

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.01.003
文章编号: 1005-8982(2021)01-0015-06

妇科肿瘤专题·论著

子宫内膜癌中 Mortalin 蛋白的表达及临床意义*

尹香琳¹, 王馨悦¹, 韩安娜¹, 李楠², 杨洋¹

(1. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133002; 2. 温州大学, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 探讨寿命蛋白(Mortalin)在子宫内膜癌(EC)中过表达的临床病理学意义。**方法** 采用免疫组织化学EnVision法检测Mortalin蛋白在88例EC组织和37例正常子宫内膜组织中的表达, 分析其过表达与EC临床病理特征之间的关系。应用UALCAN数据库分析Mortalin mRNA在EC组织中的表达水平, 应用The Human Protein Atlas和The Cancer Genome Atlas(TCGA)数据库进行生存分析。**结果** Mortalin蛋白主要表达于EC细胞的细胞质中; 在EC组织中, Mortalin蛋白的阳性率和强阳性率分别为88.6% (78/88) 和56.8% (50/88), 高于正常子宫内膜组织($P<0.05$)。Mortalin蛋白的表达与EC患者的病理分级、TNM分期和淋巴结转移相关($P<0.05$), 但与年龄无关($P>0.05$)。UALCAN数据库分析显示, EC组织中的Mortalin mRNA表达高于正常子宫内膜组织($P<0.05$)。The Human Protein Atlas和TCGA数据库生存分析结果显示, Mortalin蛋白和mRNA高表达的EC患者总生存期低于Mortalin蛋白和mRNA低表达患者($P<0.05$)。**结论** Mortalin的表达与EC的发生、发展及预后相关, 其有望成为EC患者靶向治疗及预后评估的重要指标。

关键词: 子宫内膜癌; Mortalin蛋白; 免疫组织化学; 预后评估

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Clinical significance of mortalin expression in endometrial carcinoma*

Xiang-lin Yin¹, Xin-yue Wang¹, Anna Han¹, Nan Li², Yang Yang¹

(1. Yanbian University Medical College, Yanji, Jilin 133002, China; 2. Wenzhou University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

Abstract: Objective To investigate the clinicopathological significance of the overexpression of Mortalin protein in endometrial carcinoma (EC). **Methods** Mortalin expression was evaluated in 88 EC samples and 37 para-carcinoma tissue samples by immunohistochemical (IHC) staining. The expression of Mortalin mRNA in EC tissues was analyzed by UALCAN database. Correlations between Mortalin overexpression and clinicopathological features of EC patients were analyzed. Overall survival rate of EC patients was performed based on The Human Protein Atlas and The Cancer Genome Atlas (TCGA) databases. **Results** Mortalin showed a cytoplasmic staining pattern in EC. The positive rate and strongly positive rate of Mortalin in EC were 88.6% (78/88) and 56.8% (50/88), which were both significantly higher compared with para-carcinoma tissues ($P < 0.05$). Mortalin overexpression was positively correlated with the pathological grade, TNM stage and LN metastasis in EC ($P < 0.05$), while it had no statistical significance with age ($P > 0.05$). The UALCAN database noted that the expression of Mortalin mRNA was elevated in EC tissues compared with that observed in paracarcinoma tissue samples. Additionally, The Human Protein Atlas and TCGA database showed that the patients with high Mortalin expression had poorer prognosis than those with low Mortalin expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Mortalin high expression is significantly associated with tumorigenesis, cancer progression and the prognosis of EC patients, which may serve as an important indicator for

收稿日期: 2020-06-31

*基金项目: 延边大学应用基础项目[No: 延大科合字(2019)第20号]

[通信作者] 杨洋, E-mail: yangyang@ybu.edu.cn; Tel: 0433-2435056

target therapy and prognosis evaluation in EC.

