

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00329

卵巢癌组织即刻早期基因 IEX-1 的表达

Expression of immediate early gene X-1 in ovarian carcinoma tissue

韩丽萍*, 刘香荣

郑州大学第一附属医院妇产科, 郑州 450052

[摘要] **目的** 检测即刻早期基因 X-1(IEX-1)在卵巢癌、卵巢良性肿瘤组织及交界性卵巢肿瘤组织中的表达,初步探讨其与卵巢癌发生发展的关系。**方法** 应用免疫组化法对 105 例卵巢组织(良性肿瘤 21 例、交界性肿瘤 24 例、恶性肿瘤 60 例)进行 IEX-1 蛋白检测。**结果** IEX-1 蛋白在卵巢癌组织中的阳性表达率[38.3%(23/60)]均明显低于良性[80.9%(17/21)]和交界性[62.5%(15/24)]卵巢肿瘤组织($P < 0.01$),IEX-1 在不同年龄、组织学类型的卵巢癌中阳性表达率差异无统计学意义;FIGO 分期晚期(Ⅲ~Ⅳ期)及组织分化程度低者(G_3)IEX-1 阳性表达率低于 FIGO 分期早期(Ⅰ~Ⅱ)及中高分化者($G_1 \sim G_2$),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** IEX-1 蛋白低表达可能与卵巢癌的发生发展有关。

[关键词] 卵巢肿瘤;即早基因 X-1;免疫组织化学

[中图分类号] R 737.31 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0329-03

即刻早期基因-1(immediate early response gene X-1, IEX-1)是一种能够调节多种转录因子的基因^[1-2],其表达产物作为转录因子调控着诸多靶基因的表达,以独立或与其他核蛋白结合构成复合体的方式而起作用^[3-7]。多个实验表明多种信号刺激可迅速诱导 IEX-1 蛋白表达,后者作为一个转录因子,调节着细胞的生长和分化,并在细胞的增殖和凋亡中起着极为重要的作用,且与一些癌细胞的生长和浸润有关^[8-9]。目前关于 IEX-1 在肿瘤组织中的表达已有少量报道^[8-10],但 IEX-1 蛋白在卵巢肿瘤组织中的表达情况尚未见报道。本研究采用免疫组化法观察了 IEX-1 蛋白在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达,并初步探讨了其与卵巢组织学类型和生物学行为的关系。

1 材料和方法

1.1 临床资料 选取郑州大学第一、三附属医院妇产科 2006 年 1 月至 2007 年 10 月 105 例卵巢肿瘤蜡块,经 2 名有经验的病理医师两次确诊,其中良性肿瘤 21 例、交界性肿瘤 24 例、恶性肿瘤 60 例(浆液性癌 48 例、黏液性癌 8 例、内膜样癌 4 例)。卵巢恶性肿瘤根据 2000 年 FIGO 分期:Ⅰ期 3 例,Ⅱ期 4 例,Ⅲ期 35 例,Ⅳ期 18 例;根据细胞分化程度分为:高分化癌(G_1) 11 例,中分化癌(G_2) 5 例,低分化癌(G_3) 44 例。每例连续切片约 4 μm 厚,患者年龄 20~74 (47.54 \pm 12.42)岁,所有患者术前均未接受任何放、化疗。

1.2 主要试剂及免疫组化染色 鼠抗人 IEX-1 多克隆抗体由哈佛大学医学院 May Wu 惠赠,二抗、S-P 复合物、DAB 显色试剂购自福州迈新生物技术有限公司。105 例卵巢肿瘤均行免疫组化染色,严格按照操作说明进行,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断标准 IEX-1 阳性反应的切片其细胞核及胞

质出现黄色或棕黄色着色,依据阳性细胞数的多少分为:阴性(-),切片中细胞膜和胞质均未见染色;弱阳性(+),切片中阳性细胞数 $< 25\%$,胞质呈浅棕色;中度阳性(++),切片中阳性细胞数占 $25\% \sim 50\%$,胞质呈棕色颗粒状;强阳性(+++),切片中阳性细胞数 $> 50\%$,胞质呈深棕色颗粒状。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件行 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 IEX-1 在卵巢良、恶性肿瘤中的表达 结果(图 1,表 1)表明:卵巢良、恶性及交界性肿瘤组织中 IEX-1 阳性信号定位于细胞胞质,少部分胞核亦着色,呈棕黄色。卵巢癌、交界性卵巢肿瘤、卵巢良性肿瘤组织 IEX-1 表达阳性率分别为 38.3%(23/60)、62.5%(15/24)、80.9%(17/21)。IEX-1 在卵巢癌组织中的表达阳性率低于良性及交界性卵巢肿瘤,经过独立有序多分类资料秩和检验以及 χ^2 检验,结果表明组间有显著差异($P < 0.01$)。

