

PLC delta1 基因在上皮性卵巢肿瘤中的表达和临床意义

何剑辉^{1,2}, 杨国奋^{1*}, 蔡木炎³, 谢丹³

(1. 中山大学附属第一医院妇科, 广东 广州 510080; 2. 广东省人民医院妇产科, 广东 广州 510080;
3. 中山大学肿瘤防治中心//华南肿瘤国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】本研究旨在探讨 PLC delta1 在上皮性卵巢肿瘤中的表达及其临床意义。【方法】采用免疫组化方法, 检测 PLC delta1 在 223 例上皮性卵巢肿瘤(183 例卵巢癌和对照组 40 例交界性卵巢肿瘤)组织芯片中的表达; 结合患者的临床资料, 分析 PLC delta1 的表达与上皮性卵巢癌的关系。【结果】在有效检测的 197 例上皮性卵巢肿瘤标本中, 大多数(25 例, 80.6%)交界性肿瘤呈现正常表达, 而在卵巢癌中, 多数(91 例 54.8%)肿瘤出现 PLC delta1 的过度表达, 两者存在显著差异($P < 0.000 1$); 而且 PLC delta1 在卵巢癌中表达与肿瘤的临床分期、患者年龄有显著的相关性($P < 0.000 1$)。【结论】PLC delta1 在卵巢癌组织中的过度表达与肿瘤的恶性进展密切相关, 可能是未来检测卵巢癌的一种有价值的新肿瘤标志物。

关键词: 卵巢肿瘤; PLC delta1; 癌基因

中图分类号: R737.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)04-0540-05

PLC Delta 1 Expression in Epithelial Ovarian Tumor and Its Clinical Significance

HE Jian-hui^{1,2}, ANG Guo-Fen¹, CAI Mu-yan³, XIE Dan³

(1. Department of Gynecology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Department of Gynecology, Guangdong general hospital, Guangzhou 510080, China;
3. State Key Laboratory of Oncology in Southern China//Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of PLC delta 1 in epithelial ovarian tumor and its clinical significance. 【Method】Examination of PLC delta 1 expression in the tissue microarray among 223 cases of epithelial ovarian tumor (including 183 cases of ovarian cancer and the control group, 40 of borderline ovarian tumor), using immunohistochemistry method. Subsequent analysis was conducted to reveal the relationship between PLC delta 1 expression and the occurrence of epithelial ovarian cancer. 【Results】Among 197 valid samples, most of the borderline tumor cases (25 samples, 80.6%) indicated normal expression of PLC delta 1; most of the ovarian cancer cases (91 samples, 54.8%), on the other hand, indicated overexpression of PLC delta 1. The study also found a significant difference in PLC delta 1 expression ($P < 0.000 1$) between the two types of cases. Also, there is a significant correlation between the PLC delta 1 expression in the ovarian cancer cases and their clinical stages, as well as the age of the patients ($P < 0.000 1$). 【Conclusion】The overexpression of PLC delta 1 in the ovarian cancer tissue is closely related to tumor malignancy, suggesting that PLC delta 1 could be another effective marker for the diagnosis of ovarian cancer.

Key words: ovarian tumor; PLC delta 1; cancer genes

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(4):540-544]

卵巢癌是女性生殖器官常见恶性肿瘤, 发病年龄以 50 岁左右为高峰。由于卵巢肿瘤发病隐匿, 早期诊断困难, 大多数(约 70%)卵巢癌患者在初诊时已是浸润晚期(FIGO III 或 IV 期)的肿瘤, 其

5 年生存率不超过 30%, 死亡率居妇科恶性肿瘤的首位^[1]。在我国, 卵巢癌的发病呈上升趋势, 在一些大城市如上海今年的卵巢癌发病率达 6.9/10 万^[2], 成为危害女性生命健康的主要“杀手”之一。

收稿日期: 2010-03-25

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B35001004)