Keywords: endometrial neoplasms; mortalin; immunohistochemical staining; prognosis

子宫内膜癌(Endometrial carcinoma, EC)是最常见的女性生殖系统侵袭性肿瘤之一^[1], 50~59岁为其发病高峰期。在美国, EC的新发病率位居女性恶性肿瘤第4位, 占每年新发癌症的7%, 死亡患者高达10 170例^[2]。在中国, EC新发病率不断上升, 仅次于宫颈癌^[3], 每年新发患者约为5万例, 死亡人数为1.8万^[4], 且患者呈现明显的年轻化趋势。由于部分早期EC患者对传统手术治疗方法较为抵触, 且中晚期EC患者生存期短, 治疗效果差, 预后欠佳, 因此发现新型生物标志物对EC早期诊断、靶向治疗及预后评估有着重要的临床意义。

寿命蛋白(Mortalin/HSPA9/GRP75/mtHSP70/HSPA9B)是一种葡萄糖调节蛋白, 约75 kD, 属于热休克蛋白70家族, 是高度保守的线粒体分子伴侣蛋白^[5]。其在核编码蛋白的转运、蛋白完整性的保持、细胞周期调控和线粒体产能等方面有至关重要的作用^[6]。研究表明, Mortalin蛋白在正常组织中无表达或低表达, 但在多种恶性肿瘤中异常高表达, 如肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、结肠癌、卵巢癌等^[6~9]。但关于Mortalin蛋白在EC组织中的表达尚未见报道。本研究应用免疫组织化学EnVision法检测Mortalin蛋白在88例EC组织和37例正常子宫内膜组织中的表达, 探讨其与EC临床病理特征的关系, 并分析Mortalin蛋白表达在EC患者临床预后评估中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

收集2011年5月—2014年12月上海芯超科技有限公司组织芯片和吉林大学第二医院的EC组织标本, 包括88例EC组织和37例正常子宫内膜组织。88例EC标本中, 年龄<50岁20例, ≥50岁68例; 有淋巴结转移25例, 无淋巴结转移63例; 病理分级: I级25例, II级48例, III级15例; 国际TNM分期: I+II期60例, III+IV期28例。二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 苏木精染液购自珠海贝索生物技术有限公司, Mortalin抗体(ab53098)购自美国Abcam公司。

1.2 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学EnVision法检测Mortalin蛋白的表达^[10]: 4 μm厚连续切片, 常规脱蜡, 梯度乙醇水化, 抗原修复, 滴加一抗Mortalin抗体(稀释比1:200), 4°C孵育过夜; 次日滴加二抗, DAB显色, 苏木精对比染色, 中性树胶封固。为证明Mortalin蛋白抗体免疫组织化学检测的特异性, 选用Mortalin蛋白强阳性染色的切片, 以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗的染色结果作为阴性对照。根据Beesly分级法, 以细胞质中出现棕褐色颗粒为Mortalin蛋白阳性染色的标准。根据细胞染色强度进行判断, 细胞质中无着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。根据阳性细胞数的比例判断: 阳性细胞数0%~5%为0分, >5%~25%为1分, >25%~50%为2分, >50%~75%为3分, >75%为4分。将两项得分结果相乘: 0分为(-), 1~4分为(+), 5~8分为(++)+, 9~12分为(+++)。以总分≤4分为低表达, 总分>4分为高表达。

1.3 生存分析

应用UALCAN数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)分析Mortalin mRNA在EC组织中的表达水平, 采用The Human Protein Atlas(<https://www.proteinatlas.org/>)和The Cancer Genome Atlas(TCGA)(<http://kmplot.com/analysis/index.php?service&start=1>)数据库分析Mortalin蛋白表达与EC患者预后的关系, 并根据基因和蛋白的相对表达量将样本分为高表达组和低表达组, 统计和分析EC患者的预后情况。

1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 17.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较采用t检验; 计数资料以率(%)表示, 比较采用 χ^2 检验; Kaplan-Meier法绘制生存曲线, 比较采用Log-rank χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

