

• 论 著 •

上皮性卵巢癌 P53、Livin 和 PARP 表达检测及其对卵巢癌化疗耐药、临床预后的影响研究*

贾敏利¹, 宋晓彤^{2△}

(1. 北京首都国际机场医院检验科, 北京 100621; 2. 北京大学肿瘤医院暨北京市
肿瘤防治研究所输血科, 北京 100142)

摘要:目的 探讨 P53、Livin 和多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)在上皮性卵巢癌中的表达, 以及与卵巢癌化疗耐药和临床预后间的相关性。方法 选取 2011 年 1 月至 2015 年 6 月北京首都国际机场医院妇科经手术病理检查证实的上皮性癌卵巢患者 74 例为研究对象。对患者进行随访, 根据复发情况分为化疗敏感组与化疗耐药组, 对比两组间的耐药基因表达情况及生存率, 并对生存时间的影响因素进行分析。结果 P53、Livin 和 PARP 在化疗敏感组的阳性率分别为 47.1%、56.9%、52.9%, 在化疗耐药组的阳性率分别为 73.9%、95.7%、95.7%, 组间比较各项在化疗敏感组的阳性率均低于化疗耐药组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。化疗敏感组中位生存时间 52.0 个月, 其 3 年、5 年累计生存率分别为 68.63% 和 41.18%, 化疗耐药组中位生存时间 31.5 个月, 3 年、5 年生存率分别为 47.83% 与 26.10%, 组间比较化疗敏感组的各期生存率均高于化疗耐药组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。将年龄、病理分化程度、临床分期、化疗敏感程度引入 Cox 回归模型, 临床分期、化疗敏感程度对生存时间有显著影响($P<0.05$)。结论 P53、Livin 和 PARP 的表达均与上皮性卵巢癌患者的化疗耐药性相关, 因此可用来预测患者的化疗疗效, 对于耐药基因高表达的患者, 可给予个性化的治疗方案, 以改善患者预后。

关键词: 上皮性卵巢癌; 化疗耐药; 临床预后
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.008 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2017)04-0452-03

Expression of P53, Livin and PARP in epithelial ovarian cancer and its impact on chemotherapy resistance and clinical prognosis*

JIA Minli¹, SONG Xiaotong^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Capital International Airport Hospital, Beijing, 100621, China;
2. Department of Blood Transfusion, Tumor Hospital of Beijing University/Tumor
Institute of Tumor Prevention and Treatment, Beijing 100142, China)

Abstract: Objective To explore the expression of P53, Livin and PARP in epithelial ovarian cancer and its correlation with the chemotherapy resistance and clinical prognosis. **Methods** Seventy-four specimens of epithelial ovarian cancer confirmed by operation and pathology in the gynecology department of our hospital from January 2009 to June 2011 were selected, followed up and divided into chemotherapy sensitivity group and chemotherapy resistance group according to the recurrence condition. The difference of drug resistance genes, survival rate and influencing factors of survival time were compared between the two groups. **Results** The positive rates of P53, Livin and PARP in the chemotherapy sensitivity group were 47.1%, 56.9% and 52.9% respectively, which in the chemotherapy resistance group were 73.9%, 95.7% and 95.7% respectively, the sensitivity rate of each item in the chemotherapy sensitivity group was lower than that in the chemotherapy resistance group($P<0.05$). The median survival time in the survival rate in the chemotherapy sensitivity group was 52.0 months, its 3-year and 5-year survival rates were 68.63% and 41.18% respectively, the medium survival time in the chemotherapy resistance group was 31.5 months, its 3-year and 5-year survival rates were 47.83% and 26.10% respectively, the survival rate of various stages in the chemotherapy sensitivity group was higher than that in the chemotherapy resistance group, the difference was statistically significant($P<0.05$). The age, pathological differentiation degree, clinical staging and chemotherapy sensitivity degree were introduced into the Cox regression model, the clinical staging and chemotherapy sensitivity degree had significant influence on the survival time($P<0.05$). **Conclusion** The expression of P53, Livin and PARP is correlated with the chemotherapy resistance in the patients with epithelial ovarian cancer, therefore, which can be used to predict the chemotherapeutic effect. For the patients with high expression of drug resistance genes, the personalized coping scheme may be given for improving the patient's prognosis.

