

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.018

· 临床研究 ·

Cdk1 在浆液性卵巢癌中的表达及其与化疗耐药及预后的相关性 *

李娜 孙朝阳 周波 郭恩松 卢豪 陈刚 翁丹卉[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院妇科 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:卵巢癌是女性生殖致死率最高的恶性肿瘤。Cdk1 作为细胞周期依赖性激酶中的核心分子,对肿瘤细胞的发生发展具有重要作用。本文旨在探讨 Cdk1 蛋白在上皮性浆液性卵巢癌中的表达情况,并分析其表达水平与患者临床病理特征、化疗反应及预后之间的关系。**方法:**采用免疫组化法检测 68 例浆液性卵巢癌中 Cdk1 蛋白的表达情况,并结合临床资料分析 Cdk1 蛋白的表达水平在浆液性卵巢癌患者中的意义。**结果:**Cdk1 在浆液性卵巢癌患者中具有不同程度的阳性表达,其表达水平和患者的年龄、病理分化程度、淋巴结转移情况及临床分期无明显相关性($P > 0.05$),但其高表达与化疗耐药明显相关($P = 0.040$)。化疗耐药的卵巢癌患者中 Cdk1 的蛋白表达明显高于化疗敏感组,并且生存分析发现,高表达 Cdk1 的患者预后较差。**结论:**本研究证明 Cdk1 在浆液性卵巢癌中有较高表达,并且 Cdk1 的表达与卵巢癌化疗后复发有关,高的 Cdk1 表达预示着较差的预后。Cdk1 可能是晚期浆液性卵巢癌治疗的新靶点。

关键词:Cdk1;免疫组化;卵巢癌;化疗耐药

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1467-04

Expression of Cdk1 Protein in Serous Ovarian Cancer Correlates to Chemo-Resistance and Prognosis of Patients*

LI Na, SUN Chao-yang, ZHOU Bo, GUO En-song, LU Hao, CHEN Gang, WENG Dan-hui[△]

(Department of Gynecological Oncology of Tongji Hospital,

Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

ABSTRACT Objective: To study the Cdk1 protein expression of ovarian cancer tissues and the relationship between Cdk1 level and the chemotherapy resistance and prognosis of ovarian cancer patients. **Methods:** The Cdk1 protein expression was assessed by immunohistochemistry (IHC) in 68 specimens of serous ovarian cancer. A correlation was analyzed between Cdk1 protein expression and clinical pathological features. The Kaplan-meier curve was used to analyse the correlation of Cdk1 expression with prognosis of ovarian cancer patients. **Results:** Cdk1 protein expression level was not related to age, lymph nodes metastasis, clinical stage and pathological differentiation($P > 0.05$), while high Cdk1 expression was associated with chemotherapy resistance($P = 0.040$). And the chemo-resistance patients group had a much higher Cdk1 expression. Survival analysis found out that Cdk1 expression was an independent factor of PFS of ovarian cancer patients. **Conclusion:** Our data represent firstly that Cdk1 protein expression may contribute to chemotherapy resistance and prognosis of serous ovarian carcinoma. Cdk1 may be a promising therapy target for serous ovarian cancer.

Key words: Cdk1; IHC; Serous ovarian cancer; Chemo-resistance

Chinese Library Classification: R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1467-04

前言

卵巢癌在所有的妇科恶性肿瘤中,致死率居首位,确诊时多处于晚期,已伴有远处转移,难以彻底手术清除癌灶,以铂类药物为基础的化疗是对卵巢癌患者进行治疗的重要手段^[1]。大多数的晚期卵巢癌患者化疗结束后会复发或疾病持续存在,卵巢癌耐药问题日益突出,严重降低了卵巢癌患者的远期

生存率。针对卵巢癌铂类治疗的复发和耐药,对新的分子靶点的探索成为卵巢癌治疗的研究热点。

细胞周期调控异常从而导致细胞失控性生长,是肿瘤发生及复发的重要原因。细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, Cdk)是调控细胞周期的核心分子,它与 cyclins 蛋白相结合而被时相性激活,驱动细胞周期正常运行和细胞的分裂增殖。其中,Cdk1 是调控 G2/M 期 DNA 损伤检查点活性的

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81000979/H1609);国家自然科学基金项目(81272859);

湖北省自然科学基金项目(2011CBD542);中央高校基本科研业务费(2012TS058)

作者简介:李娜(1986-),女,博士,住院医师,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:8613129945077, E-mail: lina.smart365@gmail.com

