

ALDH1、Nanog 蛋白在卵巢癌中的表达及其临床意义

薛巧梅¹, 纪新强², 王海燕¹

1. 青岛大学医学院附属威海医院 威海市妇幼保健院妇科, 山东 威海 264200;

2. 青岛大学医学院附属医院妇科, 山东 青岛 266003

摘要: **目的** 研究乙醛脱氢酶(ALDH)1 及胚胎干细胞关键因子 Nanog 蛋白在卵巢癌中的表达,探讨其临床意义。**方法** 收集 2006 年至 2013 年妇产科收治手术治疗的 100 例患者的病理标本,其中 60 例确诊为卵巢癌(I ~ II 期 18 例,III ~ IV 期 42 例)作为卵巢癌组,20 例卵巢良性肿瘤(卵巢浆液性或黏液性囊腺瘤)作为良性肿瘤组,20 例正常卵巢组织(子宫良性病变行全子宫加双附件切除)作为正常卵巢组。应用免疫组化技术检测 ALDH1 蛋白及 Nanog 蛋白在三组卵巢组织中的表达,并分析其表达与肿瘤病理分期及分化程度的相关性。**结果** ALDH1 蛋白及 Nanog 蛋白在三组卵巢组织中的表达水平和阳性率均不同,二者在卵巢癌组的表达水平和阳性率高于良性肿瘤组和正常卵巢组(P 均 < 0.01),在良性肿瘤组与正常卵巢组间无统计学差异(P 均 > 0.05)。ALDH1 蛋白及 Nanog 蛋白在不同病理分期及不同分化程度卵巢癌组织中的表达水平和阳性率也不同,III ~ IV 期高于 I ~ II 期(P 均 < 0.01),低分化高于高分化(P 均 < 0.01)。**结论** ALDH1 蛋白及 Nanog 蛋白在卵巢癌组织均高表达,其与卵巢癌关系密切,有望成为新的卵巢癌表面标志物。

关键词: 卵巢癌; 乙醛脱氢酶 1; Nanog 基因; 免疫组织化学

中图分类号: R 737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)08-0992-04

Expressions of ALDH1 and Nanog proteins in ovarian cancer and their clinical significance

XUE Qiao-mei*, JI Xin-qiang, WANG Hai-yan

* Department of Gynaecology, Weihai Maternal and Child Health Hospital, Affiliated Weihai Hospital of Qingdao University Medical College, Weihai, Shandong 264200, China

Corresponding author: JI Xin-qiang, E-mail: jxqsjy@126.com

Abstract: Objective To investigate the expressions of aldehyde dehydrogenase (ALDH) 1 and Nanog (a key factor of embryonic stem cells) proteins in ovarian cancer and their clinical significance. **Methods** A total of 100 pathological specimens from patients treated by operation between 2006 and 2013 were collected. Out of the 100 specimens, 60 from confirmed ovarian cancer patients (18 for stage I - II, 42 for stage III - IV) were as ovarian cancer group, 20 from benign ovarian tumor patients (ovarian serous or mucinous cystadenoma) were as benign tumor group, and 20 were from the patients with normal ovarian tissues (from total hysterectomy plus double accessory resection because of benign uterine lesions) were as normal ovary group. The expressions of ALDH1 and Nanog proteins in ovarian tissues were detected by immunohistochemistry method, and the relationship between their expressions and pathological staging, differentiation degree of tumors was analyzed. **Results** The expression levels and positive expression rates of ALDH1 and Nanog proteins in ovarian tissues of ovarian cancer group were all significantly higher than those of benign tumor group and normal ovary group (all $P < 0.01$), while they were similar between benign tumor group and normal ovary group (all $P > 0.05$). The expression levels and positive expression rates of ALDH1 and Nanog proteins in ovarian cancer tissues of different pathological staging and different differentiation degree were not same, for example, which were significantly higher in stage III - IV than those in stage I - II (all $P < 0.01$), and which were significantly higher in poorly differentiated cancer tissues than those in well-differentiated cancer tissues (all $P < 0.01$). **Conclusions** Both ALDH1 and Nanog proteins present high-expressions in ovarian cancer tissues and are closely associated with ovarian cancer, therefore they are expected to serve as the new surface markers of ovarian cancer.

