

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.13.011

文章编号: 1005-8982(2016)13-0058-05

论著

细胞周期突变体相关蛋白激酶 2、P-糖蛋白和谷胱甘肽 巯基转移酶 - π 在宫颈癌中的表达及临床意义*

刘思思, 田佳, 张美艳, 侯巧燕, 莫文法, 周英琼
(桂林医学院附属医院 病理科, 广西 桂林 541001)

摘要:目的 检测宫颈癌中细胞周期突变体(NIMA)相关蛋白激酶(Nek2)与耐药蛋白 P-糖蛋白(P-gp)、胱甘肽巯基转移酶 - π (GST- π) 的表达及其与临床病理特征的相关性。**方法** 应用免疫组织化学法检测 144 例宫颈癌组织和 32 例慢性宫颈炎非癌组织中 Nek2、P-gp、GST- π 的表达。**结果** ①Nek2、P-gp 和 GST- π 在宫颈癌及宫颈炎组织中的阳性表达率分别为 (51.4% vs 31.2%)、(55.6% vs 12.5%) 和 (73.6% vs 53.1%)，组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。②Nek2 表达与宫颈癌组织学分级、临床分期相关 ($P < 0.05$)，与年龄、组织学类型、浸润深度、细胞角蛋白(CK)、CK14、癌胚抗原(CEA)、抗癌基因 P16、生存时间无关 ($P > 0.05$)。P-gp、GST- π 在宫颈癌的阳性表达与以上临床病理特征无相关性 ($P > 0.05$)。③宫颈癌中 Nek2 与 P-gp、GST- π 表达呈正相关 ($r = 0.193$ 和 0.207 , $P < 0.05$)。**结论** Nek2 可能介导宫颈癌中 P-gp、GST- π 的表达。Nek2、P-gp 及 GST- π 蛋白在宫颈癌发生、发展及耐药机制中发挥重要作用。联合检测对宫颈癌治疗方案的合理制定及化疗反应性的评估可能具有积极的临床指导意义。

关键词: 宫颈癌; 细胞周期突变体相关蛋白激酶 2; P-糖蛋白; 胱甘肽巯基转移酶 - π ; 耐药性

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Expressions of Nek2, P-gp and GST- π in cervical cancer and their clinical significance*

Si-si Liu, Jia Tian, Mei-yan Zhang, Qiao-yan Hou, Wen-fa Mo, Ying-qiong Zhou
(Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University,
Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of never-in-mitosis A-related kinase 2 (Nek2), P-glycoprotein (P-gp) and glutathione S-transferase- π (GST- π) in cervical cancer, and analyze their correlations with clinical pathological features. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expressions of Nek2, P-gp and GST- π in the cervical cancer tissues of 144 cases and chronic cervicitis tissues of 32 cases. Then the relationships of Nek2, P-gp and GST- π with clinicopathologic parameters were analyzed. **Results** The positive expression rate of Nek2, P-gp and GST- π in 144 cases of cervical cancer and 32 cases of chronic cervicitis tissues were 51.4% vs 31.2%, 55.6% vs 12.5% and 73.6% vs 53.1% respectively ($P < 0.05$). The positive expression rate of Nek2 in the cervical cancer tissues was correlated to histological grade and clinical stages ($P < 0.05$), but not correlated with age, pathological type, depth of invasion, CK14, CEA, CK, P16 or survival time ($P > 0.05$). The positive expressions of P-gp and GST- π in the cervical cancers were not in correlation with the above clinicopathological features ($P > 0.05$). The expression of Nek2 in the cervical cancer was positively correlated with P-gp and GST- π expressions ($r = 0.193$ and 0.207 , $P < 0.05$). **Conclusions** Nek2 maybe mediates P-gp and GST- π expressions in cervical cancer. Nek2, P-gp and GST- π play vital

收稿日期: 2016-01-28

* 基金项目: 广西省桂林市科学研究与技术开发项目 (No: 20140120-1-11)

[通信作者] 周英琼, E-mail: 15977321166@163.com; Tel: 15977321166

roles in the occurrence, development and drug-resistant mechanism of cervical cancer.

