

Pokemon 在子宫内膜癌组织中的表达及其与突变型 p53 的相关性研究

夷恬进, 王平[△]

四川大学华西第二医院 妇科(成都 610041)

【摘要】 目的 初步探讨 Pokemon 表达与子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)临床特征之间的关系,并分析不同类型 EC 组织中 Pokemon 表达与 p53 突变的关系,为寻求基因治疗的有效靶点提供理论基础。方法 收集四川大学华西第二医院病理科 2012 年 7 月至 2014 年 7 月的子宫内膜存档石蜡标本共 98 例(其中 EC 58 例,正常内膜组织 20 例,非典型增生内膜组织 20 例),采用免疫组化法检测每例切片中 Pokemon 蛋白的表达情况,分析其表达水平与临床病理特征的关系,并分析 Pokemon 和突变型 p53 两者之间的相关性。结果 Pokemon 在正常内膜组织、非典型增生内膜组织、EC 组织的阳性率分别为 25.00%(5/20)、60.00%(12/20)、93.10%(54/58),表达程度逐渐增强(P 均 <0.05);Pokemon 在 II 型 EC 组织的阳性率 97.14%(34/35)高于 I 型的阳性率 86.96%(20/23)($P=0.018$);Pokemon 在 III~IV 期、II 型及 Ki-67 增殖指数 ≥ 50 的内膜癌组织中表达程度较高($P=0.012, 0.023, 0.029$);II 型 EC 组织中, Pokemon 和突变型 p53 的秩和相关系数 $r_s=0.669(P=0.000)$ 。结论 Pokemon 的高表达引起突变型 p53 表达上调,可能是 II 型 EC 的致癌模式之一。

【关键词】 Pokemon 子宫内膜癌 突变型 p53 临床病理特征 靶点

The Expression of Pokemon in Endometrial Carcinoma Tissue and the Correlation with Mutant p53 YI Tian-jin, WANG Ping[△]. Department of Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: wangping_886@126.com

【Abstract】 Objective To detect the expression of Pokemon in endometrial carcinoma (EC), to provide preliminary theoretical basis for clarifying pathogenesis and searching for effective targets. **Methods** Ninety-eight cases of endometrial tissue paraffin specimens from July 2012 to July 2014 in West China Second University Hospital, Sichuan University, were collected, including: EC group, consisting of adenocarcinoma 23 cases, adenosquamous 12 cases, serous 3 cases, mucinous 11 cases and clear cell 9 cases, and control group, consisting of atypical hyperplasia endometrium 20 cases and normal endometrium 20 cases (secretory 10 cases, hyperplasia 10 cases). Immunohistochemistry was used to detect the expression of Pokemon in each section, analyzing the correlation of Pokemon expression with clinicopathologic characteristics and p53 expression. **Results** The positive rate of Pokemon in normal endometrium was 25% (5/20), significantly lower than that in atypical hyperplasia endometrium (60.0%, 12/20) and EC (93.1%, 54/58) ($P<0.05$); the rate in type II was 97.12% (34/35), significantly higher than that in type I (86.96%, 20/23) ($P=0.018$). The positive rate of Pokemon in III-IV stage, type II and Ki-67 ≥ 50 EC tissue was much higher ($P=0.012, 0.023, 0.029$). In type II EC tissue, the correlation index between Pokemon and p53 is 0.669 ($P=0.000$). **Conclusion** The over expression of Pokemon upregulates the expression of mutant p53, which may be one of the carcinogenesis modes in type II EC.

【Key words】 Pokemon Endometrial carcinoma Mutant p53 Clinicopathological characteristics Targets

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是指原发于子宫内膜的一组上皮性恶性肿瘤。根据病理特点和预后结局不同,分为两种亚型: I 型为雌激素依赖型,组织类型为子宫内膜样腺癌,雌/孕激素受体(ER/PR)呈强阳性表达,预后较好,5 年生存率

74.1%~91.2%^[1]; II 型为雌激素非依赖型,组织类型为子宫内膜浆液性癌、腺鳞癌、黏液性癌、透明细胞癌等,ER/PR 多呈阴性,常见 TP53 基因突变,预后较差,5 年生存率 27.0%~69.9%^[1]。2005 年 MAEDA 等^[2]发现转录抑制因子 Pokemon,即 POK 红髓系致癌因子(POK erythroid myeloid ontogenic factor),其高表达与多种人类实体肿瘤的发生发展