Key words: Ovarian cancer; Aldehyde dehydrogenase 1; Nanog gene; Immunohistochemistry

卵巢癌由于起病隐匿,早期发现率低,75%患者就诊时已属晚期,近年来已成为病死率最高的妇科恶性肿瘤^[1],主要原因是化疗过程中部分肿瘤细胞耐药,从而导致肿瘤的复发。研究表明只有占肿瘤细胞数量 1%~0.1% 的肿瘤干细胞才是导致肿瘤耐药、复发及转移的根源^[2]。乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)1 目前已成为乳腺癌及多种肿瘤干细胞的标志物之一,而大量的功能缺失研究结果显示胚胎干细胞关键因子 Nanog 基因在肿瘤细胞发展中起非常重要的作用^[3]。本研究应用免疫组织化学技术检测卵巢癌、卵巢良性肿瘤、正常卵巢等组织中 ALDH1 及 Nanog 的表达情况,并探讨其在卵巢癌中的表达规律,明确二者在卵巢癌的早期诊断及预后评估中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例标本来源 卵巢癌组 60 例患者标本来自 2006 年至 2013 年青岛大学医学院附属威海医院威海市妇幼保健院手术患者的卵巢癌组织,患者年龄 42~70 岁,平均 53.6 岁;术前所有患者均未给予激素及放化疗等治疗;所有标本均经本院高年资病理医师阅片确诊,其中高分化(G1)18 例,中分化(G2)20 例,低分化(G3)22 例;根据国际妇产科学会 2009 卵巢原发肿瘤分期标准,60 例卵巢癌患者中有 18 例为 I~II 期,42 例为 III~IV 期。良性肿瘤组 20 例标本来源于同期术后病理确诊为卵巢浆液性或黏液性囊腺瘤患者的卵巢良性肿瘤组织;正常卵巢组 20 例标本来自同期因子宫良性病变行全子宫加双附件切除患者的正常卵巢组织。

1.2 实验试剂及仪器 鼠抗人 ALDH1 单克隆抗体(上海远慕)、兔抗人 Nanog 多克隆抗体(北京博奥森)、鼠兔共用二抗(北京中杉)、DAB 显色试剂盒、PBS、EDTA 修复液。LEICA RM-2235 石蜡切片机、立鹤牌 420 型电热恒温培养箱、Galanz 微波炉 WP750S、显微照相系统 OLYMPUS CH 显微镜、海尔电冰箱、硅化载玻片。

1.3 免疫组织化学法 PV-6000 方法检测卵巢癌组织 ALDH1、Nanog 蛋白表达:组织石蜡包埋后连续切片,厚 4 μm ,脱蜡,使用 pH6.0 的 SSC 缓冲液高温修复抗原,加入一抗鼠抗人 ALDH1(1:100 稀释)后室温孵育 3 h,加二抗后 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 30 min,其余具体按常规 PV-6000 方法操作;而 Nanog 是在抗原修复后,加入一抗兔抗人 Nanog(1:200 稀释),余步骤同