Key words: epithelial ovarian cancer; chemotherapy resistance; clinical prognosis

卵巢癌在女性生殖系统中的发病率仅次于宫颈癌和宫体癌, 居第 3 位^[1]。由于卵巢位于盆腔的深部, 因此早期症状不

明显, 70% 的患者在确诊时已属晚期, 病死率较高^[2]。虽然近年来随着紫杉醇的问世, 以及与铂类的联合应用, 上皮性卵巢

* 基金项目: 2016 年度北京市自然科学基金项目(7163148)。
作者简介: 贾敏利, 女, 主管技师, 主要从事生化研究。 △ 通信作者, E-mail: 13651159117@163.com。

癌的疗效获得了改善,但总体 5 年生存率仍未见提升,究其原因主要在于化疗耐药性的产生^[3]。化疗耐药是由多因素、多水平、多基因参与的复杂过程,多种抑癌基因在其发生发展中发挥着重要作用^[4]。本研究通过免疫组织化学技术从蛋白水平上分析 P53、Livin 和多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)等在临床化疗敏感组与临床化疗耐药组间的表达差异,探讨各基因在上皮性卵巢癌组织中的表达以及与卵巢癌化疗耐药及预后间的关系,而为卵巢癌治疗开辟新的靶点。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月至 2015 年 6 月本院妇科经手术病理检查证实的上皮性卵巢癌患者 74 例为研究对象。患者 26~73 岁,平均(56.32±4.24)岁;FIGO 分期:Ⅰ~Ⅱ期 19 例,Ⅲ~Ⅳ期 55 例;低分化 14 例,中分化 29 例,高分化 31 例;患者主要以腹胀、腹痛、阴道不规则出血等为首发症状。所有患者均于本院行早期全面分期手术或肿瘤细胞减灭术,术后行以铂类为基础的规范化疗。对患者进行随访,根据复发情况分为化疗敏感组(化疗后达到临床缓解,停用化疗 6 个月以后出现复发)51 例,化疗耐药组(化疗结束 6 个月内复发)23 例。

1.2 仪器与试剂 兔抗人 P53 单克隆抗体、兔抗人 Livin 多克隆抗体、兔抗人 PARP 多克隆抗体购自美国 abcom 公司;酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物购自福州迈新生物技术开发有限公司;SP 通用型免疫组化试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化方法 标本经多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μm 连续切片,脱蜡,灭活内源性过氧化物酶,孵育 10 min, PBS 冲洗;切片上滴加稀释的一抗(兔抗人 P53 单克隆抗体 1:100,兔抗人 Livin 多克隆抗体 1:150,兔抗人 PARP 多克隆抗体 1:120),室温下孵育 60 min, PBS 冲洗;滴加酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物, DAB 显色,苏木精复染,脱水透明封片。以同期住院的良性卵巢肿瘤患者病变组织标本作为对照,阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.3.2 结果判定 光镜下进行观测,观察时每张切片选取 5 个高倍视野,每个视野计数细胞 100 个细胞。(1)P53:以细胞浆呈清晰棕黄色为阳性,计算 5 个视野的平均阳性染色细胞百分比,<10%为阴性,≥10%为阳性。(2)Livin 和 PARP:按照观察视野中阳性细胞所占的百分比例进行评分,≤5%时为 0 分,5%~<25%为 1 分,25%~<50%为 2 分,50%~<75%为 3 分,≥75%时为 4 分。按照染色强度进行评分,0 分为阴性(无色),1 分为弱阳性(黄色),2 分为中等阳性(棕黄色),3 分为强阳性(黄褐色)。最后按两者乘积将标本的阳性反应分成 4 个等级,分别为阴性:1 级(0、1、2),弱阳性:2 级(3、4),中度阳性:3 级(6、8),强阳性:4 级(9、12)。两者相乘得分≥3 分时为阳性表达,<3 分时为阴性表达。同时以阳性切片为阳性对照,阴性对照以 PBS 代替一抗。结果判断由 2 人独立进行,综合评分,对于某结果两人分歧较大时,则进行第三人确认,以减少人为误差。

1.4 统计学处理 应用 SPSS20.0 软件进行数据处理,组间率的比较采用卡方检验,多因素分析采用 Cox 回归模型,以 α=0.05 作为检验水准,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P53、Livin 和 PARP 在化疗耐药组和化疗敏感组间的阳

