

ERK1/2 和 cyclinD1 蛋白在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达及其意义

韦淑琴¹, 隋丽华², 戚基萍³, 郑建华¹

Expression of ERK 1/2 and cyclinD1 in Epithelial Ovarian Cancer Protein and Their Significance

WEI Shu-qin, SUI Li-hua, QI Ji-ping, et al

Department of Obstetrics and Gynecology, the First Clinical College, Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Abstract: Objective To investigate the expression of ERK1/2 and cyclinD1 and their significance in epithelial ovarian tumor. **Methods** Expression of ERK1/2 and cyclinD1 were examined by immunohistochemical technique in the epithelial ovarian cancer of 49 patients, benign epithelial ovarian tumor of 26 patients and normal ovarian tissue of 10 patients. **Results** The positive percentage of ERK1/2 and cyclinD1 protein was significantly higher than that in benign tumors and normal ovarian tissues ($P < 0.01$). The positive percentage of ERK and cyclinD1 protein in stage ~ epithelial ovarian cancer was significantly higher than in stage ~ epithelial ovarian cancer ($P < 0.05$). ERK1/2 and cyclinD1 positive rates were positively correlated. **Conclusion** ERK and cyclinD1 may play an important role in the development of human epithelial ovarian cancer. ERK may induce overexpression of cyclinD1 protein and result in persistent proliferation and progression of ovarian cancer.

Keywords: Ovarian neoplasms; Signal transduction; Oncogene protein; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨卵巢上皮性肿瘤组织中细胞外信号调节激酶(ERK1/2)及细胞周期素D1(cyclinD1)的表达及意义。方法 应用免疫组织化学技术,检测49例卵巢上皮性癌组织,26例良性卵巢上皮性肿瘤组织及10例正常卵巢组织中ERK1/2和cyclinD1蛋白表达。结果 ERK1/2和cyclinD1在卵巢上皮性癌组织中的表达阳性率显著高于正常卵巢组织和良性卵巢上皮性肿瘤组织($P < 0.01$)。~期卵巢癌组织中的ERK1/2和cyclinD1蛋白表达水平高于~期卵巢癌($P < 0.05$)。ERK1/2和cyclinD1蛋白表达阳性率呈明显的正相关($P < 0.05$)。结论 ERK1/2和cyclinD1在卵巢上皮性癌发生、发展中起重要作用,ERK通过诱导cyclinD1蛋白过表达使卵巢上皮性癌细胞增殖和演进。

关键词: 卵巢肿瘤;信号转导;癌基因蛋白;免疫组织化学

中图分类号:R737.31 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)02-0090-03

0 引言

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPK)是细胞内一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞信号的重要传递者。细胞外调节信号激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是MAPK家族的一个亚族,可被多种生长因子、细胞因子激活,参与调节细胞的增殖与分化。ERK活化后通过转录调节引起多种癌基因包括细胞周期素D1(cyclinD1)基因的相继激活导致细胞恶性转

化^[1]。为研究其在卵巢癌发生、发展中的作用,我们对卵巢上皮性肿瘤组织和正常卵巢组织中ERK和cyclinD1蛋白的表达进行了检测。

1 资料和方法

1.1 研究资料 49例卵巢上皮性癌,26例卵巢良性上皮性瘤及10例正常卵巢,取自哈尔滨医科大学第一临床医学院和第三临床医学院妇科2001年9月至2002年9月间住院行手术治疗的患者。49例卵巢上皮性癌中,卵巢浆液性囊腺癌18例,子宫内膜样癌14例,粘液性囊腺癌17例。

1.2 研究方法

1.2.1 免疫组织化学染色 手术切除的标本经10%的甲醛固定,石蜡包埋,组织切片厚4μm,脱蜡、水化后,3% H_2O_2 灭活内源性酶,分别于一抗(免

收稿日期:2003-02-24;修回日期:2003-05-09

基金项目:1. 黑龙江省自然科学基金项目(D03-55);2. 黑龙江省卫生厅自然科学基金项目(2003-003)

作者单位:1.150001 哈尔滨医科大学第一临床医学院妇产科;2. 哈尔滨医科大学第三临床医学院妇科;3. 哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科

抗 ERK1/2 多克隆抗体,鼠抗人 CyclinD1 单克隆抗体,美国 SantaCruz 公司产品,工作浓度为 1 000)、二抗(生物素标记 IgG,1 400 稀释)及辣根过氧化物酶标记的链霉素亲和素复合物(1 400 稀释)孵育。免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)法染色。SP 试剂盒购自北京中山生物技术公司产品。免疫染色阴性对照采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,另选择 2 例已知 ERK 和 cyclinD1 蛋白表达阳性的乳腺癌和子宫内膜癌石蜡切片作为阳性对照。