作者简介: 何剑辉, 妇科在职硕士研究生, 医师, 工作单位: 广东省医学科学院广东省人民医院妇产科, 研究方向妇科肿瘤, E-mail: jefyho@163.com; * 通信作者: 杨国奋, 副教授, 硕士生导师, 研究方向妇科肿瘤, E-mail: pgf_yang@126.com

众所周知,卵巢癌的发生发展是一个多基因改变多步骤的复杂过程^[3]。因此,卵巢癌密切相关基因的分子致癌机制及其临床肿瘤学意义的深入研究,将对加强和促进卵巢癌的防治工作提供实验研究的基础。目前,越来越多的新基因如 RUNX1、TACC1、DeltaTAp73、clusterin、THY1 及 YKL-40 蛋白等异常已被证实与卵巢癌的发生发展和预后密切相关^[4-6]。人类 PLC delta1 基因定位于染色体 3p22,包括 16 个外显子,编码 756 个氨基酸的蛋白质。PLC delta1 是哺乳动物中磷酸肌醇 PLC 大家庭中的一员。PLC delta1 的表达水平、调节机理和生物学特征已经被广泛研究。但是,该基因在癌症发生、发展中的作用研究很少。国外有学者研究发现,PLC delta1 与食管鳞癌^[7]和结肠癌^[8]的恶性进展密切相关。目前,国内外暂时还没有关于 PLC delta1 在上皮性卵巢肿瘤中表达的相关研究。因此,本研究旨在初步探讨 PLC delta1 在上皮性卵巢肿瘤中的表达情况及其临床意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选取 1994 年至 2003 年间在中山大学附属第一医院妇产科接受手术治疗的上皮性卵巢肿瘤患者 223 例(术前均未行放疗或生物治疗),收集其临床病理资料。其中卵巢癌患者 183 例,交界性卵巢肿瘤患者 40 例。本组上皮性卵巢癌患者的中位年龄为 50.5 岁,其中浆液性腺癌 120 例、粘液性腺癌 23 例、其它类型肿瘤 40 例;在肿瘤的 Silverberg 氏分级中,36 例是 G1 级卵巢癌、104 例为 G2 级卵巢癌、43 例为 G3 级卵巢癌。临床分期按国际 FIGO 分期标准: I 期 35 例, II 期 21 例, III 期 101 例, IV 期 26 例。所有组织标本均再次切片 HE 染色证实诊断。同时选取 20 例非卵巢疾病(如子宫肿瘤等)手术切除的正常卵巢组织作为实验对照组;标本经 40 g/L 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋。

1.2 主要仪器和试剂

仪器:组织芯片制作机为美国 NIH 国家人类基因研究所肿瘤遗传实验室制造。石蜡切片机购自德国 Leica 公司。显微镜及显微摄像装置为日本 Olympus 公司产品。试剂:PLC delta1 的多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc

1.3 组织芯片的制作及结果判断

首先在显微镜下对“供体”蜡块的切片选出典型病变部位,然后从“供体”蜡块标本中取出所需组织(每例肿瘤选定 2 个不同取样位点,取样确保组织的代表性),插入“受体”蜡块的洞内,排列成微组织阵列,制成组织芯片蜡块。用切片机对组织芯片蜡块进行连续切片,厚约 4 μm ,选取石蜡切片作 HE 染色,检查每一点是否与设计阵列中的组织一致。组织芯片石蜡切片作 HE 染色后,对组织芯片阵列中的每一点在显微镜下进行观察与核对,为保证实验结果的可靠性组织芯片中若存在以下情况之一即予剔除:组织定位与取材的偏差导致无效组织过多,有效细胞数过少,缺乏代表性;组织芯片脱片,即制片过程中组织芯的移位或脱落;记录被剔除的组织芯所在阵列,在下一步实验将不列入观察统计。

