

# 酪氨酸激酶 c-Kit 及 phospho-c-Kit(Tyr719)在上皮性卵巢癌中的表达及意义

陈晨<sup>1,2</sup>, 李俊东<sup>2\*</sup>, 王浩渊<sup>3</sup>

(1.江门市中心医院肿瘤科, 广东 江门 529030; 2.中山大学肿瘤防治中心妇科 广东 广州 510060;  
3. 江门市中心医院重症医学科, 广东 江门 529030)

**摘要:**【目的】探讨膜受体型的酪氨酸激酶 c-Kit 及 719 位酪氨酸磷酸化的 c-Kit [phospho-c-Kit(Tyr719)] 的表达与上皮性卵巢癌的关系。【方法】采用免疫组织化学法分别检测 c-Kit、phospho-c-Kit(Tyr719) 在上皮性卵巢癌(82 例)及卵巢良性肿瘤(25 例)、正常卵巢组织(10 例)表达情况,并分析这两项指标的表达与卵巢癌临床病理特征及预后的关系。【结果】82 例卵巢癌中,c-Kit 阳性表达率显著高于卵巢良性病变和正常卵巢组织( $P < 0.05$ )。c-Kit 的表达水平与患者的临床分期呈负相关,I、II 期患者的 c-Kit 阳性率显著高于 III、IV 期患者( $P < 0.05$ )。Phospho-c-Kit(Tyr719) 在卵巢癌组织、卵巢良性病变和正常卵巢组织中几乎无表达。【结论】c-Kit 在卵巢癌中表达明显升高提示 c-Kit 可能与卵巢癌的发生发展有关。在上皮性卵巢癌中,c-Kit 蛋白的表达水平与患者的临床分期呈负相关,提示 c-Kit 蛋白可能是在卵巢癌发展的早期阶段起作用的。而 phospho-c-Kit(Tyr719) 在卵巢癌组织中几乎无表达,提示 c-Kit 蛋白在 Tyr719 位点磷酸化可能不是上皮性卵巢癌发生、发展的激活途径。

**关键词:** 上皮性卵巢肿瘤;c-Kit;免疫组织化学法

中图分类号:R737.31 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2013)05-0750-06

## Expression of c-Kit and Phospho-c-Kit (Tyr719) in Epithelial Ovarian Carcinoma

CHEN Chen<sup>1,2</sup>, LI Jun-dong<sup>2\*</sup>, WANG Hao-yuan<sup>3</sup>

(1. Department of Oncology, Jiangmen Central Hospital, Jiangmen 529030, China; 2. Department of Gynecology, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 3. ICU, Jiangmen Central Hospital, Jiangmen 529000, China)

**Abstract:**【Objective】 This study aimed to explore the expression patterns of c-Kit and phospho-c-Kit (Tyr719) in epithelial ovarian cancer.【Methods】 A total of 82 patients of epithelial ovarian cancer who were treated at Sun Yat-sen University Cancer Center were enrolled along with 25 patients with benign ovarian lesions and 10 normal ovarian tissues served as controls. Expression of c-Kit and phospho-c-Kit (Tyr719) was examined using immunohistochemistry.【Results】 As compared to the control group, a significantly greater proportion of ovarian cancer tissues were positive for c-Kit ( $P < 0.05$ ). C-Kit expression was negatively correlated with FIGO stage. The positive rate of phospho-c-Kit (Tyr719) in ovarian cancer was low and there was no significant difference between the study group and the control group.【Conclusions】 The increased c-Kit expression in epithelial ovarian cancer suggests that c-Kit may play a role in carcinogenesis of ovarian cancer. C-Kit expression was negatively correlated with FIGO stage. This result suggests that c-Kit may play a role in the early stages of ovarian cancer development. The phosphorylation in Tyr719 of c-Kit protein may not be the main mechanism of c-Kit in carcinogenesis and progression of ovarian cancer.