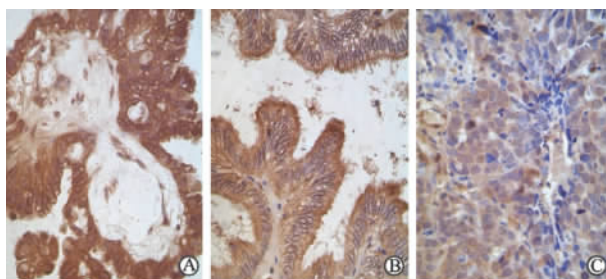


图 1 卵巢良性肿瘤(A)、卵巢交界性肿瘤(B)及卵巢癌(C)组织 IEX-1 蛋白的表达(S-P)

Original magnification: $\times 400$

[收稿日期] 2009-11-04 **[接受日期]** 2010-01-06

[作者简介] 韩丽萍,博士,副教授。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0371-66862052, E-mail: hanlp0825@yahoo.com.cn

表 1 不同卵巢组织 IEX-1 蛋白的表达

类型	n	IEX-1 表达				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
良性	21	4	4	2	11	80.9
交界	24	9	5	7	3	62.5
恶性	60	37	4	6	13	38.3

组间比较 $H=11.217, P=0.004$

2.2 IEX-1 蛋白表达与卵巢癌临床病理特征的关系 结果(表 2)表明:IEX-1 在不同年龄、组织学类型的卵巢癌中阳性表达率差异无统计学意义;FIGO 分期晚期(Ⅲ~Ⅳ期)及组织分化程度低者(G_3)IEX-1 阳性表达率低于 FIGO 分期早期(Ⅰ~Ⅱ)及中高分化者($G_1 \sim G_2$),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 IEX-1 蛋白表达与卵巢癌临床病理特征的关系

临床病理特征	N	IEX-1 阳性表达		
		n	χ^2	P 值
年龄(岁)				
≤60	32	7	0.002	0.976
>60	28	6		
组织学特征				
浆液性	48	9	0.497	0.481
非浆液性	12	4		
FIGO 分期				
Ⅰ~Ⅱ	7	5	8.481	0.004
Ⅲ~Ⅳ	53	8		
分化程度				
$G_1 \sim G_2$	16	9	12.722	0.000
G_3	44	4		

3 讨论

即刻早期基因(immediate early gene, IEG)是一类能在多种刺激因子(如有丝分裂原、分化诱导生长因子、电离辐射等)的作用下诱导其快速、短暂地表达,对早期的细胞生长起调节作用的基因,这一类基因主要包括 IEX-1、Egr-1、Egr-2、Egr-3、Egr-4、C-jun、c-fos 和 WT1。研究表明,IEX-1 在多种恶性肿瘤中表达降低或消失,而通过诱导产生的 IEX-1 有抑制肿瘤细胞生长的作用^[11]。

IEX-1 又称 Dif2、IER3、p22/PRG1、鼠 gly96 同源基因,基因定位于人的第 6 对染色体 p21.3。IEX-1 基因在上游启动子中含多种转录因子的相同序列,包括 p53、SRE、HRE、RRE、VDRE、NF-KB/rel、SP1 等^[1-2]。其中 SRE 为血清反应元件,RRE 为辐射反应元件,HRE 为激素反应元件;其下游为 IEX-1 基因的外显子区域,编码一个相对分子质量为 18 000、由 156 个氨基酸组成的 IEX-1 蛋白产物。IEX-1 基因的功能主要表现在细胞内的信号传递方面,其表达产物在外界信号刺激引起的细胞内信息传递的级联反应(cascade response)中起着重要的偶联作用,调控那些决定细胞核型变化的下游长期反应基因(long term response genes)的表达,调控着细胞的生长、增殖、分化和凋亡^[11-12]。研究发现,在许