Keywords: cervical cancer; never-in-mitosis A-related kinase 2; P-glycoprotein; glutathione S-transferase- π ; drug resistance

宫颈癌是全世界女性的第 2 位高发癌症,目前存在年轻化趋势^[1]。如今针对宫颈癌的治疗仍以手术为主,联合化疗和放疗的综合治疗。化疗作为宫颈癌患者主要的辅助治疗越来越受到重视,但是随着各种化疗药物的运用,肿瘤细胞表现出多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象,限制化疗药物的运用,从而导致化疗失败^[2]。国内外研究发现,宫颈癌 MDR 的形成是多种机制共同参与的结果,主要与 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、谷胱甘肽巯基转移酶- π (glutathione S-transferase- π , GST- π)过度表达,活性下降有关^[3]。细胞周期突变体(never-in-mitosis A, NIMA)相关蛋白激酶 2(NIMA-related kinase 2, Nek2)是目前倍受关注的调节染色体分离的蛋白激酶, Nek2 异常表达会影响有丝分裂的正常进行,从而诱导中心体不稳定、细胞周期失调,亦与肿瘤的多药耐药产生有关^[4]。对于不同级别宫颈癌中 Nek2 的表达及其与 P-gp、GST- π 相关性的研究国内外鲜见报道。因此,本研究旨在探讨宫颈癌及慢性宫颈炎非癌组织中 Nek2、P-gp、GST- π 的表达,分析其与临床病理特征的相关性以及相互间表达的联系。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选取 2009 年 1 月-2011 年 12 月广西桂林医学院附属医院手术切除的 144 例宫颈组织标本,经病理组织学证实均为宫颈癌。144 例女性患者年龄 29~79 岁,中位年龄 50 岁。其中 ≤ 40 岁 23 例,40~60 岁 96 例, ≥ 60 岁 25 例;生存期 ≥ 5 年 123 例,生存期在 < 5 年 21 例(其中最短 1 例仅存活 1 月);依《肿瘤组织病理学诊断》标准分级: I 级 97 例, II 级 46 例, III 级 1 例;采用宫颈癌国际妇产科协会(Federation International of Gynecology and Obstetrics, FIGO)临床分期标准: I、II 期 95 例, III、IV 期 49 例;据组织学类型:鳞癌 136 例,腺癌 8 例。另取经病理证实为慢性宫颈炎非癌组织 32 例(来自本院 2015 年就诊患者)作为对照组。所有患者临床及病理资料较完整。

1.2 实验方法与试剂

组织标本常规 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,

4.0 μm 连续切片,采用即用型二步法(以 EnVision 通用检测试剂盒为例)免疫组织化学法染色。按照免疫组织化学法试剂盒说明步骤进行 Nek2、P-gp、GST- π 检测,其中一抗 Nek2 为兔抗人单克隆抗体,稀释浓度为 1:800,购自艾博抗上海贸易有限公司(ab55550)。EnVision 通用检测试剂盒、即用型鼠抗人单克隆抗体 P-gp、GST- π 及二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显示试剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司。选取人的睾丸组织作为 Nek2 的阳性对照,选取人肠癌组织作为 P-gp 阳性对照, GST- π 阳性对照为肺鳞癌组织,磷酸缓冲盐溶液代替一抗作为阴性对照组。

1.3 结果判定标准

Nek2 蛋白主要表达于胞质及部分胞核。P-gp 蛋白表达于胞膜及胞质。GST- π 蛋白主要表达于胞质及部分胞核。以细胞内出现棕黄色或黄色颗粒为阳性表达^[5]。每张切片在光镜下随机选取 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞。着色强度:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,黄色及棕黄色为 2 分。阳性细胞数: $< 10\%$ 为 0 分; $10\% \sim 50\%$ 为 1 分; $> 50\%$ 为 2 分,两项得分相乘后分为两级,结果 ≥ 2 分为阳性, < 2 分为阴性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计数资料以用百分比或率表示,用 χ^2 检验及 Spearman 相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌组织与慢性宫颈炎非癌组织 Nek2、P-gp、GST- π 的表达及其与临床病理特征的相关性