ALDH1。ALDH1 选取乳腺癌阳性组织切片对照, Nanog 选取精原细胞瘤作为阳性对照, PBS 代替一抗作为阴性对照。

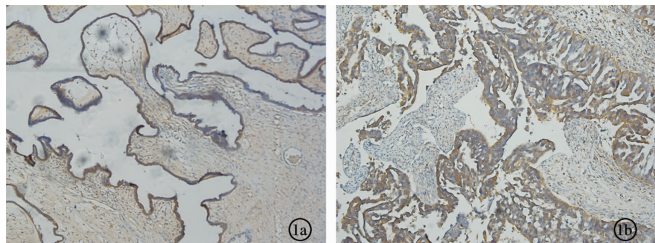
1.4 结果评价方法 光镜下 ALDH1、Nanog 抗原阳性反应为位于细胞浆内出现棕黄色颗粒,采用 Sini-crope 改良法^[4],按照 5 个 400 倍视野下染色细胞计数所占比例分为 5 级, <5% 为 0 分, 5%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。按照染色强度分为 4 级,不着色为 0,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两者相乘即为所得分数。所得分数 <3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件分析。定量数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和两两比较的 LSD-*t* 检验;定性资料采用 χ^2 和 R \times C 分割的 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

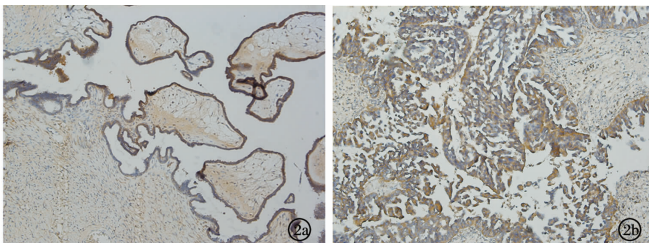
2.1 ALDH1 蛋白在卵巢组织中的表达 在卵巢癌组织中 ALDH1 蛋白的表达为阳性,呈棕黄色颗粒,主要位于细胞质;卵巢良性肿瘤和卵巢正常组织中 ALDH1 蛋白表达为阴性或弱阳性(图 1)。在不同卵巢组织中,卵巢恶性肿瘤与正常组织或良性肿瘤相比,ALDH1 蛋白表达水平和阳性率均明显升高(P 均 < 0.01),但正常卵巢组织与良性肿瘤之间无统计学差异(P 均 > 0.05);在卵巢癌不同临床病理分期中,晚期(III~IV 期)卵巢癌组织 ALDH1 蛋白表达水平和阳性率均高于早期(I~II 期)卵巢癌(P 均 < 0.01);在卵巢癌不同分化程度中,G1 的 ALDH1 蛋白表达水平和阳性率明显低于 G2、G3 (P 均 < 0.01)。见表 1。

2.2 Nanog 蛋白在卵巢组织中的表达 在卵巢癌组织中 Nanog 蛋白表达呈阳性,为棕黄色颗粒,主要位于细胞质;卵巢良性肿瘤和卵巢正常组织中 Nanog 蛋白表达为阴性或弱阳性(图 2)。在不同卵巢组织中,卵巢恶性肿瘤与正常组织或良性肿瘤相比,Nanog 蛋白表达水平和阳性率明显升高(P 均 < 0.01),但在正常卵巢组织与良性肿瘤之间无统计学差异($P > 0.05$);在卵巢癌不同临床病理分期中,晚期(III~IV 期)卵巢癌组织 Nanog 蛋白表达水平和阳性率高于早期(I~II 期)卵巢癌(P 均 < 0.01);在卵巢癌不同分化程度中,G1 的 Nanog 蛋白表达水平和阳性率明显低于 G2、G3 (P 均 < 0.01)。见表 1。



注:1a:正常卵巢组织;1b:卵巢癌组织。

图1 ALDH1 蛋白在卵巢组织中的表达(免疫组化, ×200)



注:2a:正常卵巢组织;2b:卵巢癌组织。

图2 Nanog 蛋白在卵巢组织中的表达(免疫组化, ×200)