1.4 免疫组织化学染色

采用免疫组化染色二步法。首先,将制作成的组织芯片脱蜡至水,然后放入 3 mL/L H_2O_2 甲醇液中 20 min(室温)。接着蒸馏水洗后,放入抗原修复液(pH 6.0)内微波修复 20 min。pH 7.2 PBS 缓冲液洗 3 次,滴加正常血清 37 $^{\circ}\text{C}$,放置 20 min;甩去多余血清后,将其放入 PLC delta1 的多克隆抗体中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。pH 7.2 PBS 缓冲液洗 3 次后,放入 1:200 的二抗液体中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 30 min。pH 7.2 PBS 缓冲液洗 3 次,DAB 显色 5 min,水洗后,苏木素淡染,蓝化,脱水,透明,封固(图 1)。结果观察采用半定量的 9 分法:按染色的强度,阴性染色记为 0 分,弱阳性染色 1 分,中度阳性 2 分,强阳性 3 分。按阳性细胞数, $\times 400$ 倍显微镜下每例观察 5 个视野,每个视野 100 个细胞,计数染色阳性细胞数,当阳性细胞数少于 1%时,为 0 分;1%~30%为 1 分;31%~70%为 2 分;超过 70%为 3 分。将两者的积分相乘(即 0~9 分),记录染色结果。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计处理。计数资料采用 χ^2 检验。所有检验结果以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

在本组 223 例上皮性卵巢肿瘤组织中,有 166

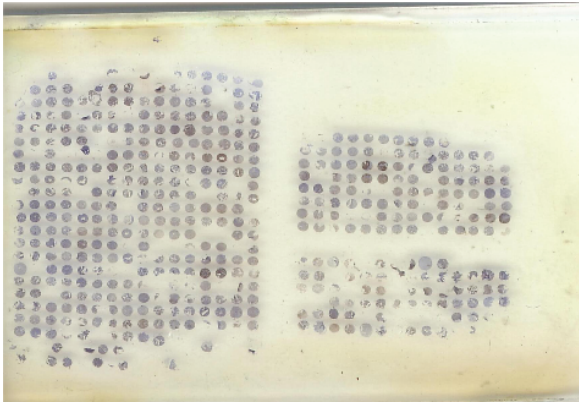


图 1 免疫组化染色后的组织芯片

Fig.1 Tissue microarray stained by immunohistochemistry

(Each case get two tissues): tissues of ovarian cancers are on the left side, and the tissues of borderline tumors are on the right side.

例卵巢癌标本和 31 例交界性卵巢肿瘤标本成功地进行了 PLC delta1 免疫组化检测 (17 例卵巢癌标本和 9 例交界性肿瘤标本无效检测的病例因组织芯片取材代表性不足或芯片组织脱落而被剔除)。

因为 20 例正常卵巢组织均呈 PLC delta1 低水平的表达,根据半定量积分法,表达积分均低于 2 分(图 2),所以我们定义染色积分小于 2 分为阴性,正常表达;大于 2 分则判为阳性,过度表达。

2.1 PLC delta1 在上皮性卵巢肿瘤中表达情况

PLC delta1 在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达是经免疫组化染色后胞浆内呈现棕黄色颗粒。按半定量的 9 分法积分标准观察,有效检测的卵巢肿瘤标本中,我们发现 PLC delta1 在卵巢癌组织中的表达明显高于交界性卵巢肿瘤:大多数的交

