

[文章编号] 1674-8115(2011)02-0203-05

· 论 著 ·

PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 在子宫内膜样腺癌中的表达和相关性研究

冯振中^{1,2}, 陈嘉薇¹, 杨兆瑞¹, 路光中¹, 蔡兆根²

(1. 上海交通大学附属第一人民医院病理科, 上海 200080; 2. 蚌埠医学院病理学教研室, 蚌埠 233030)

[摘要] **目的** 探讨 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 蛋白的异常表达在子宫内膜样腺癌发生、侵袭和转移中的作用及意义。**方法** 采用免疫组织化学方法, 结合组织芯片技术, 检测 124 例 I 型子宫内膜癌、28 例内膜不典型增生、35 例正常内膜组织中 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 的表达水平, 结合临床病理因素进行分析。**结果** PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 在子宫内膜样腺癌中的阳性表达率分别为 29.8%、61.3%、52.4%, 与正常内膜组和不典型增生组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。PTEN 表达下调和 NDRG1 过度表达与肿瘤分化程度明显相关 ($P < 0.05$), HIF-1 α 蛋白表达与肿瘤分化、肌层浸润和淋巴结转移明显相关 ($P < 0.05$)。子宫内膜样腺癌组织中 PTEN 和 HIF-1 α 和 NDRG1 的表达存在负相关关系 ($r = -0.314$, $P < 0.01$, $r = -0.296$, $P = 0.001$), 而 HIF-1 α 蛋白与 NDRG1 的表达正相关 ($r = 0.237$, $P = 0.008$)。**结论** PTEN 缺失可能上调 HIF-1 α 和 NDRG1 蛋白的表达, 在子宫内膜样腺癌发生、侵袭和转移中起重要作用, 联合检测对于判断子宫内膜癌的恶性程度和预后有重要意义。

[关键词] 子宫内膜癌; 第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因; 缺氧诱导因子-1 α ; N-myc 下游调节基因 1; 组织芯片

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.02.019

[中图分类号] R737.33

[文献标志码] A

Expression of PTEN, HIF-1 α and NDRG1 in endometrioid carcinoma and their correlations

FENG Zhen-zhong^{1,2}, CHEN Jia-wei¹, YANG Zhao-rui¹, LU Guang-zhong¹, CAI Zhao-gen²(1. Department of Pathology, The First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China;
2. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of aberrant expression of PTEN, HIF-1 α and NDRG1 protein in the pathogenesis and progression of endometrioid carcinoma. **Methods** Tissue microarray and immunohistochemical staining were employed to detect the expression of PTEN, HIF-1 α and NDRG1 in tissues of type I endometrial carcinoma ($n = 124$) and atypical hyperplasia ($n = 28$) and normal endometrial tissues ($n = 35$). The relationship among the markers, as well as their correlations with clinicopathological features were evaluated. **Results** The expression of PTEN, HIF-1 α and NDRG1 in tissues of endometrioid carcinoma was 29.8%, 61.3% and 52.4%, respectively, and was significantly different from that in tissues of atypical hyperplasia and normal endometrial tissues ($P < 0.01$). The downregulation of expression of PTEN and overexpression of NDRG1 were significantly related to the tumor differentiation ($P < 0.05$), and the expression of HIF-1 α protein was significantly related to the tumor differentiation, myometrial invasion and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of PTEN was negatively related to that of HIF-1 α and NDRG1 in tissues of endometrioid carcinoma ($r = -0.314$, $P < 0.01$, $r = -0.296$, $P = 0.001$), and the expression of HIF-1 α protein was positively related to that of NDRG1 ($r = 0.237$, $P = 0.008$). **Conclusion** The absence of PTEN may upregulate the expression of HIF-1 α and NDRG1 protein, which may be involved in the pathogenesis and progression of endometrioid carcinoma, and the combined detection of these markers is of great value in the prediction of tumor behavior and prognosis.

[Key words] endometrial cancer; phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10; hypoxia inducible factor-1 α ; N-myc downstream regulated gene 1; tissue microarray

[作者简介] 冯振中(1975—), 男, 副教授, 博士; 电子信箱: fzz1976@sina.com。

[通信作者] 陈嘉薇, 电子信箱: jiaweichen2000@sina.com。

子宫内膜癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,严重威胁女性健康,发病率有逐渐上升趋势^[1],2009年度美国新诊断患者42 160例,死亡7 780例^[2]。因此,寻找能有效判断肿瘤生物学行为和临床预后的分子标志物,是近年来妇科肿瘤研究的热点问题。