表1 ALDH1 和 Nanog 蛋白在各种卵巢组织的表达

不同组织类型及恶性 肿瘤的分期、分级	例数	ALDH1		Nanog	
		阳性[例(%)]	表达水平(分, $\bar{x} \pm s$)	阳性[例(%)]	表达水平(分, $\bar{x} \pm s$)
正常卵巢组织	20	6(30.0) ^①	1.70 ± 1.342 ^①	5(25.0) ^①	1.60 ± 1.429 ^①
卵巢良性肿瘤	20	5(25.0) ^①	1.75 ± 1.650 ^①	4(20.0) ^①	1.60 ± 1.536 ^①
卵巢恶性肿瘤	60	40(66.7)	5.68 ± 3.829	41(68.3)	6.05 ± 3.657
恶性肿瘤临床分期					
I ~ II	18	5(27.8)	2.39 ± 2.279	4(22.2)	1.94 ± 1.056
III ~ IV	42	35(83.3) ^②	7.26 ± 3.623 ^②	37(88.1) ^②	7.62 ± 3.320 ^②
恶性肿瘤组织学分级					
G1	18	2(11.1)	1.22 ± 1.396	6(33.3)	2.17 ± 1.757
G2	20	18(90.0) ^③	7.75 ± 2.712 ^③	15(75.0) ^③	5.90 ± 3.275 ^③
G3	22	20(90.9) ^③	7.32 ± 3.213 ^③	20(90.9) ^③	8.64 ± 3.472 ^③

注:与卵巢恶性肿瘤相比,^① $P < 0.01$;与 I ~ II 期相比,^② $P < 0.01$;与 G1 相比,^③ $P < 0.01$ 。

3 讨论

ALDH1 是 ALDH 家族成员之一,是一种负责细胞内醛类物质脱氢氧化的酶,在干细胞分化早期催化视黄醇氧化为视黄酸^[5],参与多种组织的分化和基因表达,也是组织中正常干细胞与肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)生长、分化的必需物质^[6-7]。人类的 ALDH1 基因表达存在于细胞质中,其基因克隆和定位在 9q21 染色体,由 53×10^3 个碱基对构成,包含 13 个外显子,共编码 501 个氨基酸序列。2007 年, Ginestier 等^[8]研究发现,只用 500 个 ALDH1 + 细胞就能形成肿瘤,ALDH1 + CD44⁺/CD24⁻的细胞只要 20 个就能形成肿瘤,而即使用 5 000 个 ALDH1(-)细胞也不会形成肿瘤,说明 ALDH1(+)的乳腺癌细胞具有很高的致瘤能力,目前 ALDH1 已成为乳腺癌干细胞的标记物;另有研究表明 ALDH1 也是头颈部鳞状细胞癌、眼癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌、结直肠癌干细胞的通用标记物^[9-10]。Sládek 等^[11]研究表明那些对以环磷酰胺(CTX)为主的联合化疗没有反应的转移性肿瘤细胞比有反应的肿瘤细胞 ALDH1 显著高表达。马圣伟等^[12]研究表明 ALDH1 与血管新生有关,肿瘤细胞周围新生血管增多,为肿瘤提供了丰富的营养及氧供,促进了肿瘤的生长及转移。以上研究结果表明 ALDH1 在肿瘤的发生、发展、转移和耐药中发挥重要作用。目前国内外仅有少数文章是关于 ALDH1 在卵巢癌方面的研究,结果显示 ALDH1 高表

达的卵巢癌患者其肿瘤细胞具有更强的侵袭性,更易发生肿瘤耐药,且患者预后较差。本研究结果显示 ALDH1 在卵巢癌中的表达明显高于正常卵巢组织和卵巢良性肿瘤,且随着临床手术病理分期和组织学分级的增加,ALDH1 蛋白的表达程度增加,而临床上我们常常发现随着临床手术病理分期和组织学分级的增加,患者术后复发及耐药增加,病死率增高,预示着 ALDH1 可能与卵巢癌的发生发展及耐药有关。