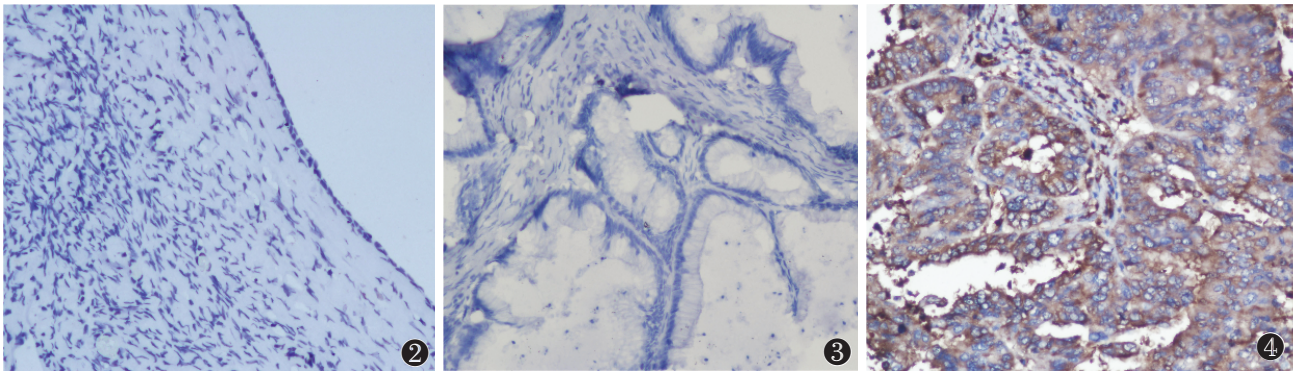


图 2 PLC delta1 在正常卵巢组织中的表达

Fig.2 PLC delta1 expression in normal ovarian tissue (×200)

图 3 PLC delta1 在交界性肿瘤中的表达

Fig.3 PLC delta1 expression in borderline ovarian tumors (× 200)

图 4 PLC delta1 在卵巢癌中的表达

Fig.4 PLC delta1 expression in ovarian cancer (× 200)

界性卵巢肿瘤 (25 例,80.3%) 表现为 PLC delta1 正常表达(图 3);而多数的卵巢癌组织(91 例,54.82%)则呈 PLC delta1 的过度表达(图 4);两者之间存在显著差异($\chi^2 = 13.145, P < 0.0001$;表 1)。

2.2 上皮性卵巢癌中 PLC delta1 表达与临床分期的关系

在对 166 例成功检测的卵巢癌组织进行进一步分析后,我们发现在不同临床分期的肿瘤中,PLC delta1 表达有显著差异 ($\chi^2 = 11.848, P = 0.008$), PLC delta1 过度表达率随卵巢癌临床分期的进展

表 1 PLC delta1 在上皮性卵巢肿瘤中表达情况

Table 2 Expression of PLC delta1 in epithelial ovarian tumors

| Tumor classification | expression of PLC delta1 | | Total |
|----------------------|--------------------------|-----------------|-------|
| | Normal expression | Over expression | |
| Borderline | 25(80.3%) | 6(19.7%) | 31 |
| Malignant | 75(45.2%) | 91(54.8%) | 166 |
| Total | 100 | 97 | 197 |

$\chi^2 = 13.145, P < 0.0001$

而增高(表 2)。

表2 上皮性卵巢癌中 PLC delta1 表达与临床分期的关系

Table 2 Relations between expression of PLC delta1 and clinical stage in epithelial ovarian cancers

| clinical stage | expression of PLC delta1 | | Total |
|----------------|--------------------------|-----------------|-------|
| | Normal expression | Over expression | |
| Stage I | 20(62.5%) | 12(37.5%) | 32 |
| Stage II | 8(44.1%) | 10(55.6%) | 18 |
| Stage III | 43(46.7%) | 49(53.3%) | 92 |
| Stage IV | 4(16.7%) | 20(83.3%) | 24 |
| Total | 75(45.2%) | 91(54.8%) | 166 |

$$\chi^2 = 11.848, P = 0.008$$

2.3 上皮性卵巢癌中 PLC delta1 表达与患者年龄的关系

本组 166 例上皮性卵巢癌患者的中位年龄为 50.5 岁,故以 51 岁为界分为两组。研究发现,在年龄较小的组别(≤ 50 岁)中,有 52 例(62.7%)呈 PLC delta1 过度表达;在年龄较大的组别(> 50 岁)中,有 39 例(45.5%)呈 PLC delta1 过度表达。两组间存在统计学差异($\chi^2 = 4.110, P = 0.043$),年龄越小,PLC delta1 表达越活跃(见表 3)。