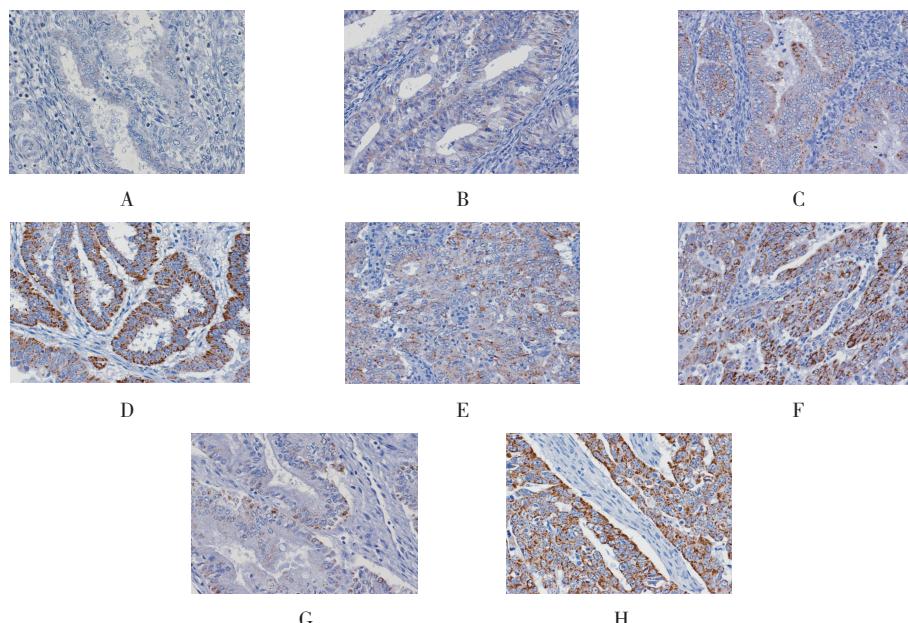
2 结果

2.1 Mortalin蛋白在EC组织中高表达

免疫组织化学检测结果显示, Mortalin蛋白在正

常子宫内膜组织中低表达或不表达, 在 EC 组织中高表达, 且主要表达于细胞质 (见图 1)。Mortalin 蛋白在 EC 组织中的阳性率和强阳性率分别与正常子宫内

膜组织中的阳性率和强阳性率比较, 采用 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=40.815$ 和 31.582 , 均 $P=0.000$), EC 组织均高于正常子宫内膜组织 (见表 1)。



A: Mortalin 在正常子宫内膜组织中呈阴性; B: Mortalin 在病理分级 I 级子宫内膜癌组织中呈弱阳性; C: Mortalin 在病理分级 II 级子宫内膜癌组织中呈阳性; D: Mortalin 在病理分级 III 级子宫内膜癌组织中呈强阳性; E: Mortalin 在早期子宫内膜癌组织中呈阳性; F: Mortalin 在晚期子宫内膜癌组织中呈强阳性; G: Mortalin 在无淋巴结转移子宫内膜癌组织中呈弱阳性; H: Mortalin 在有淋巴结转移子宫内膜癌组织中呈强阳性。

图 1 Mortalin 蛋白在正常子宫内膜和各组子宫内膜癌组织中的表达 (EnVision 法 $\times 400$)

表 1 正常子宫内膜组织和 EC 组织中的 Mortalin 蛋白表达阳性率和强阳性率的比较

组别	n	Mortalin/例				阳性率/%	强阳性率/%
		-	+	++	+++		
正常子宫内膜组织	37	25	11	1	0	32.4	2.7
EC 组织	88	10	28	39	11	88.6	56.8

2.2 EC 患者不同因素间 Mortalin 蛋白强阳性率的比较

Mortalin 蛋白高表达与病理分级、TNM 分期及是否有淋巴结转移有相关性 ($P<0.05$), 但与年龄无关 ($P>0.05$) (见表 2)。其中, 病理分级 III 级的 Mortalin 蛋白阳性率与 I 级和 II 级比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), III 级 Mortalin 蛋白的阳性率高于 I 级和 II 级; TNM 分期晚期 (III、IV 期) 的 Mortalin 蛋白高表达率与早期 (I、II 期) 的高表达率比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 晚期 (III、IV 期) 高于早期 (I、II 期); 有淋巴结转移的 Mortalin 蛋白高表达率与无淋巴结转移的高表达率比较, 差异有统计学意义

($P<0.05$), 有淋巴结转移高于无淋巴结转移。根据该结果, 本研究通过运用 JMP10 软件, 直观地展现了 Mortalin 蛋白在不同的病理分级、TNM 分期及有无淋巴结转移的情况下蛋白表达差异性 (见图 2)。