[△] 通信作者, E-mail: wangping_886@126.com

密切相关,然而是否在 EC 中发挥作用国内外尚无文献报道。本研究采用免疫化学法检测不同子宫内 膜组织中 Pokemon 的表达,分析其表达水平与临床 病理特征的关系及与突变型 p53 的相关性,初步探 讨 EC 的发病机制,并寻求基因治疗的有效靶点。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集四川大学华西第二医院病理科 2012 年 7 月至 2014 年 7 月的子宫内膜存档石蜡标本共 135 例,纳入标准:病理诊断结果由我院两位妇科肿瘤病 理专家复核;术前未行化疗、放疗、激素治疗或生物 治疗;病理诊断报告包含免疫组化 ER、PR、p53 和 Ki-67 四项结果。最终纳入 100 例标本,在染色过 程中有 2 例脱片,故有效标本共 98 例,包括 EC 组 织 58 例(子宫内膜样腺癌 23 例,腺鳞癌 12 例,浆液 性癌 3 例,黏液性癌 11 例,透明细胞性癌 9 例),同 期因其他病因手术切除子宫石蜡标本 40 例(对照 组),其中子宫内膜非典型增生 20 例,正常子宫内膜 20 例(分泌期 10 例,增生期 10 例)。

1.2 临床病理资料

58 例 EC 标本中,无肌层浸润或浸润 $<1/2$ 肌 层 37 例, $\geq 1/2$ 肌层 21 例;宫颈间质受累 12 例,无 受累 46 例;出现盆腔卵巢、输卵管和/或宫旁转移 7 例,腹腔转移 3 例,无转移 48 例;术中行淋巴结清扫 54 例,有淋巴结转移 9 例,无转移 45 例;FIGO (2009 年)分期: I 期 19 例(IA 10 例,IB 9 例), II 期 18 例, III 期 16 例(III A 4 例, III B 3 例, III C₁ 8 例, III C₂ 1 例), IV 期 5 例(IV A 期 1 例, IV B 4 例);肿瘤组 织学分类(WHO, 2014 年): I 型 EC 23 例, II 型 EC 35 例(腺鳞癌 12 例,浆液性癌 3 例,黏液性癌 11 例,透明细胞性癌 9 例);病理组织学分级:高分化 9 例,中分化 30 例,低分化 19 例;ER 表达阳性 44 例, 阴性 14 例;PR 表达阳性 42 例,阴性 16 例;突变型 p53 表达阳性 32 例(其中“+” 5 例、“++” 6 例和 “+++” 21 例),阴性 26 例;Ki-67 指数 ≥ 50 者 44 例, <50 者 14 例。

1.3 实验试剂和器材

主要试剂:Pokemon 山羊抗人多克隆抗体(美 国 SANTA 公司);山羊超敏二步法免疫组化检测 试剂、PBS 缓冲液(pH7.2~7.4)、浓缩型 DAB 试剂 盒、Tris/EDTA 溶液(pH 9.0~10.0)(北京中杉金 桥生物技术有限公司);酒精、二甲苯溶液、苏木素 液等。主要器材:微波炉(苏泊尔);Eppendorf 微量

加样器及吸头(德国);显微镜(OLMPUS);计算机 彩色病理图像系统(四川大学华西第二医院西部妇 幼研究院公共实验室);Image-Pro Plus6.0 软件 (MEDIA CYBERNETICS 专业图像分析系统开发 公司)。

1.4 实验方法及步骤

检测组织中 Pokemon 的表达采用免疫组化 EnVision 染色法。主要实验步骤:防脱片处理→脱 蜡至水→热抗原修复(将切片浸入 pH 9~10 的 Tris/EDTA 溶液,微波炉法)→消除内源性过氧化 物酶活性(3% H₂O₂ 室温,避光孵育 10 min)→滴加 1:50 浓度的一抗 Pokemon,4 °C 孵育过夜→滴加 试剂 1 Polymer Helper(即用型),37 °C 孵育 15 min 后滴加试剂 2 poly-HRP anti-Goat IgG(即用型), 37 °C 孵育 15 min→DAB 显色→蒸馏水冲洗→苏木 素复染→脱水透明封片。