**Key words:** epithelial ovarian neoplasia; c-Kit; immunohistochemistry (IHC)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(5):750-755]

收稿日期:2013-04-09

基金项目:广东省科技厅计划项目(2012B031800385)

作者简介:陈晨,硕士研究生,主治医师,研究方向:肿瘤学,E-mail:chen500119@163.com;\* 通信作者:李俊东,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail:gzzundong@yahoo.com

研究发现,蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 与肿瘤的关系非常密切。c-Kit 是一种膜受体型的酪氨酸激酶,与血小板衍生的生长因子受体(PDGFR)属于同一受体家族,即 PDGFR 家族<sup>[1]</sup>。c-Kit 与其配体干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 结合后,可触发 c-Kit 受体形成同源二聚体, c-Kit 自身磷酸化并激活下游信号分子,通过多种信号传导途径将细胞外信号传导到细胞内部,从而调节一系列重要基因的转录过程<sup>[2-4]</sup>。c-Kit 受体中 719 位酪氨酸(Tyr719)是其胞浆区磷酸化激活位点之一, c-Kit 受体 Tyr719 自身磷酸化后,激活 PI3K/AKT 途径。该通路调节肿瘤细胞的增殖和存活,其活性异常不仅能导致细胞恶性转化,而且与肿瘤细胞的迁移、黏附、肿瘤血管生成以及细胞外基质的降解等相关<sup>[5]</sup>。本研究通过检测 c-Kit 蛋白及其激活状态 719 位酪氨酸磷酸化的 c-Kit,即 phospho-c-Kit(Tyr719)在上皮性卵巢癌中的表达水平,探讨 c-Kit 与上皮性卵巢癌发生发展的关系及其临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料

1.1.1 卵巢癌组 选取 1999 年 1 月至 2005 年 12 月中山大学肿瘤防治中心收治的上皮性卵巢癌患者 82 例。病例入组标准:①在中山大学肿瘤防治中心初治并经病理确诊的病例,②行肿瘤细胞减灭术,术前未行放、化疗及其它治疗,③有详细的临床病理资料及随访资料,④无合并身体其它器官的肿瘤。年龄 18~67 岁,中位年龄 47.5 岁。病理类型包括:浆液性乳头状囊腺癌 45 例,粘液性乳头状囊腺癌 13 例,未能分类的腺癌 20 例,子宫内膜样癌 2 例,混合性癌 2 例。按国际妇产科联盟 (international federation of gynecology and obstetrics, FIGO) 分期标准, I 期 27 例, II 期 19 例, III 期 33 例, IV 期 3 例。

1.1.2 对照组 随机选择同期卵巢良性病变的囊壁 25 例及正常卵巢组织 10 例作为对照组。对照组患者年龄 17~80 岁,中位年龄 36 岁。卵巢良性病变中卵巢单纯性囊肿 15 例,黄体囊肿 2 例,包涵性囊肿 2 例,滤泡囊肿 4 例,慢性炎症 2 例。正

常卵巢组织取自因宫颈癌而切除附件的患者,所取正常卵巢组织均经病理证实无病变且包含正常卵巢上皮。

### 1.2 主要试剂

c-Kit 兔抗多克隆抗体 (#3392) 及 phospho-c-Kit(Tyr719) 兔抗人多克隆抗体 (#3391) 购自 Cell Signaling 公司。PV-9000 通用型二步法检测试剂盒、一抗稀释液及 DAB 显色液等均购自北京中杉金桥生物有限公司。

### 1.3 检测方法

采用 PV-9000 免疫组织化学二步法进行检测,石蜡包埋病变组织 4  $\mu\text{m}$  厚连续切片,石蜡切片二甲苯脱蜡后,于乙醇中水化,蒸馏水冲洗,磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS) 溶液浸泡 5 min,置于 PH=6.0 的枸橼酸盐缓冲液中使用高压加热法进行抗原修复,自然冷却至室温,用  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性, PBS 溶液冲洗,滴加适当比例稀释的一抗 (按预实验结果, c-Kit 一抗稀释度为 1:60, phospho-c-Kit(Tyr719) 一抗稀释度为 1:40), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,滴加聚合物辅助剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min, PBS 溶液冲洗,滴加辣根酶标记羊抗兔/小鼠 IgG 多聚体, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min, PBS 冲洗。二氨基联苯胺显色剂显色,自来水充分冲洗,适度苏木素复染后,中性树胶封片。本实验以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.4 结果判断