2.3 正常子宫内膜组织和 EC 组织中的 Mortalin mRNA 表达比较

UALCAN 数据库显示, 与正常子宫内膜组织 Mortalin mRNA 相对表达量 (109.02 ± 39.25) 比较, EC 组织 Mortalin mRNA 相对表达量 (136.42 ± 120.9) 较高 ($t=39.827$, $P=0.000$) (见图 3)。提示 Mortalin mRNA 在 EC 早期诊断、靶向治疗和预后分析中具有重要的作用。

表2 不同因素Mortalin蛋白强阳性率的比较

因素	n	强阳性例(%)	χ^2 值	P值
年龄				
<50岁	20	9(45.0)		
≥50岁	68	41(60.3)	1.473	0.225
病理分级				
I级	25	3(12.0)		
II级	48	34(70.8)	29.757	0.000
III级	15	13(86.7)		
TNM分期				
I、II	60	28(46.7)		
III、IV	28	22(78.6)	7.920	0.005
淋巴结转移				
无	63	31(49.2)		
有	25	19(76.0)	7.162	0.022

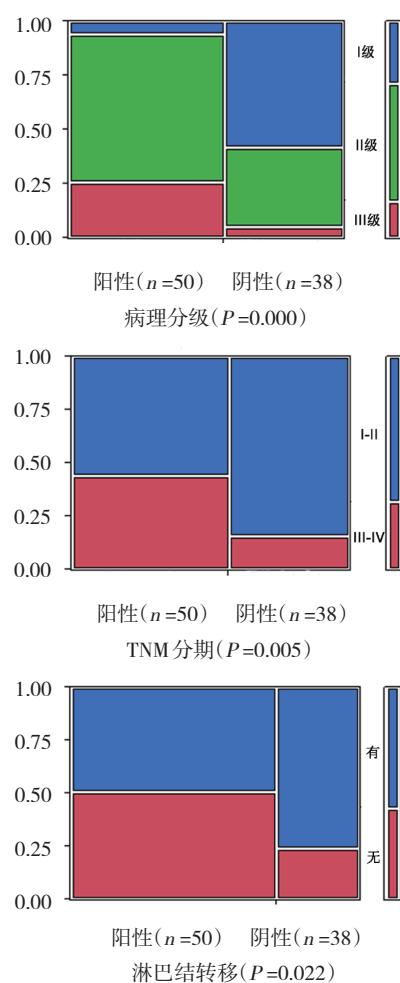


图2 不同病理分级、TNM分期、淋巴结转移情况下Mortalin蛋白表达差异性

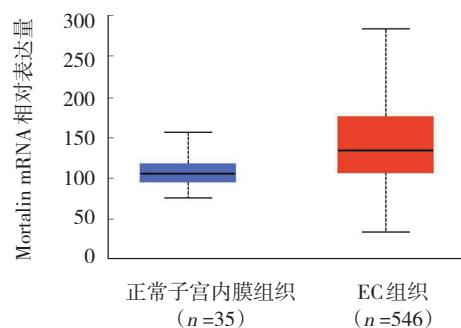
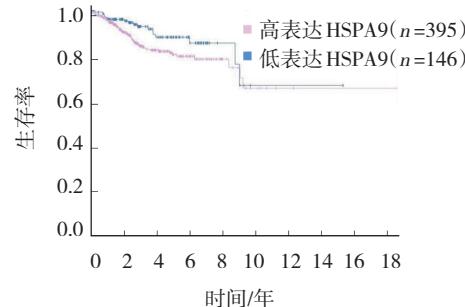
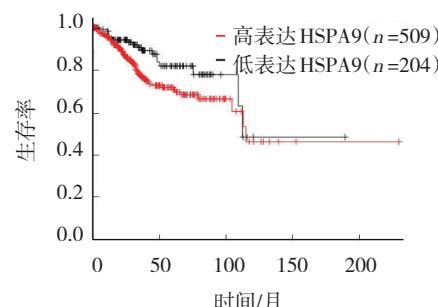


图3 Mortalin mRNA在正常子宫内膜组织和EC组织中的表达比较 (UALCAN数据库)