每次均用已知 Pokemon 蛋白表达阳性的卵巢 癌作为阳性对照^[3],用 pH7.4 的 PBS 作为阴性对 照。

1.5 结果判读

定性判断:由我院两位病理科专家观察(双盲 法),采用二级计分法^[4]:首先计数每个视野($\times 200$) 下阳性细胞所占的比例,着色细胞 $\leq 10\%$ 为 0 分, 11%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分, $>50\%$ 为 3 分;再评估其染色强度,细胞核和/或细胞质无染色 为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将每张切片着色细胞百分率得分与染色强度得 分相乘,乘积为最后得分:0~1 分为阴性(-);2~3 分为弱阳性(+);4~6 分为中等阳性(++);6 分以 上为强阳性(+++)。

半定量判断:由 Image-pro plus 6.0 图像软件 计算每个视野的平均光密度(MD)值[累积光密度 (integrating optical density, IOD)/面积]。每例切 片的 MD 取 5 个视野 MD 的均值。

1.6 统计学方法

正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;两独立样本 均数的比较采用 *t* 检验,多个样本均数的两两比较 采用 SNK 检验;计数资料采用四格表资料或行 \times 列表资料的 χ^2 检验;两等级资料的相关性分析采用 Spearman 秩相关。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Pokemon 在正常内膜组织、非典型增生内膜组 织及内膜癌组织中的表达

Pokemon 主要定位表达于腺体及间质细胞的胞浆及胞核。在正常内膜组织、非典型增生内膜组织及 EC 组织中的表达呈不同程度阳性(图 1),在 3 组组织中的阳性表达率分别为 25.00%(5/20)、60.00%(12/20)、93.10%(54/58)。EC 组织中的

阳性率高于正常内膜组织($\chi^2 = 36.71, P = 0.000$)和非典型增生内膜组织($\chi^2 = 12.36, P = 0.012$);非典型增生内膜组织的阳性率高于正常内膜组织($\chi^2 = 5.013, P = 0.025$)(表 1)。

2.2 Pokemon 在 I 型和 II 型内膜癌组织中的表达

表 1 Pokemon 在正常内膜、非典型增生内膜及内膜癌组织中的表达情况

Table 1 The expression of Pokemon in normal endometrium, atypical hyperplasia endometrium and endometrial carcinoma

Group	n	The expression of Pokemon/case				Positive rate/%
		-	+	++	+++	
Normal endometrium	20	15	5	0	0	25.00*
Atypical hyperplasia endometrium	20	8	11	1	0	60.00
Endometrial carcinoma	58	4	8	25	21	93.10*·△

* $P < 0.05$, vs. atypical hyperplasia endometrium group; △ $P < 0.05$, vs. normal endometrium group

I 型 EC 组织中, Pokemon 阳性率为 86.96%(20/23); II 型 EC 组织中, Pokemon 阳性率为 97.12%(34/35)。Pokemon 在 II 型内膜癌组织的表达程度高于 I 型内膜癌组织($P = 0.018$)(表 2, 图 2)。

表 2 Pokemon 在 I 型及 II 型 EC 组织中的表达情况

Table 2 The expression of Pokemon in type I and type II endometrial carcinoma

Group	n	The expression of Pokemon/case				Positive rate/%	P
		-	+	++	+++		
Type I	23	3	5	10	5	86.96	0.018
Type II	35	1	3	15	16	97.12	