△通讯作者:翁丹卉,电话:027-83663134, E-mail: weng.dh@gmail.com

(收稿日期:2013-08-12 接受日期:2013-09-12)

关键分子,近年来有研究指出 Cdk1 的异常表达与肿瘤的发生发展、化疗耐药等密切相关,成为肿瘤治疗研究的热点^[2-7]。本文旨在探讨 Cdk1 在浆液性卵巢癌患者癌灶中的表达情况以及 Cdk1 表达水平和卵巢癌患者耐药、预后之间的关系^[8-10]。

1 材料和方法

1.1 卵巢癌标本及临床资料

选取 2007 年 3 月至 2010 年 5 月期间就诊于华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科的 68 例浆液性卵巢癌患者,所有患者在进行卵巢癌肿瘤细胞减灭术后,进行 6-8 个周期的 TP 方案化疗。选取的 68 例患者的石蜡切片都经过病理科 HE 染色确诊。患者均为女性,初诊卵巢癌,年龄区间 23~56 岁,手术前未行放、化疗。统计卵巢癌组织类型,其中高分化者 14 例,中高分化 15 例,中分化 23 例,中低分化 3 例,低分化 9 例,数据缺失 4 例;卵巢癌患者 FIGO 手术病理分期为 II a~b 期者 5 例,III a~III c 期者 33 例,IV 期者 14 例,分期不明确 16 例。化疗耐药的定义为,在治疗达到完全缓解(CR)后的 6 个月内疾病进展(包括治疗未能达到 CR 者也属于化疗耐药),否则定义为化疗敏感。

1.2 主要试剂

一抗为兔抗人 Cdk1 多克隆抗体(Epitomics,USA),工作浓度稀释比例为 1:200(PBS 稀释);二抗及 DAB 显色液来自鼠兔通用型免疫组化试剂盒(Dako,USA);封闭用山羊血清(效价 1:10)购于武汉博士德公司。

1.3 免疫组织化学

卵巢癌手术切除癌灶组织多聚甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋。蜡块厚度 4 μ m 切片,65℃ 烤片机上烤片 2 h,常规二甲苯脱蜡,无水乙醇、浓度为 95%、80%、70%的乙醇依次梯度水化,

10 mM 枸橼酸钠抗原修复液(pH = 6.0)微波修复,3% H₂O₂ 避光 37℃ 孵育 15 min,目的是阻断内源性过氧化物酶活性。封闭用山羊血清按说明稀释 10 倍,37℃ 封闭 30 min,滴加工作浓度的 Cdk1 (1:200) 抗体稀释液,湿盒中 4℃ 冰箱过夜,复温 20 min,PBS 洗涤 3 次,滴加二抗工作液,37℃ 温箱孵育 45 min,DAB 显色,苏木精染核,1%盐酸酒精分化,梯度脱水,中性树脂封片,显微镜下观察。PBS 代替 Cdk1 抗体工作液作为阴性对照。

1.4 免疫组化结果评分

Cdk1 在细胞核和浆都有不同程度的表达。按表达阳性细胞数所占比例分为:阳性细胞数 <10%,计 1 分;阳性细胞数 10%~25%,计 2 分;阳性细胞数 26%~50%,计 3 分;阳性细胞数 51%~75%,计 4 分;阳性细胞数 76%~100%,计 5 分。按表达阳性细胞的染色强度分为:无 DAB 棕黄色染色,计 0 分;淡黄色染色,计 1 分;染色中等深浅,几乎无颗粒状 DAB 沉积,计 2 分;染色强,呈金黄到深棕色,细胞中可见大块的 DAB 沉积,计 3 分。该两项评分相乘即为 Cdk1 的免疫组化总评分。

1.5 统计学分析

实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,相关性分析采用 Spearman 相关性分析,生存资料采用 Kaplan-meier 曲线分析,计数资料采用 χ^2 检验和非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 卵巢癌患者病理组织中 Cdk1 蛋白的表达情况

浆液性卵巢癌患者的临床资料见表 1。对标本进行免疫组化化学检测,结果显示 Cdk1 蛋白在上皮性浆液性卵巢癌组织中存在不同程度的细胞核和细胞浆的表达,在肿瘤间质中呈阴