第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10, PTEN)是目前发现的唯一具有双磷酸酯酶活性的抑癌基因,突变或缺失参与多种肿瘤的发生、发展过程,尤其在子宫内膜样腺癌中突变率最高,达到50%~83%^[3]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是缺氧状态下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,高表达与肿瘤的细胞增殖、新生血管生成、侵袭和转移等多种恶性生物学行为密切相关^[4]。除缺氧外,某些抑癌基因,包括PTEN的突变也会影响HIF-1 α 及其靶基因的表达。N-myc下游调节基因1(N-myc downstream regulated gene 1, NDRG1)是一种与细胞增殖和分化相关的基因^[5],在人体多种组织中均有表达,并参与肿瘤的发生、发展和转移,但确切功能尚不完全清楚。本课题组前期研究发现^[6],在子宫内膜癌肿瘤坏死区域的周围,NDRG1蛋白的表达高于一般肿瘤组织,提示缺氧可能调控NDRG1基因的表达。迄今为止,PTEN、HIF-1 α 和NDRG1在子宫内膜癌中的表达和调控关系还未见相关报道。本研究采用免疫组织化学方法,结合组织芯片技术,初步探讨PTEN调控HIF-1 α 和NDRG1表达在子宫内膜癌发生演变中的作用,为判断预后及临床治疗提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

标本取自上海交通大学附属第一人民医院病理科2005年1月—2009年9月手术切除并经病理检查证实的子宫内膜癌患者,共124例,年龄27~81岁,平均年龄57岁。根据2000年国际妇产科联盟标准,TNM分期为I~II期101例,III~IV期23例。根据2003年世界卫生组织标准,病理分级为高分化57例,中分化41例,低分化26例。肌层浸润>50%者40例, \leq 50%者84例。有淋巴结转移者31例,无转移者93例。所有患者术前均未接受放疗、化疗,具有完整临床资料,所有肿瘤标本均为

I型子宫内膜癌(子宫内膜样腺癌)。

子宫内膜不典型增生病例28例(单纯性不典型增生3例,复杂性不典型增生25例)。正常子宫内膜35例(增生期16例,分泌期19例),分别取自妇科活检和子宫平滑肌瘤的内膜组织。

1.2 主要试剂

鼠抗人单克隆PTEN抗体(Antibody Diagnostica公司,工作浓度1:60);兔抗人多克隆HIF-1 α 抗体(Abcam公司,工作浓度1:75);鼠抗人单克隆NDRG1抗体(Santa Cruz公司,工作浓度1:100);Ultra-Sensitive试剂盒和DAB显色液(福州迈新生物技术有限公司);SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 组织芯片制作

选择所需病例存档蜡块,根据HE染色切片仔细进行形态学观察,确定具有代表性的病变部位并标记,参照文献[7]制备组织芯片(上海芯超生物有限公司技术支持)。

1.4 实验方法

PTEN、HIF-1 α 采用SP两步免疫组织化学染色法,NDRG1采用SABC免疫组织化学染色法。实验步骤严格按照说明书进行。PBS代替一抗为阴性对照,已知阳性切片为阳性对照。

1.5 结果判断

HIF-1 α 蛋白主要定位于细胞核,部分伴有胞质着色,NDRG1蛋白主要定位于细胞质,以子宫内膜腺上皮细胞内出现定位明确、染色明显的样本为阳性,判定标准^[8-9]:①阳性细胞率: \leq 5%为0,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分;②染色强度:无色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。两者乘积<2分为阴性, \geq 2分为阳性表达。