2.4 Mortalin蛋白高表达预示预后不良

The Human Protein Atlas 数据库统计分析结果表明，Mortalin 蛋白高表达 EC 患者的生存期短于 Mortalin 蛋白低表达 EC 患者 ($\chi^2 = 4.515$, $P = 0.037$) (见图 4); TCGA 数据库统计分析结果显示，Mortalin mRNA 高表达的 EC 患者其预后比 Mortalin mRNA 低表达 EC 患者差 ($\chi^2 = 4.475$, $P = 0.034$) (见图 5)。该结果提示 Mortalin 有望成为 EC 患者预后评估的重要新型分子标志物之一。

图4 Mortalin蛋白与EC患者生存期的关系
(The Human Protein Atlas数据库)图5 Mortalin mRNA与EC患者生存期的关系
(TCGA数据库)

3 讨论

Mortalin 蛋白首次在正常小鼠成纤维细胞质中克隆而来, 定位于染色体 5q31.2, 是一种主要位于线粒体的非热应激诱导蛋白质, 可以与细胞内多种蛋白质相互作用, 具备线粒体产能、分子伴侣、使肿瘤低分化等多种功能^[11], 该蛋白在除线粒体以外的其他细胞器中也同样起着诸多作用, 如信号转导、应激反应、细胞增殖等生物学功能^[12]。有文献研究结果显示^[5], 正常情况下 Mortalin 蛋白在细胞中心体通过结合 *P53*、*MPS1* 等多种基因或激酶来维持原有的造血功能, 敲除 Mortalin 蛋白使 *P53*、*MPS1* 等不能保持正常细胞状态和染色体稳定性, 导致骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 等疾病的产生, 因此, Mortalin 蛋白是人体不可或缺的基因蛋白。同时, Mortalin 蛋白亦可在多种恶性肿瘤中异常表达。研究表明^[8], Mortalin 蛋白在卵巢癌组织中表达显著上调, 且与临床分期、分化程度及生存期相关。CUI 等^[6]的研究表明 Mortalin 蛋白在胰腺癌组织中与临床分期、淋巴结转移、生存期等相关, 且 Mortalin 蛋白的表达明显高于其癌旁组织, 可作为胰腺癌的独立预后因素; 另外, 推测其主要机制是过表达的 Mortalin 蛋白抑制 *P53* 的转录活性, 而这一机制亦被 YI 等^[7]学者推断为 Mortalin 蛋白过表达促进肝癌发生和进展的基础。截至目前, 尚无有关 Mortalin 蛋白与子宫内膜癌之间关系的报道。

本研究发现 Mortalin 蛋白表达定位于 EC 细胞质, 且在 EC 组织中的表达水平高于正常子宫内膜组织。进一步分析 Mortalin 蛋白过表达与 EC 临床病理特征的关系发现, Mortalin 蛋白在病理分级Ⅲ级 EC 组织中的高表达率高于Ⅰ级和Ⅱ级 EC 组织; TNM 晚期 EC 组织中的高表达率高于早期 EC 组织; 有淋巴结转移的 EC 组织中的高表达率高于无淋巴结转移的 EC 组织。本研究结果表明, 随着 EC 疾病的进展, Mortalin 蛋白的表达呈升高趋势。这一结果与 JIN 等^[13]在乳腺癌中 Mortalin 蛋白表达的结果相符。

本研究运用 The Human Protein Atlas 和 TCGA 数据库来分析 Mortalin 蛋白和 mRNA 的表达与 EC 患者预后的关系, 发现 Mortalin 蛋白和 mRNA 高表达患

者的生存期低于低表达患者, 提示 Mortalin 过表达有望成为 EC 患者不良预后的重要新型分子标志物。

综上所述, Mortalin 蛋白在 EC 组织中高表达, 且随着病理分级和临床分期的升高及淋巴结转移呈升高趋势, 说明 Mortalin 蛋白在 EC 的恶性演进过程中起重要作用, 提示 Mortalin 蛋白可以成为 EC 预后评估的分子标志物, 但其是否可以成为 EC 靶向治疗的新靶点, 则有待进一步的深入研究。

参 考 文 献 :