表3 上皮性卵巢癌中 PLC delta1 表达与年龄的关系

Table 3 Relations between expression of PLC delta1 and age in epithelial ovarian cancers

| age | expression of PLC delta1 | | Total |
|-----------|--------------------------|-----------------|-------|
| | Normal expression | Over expression | |
| < 51 | 31(37.3%) | 52(62.7%) | 83 |
| ≥ 51 | 44(53.0%) | 39(47.0%) | 83 |
| Total | 75 | 91 | 166 |

$$\chi^2 = 4.110, P = 0.043$$

2.4 上皮性卵巢癌中 PLC delta1 表达与其他临床数据的关系

PLC delta1 表达与本组患者的组织学分型、病理学分级均未观察到统计学意义的相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

人类 PLC delta1 基因定位于染色体 3p22,包括 16 个外显子,编码 756 个氨基酸的蛋白质。PLC delta1 是哺乳动物中磷酸肌醇 PLC 大家庭中的一员,它主要存在于静止期细胞的细胞膜上和胞浆中。PLC delta1 可以与具有 II 型转谷氨酰胺酶

(transglutaminas II, TG II) 活性的 $G_{\alpha h}$ 能够结合并活化^[9];另外,RhoA 特异性的 p12GTP 酶活化蛋白(p12GAP)也能够活化 PLC delta1^[10];Gi/Go 蛋白偶联受体激动剂能够通过 Ca^{2+} 介导激活 PLC delta1^[11]。这些激活的 PLC delta1 可以水解小分子的脂质混合物和 PIP_2 ,同时释放第二信使,如可以使钙离子从细胞内释放出来的 IP-3,可以介导 PKC 激活的二酰基甘油^[12-13],进而将细胞外的信息传递给下游的效应分子,调节生命活动。

在本研究中,我们采用免疫组织化学染色的方法,检测了卵巢肿瘤组织中 PLC delta1 的表达水平。结果发现,PLC delta1 在卵巢癌过度表达率明显高于交界性卵巢肿瘤。提示 PLC delta1 在上皮性卵巢肿瘤组织中的表达上调与肿瘤的恶性程度有关。另外,在本组卵巢癌组织中,我们发现 PLC delta1 过度表达率随着卵巢癌的临床分期的进展而增高。这一观察结果提示:PLC delta1 在卵巢癌组织中的过度表达与肿瘤的恶性进展密切相关,可以作为临床上评估卵巢癌有价值的候选肿瘤标志物。同时,我们还观察到 PLC delta1 的表达与年龄相关:年龄越小表达越活跃。这可能与年轻患者的卵巢组织生长活跃有关。目前,关于 PLC delta1 在肿瘤发生发展中的分子机制还很不清楚。Stallings 等^[14]研究发现,在真核生物细胞中,抑制 PLC delta1 的表达,可以通过对细胞周期中的 cyclinE 的调控,从而抑制细胞的增殖;Kaproth-Joslin 等^[15]的研究也表明,PLC delta1 可以通过激活 cyclin E-CDK2 活性和增加 P27 水平,促进细胞周期从 G1 期进入 S 期,从而促进细胞的增殖。因此,我们推测:PLC delta1 在卵巢癌组织中的表达上调,可能通过对细胞周期的调控,从而促进肿瘤细胞的增殖和恶性进展。显然,PLC delta1 在卵巢癌发生发展中的确切分子机制,尚有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Walsh JM, Dolan NC, Charney P, et al. Update in women's health [J]. Ann Int Med, 2000, 133(10): 808-814.
- [2] 刘恩菊,项永兵,金凡,等.上海市区恶性肿瘤发病趋势分析(1972-1999年)[J]. 肿瘤,2004,24(1):11-15.
- [3] Menon U, Jacobs J. Recent developments in ovarian cancer screening [J]. Curr Opin Obstet Gynaecol, 2000, 12(1): 39-42.