PTEN判定标准^[10]:PTEN蛋白定位于细胞核,子宫内膜组织中出现一个或多个明确的腺体表达缺失,即使周围腺体呈阳性表达,也判定为PTEN表达阴性。

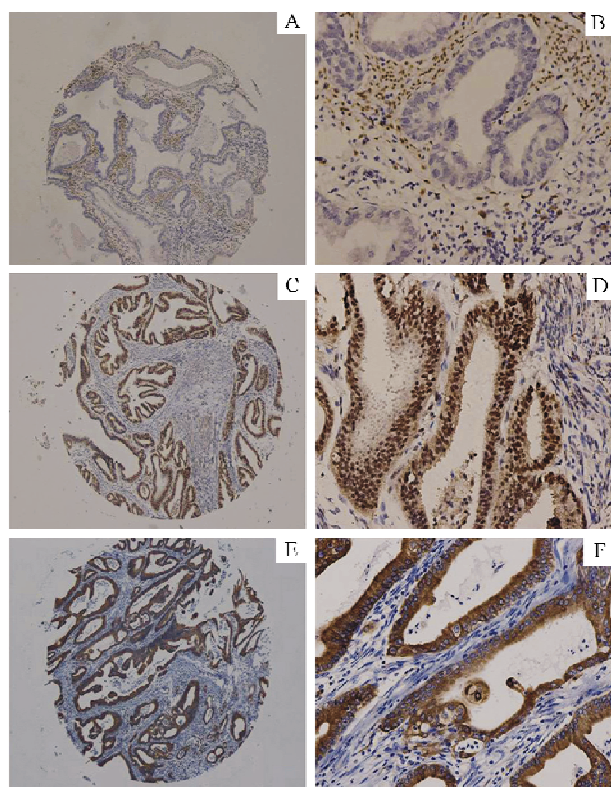
1.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件。计数资料率的比较采用 χ^2 检验或Fisher精确检验,相关关系采用Spearman等级相关分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PTEN, HIF-1 α 和 NDRG1 蛋白在不同内膜组织中的表达

PTEN 在正常内膜中表达率最高 88.6% (31/35), 在不典型增生内膜和子宫内膜样腺癌中明显降低, 分别为 57.1% (16/28) 和 29.8% (37/124) ($P < 0.01$) (图 1A、B)。HIF-1 α 和 NDRG1 蛋白的表达呈相反趋势, 随着子宫内膜恶性转变过程, 阳性率逐渐增高, 在子宫内膜样腺癌中分别达到 61.3% (76/124)、52.4% (65/124) ($P < 0.01$) (图 1C ~ F), 但 HIF-1 α 蛋白的表达在正常组和不典型增生组之间无明显差异 ($P = 0.409$) (表 1)。



A、B: PTEN 在子宫内膜样腺癌中阴性表达, 间质细胞呈阳性, SP 法, A $\times 40$, B $\times 200$; C、D: HIF-1 α 在子宫内膜样腺癌中阳性表达, SP 法, C $\times 40$, D $\times 200$; E、F: NDRG1 在子宫内膜样腺癌中阳性表达, SABC 法, E $\times 40$, F $\times 200$ 。

图 1 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 在子宫内膜样腺癌中的表达

Fig 1 Expression of PTEN, HIF-1 α and NDRG1 in endometrioid carcinoma

2.2 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 表达与子宫内膜样腺癌临床病理因素的关系

子宫内膜样腺癌中 PTEN 的缺失、NDRG1 的阳性表达与肿瘤细胞分化程度明显相关 ($P < 0.05$), 但

与其他临床病理指标无明显关系。HIF-1 α 蛋白与肿瘤分化、肌层浸润和淋巴结转移明显相关 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.3 子宫内膜样腺癌中 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 的相关性

87 例 PTEN 阴性的肿瘤组织中, 62 例 HIF-1 α (71.3%, 62/87)、54 例 NDRG1 (62.1%, 54/87) 阳性表达, 而 37 例 PTEN 阳性标本, 仅有 14 例 HIF-1 α (37.8%, 14/37)、11 例 NDRG1 (29.7%, 11/37) 阳性表达, PTEN 与 HIF-1 α 和 NDRG1 两者均呈负相关关系 ($r = -0.314$, $P < 0.001$, $r = -0.296$, $P = 0.001$)。肿瘤中 HIF-1 α 和 NDRG1 蛋白在 47 例均阳性表达, 30 例均呈阴性, 两者呈正相关关系 ($r = 0.237$, $P = 0.008$) (表 3)。

表 1 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 蛋白在不同内膜组织中的表达 (n)

Tab 1 Expression of PTEN, HIF-1 α and NDRG1 protein in different endometrial tissues (n)

组别	N	PTEN		HIF-1 α		NDRG1	
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
正常内膜组	35	4	31	27	8	30	5
不典型增生组	28	12	16	19	9	17	11
子宫内膜癌组	124	87	37	48	76	59	65 ^①

^① $P < 0.01$ 与正常内膜组和不典型增生组比较。

表 2 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 表达与子宫内膜样腺癌临床病理指标的关系 (n)

Tab 2 Relationship between expression of PTEN, HIF-1 α and NDRG1 and clinicopathological features of endometrioid carcinoma (n)

指标	N	PTEN		HIF-1 α		NDRG1	
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
年龄							
<50 岁	29	21	8	10	19	13	16
≥ 50 岁	95	66	29	38	57	46	49
病理分级							
高分化	57	34	23	29	28	32	25
中分化	41	30	11	14	27	21	20
低分化	26	23	3 ^①	5	21 ^①	6	20 ^①
TNM 分期							
I + II	101	69	32	42	59	51	50
III + IV	23	18	5	6	17	8	15
肌层浸润							
$\leq 1/2$	84	61	23	39	45	36	48
$> 1/2$	40	26	14	9	31 ^②	23	17
淋巴结转移							
无	93	68	25	41	52	48	45
有	31	19	12	7	24 ^③	11	20