- [1] 惠培. 子宫内膜癌的二元发病模式及其临床病理意义[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(12): 705-707.
- [2] BUHTOIAROVA T N, BRENNER C A, SINGH M. Role of current and emerging biomarkers in resolving persistent clinical dilemmas[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 145(1): 8-21.
- [3] 陈晓斐, 王鹏飞, 刘晨晨, 等. FIGO I期子宫内膜癌患者 159 例预后影响因素[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(6): 416-420.
- [4] 肖庆, 刘莉, 胡雅君, 等. IL-17 通过抑制 miR-195-5P 表达促进子宫内膜癌细胞生长和转移[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(6): 1063-1068.
- [5] TIBBITTS J F, RAJU G, WALSHAUSER M A. Knockdown of Hspa9, a del (5q31.2) gene, results in a decrease in hematopoietic progenitors in mice[J]. Blood, 2011, 117(5): 1530-1539.
- [6] CUI X, LI Z, PIAO J, et al. Mortalin expression in pancreatic cancer and its clinical and prognostic significance[J]. Hum Pathol, 2017, 64: 171-178.
- [7] YI X, LUKE J M, LEE N P, et al. Association of mortalin (HS-PAA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence[J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 7(2): 315-325.
- [8] STARENKI D, SOSONKINA N, HONG S K, et al. Mortalin (GRP75/HSPA9) promotes survival and proliferation of thyroid carcinoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): E2069.
- [9] XU M, JIN T, CHEN L, et al. Mortalin is a distinct bio-marker and prognostic factor in serous ovarian carcinoma[J]. Gene, 2019, 696: 63-71.
- [10] 关宏铜, 李楠, 单薪宇, 等. 胰腺癌组织中 PAIP1 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(11): 1185-1188.
- [11] 犹勇. HSPA9 抑制 Apoptin 诱导 HepG2 细胞凋亡[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [12] JUBRAN R, KOCSIS J, GARAM N, et al. Circulating mitochondrial stress 70 protein/mortalin and cytosolic Hsp70 in blood: Risk indicators in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2017, 141(11): 2329-2335.
- [13] JIN H, JI M, CHEN L, et al. The clinicopathological significance of Mortalin overexpression in invasive ductal carcinoma of breast[J]. Oncotarget, 2016, 7(4): 4712-4723.
- [14] CHENG W, ZHANG B, ZIKELIYAR M, et al. Elevated Mortalin correlates with poor outcome in hepatocellular carcinoma[J].

- Ann Diagn Pathol, 2019, 42: 59-63.
- [15] SHANG C, AO C N, CHEONG C C, et al. Long Non-coding RNA CDKN2B Antisense RNA 1 Gene contributes to paclitaxel resistance in endometrial carcinoma[J]. Front Oncol, 2019, 9: 27.
- [16] FANG F, LI D, ZHAO L, et al. Expression of nr1h3 in endometrial carcinoma and its effect on the proliferation of ishikawa cells in vitro[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 685-697.
- [17] SHAN Y, CORTOPASSI G. Mitochondrial Hspa9/Mortalin regulates erythroid differentiation via iron-sulfur cluster assembly[J]. Mitochondrion, 2016, 26: 94-103.
- [18] LIU T, KRYSIAK K, SHIRAI C L, et al. Knockdown of HSPA9 induces TP53-dependent apoptosis in human hematopoietic progenitor cells[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0170470.
- [19] 郎景和. 子宫内膜癌诊治的几个问题[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(5): 261-263.
- [20] 沈铿. 子宫内膜癌诊治中存在的问题与思考[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(3): 145-147.
- [21] SCHMITZ-ABE K, CIESIELSKI S J, SCHMIDT P J, et al. Congenital sideroblastic anemia due to mutations in the mitochondrial SP70 homologue HSPA9[J]. Blood, 2015, 126(25): 2734-2738.
- [22] 李美霞, 张菡菡. 千金藤素通过调节 eIF4E 相关 miR-215 促进 RL-952 细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(9): 1586-1592.
- [23] 章丽, 张志秀, 于爱军, 等. 子宫内膜癌组织 microRNA-944 的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(1): 50-54.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 尹香琳, 王馨悦, 韩安娜, 等. 子宫内膜癌中 Mortalin 蛋白的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(1): 15-20.

Cite this article as: YIN X L, WANG X Y, HAN A N, et al. Clinical significance of mortalin expression in endometrial carcinoma[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(1):15-20.