- [4] 杨国奋, 李晓明, 谢丹, 等. 卵巢癌组织中 clusterin 蛋白表达和细胞凋亡检测 [J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(12): 674-676.
- [5] 杨国奋, 朝葵, 李晓明, 等. THY1 基因在上皮性卵巢癌组织中的表达及其意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(3): 203-207.
- [6] 杨国奋, 蔡鹏宇, 李晓明, 等. 上皮性卵巢癌组织中 YLKL-40 蛋白的表达及其临床意义 [J]. 癌症, 2009, 28(2): 173-177.
- [7] Fu L, Qin YR, Xie D, et al. Characterization of a novel tumor-suppressor gene PLC delta 1 at 3p22 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer research, 2007, 67(22): 10720-10726.
- [8] Nomoto K, Tomita N, Miyake M, et al. Expression of phospholipases gamma 1, beta 1, and delta 1 in primary human colon carcinomas and colon carcinoma cell lines [J]. Mol Carcinog, 1995, 12(3): 146-152.
- [9] Kang SK, Kim DK, Damron DS, et al. Modulation of intracellular Ca(2+) via alpha(1B)-adrenoreceptor signaling molecules, G alpha(h) (transglutaminase II) and phospholipase C-delta 1 [J]. Biochem Biophys Res Commu, 2002, 293(1): 383-390.
- [10] Homma Y, Emori Y. A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities [J]. EMBO J, 1995, 14(2): 286-291.
- [11] Murthy KS, Zhou H, Huang J, et al. Activation of PLC-delta 1 by Gi/ocoupled receptor agonists [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(6): 1679-1687.
- [12] Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction [J]. Nature, 1984, 312(5992): 315-321.
- [13] Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation [J]. Nature, 1988, 334(6184): 661-665.
- [14] Stallings JD, Zeng YX, Narvaez F, et al. Phospholipase C-delta1 expression is linked to proliferation, DNA synthesis, and cyclin E levels [J]. J Biol Chem, 2008, 283(20): 13992-14001.
- [15] Kaproth-Joslin KA, Li X, Reks SE, et al. Phospholipase C delta 1 regulates cell proliferation and cell-cycle progression from G1- to S-phase by control of cyclin E-CDK2 activity [J]. Biochem J, 2008, 415(3): 439-348.

(编辑 张恩健)

(上接第 529 页 from page 529)

- treated by radiochemotherapy [J]. Gynecologic oncology, 2007, 106(1): 8-11.
- [10] Liao Y, Abel U, Grobholz R, et al. Up-regulation of insulin-like growth factor axis components in human primary prostate cancer correlates with tumor grade [J]. Hum Pathol, 2005, 36(11): 1186-1196.
- [11] Haydon AM, Macinnis RJ, English DR, et al. Physical activity, insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and survival from colorectal cancer [J]. Gut, 2006, 55(5): 689-694.
- [12] Kaulsay KK, Ng EH, Ji CY, et al. Serum IGF-binding protein-6 and prostate specific antigen in breast cancer [J]. Eur J Endocrinol, 1999, 140(2): 164-168.
- [13] Cacalano NA, Le D, Paranjpe A, et al. Regulation of IGFBP6 gene and protein is mediated by the inverse expression and function of c-jun N-terminal kinase (JNK) and NFkappaB in a model of oral tumor cells [J]. Apoptosis, 2008, 13(12): 1439-1449.
- [14] Iwakiri D, Sheen TS, Chen JY, et al. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces insulin-like growth factor 1 and supports growth of nasopharyngeal carcinoma-derived cell lines [J]. Oncogene, 2005, 24(10): 1767-1773.
- [15] Zhang PJ, Weber R, Liang HH, et al. Growth factors and receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma and nasal polyps: an immunohistochemical study [J]. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127(11): 1480-1484.

(编辑 徐杰)