^① $P < 0.05$ 与高、中分化组比较; ^② $P < 0.05$ 与肌层浸润 $\leq 1/2$ 组比较; ^③ $P < 0.05$ 与无淋巴结转移组比较。

表3 子宫内膜样腺癌中 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 的相关性 (n)Tab 3 Relationship between expression of HIF-1 α and expression of PTEN and NDRG1 in endometrioid carcinoma (n)

HIF-1 α	N	PTEN		NDRG1	
		(-)	(+)	(-)	(+)
阴性	48	25	23	30	18
阳性	76	62	14	29	47

3 讨 论

由于肿瘤细胞的无限制性快速增生,必然会造成局部组织严重缺氧和代谢紊乱,所以缺氧是绝大多数恶性肿瘤,尤其是实体肿瘤的共有特征。HIF-1 是调节细胞内氧代谢的关键性作用因子,影响多种缺氧反应基因的转录和表达,促使肿瘤组织产生一系列缺氧适应反应,涉及细胞能量代谢、新生血管生成、侵袭和转移、离子代谢等过程。HIF-1 是由 α 和 β 亚基构成的异二聚体核转录因子,其中 HIF-1 α 是唯一的氧分子调节亚单位,决定 HIF-1 的活性。本实验中,免疫组织化学染色结果证实,HIF-1 α 蛋白在子宫内膜样腺癌中的阳性表达率明显高于正常和不典型增生内膜组织,并与肿瘤的分化程度、肌层浸润、淋巴结转移情况明显相关,说明 HIF-1 α 参与子宫内膜癌的发生、发展过程,其高表达与肿瘤的恶性程度、侵袭转移等生物学行为关系密切,与其他文献报道一致。Zhong 等^[11]对 179 例 19 种不同类型肿瘤标本研究发现,HIF-1 α 蛋白在 13 种肿瘤组织中过度表达,而对应的正常组织或良性肿瘤呈低度表达或不表达,原发性乳腺癌中仅有 29% 的样本 HIF-1 α 阳性表达,而 69% 的转移性乳腺癌高表达。Sun 等^[9]研究报道 HIF-1 α 在 70.7% 的胰腺癌中过度表达,并与肿瘤分期和淋巴结转移明显相关,阳性表达患者生存时间明显缩短,HIF-1 α 是独立的临床预后判断指标。

HIF-1 α 的表达和活性不仅与缺氧微环境有关,而且受到某些原癌基因激活和抑癌基因失活的调控。本研究发现,PTEN 基因在正常内膜组织中阳性率最高,不典型增生时表达率明显下降,在子宫内膜样腺癌中显著降低,并随着细胞恶性程度的增加、肿瘤分化水平的降低,阳性表达减少,而 HIF-1 α 蛋白在子宫内膜癌恶性演变过程中逐渐递增,与 PTEN 的递减趋势相反,两者在 I 型子宫内膜癌中呈明显负相关($r = -0.314$, $P < 0.01$)。Burrows 等^[12]研究结果显示:HIF-1 α 在甲状腺癌组织和肿瘤细胞株中高表

达,采用低氧(1% O₂) 或者氯化钴模拟低氧环境培养 FTC-133 肿瘤细胞,可进一步增加 HIF-1 α 的含量,转染野生型 PTEN 基因可有效降低肿瘤细胞内源性和诱导性的 HIF-1 α 过度表达,使用 PI3K/AKT 信号通路特异性抑制剂 LY294002,也能够抑制 HIF-1 α 的转录表达。PI3K/AKT 通路的活化不仅上调 HIF-1 α 的表达,还可以稳定 HIF-1 α 的蛋白水平^[13]。由于 PTEN 基因是 PI3K/AKT 信号通路的主要负性调控因子,结合上述文献,我们推测在子宫内膜样腺癌中 PTEN 基因的大量缺失或突变,导致 PI3K/AKT 信号传导途径失调,促进 HIF-1 α 及下游多种靶基因的转录和表达,从而提高子宫内膜癌细胞的恶性程度和侵袭转移能力。