多生长因子基因和原癌基因的启动子区域中存在 IEX-1 蛋白的结合位点^[1-2],提示 IEX-1 与肿瘤的发生发展可能存在着某种关系。近年来对人的肿瘤细胞系及其模型的研究均发现,IEX-1 在多种恶性肿瘤细胞中表达降低或消失^[5,7-8],外源性 IEX-1 基因有抑制乳腺癌细胞的生长和恶性转化的作用^[12-13]。有研究报道 IEX-1 在正常组织通常呈高水平表达,如皮肤、胃肠道、胰腺。乳腺中均呈现高水平表达,仅在少数成人器官,如脾、骨骼肌、心肌细胞中有相对低水平的表达^[8-9,13]。

本研究发现,在卵巢良性和交界性肿瘤细胞内 IEX-1 的表达有所减少,而卵巢癌组织阳性例数减少且强度减弱,表明 IEX-1 表达与卵巢肿瘤发生过程的细胞生长失控有关^[8-9,14]。本研究表明良性、恶性上皮性卵巢组织中 IEX-1 蛋白的阳性表达率有显著差异,与国外应用免疫组化法检测 IEX-1 在其他组织中表达情况的研究结果相符。Schafer 等^[3]用免疫组织化学的方法对直肠癌的癌组织和癌旁正常组织进行研究,发现癌组织 IEX-1 的表达明显低于其相应的癌旁正常组织。IEX-1 在人和鼠的正常乳腺组织呈高表达,而在乳腺癌组织和乳腺癌细胞株中表达消失;Semlali 等^[4]在 25 例乳腺癌患者的癌组织中也观察到 IEX-1 表达的大幅度下调。但是也有相反的报道,Dilley 等^[5]用定量 RT-PCR 对 24 个非典型增生(或原位癌)和 27 个浸润乳腺癌进行研究,发现 IEX-1 在这两种病变组织中高表达,并且这种高表达是依赖周期素 D₁ 和雌激素调节信号途径的。本研究结果显示,不同类型和分化的卵巢癌其 IEX-1 表达情况不同,分化好的癌其表达较强,在低分化癌的表达则逐渐减弱甚至消失,推测 IEX-1 可能起到一个负性调节人肿瘤细胞生长的作用。肿瘤组织中 IEX-1 的阳性表达是一个独立的预示因子,在对癌症进行定级及预后的推测上 IEX-1 同淋巴结的转移情况同样重要。肿瘤组织阳性表达 IEX-1 的患者预期结果要比 IEX-1 阴性表达者好^[6,15],胰腺癌肿瘤组织中 IEX-1 的阴性表达与癌的局部浸润有关,而与远处转移或淋巴结转移无关,这表明 IEX-1 的失表达促进肿瘤的局部浸润而不是远处迁移^[3,5]。肿瘤细胞从宿主免疫逃逸是促进肿瘤发展和进程的一个重要机制^[15-16]。如高分化的肿瘤细胞通常缺失肿瘤抗原通过细胞毒素 T 细胞逃脱免疫监视。有研究表明 IEX-1 编码肿瘤抗原表位,此表位可以被从胃腺癌转移的淋巴瘤瘤中建立的肿瘤细胞特有的细胞毒素 T 细胞所识别^[15]。而且在不同类型的上皮癌患者的外周血培养液中 IEX-1 编码的抗原肽可以诱导肿瘤特有的细胞毒素 T 细胞^[6,15]。尽管 IEX-1 作为肿瘤抗原的机制还不清楚,但是 IEX-1 表达的缺失却可以通过肿瘤细胞从免疫监视逃逸而促进肿瘤的进程^[16-18]。