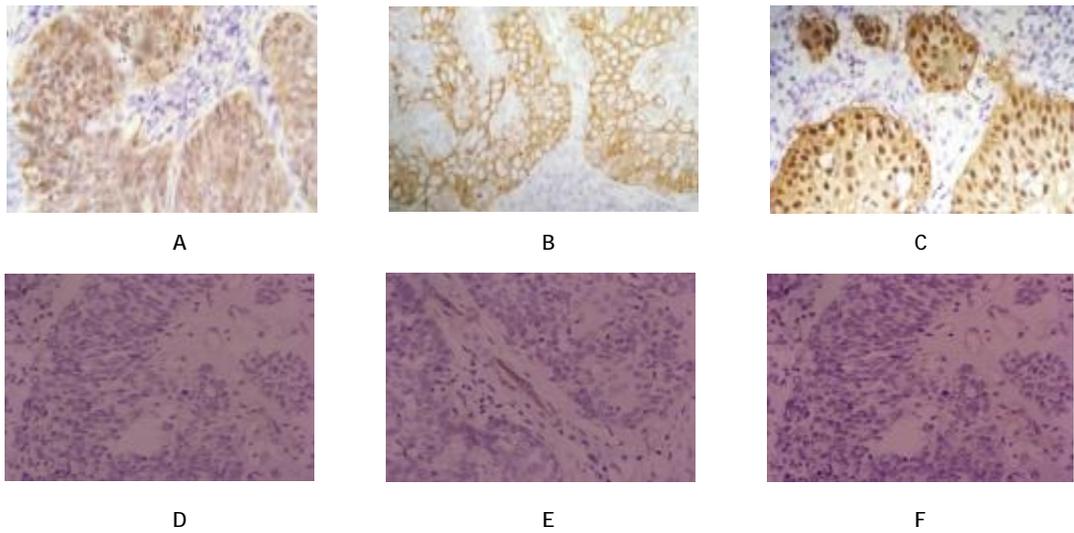
Nek2 在癌组织的阳性表达率为 51.4%,明显高于慢性宫颈炎非癌组织(31.2%),经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=4.256, P=0.039$)(见表 1 和图 1、2)。P-gp 在癌组织的阳性表达率为 55.6%,慢性宫颈炎非癌组织的阳性表达率 12.5%,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=41.454, P=0.000$)(见表 1 和图 1、2)。GST- π 在癌组织中阳性表达率为 73.6%,高于慢性宫颈炎非癌组织的阳性表达率为 53.1%,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=5.221, P=0.022$)(见表 1 和图 1、2)。在癌组织中, Nek2 阳性表达随

组织学分级及临床分期的增高而升高 ($P < 0.05$) (见表 2)。两组患者年龄、组织学类型、浸润深度、细胞角蛋白 (Cytokeratin, CK)、CK14、癌胚抗原 (carcino-embryonic antigen, CEA)、抗癌基因 P16、生存时间等临床病理特征比较, 经 χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。而 P-gp、GST- π 在宫颈癌的阳性表达与以上临床病理特征比较, 经 χ^2 检验, 差异

