

EN2 及 β -catenin 在卵巢癌组织中的表达及临床意义

宋 晨 王春莲 赵丽荣 王箴言 戴红英

摘要 **目的** 探讨卵巢癌组织中 Engrailed-2 (EN2) 及 β -catenin 蛋白的表达及临床意义。**方法** 收集笔者医院 2010 年 1 月~2013 年 12 月收治的卵巢肿瘤患者的病例资料共 110 例,其中卵巢癌 60 例,交界性肿瘤 28 例,良性肿瘤 22 例。采用免疫组织化学方法检测组织中 EN2 及 β -catenin 蛋白的表达情况,分析 EN2 及 β -catenin 的蛋白表达水平与患者临床病理特征之间的关系及 EN2 与 β -catenin 之间的相关性。**结果** 卵巢癌组织、交界性肿瘤组织中 EN2 及 β -catenin 蛋白的阳性表达率明显高于正常组织 ($P < 0.05$); EN2 及 β -catenin 蛋白在低分化卵巢癌中的阳性表达率明显高于高分化组 ($P < 0.05$); 早期 (I ~ II 期) 卵巢癌中 EN2 及 β -catenin 蛋白的阳性表达率与晚期 (III ~ IV 期) 卵巢癌比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),且 EN2 及 β -catenin 蛋白表达与患者年龄、卵巢癌类型及是否发生淋巴结转移无显著相关性 ($P > 0.05$); Spearman 等级相关性分析结果显示, EN2 及 β -catenin 在卵巢癌中的表达呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论** EN2 及 β -catenin 在卵巢癌组织中高表达,可能与卵巢癌的发生、发展相关。

关键词 卵巢癌 EN2 β -catenin 临床意义 相关性

中图分类号 R737.31

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.017

Expression and Clinical Significance of EN2, β -catenin in Ovarian Cancer. Song Chen, Wang Chunlian, Zhao Lirong, et al. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong 266100, China

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of Engrailed-2 (EN2) and β -catenin proteins in ovarian cancer tissues. **Methods** A total of 110 cases of ovarian tumor patients admitted in our hospital from January 2010 to December 2013 were collected, including 60 cases of ovarian cancer, 28 cases of borderline tumor, 22 cases of benign tumor. The expression of EN2 and β -catenin in tissues were detected by immunohistochemistry. The relationship between the protein expression levels of EN2 and β -catenin and clinical pathological features was analyzed, and the correlation between EN2 and β -catenin was further analyzed. **Results** The positive expression rates of EN2 and β -catenin in ovarian cancer tissues and borderline tumor tissues were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The positive expression rate of EN2 and β -catenin in low differentiated ovarian cancer tissues was significantly higher than that in the high differentiated ovarian cancer tissues ($P < 0.05$). There was no significantly difference between in early phase (I - II) ovarian cancer and in late (III - IV) ovarian cancer for EN2 and β -catenin protein positive expression rate ($P > 0.05$). There was no significant correlation between EN2 and β -catenin protein expression and age of patients, ovarian cancer types and pelvic lymph node metastasis ($P > 0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that there was positively correlation between the expression of EN2 and β -catenin in ovarian cancer ($P < 0.05$). **Conclusion** EN2 and β -catenin are highly expressed in ovarian cancer tissues, and may be related to the occurrence and development of ovarian cancer.

Key words Ovarian cancer; EN2; β -catenin; Clinical significance; Correlation

卵巢癌发生率较高,是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,癌症致死率位居第 8 位^[1]。每年约有 24 万女性被诊断患有卵巢癌,5 年生存率约为 45%,严重威胁女性生命健康^[2,3]。Engrailed-2 (EN2) 基因是同源异型盒基因家族的成员之一,在胚胎和神经系统发育中起着重要的作用^[4]。既往研究表明,