1.2.2 结果判定 采用双盲法观察结果。阳性细胞呈棕黄色着色,按细胞染色强度分:不着色为阴性(-),淡棕黄色为弱阳性(+),深棕黄色为强阳性(+++),阳性着色介于弱阳性至强阳性之间(++)。

1.3 统计学方法 采用 SAS (statistical analysis system)软件包进行统计分析,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 ERK 和 cyclinD1 蛋白在不同卵巢组织中的表达和定位 ERK 和 cyclinD1 蛋白主要在卵巢癌细胞核内分布,部分胞浆着色,呈棕黄色(图略)。在 75 例卵巢上皮性肿瘤组织中,ERK 蛋白表达阳性者 38 例,其中卵巢上皮性癌 31 例,表达阳性率为 63%,良性肿瘤 7 例,表达阳性率为 27%。cyclinD1 在卵巢上皮性癌组织中表达阳性率为 47%,在卵巢良性肿瘤组织中表达阳性率 15%。10 例正常卵巢组织中 ERK 和 cyclinD1 蛋白表达均为阴性。ERK 和 cyclinD1 蛋白在卵巢上皮性癌中的表达阳性率明显高于正常卵巢及卵巢上皮性良性肿瘤 ($P < 0.01$)。卵巢上皮性良性肿瘤中 ERK 蛋白阳性率高于正常卵巢,但差异无显著性,见表 1。

2.2 ERK 和 cyclinD1 蛋白表达与卵巢上皮性癌临床病理特征的关系 卵巢上皮性癌中 ERK 和 cyclinD1 蛋白的表达与临床病理分期有关,Ⅰ~Ⅱ期卵巢癌 ERK 和 cyclinD1 蛋白表达水平高于Ⅲ~Ⅳ期,差异有显著性 ($P < 0.05$)。ERK 蛋白表达与卵巢上皮性癌的患者年龄、病理类型、组织学类型方面比较,差异均无显著性 ($P > 0.05$),见表 1。

2.3 卵巢上皮性癌中 ERK 和 cyclinD1 蛋白阳性表达的相关性 31 例 ERK 阳性的卵巢上皮性癌病例中,21 例 cyclinD1 蛋白呈阳性表达,阳性符合率 68%;18 例 ERK 阴性病例中,16 例 cyclinD1 蛋白呈阴性表达,阴性符合率 89%,统计学分析表明 ERK 和 cyclinD1 蛋白的表达呈正相关 ($P < 0.05$),见表 2。

表 1 卵巢上皮性肿瘤患者各临床病理因素中 ERK 和 cyclinD1 的表达

类别	总例数	ERK 蛋白表达阳性		cyclinD1 蛋白表达阳性	
		例数	百分率 (%)	例数	百分率 (%)
正常卵巢	10	0	0/10	0	0/10
卵巢良性肿瘤	26	7	27	4	15
卵巢上皮性癌	49	31	63	23	47
年龄(岁)					
60	27	17	63	14	52
>60	22	14	64	9	41
手术病理分期					
~ 期	13	4	31	2	15
~ 期	36	27	75	21	58
组织学类型					
浆液性囊腺癌	18	13	13/18 *	9	9/18 *
子宫内膜样癌	14	7	7/14 *	6	6/14 *
粘液性囊腺癌	17	11	11/17 *	8	8/17 *
病理分级					
G ₁ ~ G ₂ 级	28	18	64	14	50
G ₃ 级	21	13	62	9	43

*例数少于 20, 不计算百分率

表 2 卵巢上皮性肿瘤组织中 ERK1/2 与 cyclinD1 蛋白阳性表达的相关性

ERK1/2	cyclinD1	
	+	-
+	21	10
-	2	16

$\chi^2 = 4.08, P < 0.05$

3 讨论

RAS-RAF-MEK-MAPK 信号传导通路参与细胞增殖、分化、凋亡、运动与分泌等多种生命活动的调节,MAPK 是这一传导通路中的重要一环^[2]。它包括:ERK、JNK 与 p38 三个亚家族,其中 ERK 主要被各种生长因子、细胞因子、肿瘤启动子等激活而磷酸化,进入细胞核作用于 Elk-1、c-myc、AP-1 等转录因子,促进某些基因包括原癌基因 cyclinD1 的转录与表达,与细胞的增殖密切相关^[3]。体外及动物实验提示,ERK 的激活与大肠癌、肾癌、胰腺癌等有关,但在人卵巢癌组织中有关 ERK 的研究尚未见报道。

