理检查确诊的卵巢浆液性囊腺癌标本 60 例,按 FIGO 临床分期标准,Ⅰ期 9 例,Ⅱ期 12 例,Ⅲ期 33 例,Ⅳ期 6 例;按 WHO 组织分级标准,高分化(G1)18 例,中分化(G2)20 例,低分化(G3)22 例;取同期正常卵巢组织标本 24 例,卵巢浆液性囊腺瘤标本 24 例作为对照。上述组织标本 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片数张。其中一张 HE 染色核实病理诊断。

1.2.2 方法与试剂

切片用 EDTA 修复液进行抗原修复,SP 免疫组织化学染色(染色步骤按说明书进行),以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知的 hk10 阳性的卵巢癌组织切片作阳性对照。hk10 单克隆抗体由美国 Santa Cruz 生物技术公司进口,SP 试剂盒及 DAB

显色剂均由北京中衫生物试剂公司提供。

1.2.3 结果判定

表达结果以细胞染成黄色、黄褐色及棕褐色均为阳性,由计数阳性细胞数评判,即光学显微镜下随机观察高倍镜下(×400)5 个视野的表达情况,计算阳性细胞数所占总细胞数的百分比,取 5 个视野的算术平均值。(1)根据显色细胞的比例计分:0 分(显色细胞为 0%);1 分(显色细胞<10%);2 分(显色细胞 10%~50%);3 分(显色细胞>50%~80%);4 分(显色细胞>80%)。(2)根据细胞染色强度计分:0 分(细胞无显色);1 分(浅黄色);2 分(棕黄色);3 分(黄褐色);积分=染色强度×阳性细胞数,积分范围 0~12 分,≥4 分定义为阳性表达。

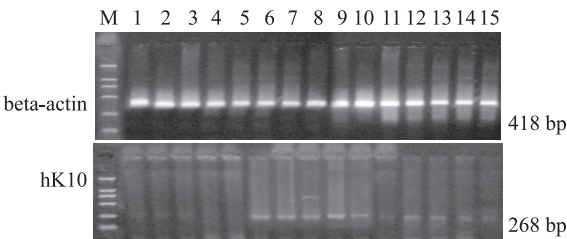
1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析,组间量的比较差异用方差分析,组间阳性率的比较用 χ^2 检验,相关分析采用等级相关分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

hk10 基因在正常卵巢及卵巢癌组织中有弱表达,在卵巢癌组织中表达明显增强,hk10 基因的相对表达量在正常卵巢组织为(0.023±0.015),在卵巢癌组织为(0.032±0.045),在卵巢癌组织为(0.106±0.045),在卵巢癌组织中表达明显增高,与正常卵巢组织及卵巢癌组织比较有统计学意义($P<0.01$),见图 1。

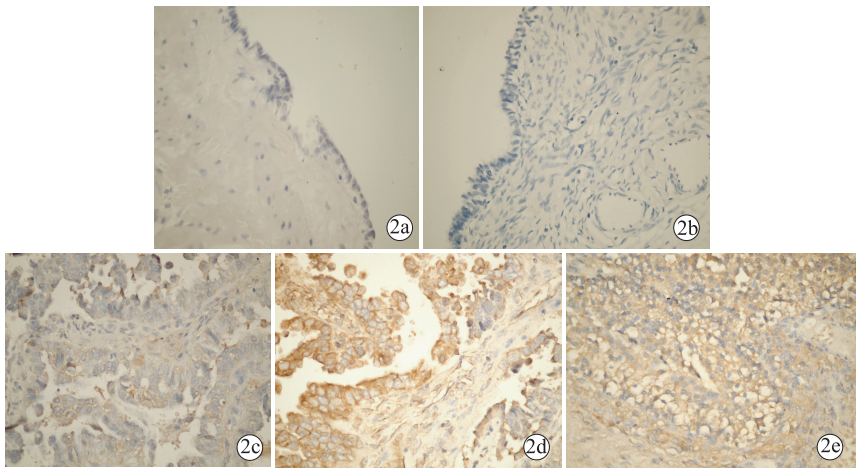


1~5: Normal ovarian; 6~10: Ovarian cancer; 11~15: Benign ovarian tumor; M: Marker, were 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp respectively