EN2 基因在多种类型的恶性肿瘤中均有高表达,包括前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌及卵巢癌^[5-8]。进一步研究发现,EN2 可作为 Wnt 信号通路的关键性信号之一,参与调控细胞分化,并能通过调控 Wnt 信号转导通路中 β -连环蛋白 (β -catenin) 调控细胞增殖^[9]。本研究通过免疫组化法检测了 EN2、 β -catenin 在卵巢癌、交界性肿瘤、良性肿瘤及正常卵巢组织中的表达,旨在探究 EN2、 β -catenin 蛋白在卵巢癌组织中的表达水平及其与患者临床病理学的相关性。

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC1303004)

作者单位:266100 青岛大学附属医院

通讯作者:戴红英,主任医师,电子信箱:daihy1997@126.com

资料与方法

1. 研究对象:收集笔者医院 2012 年 1 月 ~ 2013 年 12 月收治的卵巢肿瘤患者的病例资料共 110 例,其中卵巢癌 60 例,交界性肿瘤 28 例,良性肿瘤 22 例,患者年龄 45 ~ 70 岁,平均年龄 50.5 岁。所有患者均为首发病例,在术前均未接受过化疗或放疗,术后均经病理检查进一步诊断确诊,且所有患者病历资料完整。此外,收集同期因子宫良性病变行卵巢切除术的 20 例正常卵巢组织作为对照组。临床病理分期按照国际妇产科协会(International Federation Of Gynecology And Obstetrics, FIGO) 2009 年分期标准,卵巢癌临床早期 I ~ II 期 20 例, III ~ IV 期 40 例;分化程度:高分化(G_1) 17 例、中分化(G_2) 12 例,低分化(G_3) 31 例;发生淋巴结转移 17 例,无淋巴结转移者 43 例;浆液性腺癌 43 例,黏液性腺癌 17 例。正常对照组年龄 45 ~ 68 岁,平均年龄 52.4 岁。

2. 免疫组化法检测:对所有病理组织进行石蜡包埋,将所有石蜡包埋后的病理组织进行连续切片,切片厚度 4 μ m,展开切片后在玻片上进行贴片,脱蜡修复后,滴加一抗后室温孵育 1 ~ 2h,洗涤后滴加二抗,室温孵育 15 ~ 20min,洗涤后 DAB 显色 5min,苏木精

复染细胞核 30s,脱水后封片。

3. 结果判定:以细胞质出现淡黄色至棕黄色或棕褐色为细胞染色阳性,综合阳性细胞数及染色强度判断,0 ~ 4 分为 EN2 或 β - catenin 染色阴性,5 ~ 12 分为 EN2 或 β - catenin 染色阳性,以阴性表达为低表达,阳性表达为高表达。低倍镜下观察整张切片,高倍镜下随机选取 5 个视野计数阳性细胞数。所有染色结果均由两名经验丰富的病理科医生采用双盲法在光镜下进行观察。

4. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. EN2 蛋白在不同卵巢组织中的表达情况:免疫组化结果显示,EN2 表达于细胞质内且在所有的检测样本中均有表达(图 1),卵巢癌组织及交界性肿瘤组织 EN2 阳性表达率明显高于正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