无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。

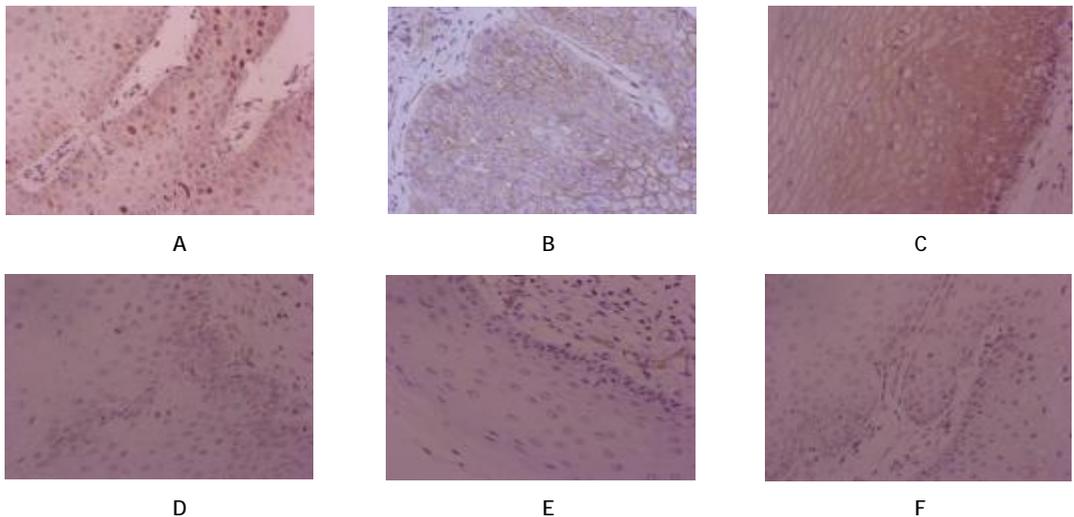
2.2 宫颈癌组织中 Nek2 与 P-gp、GST- π 表达的相关性

宫颈癌中 Nek2 与 P-gp 表达呈正相关 ($r = 0.193$, $P < 0.05$); Nek2 与 GST- π 的表达呈正相关 ($r = 0.207$, $P < 0.05$) (见表 3)。



A: Nek2 阳性 (+); B: Nek2 阴性 (-); C: P-gp 阳性 (+); D: P-gp 阴性 (-); E: GST- π 阳性 (+); F: GST- π 阴性 (-)

图 1 宫颈癌组织免疫组织化学法染色 ($\times 40$)



A: Nek2 阳性 (+); B: Nek2 阴性 (-); C: P-gp 阳性 (+); D: P-gp 阴性 (-); E: GST- π 阳性 (+); F: GST- π 阴性 (-)

图 2 宫颈炎组织免疫组织化学法染色 ($\times 40$)

表 1 宫颈炎和宫颈癌组织中 Nek2、P-gp、GST- π 表达比较 例

组别	Nek2		χ^2 值	P 值	P-gp		χ^2 值	P 值	GST- π		χ^2 值	P 值
	+	-			+	-			+	-		
宫颈炎组 ($n = 32$)	10	22	4.256	0.039	4	28	19.454	0.000	17	15	5.221	0.022
宫颈癌组 ($n = 144$)	74	70			80	64			106	38		