图 1 hk10 mRNA 在正常卵巢及卵巢肿瘤组织中的表达
Figure 1 hk10 mRNA expression in various groups

2.2 免疫组织化学结果

免疫组织化学结果显示,hk10 蛋白阳性表达部位主要定位于细胞质。正常卵巢细胞多数不表达,卵巢良性肿瘤细胞表达较弱,卵巢癌细胞则呈现强表达,见图 2。在卵巢癌组 hk10 蛋白的阳性表达率明显高于正常组和卵巢良性肿瘤组($P<0.01$),见



2a: Immunohistochemistry staining for hk10 protein in normal ovarian surface epithelial cells×400;
2b: Immunohistochemistry staining for hk10 protein in serous cystadenoma×400;
2c: Immunohistochemistry staining for hk10 protein in well-differentiated serous cystadenocarcinoma×400;
2d: Immunohistochemistry staining for hk10 protein in moderately differentiated cystadenocarcinoma×400;
2e: Immunohistochemistry staining for hk10 protein in poorly differentiated cystadenocarcinoma ×400

图 2 正常卵巢组织及卵巢肿瘤组织中 hk10 蛋白的表达

Figure 2 The expression of hk10 protein in normal ovarian tissues and ovarian serous tumors

表 1. 随着卵巢癌病理级别的增加 hk10 的蛋白表达增强($P<0.01$);临床Ⅱ期和Ⅳ期卵巢癌 hk10 阳性表达率均比Ⅰ期卵巢癌高($P<0.05$),见表 2、3。

表 1 hk10 蛋白在卵巢浆液性肿瘤和正常卵巢组织中表达 (例,%)

Table 1 The expression of hk10 protein in serous ovary tumor and normal ovary (n,%)

Groups	n	hk10 positive	hk10 negative
Control	24	2(8.3)*	22(91.7)
Benign tumor	24	5(20.8)*	19(79.2)
Cancer	60	37(61.7)	23(38.3)

Note: * : $P<0.01$ vs. Cancer group

表 2 hk10 蛋白表达与卵巢癌病理分级的关系 (例,%)

Table 2 Expression intensity of hk10 protein and pathological grading (n,%)

Groups	n	hk10 positive	hk10 negative
G1	18	5 (27.8)	13(72.2)
G2	20	10(50.0)*	10(50.0)
G3	22	16(72.7)*	6(27.3)

Note: * : $P<0.01$ pathological grading of ovary cancer

表 3 hk10 蛋白表达与卵巢癌临床分期的关系 (例,%)

Table 3 Expression intensity of hk10 protein and clinical stage (n,%)

Groups	n	hk10 positive	hk10 negative
Ⅰ	9	5 (55.5)	4(45.5)
Ⅱ	12	10 (83.3)*	2(16.7)
Ⅲ	33	25 (75.7)	8(24.3)
Ⅳ	6	5(83.3)*	1(16.7)

Note: * : $P<0.05$ vs. clinical stages Ⅰ of ovary cancer

3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一。由于至今仍缺乏有效的早期诊断方法,约 70%的卵巢癌临床发现时已属晚期,其 5 年存活率为 25%~30%。卵巢癌已成为严重威胁妇女生命的肿瘤。目前研究发现卵巢癌的发生和发展与许多已知的和未知的基因有关^[3]。人激肽释放酶(hk)家族是目前国外研究较多的基因之一。人激肽释放酶 10 是一种分子量为 30 kD 包含 276 氨基酸的分泌型丝氨酸蛋白酶,属于人激肽释放酶家族。也被称为正常上皮细胞特异性基因 1,研究报道 hk10 在卵巢癌诊断中意义重大。

Luo 等^[4]2001 年研究发现 56%的卵巢癌患者血清 hk10 浓度明显增高,并且卵巢癌不同阶段其 hk10 浓度不同,首次报道了 hk10 为卵巢癌诊断的新的血清标志物。Shvartsman 等^[5]利用基因芯片、原位杂交、Northern blot、Western blot 等技术分析 66 例原发性浆液性卵巢癌标本及 6 例卵巢癌细胞系标本,结果发现 hk10 在卵巢癌中高表达,91.4%的原发性浆液性卵巢癌、73.3%非浆液性卵巢癌与72.7%原发性腹膜癌 hk10 表达显著高于正常组织。Luo 等^[6]定量检测 97 例正常妇女,141 例妇科良性疾病患者,146 例卵巢癌患者血清 hk10 浓度,发现正常组 hk10 平均浓度为 439 ng/L,卵巢癌组 hk10 平均浓度为 1 067 ng/L,良性组 hk10 平均浓度为 447 ng/L,正常组及妇科良性疾病组血清 hk10 浓度相似,卵巢癌组术前血清 hk10 浓度明显升高;对卵巢癌诊断的特异度与敏感度分别为 90%