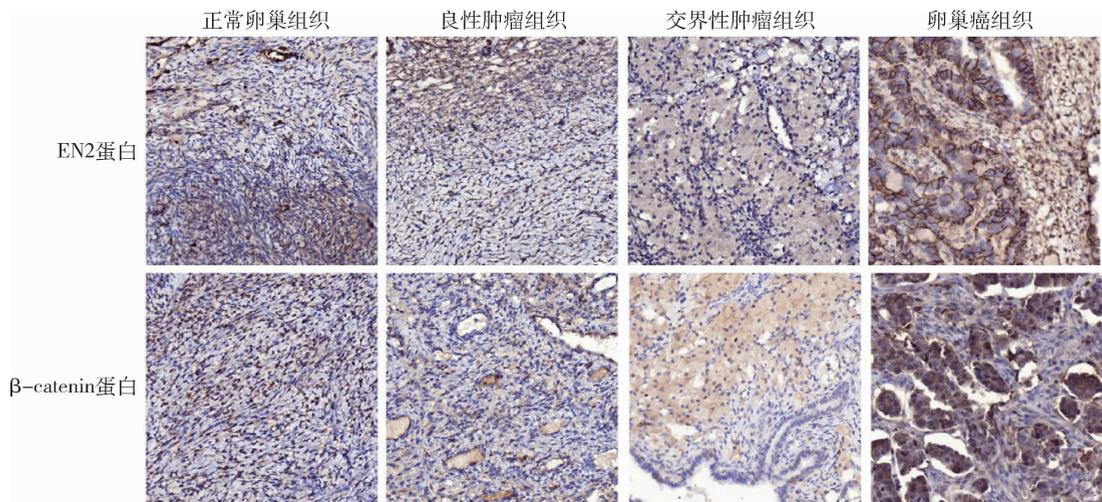


图 1 EN2 及 β - catenin 蛋白在不同卵巢组织中的表达情况(免疫组化, $\times 200$)

表 1 不同组织中 EN2 蛋白表达情况 [$n(\%)$]

组别	n	阴性	阳性
对照组	20	17(85.00)	3(15.00)
卵巢癌	60	21(35.00)	39(65.00)*
交界性肿瘤	28	12(42.86)	16(57.14)*
良性肿瘤	22	16(72.73)	6(27.27)

与对照组比较, * $P < 0.05$

2. β - catenin 蛋白在不同卵巢组织中的表达情况:免疫组化结果显示, β - catenin 表达于细胞质内且在所有的检测样本中均有表达(图 1),卵巢癌组织及交界性肿瘤组织 β - catenin 阳性表达率明显高于正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2 不同组织中 β -catenin 蛋白表达情况 [$n(\%)$]

组别	n	阴性	阳性
对照组	20	15(75.00)	5(25.00)
卵巢癌	60	17(28.33)	43(71.67)*
交界性肿瘤	28	9(32.14)	19(67.86)*
良性肿瘤	22	14(63.64)	8(36.36)

与对照组比较, * $P < 0.05$

3. EN2 蛋白表达与卵巢癌临床病理特征之间的关系: EN2 蛋白的阳性表达与患者年龄、卵巢癌病理类型无显著相关性 ($P > 0.05$); EN2 蛋白在低分化卵巢癌组织中的阳性表达率明显高于高分化组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); EN2 蛋白在早期 (I ~ II) 卵巢癌中的阳性表达率与晚期 (III ~ IV) 卵巢癌比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); EN2 蛋白淋巴结转移卵巢癌中的阳性表达率与未转移的卵巢癌比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 3)。

表 3 EN2 表达与临床病理特征相关情况 [$n(\%)$]

临床病理参数	n	阴性	阳性
年龄(岁)			
< 50	16	7	9(56.25)
≥ 50	44	14	30(68.18)
病理类型			
浆液性腺癌	43	13	30(69.77)
黏液性腺癌	17	8	9(52.94)
组织分化			
高分化	17	10	7(41.18)
中分化	12	4	8(66.67)
低分化	31	7	24(77.42)*
临床分期			
I ~ II	20	10	10(50.00)
III ~ IV	40	11	29(72.50)
淋巴结转移			
无	43	17	26(60.47)
有	17	4	13(76.47)

与高分化比较, * $P < 0.05$

4. β -catenin 蛋白表达与卵巢癌临床病理特征之间的关系: β -catenin 的阳性表达与患者年龄、卵巢癌病理类型无显著相关性 ($P > 0.05$); β -catenin 蛋白在低分化卵巢癌中的阳性表达率明显高于高分化组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); β -catenin 蛋白在早期 (I ~ II) 卵巢癌中的阳性表达率与晚期 (III ~ IV) 卵巢癌比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); β -catenin 蛋白淋巴结转移卵巢癌中的阳性表达率与未转移的卵巢癌比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 4)。

表 4 β -catenin 表达与临床病理特征相关情况 [$n(\%)$]