性率比较 P53、Livin 和 PARP 在化疗敏感组的阳性率分别为 47.1%、56.9%和 52.9%,在化疗耐药组的阳性率分别为 73.9%、95.7%和 95.7%,组间比较各项在化疗敏感组的阳性率均低于化疗耐药组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1。P53、Livin、PARP 在卵巢癌组织中的阴性与阳性表达见图 1~3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 化疗敏感组和化疗耐药组间生存率比较 随访患者时间最短 7 个月,最长 62 个月,在此期间敏感组失访 6 例,耐药组失访 2 例。化疗敏感组中位生存时间 52.0 个月,其 3 年、5 年累计生存率分别为 68.63%和 41.18%,化疗耐药组中位生存时间 31.5 个月,3 年、5 年生存率分别为 47.83%与 26.10%,组间比较化疗敏感组的各期生存率均高于化疗耐药组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 2。

表 1 P53、Livin 和 PARP 在化疗敏感组和化疗耐药组间的阳性率比较[n(%)]

组别	n	P53	Livin	PARP
化疗敏感组	51	24(47.1)	29(56.9)	27(52.9)
化疗耐药组	23	17(73.9)	22(95.7)	22(95.7)
χ ²		4.627	11.134	12.926
P		0.031	0.001	<0.001

表 2 化疗敏感组和化疗耐药组间生存率比较				
组别	n	中位生存时间 (个月)	3 年生存率 [n(%)]	5 年生存率 [n(%)]
化疗敏感组	51	52.0	35(68.63)	21(41.18)
化疗耐药组	23	31.5	11(47.83)	6(26.10)
χ ²			4.541	1.557
P			0.033	0.212

2.3 生存时间影响因素分析 将年龄、病理分化程度、临床分期、化疗敏感程度引入 COX 回归模型,分析上述因素对生存时间的影响,结果显示,临床分期、化疗敏感程度对生存时间有显著影响(P<0.05),是影响临床预后的重要因素。见表 3。

表 3 Cox 多因素回归分析相关参数					
因素	β	SE	RR	95%CI	P
临床分期	0.587	0.473	4.984	3.744~9.976	0.003
化疗敏感程度	0.403	0.293	2.827	1.474~5.659	0.005

3 讨论

肿瘤的发生涉及癌基因的激活、抑癌基因的失活、细胞凋亡与增殖失调等多因素的参与。目前卵巢癌的主要治疗方式为卵巢癌全面分期手术或肿瘤细胞减灭术,并辅以术后的规范化疗,但多数患者会因化疗耐药导致治疗失败,目前卵巢癌的 5 年生存率仅为 20%~30%^[5]。

P53 是最早被发现的抑癌基因,在大多数恶性肿瘤中均会发现 P53 的突变。研究发现,P53 与肿瘤细胞的化疗耐药相关^[6]。Livin 基因是凋亡抑制蛋白家族的一员,主要参与细胞凋亡的调控,促进了细胞的增殖,而细胞凋亡受阻同时增殖过度是形成肿瘤的重要机制^[7]。PARP 的主要作用是 DNA 损伤修复,以维持遗传信息的稳定性,当其减少时,DNA 修复功能

缺失,过高时则通过增强细胞的修复功能造成了肿瘤细胞的抗药性^[8]。研究发现 PARP 表达过高均可导致肿瘤耐药^[9]。本组病例中,化疗敏感组的 P53、Livin 和 PARP 的阳性率显著低于化疗耐药组,同时 3 年、5 年生存率明显高于化疗耐药组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与上述观点相一致。将年龄、病理分化程度、临床分期、化疗敏感程度引入 Cox 回归模型,结果显示,临床分期、化疗敏感程度对生存时间有显著影响,差异有统计学意义($P<0.05$),是影响临床预后的重要因素,提示虽然卵巢癌的预后受到多种因素的影响,但在众多因素的相互作用中某一因素会被弱化^[10]。而临床分期与化疗敏感程度却是明确的可影响卵巢癌预后的独立因素,提示疾病的早期诊断、早期治疗是提高卵巢癌生存率的极为重要的因素。

综上所述,P53、Livin 和 PARP 的表达均与上皮性卵巢癌患者的化疗耐药性相关,因此可用来预测患者的化疗疗效,对于耐药基因高表达的患者,可给予个性化的应对方案,以减少化疗伤害,提高患者的生存率。

参考文献

[1] 李淑青,陈亚萍. 卵巢癌对顺铂和紫杉醇耐药的分子机制[J]. 国际妇产科学杂志,2016,30(2):145-150.