2.3 Pokemon 与 EC 患者不同临床病理特征之间的关系

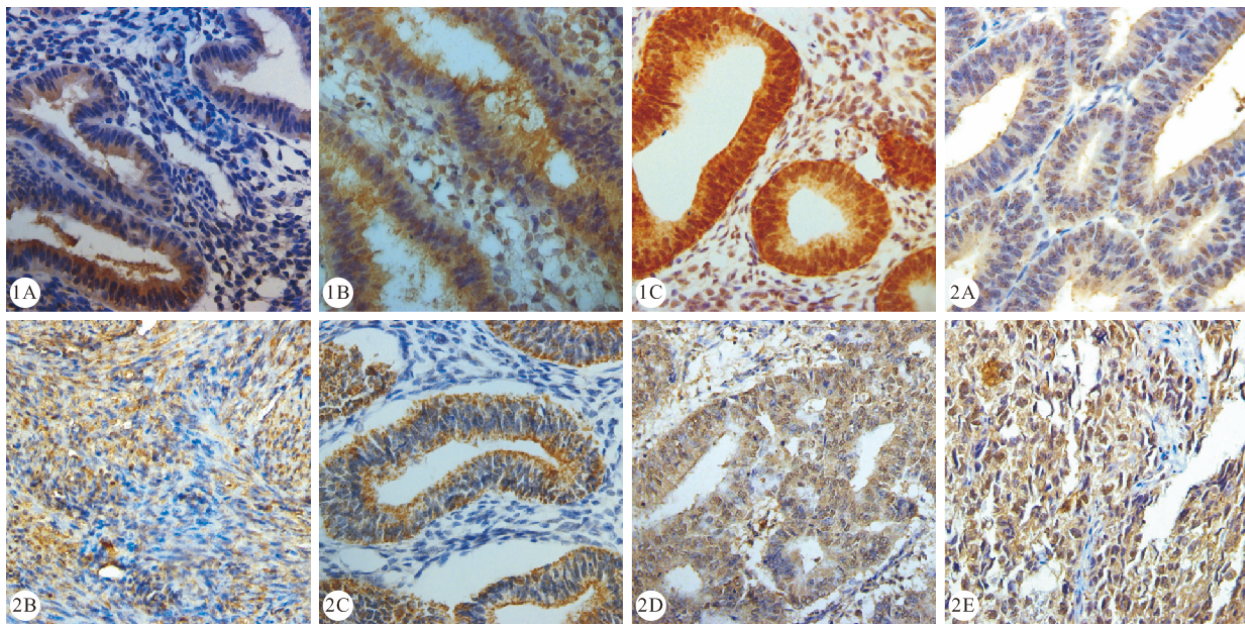


图 1 Pokemon 在各类内膜组织中的表达。EnVision ×400

图 2 Pokemon 在 I 型及 II 型子宫内膜癌中的表达。EnVision ×400

Fig 1 The expression of Pokemon in endometrium, EnVision ×400 carcinoma, EnVision ×400

Fig 2 The expression of Pokemon in type I and type II endometrial

1A: Normal endometrium; 1B: Atypical hyperplasia endometrium; 1C: Endometrial carcinoma; 2A: Endometrioid adenocarcinoma; 2B: Adenosquamous carcinoma; 2C: Serous carcinoma; 2D: Mucinous carcinoma; 2E: Clear cell carcinoma

结果(表 3)显示: Pokemon 在 EC 组织中的表达程度与手术病理分期、病理亚型及 Ki-67 指数有关,在 III~IV 期、II 型及 Ki-67 指数 ≥ 50 的内膜癌

组织中的表达程度,明显高于其在 I~II 期、I 型及 Ki-67 指数 < 50 的内膜癌组织的表达水平($P < 0.05$)。

2.4 EC 组织中 Pokemon 与突变型 p53 之间的关系

定性分析 Pokemon 和突变型 p53 在 I 型和 II 型 EC 组织中的表达,如表 4、表 5 所示。经 Spearson 秩和相关分析得出, I 型 EC 组织中, Pokemon 和突变型 p53 未发现有关关系;但在 II 型 EC 组织中, Pokemon 和突变型 p53 的表达呈正相关($r_s=0.669, P=0.000$)。