表 2 临床病理特征与宫颈癌组织中 Nek2、P-gp、GST- π 表达的关系 例

临床病理特征	例数	Nek2		χ^2 值	P 值	P-gp		χ^2 值	P 值	GST- π		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性			阴性	阳性			阴性	阳性		
年龄													
≤40 岁	23	11	12			12	11			3	20		
40~60 岁	96	42	54	5.710	0.056	37	59	4.360	0.113	28	68	2.520	0.283
≥60 岁	25	17	8			15	10			7	18		
组织学类型													
鳞癌	136	64	72	2.360	0.241	60	76	0.110	0.745	36	100	0.010	0.927
腺癌	8	6	2			4	4			2	6		
临床分期													
I+II	95	40	55	4.730	0.030	41	54	0.180	0.665	26	69	0.140	0.710
III+IV	49	30	19			23	26			12	37		
组织学分级													
I 级	97	57	40			42	55			26	71		
II 级	46	12	34	14.40	0.001	21	25	1.330	0.515	12	34	0.370	0.831
III 级	1	1	0			1	0			0	1		
浸润深度													
≤4 cm	22	11	11	0.020	0.887	7	15	1.680	0.195	5	17	0.180	0.672
>4 cm	122	59	63			57	65			33	89		
CK													
阳性	15	7	8	0.030	0.874	5	10	0.840	0.522	2	13	1.470	0.225
阴性	129	63	66			59	70			36	93		
CK14													
阳性	7	2	5	1.180	0.184	3	4	0.010	0.931	1	6	0.560	0.456
阴性	137	68	69			61	76			37	100		
CEA													
阳性	10	5	5	0.010	0.927	3	7	0.910	0.533	2	8	0.230	0.918
阴性	134	65	69			61	73			36	98		
P16													
阳性	9	4	5	0.070	0.796	4	5	0.010	0.943	1	8	1.150	0.280
阴性	135	66	69			60	75			37	98		
存活时间													
<5 年	21	8	13	1.090	0.297	13	8	3.040	0.081	7	14	0.060	0.435
≥5 年	123	62	61			51	72			31	92		

表 3 宫颈癌组织中 Nek2 与 P-gp、GST- π 表达的相关性 例

组别	P-gp		r 值	P 值	GST- π		r 值	P 值
	阳性	阴性			阳性	阴性		
Nek2 阳性	43	17	0.193	0.044	58	16	0.207	0.032
Nek2 阴性	37	33			32	22		

3 讨论

Nek2 是有丝分裂酶第三家族中与丝 / 苏氨酸蛋白激酶相关蛋白激酶同源性最高的基因。*Nek2* 通过参与调节中心体和染色质凝缩及分离, 直接干扰染色体, 在整个基因组的稳定中发挥至关重要的作用, 同时可促使细胞恶性转化, 参与肿瘤的发生、发展及浸润^[6]。本实验中发现, *Nek2* 在癌组织中的表达明显高于慢性宫颈炎非癌组织, 差异有统计学意义, 与 HAYWARD 等^[7]的研究结果相似。说明 *Nek2* 是一个危险因素, 对促进肿瘤进展, 宫颈鳞癌的恶性转化可能具有一定的意义。另外, 耐药基因 *P-gp*、*GST-π* 在宫颈癌组织中表达较高, 均高于慢性宫颈炎非癌组织, 提示耐药基因的高表达可能在宫颈癌癌变耐药的产生过程中发挥重要作用。

在对宫颈癌 *Nek2*、*P-gp*、*GST-π* 蛋白临床病理特征的研究中发现, *P-gp*、*GST-π* 的表达与患者年龄、组织学类型、临床分期、组织学分级无关, 与郭慈仁^[8]和高波等^[9]研究结果一致。在宫颈癌中 *Nek2* 的表达随组织学分级及临床分期的增高而升高, 其与年龄、组织学类型、浸润深度、CK、CK14、CEA、P16、生存时间无关, 说明该基因的表达除组织学分级及临床分期外是独立于病理特征之外的因素, 并不能充分反映与恶性程度的相关关系, 并且可能需与其他因素共同作用才能影响肿瘤细胞癌变的发展程度。其与宫颈癌患者预后之间的关系是否可以作为宫颈癌独立的预后指标, 还需要进一步研究。

另外, 研究表明, *Nek2* 基因的过表达可显著增强将化疗药物泵出细胞外的蛋白质活性, 从而产生耐药性^[9]。而 *P-gp* 是多药耐药基因 *MDR-1* 的编码产物, 经 ATP 水解供能将药物主动转运出胞外, 最终导致肿瘤耐药^[10]。*GST-π* 是一种多功能药物代谢酶, 通过促进化疗药物与谷胱甘肽结合而产生耐药, 与肿瘤细胞的多药耐药关系最为密切^[11]。*Nek2* 基因与 *P-gp*、*GST-π* 呈正相关 ($P < 0.05$), 可能共同调节宫颈癌的癌变, 并在耐药方面具有联合促进作用。