在免疫组化染色的切片上, c-Kit 及 phospho-c-Kit(Tyr719) 的阳性表达着色均定位于细胞膜及细胞浆内,呈黄色或棕黄色。采用双盲法阅片,由两位病理科医生在高倍显微镜下随机选取 10 个视野,计算阳性细胞百分数 (卵巢癌标本计数肿瘤细胞中阳性细胞比例,对照组标本计数正常卵巢上皮或良性病变的囊壁细胞中阳性细胞比例,阳性细胞 < 5% 时,定为 (-), 5%~30% 为 (+), 31%~55% 为 (++) , 56%~80% 为 (+++) , > 80% 为 (++++) )。

### 1.5 随访情况

患者随访采用病历跟踪,电话随访及信件随访的方式,随访截止日期为 2009 年 10 月 15 日。

### 1.6 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,以  $P < 0.05$  定义为有统计学差异。采用卡方检验及 Fisher 确切概率法分析卵巢癌组和对照组之间 c-Kit、phospho-c-Kit (Tyr719) 表达阳性率差异及 c-Kit 与不同临床病理特征的关系。采用 log-Rank 检验比较各临床病理参数组别间的生存率差异,对预后的多因素分析采用 COX 回归模型。

## 2 结 果

### 2.1 c-Kit 及 phospho-c-Kit (Tyr719) 在卵巢癌组及对照组中的表达

c-Kit 阳性表达的黄色或棕黄色颗粒见于细胞膜和胞浆中 (图 1、2), 82 例卵巢癌中, c-Kit 总阳性表达率为 26.8%, 而对照组为 0.0%, 阳性率表

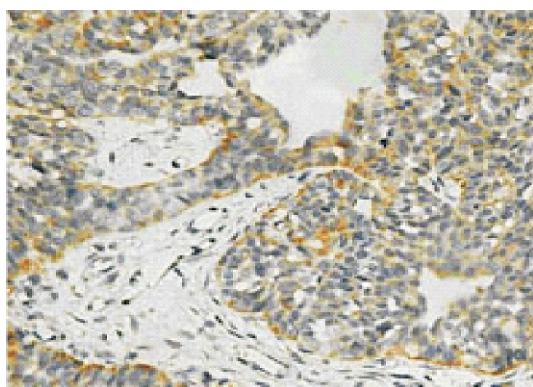


图 1 卵巢癌 c-kit 阳性(+++)的免疫组化染色

Fig.1 The strong expression of c-Kit(+++) in ovarian cancer. SP  $\times$  200

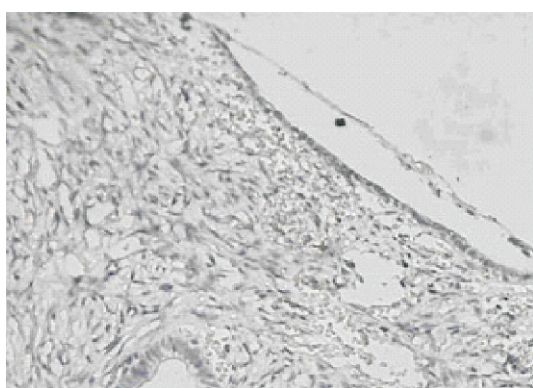


图 2 正常卵巢生发上皮 c-kit 阴性(-)的免疫组化染色

Fig.2 The negative expression of c-kit(-) in germinal epithelium of ovary. SP  $\times$  200

表 1 卵巢癌组及对照组中 c-Kit 及 phospho-c-Kit (Tyr719) 表达差异

Table 1 Expression of c-Kit and phospho-c-Kit (Tyr719) in ovarian cancer group and control group

Group	C-Kit(%)	Phospho-c-Kit(%)
ovarian cancer	26.8(22/82)	3.7(3/82)
control	0.0(0/35)	0.0(0/35)
P value	< 0.001	0.553

达差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 表 1)。phospho-c-Kit (Tyr719) 在 82 例卵巢癌中仅有 3 例阳性表达, 1 例混合性癌中表达(+++), 其余 2 例均为(+). phospho-c-Kit (Tyr719) 总阳性表达率为 3.7%, 对照组总阳性表达率为 0%, 差异无统计学意义 ( $P = 0.553$ , 表 1)。

### 2.2 c-Kit 表达与患者临床病理特征之间的关系

c-Kit 表达与患者的分期关系密切, I、II 期与 III、IV 期患者的 c-Kit 表达阳性率分别为 37.0% 及 13.9% ( $P = 0.019$ )。c-Kit 表达的未发现与其他临床病理特征有明显相关性 (表 2)。因 phospho-c-Kit (Tyr719) 在上皮性卵巢癌中表达率低, 因此不做它与临床病理特征之间的分析。