Nanog 基因是 2003 年才被正式鉴定并命名的新基因,属于 ANTP 同源基因家族成员,位于染色体 12p13.31,全长 6 661bp,由 4 个外显子和 3 个内含子组成。Nanog 基因在全能或多能干细胞中表达,是维持胚胎干细胞多向分化潜能的重要因子,而肿瘤细胞与胚胎干细胞有相似性,具有自我更新、分裂增殖的能力,所以我们推测 Nanog 基因与肿瘤有着密切的关系。研究发现 Nanog 基因缺陷的胚胎干细胞失去多能性,并开始分化,表明 Nanog 基因的下调与分化有关。大量的研究结果显示采用 RNA 干扰技术敲除 Nanog 基因将抑制肿瘤的发展,表明 Nanog 基因在肿瘤的发展中起非常重要的作用^[3]。有研究表明 Nanog 基因不仅在早期发育的胚胎及人类胎儿的卵巢及睾丸原始干细胞中表达,在培养的肿瘤细胞、异体移植体和人类原发的前列腺肿瘤细胞中也都存在不同程度的表达^[13]。有研究表明 Nanog 基因在胃癌、肺癌、食管癌、肺癌等实体肿瘤中也可以表达,且随着肿瘤临床分期及组织学分级的增高,Nanog 基因

的表达增强^[14-15],本研究结果与其一致。

本实验采用免疫组化的方法研究 ALDH1 和 Nanog 蛋白在卵巢癌中的表达。结果显示,ALDH1 和 Nanog 蛋白在卵巢正常组织和良性肿瘤中不表达或少量表达,明显低于卵巢癌组织中的表达;另外随着临床病理分期和组织学分级的增加,ALDH1 和 Nanog 蛋白的表达程度增加。上述结果提示二者可能与卵巢癌的发生发展有关,且在一定程度上影响着肿瘤的分化程度,二者联合检测有可能为卵巢癌的早期诊断和预后评估提供新的依据。

参考文献

- [1] 秦瑞,刘俊宝,曹璐,等. 卵巢上皮性癌组织中 P21 蛋白的表达及其临床意义[J]. 吉林大学学报,2012,38(1):98-101.
- [2] Marx J. Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer[J]. Science,2003,301(5638):1308-1310.
- [3] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell,2006,126(4):663-676.
- [4] Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, et al. Human aldehyde dehydrogenase gene family[J]. Eur J Biochem,1998,251(3):549-557.
- [5] Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(31):11707-11712.
- [6] 张海涛,金美善,石爱平,等. 肿瘤干细胞标记物 ALDH1 在非浸润性膀胱癌组织中的表达及其临床意义[J]. 吉林大学学报(医学版),2013,39(2):326-329,插 3.
- [7] Schwartz T, Stark A, Pang J, et al. Expression of aldehyde dehydro-

genase1 as a marker of mammary stem cells in benign and malignant breast lesions of Ghanaian women[J]. Cancer,2013,119(3):488-494.

- [8] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome [J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 555-567.
- [9] Chen YC, Chen YW, Hsu HS, et al. Aldehyde dehydrogenase1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(3): 307-313.
- [10] Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis [J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3382-3389.
- [11] Sládek NE, Kollander R, Sreerama L, et al. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH 1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2002, 49(4): 309-321.
- [12] 马圣伟,黄江平,崔丰和,等. 老年食管鳞癌患者术后组织中乙醛脱氢酶 1 和血管内皮生长因子表达的临床意义[J]. 中国老年学杂志,2014,34(2):522-523.
- [13] 柳霞,龙梅,蒋晖,等. 人 Nanog 基因的克隆及其在 COS-7L 细胞中的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2004,20(4):495-498.
- [14] 韩敬华,张飞,武冰,等. Nanog 在多种癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(1):10-13.
- [15] 骆梅青,卜庆,曹轶林,等. 干细胞标志物 Nanog 检测在肺癌诊断中的意义[J]. 现代医药卫生,2013,29(13):1924-1925.

收稿日期:2015-01-16 修回日期:2015-03-17 编辑:王海琴