表 1 浆液性卵巢癌患者的一般资料

Table 1 The basic information of patients with serous ovarian cancer

	患者个数 (Cases)	比例 (Percentage)(%)
年龄(岁) Age(y)	23~56	
病理分化 (Differentiation)		
高分化 (Well)	14	20.6
中分化 (Moderate)	15	22.1
低分化 (Poor)	23	33.8
淋巴结转移 (Lymph node metastasis)		
无 (Yes)	36	52.9
有 (No)	32	47.1
FIGO 分期 (FIGO stage)		
II a~b	5	7.35
III a - III c	33	48.5
IV	14	20.6
化疗 (Chemotherapy)		
敏感 (Sensitive)	35	51.5
耐药 (Resistant)	33	48.5

性表达,与既往文献报道相符(图1)。

2.2 Cdk1 蛋白表达和浆液性卵巢癌患者化疗耐药的关系

将 Cdk1 免疫组化表达评分高低和浆液性卵巢癌患者的年龄、分期分级等各个临床病理参数进行 Spearman 相关性分析发现,Cdk1 表达高低和患者年龄分布、卵巢癌的病理分化程度、FIGO 临床分期以及是否伴有淋巴结转移,均无显著的相关性 ($P > 0.05$),然而 Cdk1 的免疫组化表达高低与患者化疗耐药与否具有相关性,有统计学意义(相关系数 = 0.298, $P = 0.040$),这一结果表明 Cdk1 高表达的卵巢癌患者更易发生化疗耐药。进一步将患者依据耐药与否分为化疗敏感组与化疗耐药组,观察其二组间的 Cdk1 蛋白的免疫组化表达评分情况,发

现化疗耐药组具有较高的 Cdk1 评分,如图2所示。

2.3 Cdk1 蛋白表达和浆液性卵巢癌患者预后的关系

为了评估 Cdk1 蛋白表达水平对卵巢癌患者无进展生存期(PFS)的影响,通过 ROC 曲线方法,得出 Cdk1 表达评分的 cut-off 值,为 3.75。依据此 cut-off 值将卵巢癌患者分为 Cdk1 高表达和低表达两组,使用 SPSS16.0 统计软件,Kaplan-meier 法做生存分析,结果显示 PFS 均值 Cdk1 高表达组为 600.823 天(95%置信区间 472.877,728.769),明显低于 Cdk1 低表达组为 1029 天(95%置信区间 783.357,1278.893)。Cdk1 高表达组与低表达组相比,预后较差,用 log rank 检验,二者差异有统计学意义($P=0.014$),见图3。

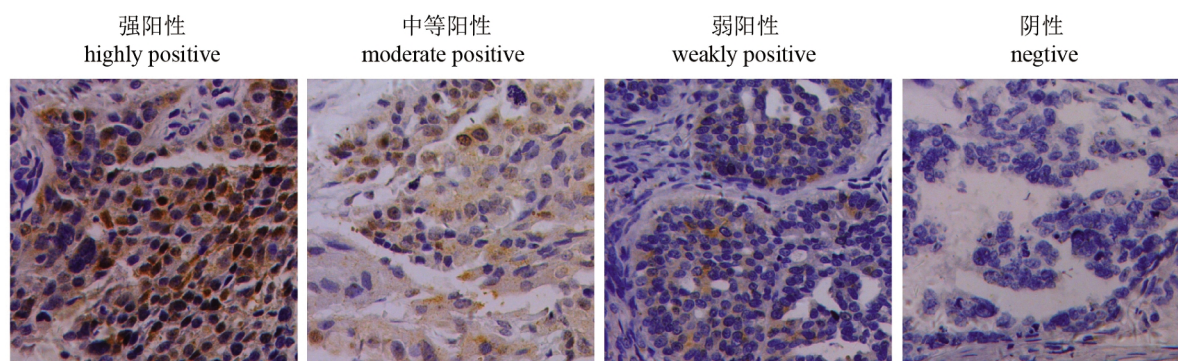


图1 Cdk1 在上皮性浆液性卵巢癌中的表达

Fig.1 Cdk1 expression in serous ovarian cancer

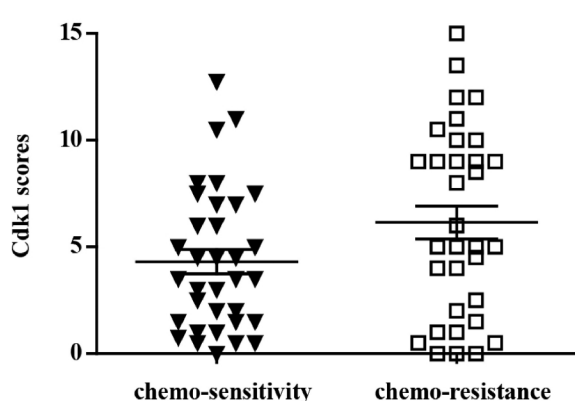


图2 浆液性上皮性卵巢癌患者 Cdk1 表达水平和患者化疗耐药之间的关系

Fig.2 Correlation of Cdk1 expression with chemo-resistance of ovarian cancer patients