### 2.3 c-Kit 表达对患者生存的影响

82 例卵巢癌患者, 按 c-Kit 表达情况分成阳性组和阴性组, 则阳性组 5 年累积生存率为 84.8%, 阴性组 5 年累积生存率为 61.9%, 但差异无统计学意义 ( $P = 0.089$ )。c-Kit 表达阳性组与阴性组生存曲线见图 3。

### 2.4 卵巢癌患者预后的生存分析

本研究中单因素生存分析显示 FIGO 分期、术后残留肿瘤大小、组织学分级对卵巢癌患者生存的影响有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 3)。而在临床上认为, 患者年龄、FIGO 分期、术后残留肿瘤大小、病理类型、组织学分级及术后化疗疗程数均可能影响卵巢癌的预后。故本研究将这 6 个因素及 c-Kit 表达情况纳入 COX 回归模型进行多因素分析。结果显示: FIGO 分期是影响上皮性卵巢癌患者生存的独立预后因素, 其相对危险度为 1.355, 95% 置信区间为 1.097-1.697, 偏回归系数为 0.304,  $P$  值为 0.001, 即 FIGO 分期越晚的患者预后越差。

表2 c-Kit 表达与卵巢癌患者临床病理特征的关系

Table 2 Correlation of the c-Kit expression and the clinical pathology characteristics of ovarian cancer

Clinical pathology characteristics	Number of cases	C-Kit's positive rate(%)	P (chi-square test)
Age			
≤40 years old	24	20.8	0.431
>40 years old	58	29.3	
Pathological types			
A	45	26.7	0.950
B	13	23.1	
C	20	23.8	
Histological grade			
I, II	39	28.2	0.789
III	43	25.6	
FIGO stages			
I, II	46	37.0	0.019
II, IV	36	13.9	

A: papillary cystadenocarcinoma of ovarian cancer; B: mucous papillate pouch gland adenocarcinoma of ovarian cancer; C: adenocarcinoma having not been able to classify

### 3 讨论

在肿瘤的发生、发展过程中,酪氨酸激酶在不同类型肿瘤中过度表达和过度激活,导致其下游信号激活,致使细胞转化、增殖和抵抗凋亡,最终打破细胞的生长平衡。因此,使用靶向药物抑制酪

氨酸激酶信号转导从而抑制肿瘤生长、促进肿瘤细胞凋亡是目前靶向治疗研究的热点之一。c-Kit 属于受体型的酪氨酸激酶,正常情况下 c-Kit 蛋白没有活性。目前认为 c-Kit 导致肿瘤的发生可能有 c-Kit/SCF 信号传导途径和 c-Kit 原癌基因功能获得性变异两个主要原因。其一是 c-Kit 与 SCF 结合后可触发 c-Kit 受体形成同源二聚体,c-Kit 磷酸化并激活下游信号分子,通过多种信号传导途径将细胞外信号传导到细胞内部,从而调节一系列重要基因的转录过程。而 c-Kit 活化的另一条途径是 c-Kit 基因的突变,该受体下游的信号传导途径对于 c-Kit 基因的突变高度敏感,使 c-Kit 受体寡聚化(不形成二聚体)并且使不同的底物蛋白磷酸化,甚至在缺乏配体结合的情况下也可以活化信号转导<sup>[6-7]</sup>。

c-Kit 蛋白与卵巢癌的关系报道不一,不同的研究小组,均使用免疫组化方法检测 c-Kit 在上皮性卵巢癌中的表达,其阳性表达率从 0%~87%不等<sup>[8]</sup>。Tonary 等<sup>[9]</sup>报道 c-Kit 在 71% 卵巢癌中表达阳性而在正常卵巢上皮中没有表达。Wilczynski 等<sup>[10]</sup>对 84 例上皮性卵巢癌研究发现 c-Kit 阳性表达率为 35%。另外一些研究也报道了在卵巢癌中非常低水平的 c-Kit 表达甚至缺少 c-Kit 表达。这