临床病理参数	n	阴性	阳性
年龄(岁)			
< 50	16	7	9(56.25)
≥ 50	44	10	34(77.27)
病理类型			
浆液性腺癌	43	10	33(76.74)
黏液性腺癌	17	7	10(58.82)
组织分化			
高分化	17	7	10(58.82)
中分化	12	4	8(66.67)
低分化	31	6	25(80.65)
临床分期			
I ~ II	20	8	12(60.00)
III ~ IV	40	9	31(77.50)
淋巴结转移			
无	43	12	31(72.09)
有	17	5	12(70.59)

5. EN2 与 β -catenin 表达的相关性分析: Spearman 等级相关性分析结果显示, EN2、 β -catenin 在卵巢癌中的表达呈正相关 ($P < 0.05$), 详见表 5。

表 5 EN2 与 β -catenin 之间的相关性 [$n(\%)$]

β -catenin	EN2 阳性	EN2 阴性
阳性	30(50.00)	13(21.67)
阴性	9(15.00)	8(13.33)

讨 论

卵巢癌 5 年生存率低、预后差, 因此, 明确卵巢癌的发病机制、探索有效的治疗手段尤为重要。同源异型盒基因(homeobox, HOX) 作为转录因子, 可与特定的 DNA 区域结合, 激活或抑制靶基因的表达, 进而参与细胞凋亡、运动与分化、血管生成和器官功能维持等多种生物学过程^[10-12]。EN2 基因属于 HOX 家族, 在人类胚胎期神经系统发育过程中起着至关重要的作用^[13-15]。有报道指出, EN2 可能在胚胎的早期发育和神经系统功能的维持中起着重要作用, 并且与神经系统发育缺陷和自闭症的发展密切相关^[4]。

研究发现, EN2 与肿瘤的发生和发展密切相关, 在某些类型的癌症中可能充当肿瘤抑制基因^[16,17]。Martin 等^[6]报道, 乳腺癌细胞中 EN2 的表达上调, 可能促进了肿瘤细胞的增殖。Bose 等^[18]研究显示, 前列腺癌细胞系中的 EN2 表达水平上调, 而 EN2 表达的沉默可能通过下调 PAX2 基因表达来抑制前列腺癌细胞的增殖。McGrath 等^[8]对 8 种上皮性卵巢癌细胞株及 100 例术后卵巢癌组织中 EN2 的表达水平

进行了研究分析,结果显示卵巢癌细胞系及浆液性卵巢癌癌组织中 EN2 mRNA 表达水平明显高于正常对照组,提示 EN2 可能有一定的预测价值。Wnt/ β -catenin 信号是经典 Wnt 通路,通过激活下游靶基因的转录与表达,调控细胞生长。李云飞等^[19]研究发现,EN2 及 β -catenin 在同一种癌症中的表达均明显增高,说明 EN2 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,参与肿瘤的发生、发展。

本研究发现,EN2 及 β -catenin 在卵巢癌中的表达明显增加,这与 McGrath 等^[8]的研究结果一致,表明 EN2 及 β -catenin 的高表达可能与卵巢癌的发生、发展有关。本研究 EN2 及 β -catenin 的表达与卵巢癌的分化程度显著相关,但与患者年龄、卵巢癌类型、临床病理分期及有无淋巴结转移无关,提示 EN2 及 β -catenin 蛋白可能与卵巢癌的浸润、进展、转移无关。本研究 EN2 及 β -catenin 的表达与卵巢癌的病理分期及淋巴结转移无显著相关性,但有相关性趋势($P=0.08$),其原因可能与样本量少有关。今后的研究中需进一步收集病理数据,探究 EN2 及 β -catenin 的表达与病理分期及淋巴结转移的关系。Spearman 相关性分析结果表明,卵巢癌组织中 EN2 与 β -catenin 的蛋白表达呈正相关,二者均与组织学分级显著相关,推测 EN2 与 β -catenin 在卵巢癌的发生、发展过程中存在协同作用。

综上所述,卵巢癌组织中 EN2 及 β -catenin 蛋白表达明显增高,并与病理分化程度呈正相关,提示 EN2 及 β -catenin 可能在卵巢癌的发生过程中作为肿瘤促进因子发挥生物学作用。

参考文献

1 Modugno F, Goughnour SL, Wallack D, et al. Breastfeeding factors and risk of epithelial ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2019, 153(1):116-122