[2] 韦露薇,李力. 上皮性卵巢癌多药耐药相关信号传导通路及其靶向药物研究进展[J]. 中国肿瘤临床,2016,38(9):396-399.

[3] Aarenstrup K, Høgdall C, Nedergaard L, et al. HE4 as a predictor of adjuvant chemotherapy resistance and survival in patients with epithelial ovarian cancer[J]. APMIS, 2016,124(12):1038-1045.

[4] 齐新颖. LRP、GST- π 表达与上皮性卵巢癌铂类化疗耐药及预后的关系[D]. 石家庄:河北医科大学,2015.

(上接第 451 页)

体的技术已日渐成熟,对于不具备肾脏病理诊断的医院,血清学检测抗 PLA₂R 抗体无疑更有利于临床诊断膜性肾病,如抗 PLA₂R 抗体阳性,则不必行肾组织活检,也可减轻患者经济负担;如阴性再建议患者行有创的肾脏检查以明确病因。对于行肾组织活检有风险的患者则获益更多。定量检测不仅可用于诊断,同时可用于病情监测与疗效判断。

参考文献

[1] Beck LJ, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med, 2009, 361(1):11-21.

[2] Hoxha E, Harendza S, Zahner G, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A₂-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(8):2526-2532.

[3] 刘琳,陈丽萌,李学旺. 特发性膜性肾病与 M 型磷脂酶 A2 受体的研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(9):792-794.

[4] 牛广华,高玉洁,王柏山,等. 磷脂酶 A2 受体抗体在特发

[5] Wang Y, Li M, Meng F, et al. HPIP expression predicts chemoresistance and poor clinical outcomes in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Hum Pathol, 2006, 27(16):30286.

[6] Xu CX, Xu M, Tan L, et al. MicroRNA MiR-214 regulates ovarian cancer cell stemness by targeting p53/Nanog[J]. J Biol Chem, 2016, 291(43):22851.

[7] Mangerich A, Biirke A. How to kill tumor cells with inhibitors of poly (ADP-ribosyl) ation[J]. Int J Cancer, 2011, 128(2):251-265.

[8] 周莹莹,王敏,吴建磊,等. 耐药及敏感卵巢癌组织与细胞系中 microRNA 的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志,2014,37(3):197-202.

[9] Liu X, Wang A, Gao H, et al. Expression and role of the inhibitor of apoptosis protein livin in chemotherapy sensitivity of ovarian carcinoma [J]. Int J Oncol, 2012, 41(3):1021-1028.

[10] Zanjirband M, Edmondson RJ, Lunec J. Pre-clinical efficacy and synergistic potential of the MDM2-p53 antagonists, Nutlin-3 and RG7388, as single agents and in combined treatment with cisplatin in ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(26):40115-40134.

(收稿日期:2016-10-23 修回日期:2016-12-14)



性膜性肾病中的诊断价值[J]. 中华检验医学杂志,2015, 38(9):595-599.

[5] 杨雪芬,潘阳彬,丁国华,等. 成人特发性膜性肾病与分泌型磷脂酶 A2-IB 及抗磷脂酶 A2 受体抗体的相关性研究[J]. 中国全科医学,2015,18(9):1018-1022.

[6] 周广宇,孙延霞,周立祥,等. 特发性膜性肾病与 M 型磷脂酶 A2 受体基因多态性的相关性[J]. 中华肾脏病杂志, 2013,29(1):1-5.

[7] 曹鹏龙,李士军,王柏山,等. 血清抗 M 型磷脂酶 A2 受体抗体与成人特发性膜性肾病的相关性[J]. 实用医学杂志,2014,30(15):2441-2444.

[8] 朱涛,赵涌,彭梦乐,等. 特发性膜性肾病患者血清抗 PLA2R 抗体表达研究[J]. 现代检验医学杂志,2016,31(3):4-6.

[9] 林力,陈楠. 磷脂酶 A2 受体抗体在膜性肾病临床诊治中的新进展[J]. 中华肾脏病杂志,2015,31(8):632-635.

[10] 林伟峰,李航,李雪梅,等. 抗磷脂酶 A2 受体抗体与特发性膜性肾病的关系[J]. 中华内科杂志,2015,54(9):783-788.

(收稿日期:2016-10-21 修回日期:2016-12-12)