表 3 Pokemon 与 EC 患者不同临床病理特征之间的关系

Table 3 Clinicopathologic factors associated with the expression of Pokemon

Factor	<i>n</i>	Pokemon (MD, $\bar{x}\pm s$)	<i>t</i>	<i>P</i>
Age			-0.649	0.519
≥50 yr.	40	0.472±0.175		
<50 yr.	18	0.506±0.194		
Menopause			0.838	0.405
Yes	49	0.491±0.184		
No	9	0.436±0.157		
Lymph-vascular invasion			0.160	0.874
No	49	0.484±0.184		
Yes	9	0.474±0.167		
FIGO stage			-2.594	0.012
I / II	37	0.439±0.175		
III / IV	21	0.560±0.165		
Tumor grade			-*	>0.05
Low	9	0.412±0.174		
Moderate	30	0.475±0.189		
High	19	0.529±0.164		
Histological subtype			2.409	0.023
Type I	20	0.397±0.221		
Type II	38	0.528±0.137		
Lymph nodes metastasis			-1.275	0.208
No	45	0.466±0.186		
Yes	9	0.536±0.153		
The expression of ER			-1.442	0.155
Negative	14	0.565±0.187		
Positive	44	0.457±0.172		
The expression of PR			-0.733	0.466
Negative	16	0.472±0.193		
Positive	42	0.511±0.142		
The expression of mutant p53			0.496	0.622
Negative	26	0.532±0.163		
Positive	32	0.437±0.185		
Ki-67 index			2.239	0.029
<50	14	0.392±0.207		
≥50	44	0.512±0.163		

MD: Mean density. * SNK(Student-New-Keul) test

表 4 Pokemon 和突变型 p53 在 I 型 EC 组织中的表达关系

Table 4 The relationship between Pokemon and mutant p53 in type I endometrial carcinoma

The expression of Pokemon	The expression of p53/case				Total	<i>r_s</i>	<i>P</i>
	-	+	++	+++			
-	2	1	0	0	3	-0.131	0.550
+	3	2	0	0	5		
++	9	0	1	0	10		
+++	4	0	0	1	5		
Total	18	3	1	1	23		

表 5 Pokemon 和突变型 p53 在 II 型 EC 组织中的表达关系

Table 5 The relationship between Pokemon and mutant p53 in type II endometrial carcinoma

The expression of Pokemon	The expression of p53/case				Total	<i>r_s</i>	<i>P</i>
	-	+	++	+++			
-	1	0	0	0	1	0.669	0.000
+	2	1	0	0	3		
++	5	1	3	6	15		
+++	0	0	2	14	16		
Total	8	2	5	20	35		

3 讨论

目前对 EC 的分子遗传学研究并不多,发病机制尚不清楚。II 型 EC 肿瘤分化程度低,常伴淋巴结转移,预后远较 I 型 EC 差。研究表明 Pokemon 通过特异性抑制可变阅读框(alterative reading frame, ARF)基因,间接性抑制由 p53 介导的细胞周期负调控途径,导致肿瘤发生发展^[2,5]。然而, Pokemon 是否在 EC(尤其是 II 型 EC)中发挥作用国内外尚无文献报道。本研究旨在初步探讨 Pokemon 在 EC 中的表达情况及其与 p53 突变的关系,为明确 EC 的发病机制、寻求基因治疗的有效靶点提供理论基础。

3.1 Pokemon 与 EC 临床病理特征的关系

ZU 等^[6]用免疫组化法检测乳腺癌组织和正常乳腺组织中 Pokemon 的表达情况,发现正常乳腺组织几乎不表达,但在 86.8%(158/182)的乳腺癌中高表达。本研究结果显示 Pokemon 主要定位于子宫内膜的胞浆及胞核,在正常内膜组织、非典型增生内膜组织及内膜癌组织中的表达程度逐渐增强。ZU 等^[6]同时分析了 Pokemon 与乳腺癌患者临床病理特征及预后的关系,结果显示 Pokemon 的表达与肿瘤大小($P=0.0148$)、淋巴结转移($P=0.0014$)有关,但与患者年龄、肿瘤类型、ER、PR 无关,并与总体生存率($P=0.01$)、无瘤生存率($P=0.0134$)呈负相关,提示 Pokemon 是预后不良的重要因素。ZHAO 等^[7]发现在非小细胞肺癌中 Pokemon 的表达还与 TNM 分期显著相关。本研究半定量分析 Pokemon 与 EC 各项临床病理特征之间的关系,结果显示 Pokemon 的表达强度与手术病理分期、病理学亚型及 Ki-67 指数有关,在 III~IV 期、II 型及 Ki-67 指数 ≥ 50 的内膜癌组织中表达水平高于其在 I~II 期、I 型及 Ki-67 指数 < 50 中的表达水平($P=0.012, 0.023$ 及 0.029)。手术病理分期是影响 EC 患者预后的首要因素,III~IV 期肿瘤发生了