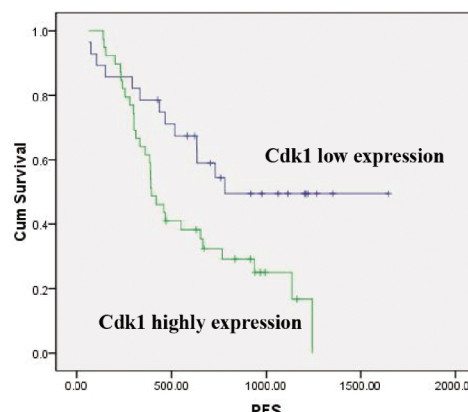


图3 K-M 曲线示卵巢癌患者 Cdk1 表达高低和患者无进展生存(PFS)之间的关系

Fig.3 Correlation of Cdk1 expression with PFS of ovarian cancer patients

3 讨论

肿瘤发生发展的特征之一就是细胞增殖周期调控异常而导致的细胞失控性生长。细胞周期的调节机制失常在其中起了很大的作用,对细胞周期调控分子的研究成为开发抗肿瘤药物的研究靶点。细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin—dependent kinase, Cdk)是调控细胞周期的核心分子,它与 cyclins 蛋白相结合而被时相性激活,驱动细胞周期正常运行和细胞的分裂增殖。Cdk 被研究证实是细胞周期中许多关键蛋白磷酸化的主要调节分子,对细胞周期的调控有至关重要的作用。在多种肿

瘤中,Cdks 的功能失调,被认为是肿瘤发生发展的重要因素^[2-4]。其中,Cdk1 是调控 G2/M 期 DNA 损伤检查点活性的关键分子,在细胞对化疗引起的 DNA 损伤反应中有重要的作用。最近多项研究发现在肺癌中 Cdk1 分子可以通过影响 DNA 损伤修复,影响肺癌细胞的耐药性和存活^[11-15]。Cdk1 蛋白在胃癌、食管癌、宫颈癌等多种肿瘤组织中检测到了表达^[16-19],并且有文献指出在卵巢癌中 Cdk1 的阳性率为 86.8%^[20]。然而 Cdk1 表达在卵巢癌耐药、预后中的影响作用尚未有研究报道,因此,本研究对 Cdk1 在浆液性卵巢癌中的表达情况以及其表达水平和卵巢癌耐药、预后之间的关系进行了探讨。

上皮性浆液性卵巢癌约占卵巢癌的 90%,临床病理特征复杂,预后差。本研究使用免疫组化方法检测上皮性浆液性卵巢癌中 Cdk1 的表达,发现在浆液性卵巢癌中,Cdk1 蛋白在细胞核与细胞浆都有不同程度的表达;并且 Cdk1 在上皮性浆液性卵巢癌中总的表达率较高,除了 4 例阴性表达外,其余 64 例的肿瘤组织均有不同程度的阳性染色。因此本研究采用了更细化的免疫组化量化评分(0-15 分)方法,对肿瘤细胞染色的深浅和比例都纳入了计量标准。通过对 Cdk1 表达水平和浆液性卵巢癌患者的一系列临床病理参数做相关性分析发现,Cdk1 表达和浆液性卵巢癌患者年龄分布、FIGO 分期、病理分化程度、淋巴结转移情况并没有明显相关性,然而 Cdk1 的表达水平和患者的化疗耐药有关,在化疗耐药的卵巢癌患者中,Cdk1 的表达明显较高,有统计学意义。在分析了卵巢癌患者的无进展生存 PFS 与 Cdk1 的表达之间的关系后,发现 Cdk1 高表达,是预示着疾病复发、有着较差预后的危险因素。这说明 Cdk1 分子在癌灶中的表达高低,是影响浆液性卵巢癌化疗耐药和预后的独立影响因素。本研究纳入浆液性卵巢癌患者 68 例,数量尚有限,Cdk1 分子能否作为浆液性卵巢癌预后的预测指标,以及进一步干预治疗的靶点,尚需要更深入的研究探讨。