综上所述, *Nek2* 是新发现的基因, 广泛高表达于多种肿瘤, 在调节肿瘤细胞生长中发挥重要功能^[12]。学者 LIU 等^[13]认为, *Nek2* 在卵巢癌的耐药方面扮演重要角色, 并可能成为主要的治疗靶点。而在宫颈癌组织 *Nek2* 表达与临床病理参数间的关系, 及与公认的 *P-gp*、*GST-π* 多药耐药基因表达的相关性研究鲜有报道。本研究中, *Nek2*、*P-gp*、*GST-π* 在宫颈癌

组织中表达异常, 且 *Nek2* 与 *P-gp*、*GST-π* 呈正相关, 提示 *Nek2* 的表达异常与 *P-gp*、*GST-π* 介导的多药耐药在宫颈癌的化疗耐药中发挥协同作用, 可能共同参与宫颈癌的发生、发展, 为肿瘤耐药机制的探索提供实验依据。

参 考 文 献:

- [1] JUSTIN O, PARKHURST, MADHULIKA V, et al. Cervical cancer and the global health agenda: InsignB from multiple policy-analysis frameworks [J]. *Global Public Health*, 2013, 8 (10): 1093-1108.
- [2] 余辉, 吴楠, 王树鹤, 等. 宫颈癌新辅助化疗临床疗效评价 [J]. *河北医学*, 2014, 20(4): 611-614.
- [3] 郭慈仁, 陈桂林, 黄燕玲, 等. *P-gp*、*GST-π* 和 *Topo II* 在巨块型宫颈癌中的表达及其与新辅助化疗的关系 [J]. *疑难病杂志*, 2013, 12(2): 120-123.
- [4] LEE J, GOLLAHON L. *Nek2*-targeted ASO or siRNA pre-treatment enhances anticancer drug sensitivity in triple negative breast cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(3): 839-847.
- [5] FRY A M. The *Nek2* protein kinase: a novel regulator of centrosome-structure [J]. *Oncogene*, 2002, 21(40): 6184-6194.
- [6] DAS T K, DANA D, PAROLY S S, et al. Centrosomal Kinase *Nek2* cooperates with oncogenic pathways to promote metastasis [J]. *Oncogenesis*, 2013, 2(9), DOI: 10.1038/oncsis.2013.34.
- [7] HAYWARD D G, NEWBATT Y, PICKARD L, et al. Identification by highthroughput screening of viridin analogs as biochemical and cellbased inhibitors of the cell cycle-regulated *Nek2* kinase [J]. *J Biomol Screen*, 2010, 15(8): 918-927.
- [8] 高波, 陶建蜀, 李海平, 等. 宫颈癌中 *MRP*、*GST-π* 的表达及意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(10): 2151-2153.
- [9] ZHOU W, YANG Y, XIA J, et al. *NEK2* induces drug resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(1): 48-62.
- [10] BAUMERT C, GTINTEL M, KRAWCZYK S, et al. Development of small molecule *P-gp* inhibitors of the *N*-benzyl 1, 4-dihydropyridine type: novel aspects in SAR and bioanalytical evaluation of multidrug resistance (MDR) reversal properties [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(1): 166-177.
- [11] 黄建军, 杨海松. 新辅助化疗对乳腺癌 *C-erbB-2*、*P53*、*P-gp*、*GST-π* 表达的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(2): 208-211.
- [12] NISCHALKE H D, SCHMITZ V, LUDA C, et al. Detection of *IGF2BP3*, *HOXB7*, and *NEK2* mRNA expression in brush cytology specimens as a new diagnostic tool in patients with biliary strictures [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8), DOI: 10.1371/journal.pone.0042141.
- [13] LIU X, GAO Y, LU Y, et al. Upregulation of *NEK2* is associated with drug resistance in ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(2): 745-754.

(童颖丹 编辑)