本研究结果显示,正常卵巢无表达,在卵巢上皮性良性肿瘤中表达很低,而在卵巢上皮性癌中 ERK 蛋白表达明显升高。提示 ERK 的升高可能与卵巢癌的发生发展有关。Manni 等^[4]在体外的研究结果提示,ERK-2 的活性异常增高可导致正常乳腺上皮

细胞 MCF-10 发生恶性转化。本研究结果提示, ERK 蛋白的过表达可能在人卵巢上皮细胞的恶性转化及卵巢癌的发生过程中起着重要作用。

本研究结果表明, ERK 蛋白的表达与卵巢癌患者的临床病理分期相关, 期、期卵巢癌组织中的 ERK 蛋白表达水平明显高于 期与 期卵巢癌, 表明随着卵巢癌的进展, ERK 蛋白表达水平增高。HiroyaOka 等^[5]用蛋白印迹法检测肾癌组织和癌旁正常组织中 ERK 活性, 肾癌组织 ERK 活性是癌旁正常组织的 2 至 18 倍, 且随手术病理分期升高活性 ERK 有增高的趋势, 表明活性 ERK 与肾癌的侵袭、转移密切相关。本研究结果与上述研究结果一致, 提示 ERK 在卵巢癌细胞的增殖、转移、侵袭等活动中可起到促进作用。因此, 对 ERK 蛋白的检测, 有可能有助于判断卵巢癌的恶性程度。

cyclinD1 为细胞周期相关癌基因, 在细胞周期关键限速点 G_1 S 期转换中通过激活细胞周期依赖性激酶 4 或 (CDK4 或 CDK6), 使后者催化一系列关键底物 (如 Rb 蛋白) 而导致转录因子释放, 促进 DNA 合成而发挥加速细胞增殖的正性调节作用。cyclinD1 的过度表达可使细胞持续增殖并可能导致恶性转化^[6]。本研究结果显示 cyclinD1 在卵巢癌中的表达水平明显高于良性卵巢瘤和正常卵巢, 且 期、期卵巢癌组织中的 cyclinD1 蛋白表达水平明显高于 期与 期卵巢癌。Masuda 等^[7]研究表明, cyclinD1 的异常表达与头颈癌的恶性程度及不良预后密切相关。本研究与上述结果一致, cyclinD1 作为一个细胞周期的正性调控因子, 它的过度表达不仅与反常的细胞周期有关, 而且影响多种肿瘤的生物行为。

Lavoie 等^[8]发现 ERK 磷酸化及转入细胞核是诱导 cyclinD1 癌基因表达的上游事件。Fiddes 等^[9]认为 MAPK 的激活是细胞周期进入 S 期的关键, 持续激活 ERK 促进 cyclinD1 的表达及其与 CDK4 的

结合, 导致细胞从 G_1 期向 S 期转化, 从而促进增殖。本研究结果显示 ERK 和 cyclinD1 蛋白在卵巢癌的表达呈正相关, 表明 ERK 可能通过促进 cyclinD1 的过度表达, 从而促使卵巢细胞维持高增状态, 并参与卵巢癌的发生发展。

参考文献:

- [1] JohnsonGL, La padatR. Mito gen-activated proteinkinase pathwaysmediatedbyERK, JNK, and p38 proteinkinases[J]. *Science*, 2002, 298 (5600): 1911-1912.
- [2] AndresenBT, RizzoMA, ShomeK, et al. The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade[J]. *FEBS Lett*, 2002, 531 (1): 65-68.
- [3] Weinstein -OppenheimerCR, WilliamLB, LindaSS, et al. The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 88 (3): 229-279.
- [4] ManniA, WechterR, GilmourS, et al. Ornithine decarboxylase overexpression stimulates mitogen-activated protein kinase and anchorage-independent growth of human breast epithelial cells[J]. *Int J Cancer*, 1997, 70 (2): 175-182.
- [5] OkaH, ChataniY, HoshinoR, et al. Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma[J]. *Cancer Research*, 1995, 55 (9): 4182-4187.
- [6] ZhouP, JiangW, We ghorstCM, et al. Overexpression of cyclinD1 enhances gene amplification[J]. *Cancer Res*, 1996, 56 (1): 36-39.
- [7] MasudaM, SuzuiM, YasumatuR, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclinD1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (12): 3351-3355.
- [8] LavoieJN, LallimiG, BrunetA, et al. CyclinD1 expression is regulated positively by the p42/p44 MAPK and negatively by p38/HOG MAPK pathway[J]. *J Biochem*, 1996, 271 (34): 20608-20616.
- [9] FiddesRJ, JanesPW, SivertenSP, et al. Inhibition of the MAP kinase cascade blocks heregulin-induced cell cycle progression in T-47D human breast cancer cell[J]. *Oncogene*, 1998, 16 (21): 2803-2813.

(刘红武校对)