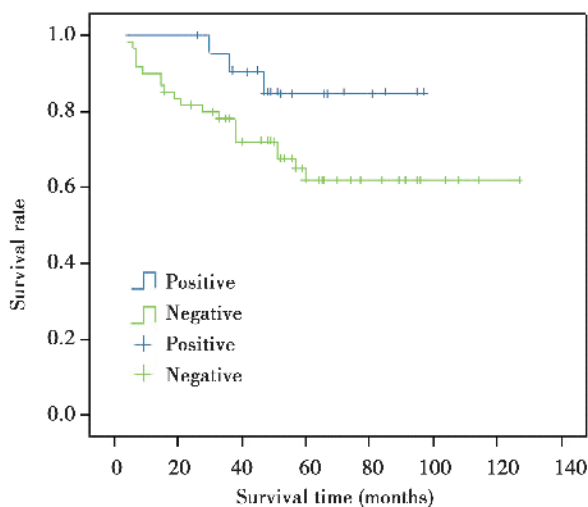


图3 卵巢癌患者 c-Kit 表达阳性组与阴性组生存曲线 ( $P=0.089$ )

Fig.3 The survival curve of c-Kit positive group and negative group ( $P=0.089$ )

表 3 上皮性卵巢癌患者生存单因素分析  
Table 3 Univariate survival analysis of patients with ovarian cancer

Clinical pathology characteristics	Number of cases	Five-year overall survival rate (%)	P
FIGO stages			
I, II	46	87.5	< 0.001
III, IV	36	40.9	
Size of remaining focus			
≤2 cm	69	76.2	< 0.001
>2 cm	13	23.1	
Histological grade			
I, II	39	76.9	0.041
III	43	43.2	
Age			
≤40 years old	24	77.4	0.294
>40 years old	58	66.3	
Pathological types			
A	45	70.6	
B	13	76.9	0.185
C	20	49.9	
Quality of chemotherapy			
≤3 course	27	59.1	
>3 course	55	70.9	0.318

A: papillary cystadenocarcinoma of ovarian cancer; B: mucous papillate pouch gland adenocarcinoma of ovarian cancer; C: adenocarcinoma having not been able to classify

些研究中,c-Kit 蛋白表达阳性率的差异可能是由于实验所应用的标本、免疫组化试剂以及采用的阳性标准不同等原因造成的。本研究发现,82 例卵巢癌中,c-Kit 阳性表达率为 26.8%,而在卵巢良性病变和正常卵巢上皮中无表达,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),这提示 c-Kit 表达可能与上皮性卵巢癌的发生有关。目前关于 c-Kit 与患者各临床病理因素关系研究结果尚有争议。有研究发现 c-Kit 的表达在卵巢癌中随着病理分级和临床分期的进展逐渐增加,阳性程度增强<sup>[11]</sup>。但在本研究显示 c-Kit 表达与患者的分期呈负相关且与其他临床病理因素无关,I、II 期患者的 c-Kit 阳性率高于 III、IV 期患者,分别为 37.0%及 13.9%,差异有统计学意义( $P = 0.019$ )。这与 Tonary 等<sup>[9]</sup>研究结果相符合,他也发现卵巢癌分期愈高,c-Kit 表达阳性率反而下降。这说明 c-Kit 可能是在卵巢癌发展的早期阶段起作用的。另外,本研究中 c-Kit 阳性组 5 年累积生存率高于阴性组,为 84.8%及

61.9%,但差异无统计学意义( $P = 0.089$ )。而追踪预后,不少研究发现在恶性肿瘤中 c-Kit 表达阴性的患者与不良的预后有关。Tonary 等<sup>[9]</sup>对 34 例恶性卵巢肿瘤 4 年随访,发现 c-Kit 阴性的 9 例患者中 8 例(89%)死亡,剩余 1 例复发,而 c-Kit 阳性的 25 例患者中 56%患者生存,其中的 8 例已经没有疾病症状,统计分析结果也表明上皮性卵巢肿瘤中 c-Kit 阴性的患者比 c-Kit 阳性的患者生存期更短( $P < 0.05$ )。类似的结果 Khalifenh L<sup>[12]</sup>等在研究高分级进展期卵巢浆液性癌 118 例病例时也发现,缺乏 c-Kit 表达的患者与不良的预后有关。Brusmann<sup>[11]</sup>研究中也证明了浆液性卵巢癌中 c-Kit 表达阴性的患者预后较差。有学者认为其原因主要是细胞质上 c-Kit 表达增高又可通过刺激环-磷腺苷(C-AMP)从而抑制卵巢上皮细胞增殖<sup>[13]</sup>。上述研究提示 c-Kit 在卵巢肿瘤的表达水平对于判断预后方面可提供一定的参考价值。本研究中,c-Kit 表达阳性的患者五年生存率高于阴性患者,