NDRG1 基因是 1997 年由 van Belzen 等^[14]首先报道发现,定位于人染色体 8q24.3,编码相对分子质量为 43 000 的蛋白质。NDRG1 蛋白在人体组织中普遍存在,但大都表达于上皮组织,与细胞生长和分化、器官形成和胚胎发育等密切相关。NDRG1 能够被多种生理或病理因素刺激诱导表达,并参与肿瘤的发生、发展和转移,但研究结果并不一致,其表达与功能尚存在争议。本研究发现,NDRG1 蛋白的表达在从正常子宫内膜到不典型增生和子宫内膜癌的演变过程中明显递增($P < 0.01$),提示其在癌变过程中发挥重要的作用。目前有学者认为 NDRG1 在肿瘤组织中过度表达可能与实体瘤缺氧有关,缺氧诱导 NDRG1 在肿瘤组织中大量积聚。本实验结果也显示,在 76 例阳性的 HIF-1 α 标本中,有 61.8% (47/76) NDRG1 表达阳性,而 48 例 HIF-1 α 阴性的样本,仅有 37.5% (18/48) NDRG1 表达阳性,在子宫内膜样腺癌中,随着 HIF-1 α 的递增,NDRG1 蛋白明显增高,二者的表达呈显著的正相关($r = 0.237$, $P = 0.008$)。生物信息软件分析^[15]证实,在 NDRG1 启动子序列有 1 个 HIF-1 α 结合位点,3' 端非翻译区有 2 个 HIF-1 α 结合位点,表明 NDRG1 存在 HIF-1 α 调控的结构基础。Cangul 等^[16]采用短期缺氧处理多种不同肿瘤细胞株,观察对 NDRG1 表达的影响,发现在 HIF-1^{+/+} 细胞株,其 mRNA 水平和蛋白含量表达上调,恢复正常氧浓度后,蛋白水平仍保持至少 16 h 的升高状态,而在 HIF-1^{-/-} 细胞株,NDRG1 水平没有改变。以上结果提示,NDRG1 可能是新的 HIF-1 α 下游靶基因和目标蛋白,各种因素导致 HIF-1 α 在肿瘤组织中聚集,进一步诱导缺氧反应基因 NDRG1

的转录、过度表达,参与子宫内膜恶变的过程。

综上所述,PTEN 蛋白缺失可能通过激活 PI3K/AKT 通路,诱导 HIF-1 α 大量产生和 NDRG1 的过度表达,在子宫内膜样腺癌的发生、侵袭和转移中发挥重要作用,也为判断肿瘤的发展阶段和恶性程度提供了分子生物学指标。因此,联合检测 PTEN、HIF-1 α 和 NDRG1 蛋白的表达,将为子宫内膜癌的临床诊断、预后判断和以后的靶向治疗提供有意义的理论依据。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43-66.
- [2] Hubbard SA, Garrett CE. A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma[J]? Reproduction, 2010, 140(1): 23-32.
- [3] Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(11): 924-930.
- [4] Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(5): 1469-1480.
- [5] Ellen TP, Ke Q, Zhang P, et al. NDRG1, a growth and cancer related gene; regulation of gene expression and function in normal and disease states[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(1): 2-8.
- [6] Li S, Chen J, Yang Z, et al. N-myc downstream-regulated gene 1 as a down-regulated target gene of PTEN in the controlling of tumorigenesis in endometrioid carcinoma[J]. Indian J Med Res, 2008, 127(5): 453-459.
- [7] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens[J]. Nat Med, 1998, 4(7): 844-847.
- [8] Chen J, Li S, Yang Z, et al. Correlation between NDRG1 and PTEN expression in endometrial carcinoma[J]. Cancer Sci, 2008, 99(4): 706-710.
- [9] Sun HC, Qiu ZJ, Liu J, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and associated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and their impact on prognosis[J]. Int J Oncol, 2007, 30(6): 1359-1367.
- [10] Baak JP, Van Diernen B, Steinbakk A, et al. Lack of PTEN expression in endometrial intraepithelial neoplasia is correlated with cancer progression[J]. Hum Pathol, 2005, 36(5): 5555-5561.
- [11] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5830-5835.
- [12] Burrows N, Resch J, Cowen RL, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1a in thyroid carcinomas[J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17(1): 61-72.
- [13] Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression[J]. 2000, 14(4): 391-396.
- [14] van Belzen N, Dinjens WN, Diesveld MP, et al. A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms[J]. Lab Invest, 1997, 77(1): 85-92.
- [15] Said HM, Stein S, Hagemann C, et al. Oxygen-dependent regulation of NDRG1 in human glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncol Rep, 2009, 21(1): 237-246.
- [16] Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers[J]. BMC Genet, 2004, 5(1): 27-38.

[收稿日期] 2010-11-09

[本文编辑] 朱宝渊