本研究结果提示,IEX-1 表达的减少或消失可作为卵巢肿瘤恶性变的生物学标志;IEX-1 的表达与卵巢癌的组织学类型和生物学特性有关,至于 IEX-1 表达在肿瘤诊断和预后的真正作用还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Wu M X, Ao Z, Prasad K V, Wu R, Schlossman S F. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF- κ B-mediated cell survival [J]. *Science*, 1998, 281:998-1001.
- [2] Pietzsch A, Buchler C, Schmitz G, Aslandls C. Genomic organization, promoter cloning, and chromosomal localization of the Dif-2 gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245: 651-657.
- [3] Schafer H, Diebel J, Arlt A, Trauzold A, Schmidt W E. The promoter of human p22/PACAP response gene 1 (PRG1) contains functional binding sites for the p53 tumor suppressor and for NF κ B[J]. *FEBS Lett*, 1998, 436: 139-143.
- [4] Semlali A, Oliva J, Badia E, Pons M, Duchesne M J. Immediate early gene X-1 (IEX-1), a hydroxytamoxifen regulated gene with increased stimulation in MCF-7 derived resistant breast cancer cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 88: 247-259.
- [5] Dille W G, Kalyanaraman S, Verma S, Cobb J P, Laramie J M, Lairmore T C. Global gene expression in neuroendocrine tumors from patients with the MEN1 syndrome[J]. *Mol Cancer*, 2005, 4: 9.
- [6] Huang Y H, Wu J Y, Zhang Y, Wu M X. Synergistic and opposing regulation of the stress-responsive gene IEX-1 by p53, c-myc, and multiple NF- κ B/rel complexes [J]. *Oncogene*, 2002, 21: 6819-6828.
- [7] Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner D A, Nozawa Y, Moriwaki H, et al. Expression of the NF- κ B target gene X-ray-inducible immediate early response factor-1 short enhance TNF- α -induced hepatocyte apoptosis by inhibiting Akt activation[J]. *J Immunol*, 2003, 170: 4053-4060.
- [8] Sasada T, Azuma K, Hirai T, Hashida H, Kanai M, Takabayashi A. Prognostic significance of the immediate early response gene X-1 (IEX-1) expression in pancreatic cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15: 609-617.
- [9] Taddeo B, Esclatine A, Zhang W, Roizman B. The stress-inducible immediate-early responsive gene IEX-1 is activated in cells infected with herpes simplex virus 1, but several viral mechanisms, including 3' degradation of its RNA, preclude expression of the gene[J]. *J Virol*, 2003, 77: 6178-6187.
- [10] Sasada T, Takedatsu H, Azuma K, Koga M, Maeda Y, Shichijo S, et al. Immediate early response gene X-1, a stress-inducible antiapoptotic gene, encodes cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitopes capable of inducing human leukocyte antigen-A33-restricted and tumor reactive CTLs in gastric cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 2882-2888.
- [11] Segev D L, Ha T U, Tran T T. Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NF κ B mediated pathway[J]. *J Biol Chem*, 2000, 15: 28371-28379.
- [12] Im J H, Craig Theodore A, Pittelkow M R, Rajiv Kumar. Characterization of a novel hexameric repeat DNA sequence in the promoter of the immediate early gene, IEX-1, that mediates 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃-associated IEX-1 gene repression[J]. *Oncogene*, 2002, 21: 3706-3714.
- [13] Kobayashi T, Pittelkow M R, Warner G M, Squillace K A, Kumar R. Regulation of a novel immediate early response gene IEX-1, in keratinocytes by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251: 868-873.
- [14] Arlt A, Grobe O, Sieke A, Kruse M L, Folsch U R, Schmidt W E, et al. Expression of the NF- κ B target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in HeLa cells[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 69-76.
- [15] Arlt A, Kruse M L, Breitenbroich M, Gehrz A, Koc B, Minkenberg J, et al. The early response gene IEX-1 attenuates NF- κ B activation in 293 cells, a possible counter-regulatory process leading to enhanced cell death [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 3343-3351.
- [16] Zhang Y, Schlossman S F, Edwards R A, Ou C N, Gu J, Wu M X. Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, and a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 878-883.
- [17] Grobe O, Arlt A, Ungefroren H, Krupp G, Schmidt W E, Folsch U R. Functional disruption of IEX-1 expression by concatemeric hammerhead ribozymes alters growth properties of 293 cells[J]. *FEBS Lett*, 2001, 494: 196-200.
- [18] Charles C H, Yoon J K, Simske J S, Lau L F. Genomic structure, cDNA sequence, and expression of gly96, a growth factor-inducible immediate-early gene encoding a short-lived glycosylated protein[J]. *Oncogene*, 1993, 8: 797-801.

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群