但未显示出统计学意义,有待扩大病例数进一步研究。

在本研究中,phospho-c-Kit(Tyr719)在卵巢癌中总阳性表达率为3.7%,对照组总阳性表达率为0%,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。如前所述,c-Kit导致肿瘤的发生可能有c-Kit/SCF信号传导途径和c-Kit原癌基因功能获得性变异两个主要原因。因本研究只是对其中一条可能的途径(即c-Kit/SCF途径)进行相关的研究,而未检测c-Kit突变状态,因此,推测c-Kit蛋白在Tyr719位点磷酸化可能不是上皮性卵巢癌发生、发展的主要激活途径。

综上所述,上皮性卵巢癌组织中c-Kit的表达水平高于对照组(卵巢良性病变及正常卵巢组织),提示c-Kit可能与卵巢癌的发生有关。在上皮性卵巢癌中,c-Kit蛋白的表达水平与患者的临床分期呈负相关,提示c-Kit蛋白可能是在卵巢癌发展的早期阶段起作用的。Phospho-c-Kit(Tyr719)在卵巢癌组织中几乎无表达,提示c-Kit蛋白在Tyr719位点磷酸化可能不是上皮性卵巢癌发生、发展的激活途径。今后可尝试c-Kit蛋白激酶的抑制剂用于上皮性卵巢癌中研究,期望可以为卵巢癌的治疗提供了新的靶点。

#### 参考文献:

- [1] 黄文林,朱孝峰.信号转导[M].北京:人民卫生出版社,2005,151-163.  
Huang W L, Zhu X F. Signal Transduction[M].Beijing: People's Medical Publishing House, 2005, 151-163.
- [2] Honegger A M, Szapary D, Schmidt A, et al. A mutant epidermal growth factor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis [J]. Mol Cell Biol, 1987, 7(12): 4568-4571.
- [3] Alimandi M, Wang L M, Bottaro D, et al. Epidermal growth factor and Betacellu linmediate signal transduction through coexpressed ErbB2 and ErbB3 receptors[J]. EMBOJ, 1997, 16(18): 5608-5617.
- [4] Paner G P, Silberman S, Hartman G, et al. Analysis of signal transduce and activator of transcription3(STAT3) in gastrointestinal stromal tumors[J]. Anti cancer Res, 2003, 23(3B): 2253-2260.
- [5] Blume-Jensen P, Jiang G, Hyman R, et al. Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility [J]. Nat Genet, 2000, 24(2): 157-162.
- [6] Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, et al. Biology and geneticspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations [J]. Hum Pathol, 2002, 33(5): 484-495.
- [7] Tsujimura KH, ashimoto K, Kitayma H, et al. Activating mutation in the catalytic domain of c-Kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site [J]. Blood, 1999, 93(4): 1319-1329.
- [8] Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. Hum Pathol, 1998, 29(5): 498-504.
- [9] Tonary AM, Macdonald EA, Faught W, et al. Lack of expression of c-KIT in ovarian cancers is associated with poor prognosis[J]. Int J Cancer, 2000, 89(3): 242-250.
- [10] Wilczynski SP, Chen YY, Chen W, et al. Expression and mutational analysis of tyrosine kinase receptors c-kit, PDGFRalpha, and PDGFRbeta in ovarian cancers [J]. Hum Pathol, 2005, 36(3): 242-249.
- [11] Brusmann H. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and c-kit in serous ovarian carcinoma clinicopathologic study [J]. Gynecol Onco, 2005, 98(3): 396-402.
- [12] Khalifeh L, Munkarah AR, Schimp V, et al. The impact of c-Kit and ki-67 expression on patients prognosis in advanced ovarian serous carcinoma[J]. Int J Gynecol Pathos, 2005, 24(3): 228-234.
- [13] Shaw TJ, Keszthelyi EJ, Tonary AM, et al. Cyclic AMP in ovarian cancer cells both inhibits proliferation and increases c-KIT express[J]. Exp Cell Re, 2002, 273(9): 95-106.

(编辑 徐杰)