综上所述,本研究使用免疫组化法在浆液性卵巢癌中检测到 Cdk1 蛋白不同程度的表达。并发现 Cdk1 表达高低与化疗耐药及预后呈相关性,Cdk1 高表达的浆液性卵巢癌患者可能更易发生化疗耐药而出现复发,预后较差。因此,Cdk1 可能作为新的预测肿瘤患者化疗效果,及指导卵巢癌个体化治疗的潜在靶标。随着对 Cdk1 在卵巢癌发生发展中作用机制的深入探讨,Cdk1 可能成为上皮性浆液性卵巢癌的新的生物治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer[J]. CA Cancer J Clin,2011,61(3):183-203
- [2] Estey MP, Di Ciano-Oliveira C, Froese CD, et al. Mitotic Regulation of SEPT9 Protein by Cyclin-dependent Kinase 1 (Cdk1) and Pin1 Protein Is Important for the Completion of Cytokinesis [J]. The Journal of biological chemistry, 2013, 288(42): 30075-86
- [3] Huang H, Hu M, Zhao R, et al. Dihydromyricetin suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing G2/M arrest through the Chk1/Chk2/Cdc25C pathway[J]. Oncology reports, 2013, 30(5): 2467-2475
- [4] Iizumi Y, Oishi M, Taniguchi T, et al. The flavonoid apigenin downregulates Cdk1 by directly targeting ribosomal protein S9 [J]. PloS one, 2013, 8(8): e73219
- [5] Liu CC, Gopalakrishnan V, Poon LF, et al. Cdk1 regulates the temporal recruitment of telomerase and CST complex for telomere replication[J]. Molecular and cellular biology, 2014, 34(1): 57-70
- [6] Zhou Y, Bi Y, Yang C, et al. Magnolol induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells through G2/M phase arrest and caspase-independent pathway[J]. Die Pharmazie,2013, 68(9): 755-762
- [7] Cheng X, Zhou D, Wei J, et al. Cell-cycle arrest at G2/M and proliferation inhibition by adenovirus-expressed mitofusin-2 gene in human colorectal cancer cell lines[J]. Neoplasma,2013,60(6):620-626
- [8] Malumbres M. Cyclins and related kinases in cancer cells[J]. J BUON, 2007, 12 Suppl 1: S45-52
- [9] de Carcer G, Perez de Castro I, Malumbres M. Targeting cell cycle kinases for cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(9): 969-985
- [10] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(3): 153-166
- [11] Johnson N, Cai D, Kennedy RD, et al. Cdk1 participates in BRCA1-dependent S phase checkpoint control in response to DNA damage[J]. Mol Cell, 2009, 35(3): 327-339
- [12] Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase[J]. Nature, 2005, 434(7035): 913-917
- [13] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy[J]. Nature,2005, 434(7035): 917-921
- [14] McCabe N, Turner NC, Lord CJ, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition [J]. Cancer Res, 2006, 66(16): 8109-8115
- [15] Johnson N, Li YC, Walton ZE, et al. Compromised Cdk1 activity sensitizes BRCA-proficient cancers to PARP inhibition [J]. Nat Med, 2011, 17(7): 875-882
- [16] Yang Y, Hu Y, Gu HY, et al. Oroxylin A induces G2/M phase cell-cycle arrest via inhibiting Cdk7-mediated expression of Cdc2/p34 in human gastric carcinoma BGC-823 cells [J].The Journal of pharmacy and pharmacology, 2008, 60(11): 1459-1463
- [17] Zempolich K, Fuhrman C, Milash B, et al. Changes in gene expression induced by chemoradiation in advanced cervical carcinoma: a microarray study of RTOG C-0128 [J]. Gynecologic oncology,2008, 109(2): 275-279
- [18] Bahnassy AA, Zekri AR, Alam El-Din HM, et al. The role of cyclins and cyclins inhibitors in the multistep process of HPV-associated cervical carcinoma [J]. Journal of the Egyptian National Cancer Institute, 2006, 18(4): 292-302
- [19] Shi HR, Zhang RT. Expression and significance of P53, P21WAF1 and Cdk1 proteins in epithelial ovarian cancer [J]. Chinese journal of cancer, 2009, 28(8): 882-885
- [20] Fujita A, Yamamoto H, Imamura M, et al. Expression level of the mitotic checkpoint protein and G2-M cell cycle regulators and prognosis in gastrointestinal stromal tumors in the stomach [J]. Virchows Archiv: an international journal of pathology, 2012, 460(2): 163-169