2 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globcan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424

3 Lheureux S, Gourley C, Vergote L, et al. Epithelial ovarian cancer [J]. *Lancet*, 2019, 393(10177):1240-1253

4 Genestine M, Lin L, Durens M, et al. Engrailed-2 (En2) deletion produces multiple neurodevelopmental defects in monoamine systems, forebrain structures and neurogenesis and behavior [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(20):5805-5827

5 Morgan R, Boxall A, Bhatt A, et al. Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(5):1090-1098

6 Martin NL, Saba-EI-Leil MK, Sadekova S, et al. EN2 is a candidate oncogene in human breast cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(46):6890-6901

7 Morgan R, Bryan RT, Javed S, et al. Expression of Engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(9):2214-2222

8 McGrath SE, Annels N, Madhuri TK, et al. Engrailed-2 (EN2) - a novel biomarker in epithelial ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):943

9 Koening SF, Brentle S, Hamdi K, et al. En2, Pax2/5 and Tcf-4 transcription factors cooperate in patterning the *Xenopus* brain [J]. *Dev Biol*, 2010, 340(2):318-328

10 Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM. HOX genes and their role in the development of human cancers [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(8):811-823

11 Ushiku H, Yamashita K, Kawamata H, et al. Homeobox-only protein expression is a critical prognostic indicator of pancreatic neuroendocrine tumor and is regulated by promoter DNA hypermethylation [J]. *Pancreas*, 2016, 45(9):1255-1262

12 He B, Ni ZL, Kong SB, et al. Homeobox genes for embryo implantation: from mouse to human [J]. *Animal Model Exp Med*, 2018, 1(1):14-22

13 Genestine M, Lin L, Durens M, et al. Engrailed-2 (En2) deletion produces multiple neurodevelopmental defects in monoamine systems, forebrain structures and neurogenesis and behavior [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(20):5805-5827

14 Morgan R, Boxall A, Bhatt A, et al. Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(5):1090-1098

15 McGrath SE, Michael A, Morgan R, et al. EN2: a novel prostate cancer biomarker [J]. *Biomark Med*, 2013, 7(6):893-901

16 Rose MID, Dondossola ER, Alexandre MCM, et al. Urinary EN-2 to predict prostate cancer: systematic review and Meta-analysis [J]. *Rev Assoc Med Bras(1992)*, 2017, 63(7):656-661

17 Martin NL, Saba-EI-Leil MK, Sadekova S, et al. EN2 is a candidate oncogene in human breast cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(46):6890-6901

18 Bose SK, Bullard RS, Donald CD. Oncogenic role of engrailed-2 (en-2) in prostate cancer cell growth and survival [J]. *Transl Oncogenom*, 2008, 3:37-43

19 李云飞,赖彩永,都兴华,等. EN2 在膀胱癌中的表达及其意义 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(19):3127-3129

(收稿日期:2019-11-21)

(修回日期:2019-12-19)

(上接第 57 页)

18 Nguyen HTT, von Schoultz B, Nguyen TV, et al. Sex hormone levels as determinants of bone mineral density and osteoporosis in Vietnamese women and men [J]. *J Bone Mine Metab*, 2015, 33(6):658-665

19 Han XG, Wang DW, Bi ZG, et al. Regulatory effect of estrogen receptor- α -mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway on osteoblast proliferation [J]. *J Biol Regul Homeostat Agents*, 2016, 30(2):381-387

20 Kalkan R, Tulay P. The interactions between bone remodelling, es-

trogen hormone and EPH family genes [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp*, 2018, 28(2):135-138

21 王文静,延军平,刘永林. 新疆旱涝气候的南北差异性分析 [J]. *干旱区研究*, 2016, 33(3):609-618

22 Cheraghi P, Cheraghi Z, Bozorgmehr S. The Prevalence and risk factors of osteoporosis among the elderly in Hamadan province: a cross sectional study [J]. *Med J Islamic Republic of Iran*, 2018, 32:111

(收稿日期:2019-11-11)

(修回日期:2019-11-28)