与 54%。研究发现 CA125 阴性的卵巢癌患者 90% 表现为 hk10 阳性,血清 hk10 与 CA125 联合应用比单独应用 CA125 的敏感度提高 21%。也认为血清 hk10 不但是卵巢癌肿瘤标志物,还是卵巢癌预后的判断指标,hk10 浓度越高卵巢癌预后越差。Rosen 等^[7]也报告 22%CA125 阴性的卵巢癌患者 hk10 阳性,而 CA125 阳性的卵巢癌患者 hk10 均为阳性,认为 hk10 是一种比 CA125 更为有意义的卵巢癌肿瘤标志物。国内也有研究报道卵巢癌组 hk10 平均浓度 1 093 ng/L,妇科良性疾病组 hk10 平均浓度 516 ng/L,健康女性对照组 hk10 平均浓度 460 ng/L,卵巢癌组 hk10 浓度明显高于妇科良性疾病组和健康女性对照组。hk10 诊断卵巢癌的敏感度为 59%,特异性为 89%。认为 hk10 是卵巢癌诊断的有价值的指标,与 CA125 联合应用可使早期卵巢癌的阳性率提高^[8]。

本研究应用 RT-PCR 及免疫组织化学技术分别检测 hk10 mRNA 和蛋白在卵巢癌组织中的表达情况,RT-PCR 结果显示,hk10 mRNA 在卵巢良性肿瘤组表达与正常卵巢组比较差异无统计学意义。而 hk10 mRNA 在卵巢癌组的相对表达量较正常卵巢组及卵巢良性肿瘤组明显增加,差异具有统计学意义。免疫组织化学结果显示,hk10 蛋白阳性表达部位主要定位于细胞质;正常卵巢组织细胞多数不表达,卵巢良性肿瘤细胞表达较弱,卵巢癌细胞则呈现强表达;卵巢癌组 hk10 蛋白的阳性表达率明显高于正常卵巢组和卵巢良性肿瘤组;本研究结果提示 hk10 mRNA 和蛋白在卵巢浆液性囊腺癌组织中表达增强,与近年来国外专家研究结果相同,提示 hk10 基因在卵巢癌发生和发展中起重要作用。但是,目前国内未见相关报道。同时本研究结果显示

随着卵巢癌病理级别的增高 hk10 蛋白表达增强;说明 hk10 蛋白的表达程度与卵巢癌恶性程度相关,研究结果还显示 II 期和 IV 期卵巢癌 hk10 蛋白的阳性表达率均比 I 期高,其原因需要进一步探讨。近年来,国外文献报道卵巢癌患者血清中 hk10 浓度增高,认为血清 hk10 是卵巢癌肿瘤标志物,并且 hk10 越高卵巢癌预后越差。为了进一步研究 hk10 基因在卵巢癌早期诊断中的意义,我们将进一步研究卵巢癌患者血清和尿液中 hk10 浓度。

参考文献:

[1] Diamandis EP, Yousef GM, Olsson AY. An update on human and mouse glandular kallikreins [J]. ClinBiochem, 2004, 37 (4): 258-260.

[2] Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease [J]. Endocr Rev, 2001, 22(2): 184-204.

[3] 孙艳,李勇,范立侨,等. survivin 胞浆与胞核表达在原发性和转移性上皮性卵巢癌中的意义[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35 (6): 445-446.

[4] Luo LY, Bunting P, Scorilas A, et al. Human kallikrein 10; a novel tumor marker for ovarian carcinoma? [J]. Clin Chim Acta, 2001, 306(1-2): 111-118.

[5] Shvartsman HS, Lu KH, Lee J, et al. Overexpression of kallikrein 10 in epithelial ovarian carcinomas[J]. Gynecol Oncol, 2003, 90(1): 44-50.

[6] Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, et al. The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis[J]. Cancer Res, 2003, 63 (4): 807-811.

[7] Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2005, 99(2): 267-277.

[8] 欧启水,刘灿,苏光建,等. 人类血清激肽释放酶 10 的检测及其在卵巢癌诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29 (1): 39-41.

[编辑:贺文;校对:刘红武]