局部/区域淋巴结转移和/或远期扩散,其生存率远低于 I ~ II 期患者。病理学亚型也是影响 EC 患者预后的另一重要因素, I 型 EC 的分化程度通常较高,常局限于子宫体,其 5 年和 10 年生存率分别为 74.1% 和 62.2%; II 型 EC 分化程度低,具有较强的侵袭性,其 5 年和 10 年生存率分别为 27.0% ~ 69.9% 和 14.0% ~ 52.7%^[1]。Pokemon 高表达于预后较差的 III ~ IV 期及 II 型 EC,并且在 Ki-67 指数 ≥ 50 的子宫内膜癌组织中过度表达,说明 Pokemon 与肿瘤的侵袭性及细胞增殖能力有关,是内膜癌预后不良的标志物。

3.2 Pokemon 与突变型 p53 在 EC 中的表达关系

p53 蛋白由 TP53 基因编码,具有监视基因组稳定性、抑制细胞异常增殖的功能,在肿瘤中有较高的突变率。其上游的重要基因之一 ARF,为具有细胞周期调控功能的抑癌基因,其编码产物为 p14ARF^[8]。p14ARF 和 p53 形成一条重要的细胞周期负调控通路 p14ARF-p53,即“p53 通路”。Pokemon 通过抑制 p14ARF 从而引起 p53 通路异常,导致肿瘤发生。研究表明,Pokemon 特异性抑制 ARF 基因可能通过两种途径^[2]:①Pokemon 直接与 ARF 转录起始点上游 50 对碱基处结合,导致 p14ARF 表达下调;②Pokemon 通过 POZ/BTB 域介导同源或异源二聚体形成,抑制 ARF 的功能。p14ARF 蛋白表达下调时,TP53 基因易发生突变,突变型 p53 表达增加。在 EC 组织中,突变型 p53 多表达于 II 型 EC。本研究结果显示 II 型 EC 组织中,Pokemon 和突变型 p53 的 $r_s = 0.669$ ($P = 0.000$),两者的表达呈正相关。Pokemon 位于 p53 通路中 ARF 基因的上游,是调控该通路行使功能的开关,故推测 Pokemon 的高表达引起突变型 p53 表达上调,可能是 II 型 EC 的致癌模式之一。

综上所述,本研究分析了 Pokemon 在不同子宫内膜组织中的表达及其与突变型 p53 和其他临床病

理特征的关系,结果显示 Pokemon 在正常内膜、内膜非典型增生及内膜癌组织的表达水平逐渐升高,在 III ~ IV 期、II 型及 Ki-67 指数 ≥ 50 的 EC 组织中的表达水平较高,Pokemon 与突变型 p53 的表达在 II 型 EC 组织中呈正相关。上述结果一定程度上说明 Pokemon 的高表达通过抑制 ARF 基因功能导致突变型 p53 表达上调,可能是 II 型 EC 中的模式致癌之一。因此,Pokemon 有望成为 II 型 EC 生物学治疗的有效靶点。然而,由于本研究时间及条件限制,对于 Pokemon 的作用机制及其对患者预后的影响还需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 曹泽毅. 中华妇产科学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,2004: 2120-2125.
- [2] MAEDA T, HOBBS RM, MERGHOU B T, *et al.* Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression. *Nature*, 2005, 433(7023): 278-285.
- [3] 张纪妍, 隋丽华, 陈 杰, 等. Pokemon 在卵巢癌中的表达及临床意义. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 2(19): 149-151.
- [4] KONNO R, YAMAKAWA H, UTSUNOMIYA H, *et al.* Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(6): 529-534.
- [5] MAEDA T, HOBBS RM, PANDOLFI PP. The transcription factor Pokemon: a new key player in cancer pathogenesis. *Cancer Research*, 2005, 65(19): 8575-2880.
- [6] ZU X, MA J, LIU H, *et al.* Pro-oncogene Pokemon promotes breast cancer progression by upregulating survivin expression. *Breast Cancer Res*, 2011, 3(2): R26.
- [7] ZHAO ZH, WANG SF, YU L, *et al.* Overexpression of Pokemon in non-small cell lung cancer and foreshadowing tumor biological behavior as well as clinical results. *Lung Cancer*, 2008, 62(1): 113-119.
- [8] SHARPLESS NE, DEPINHO RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(1): 22-30.

(2015 - 10 - 11 收稿, 2015 - 12 - 27 修回)

编辑 汤 洁