

Mirk /Dyrk1b 在上皮性卵巢癌组织中的表达及意义<sup>①</sup>杨湘军<sup>②</sup> 高景春 殷平<sup>④</sup> 胡文峰<sup>③</sup> 廖洪锋 缪智辉 潘超 李娜

厦门大学附属中山医院 (福建 厦门) 361004

中国图书分类号 R737.31 文献标识码 A 文章编号 1001-4411 (2011) 35-5614-03

**【摘要】** 目的: 探讨 Mirk/Dyrk1b (Minibrain - related kinase /Dual specificity tyrosine - phosphorylation - regulated kinase 1B) 在卵巢组织中的表达及其临床意义。方法: 利用免疫组化检测 Mirk/Dyrk1b 在 30 例上皮性卵巢癌、20 例上皮性卵巢囊腺瘤、10 例正常卵巢组织中的表达。结果: Dyrk1b 在上皮性卵巢癌中的表达明显高于上皮性卵巢囊腺瘤及正常卵巢组织 ( $P < 0.05$ ), 而其在正常的卵巢组织中几乎不表达; Dyrk1b 的阳性率与卵巢癌的组织学分化程度有明显的相关性 ( $P < 0.01$ ), 与卵巢癌的临床分期、有无淋巴转移等无明显相关性 ( $P > 0.05$ )。结论: Dyrk1b 在上皮性卵巢癌中高表达, 提示其可能参与了肿瘤的发生和发展, 并有望成为临床早期诊断的肿瘤标志物和新的卵巢癌治疗的靶基因。

**【关键词】** Mirk/Dyrk1b 卵巢癌 免疫组化

## Expression and clinical significance of Mirk/Dyrk1b in epithelial ovarian cancer tissue

YANG Xiang - Jun , GAO Jing - Chun , YIN Ping et al. Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University , Xiamen 361004 , Fujian , China

**(Abstract)** **Objective:** To explore the expression and clinical significance of minibrain - related kinase/dual specificity tyrosine - phosphorylation - regulated kinase 1b ( Mirk/Dyrk1b) in ovarian tissue. **Methods:** Immunohistochemical staining method was used to detect the expression levels of Mirk/Dyrk1b in 30 cases with epithelial ovarian cancer , 20 cases with epithelial ovarian cystadenoma and 10 cases with normal ovarian tissue. **Results:** The expression level of Dyrk1b in epithelial ovarian cancer was significantly higher than that in epithelial ovarian cystadenoma and normal ovarian tissue ( $P < 0.05$ ), but Dyrk1b rarely expressed in normal ovarian tissue. There was a significant correlation between the positive rate of Dyrk1b and degree of histological differentiation ( $P < 0.01$ ), but there was no correlation between the positive rate of Dyrk1b and clinical stage and lymph node metastasis of ovarian cancer ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** The expression level of Dyrk1b in epithelial ovarian cancer is high, which indicates that it may participate in the occurrence and development of epithelial ovarian cancer, and it may become to be a tumor marker for clinical early diagnosis and a new target gene for treatment of ovarian cancer.

**(Key words)** Mirk/Dyrk1b; Ovarian cancer; Immunohistochemistry

卵巢癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 由于其发病隐匿, 临床不易早期诊断, 且易对化疗药物形成耐药, 故患者预后较差, 术后 5 年存活率较低。因而找到有助于临床早期诊断的肿瘤标志物和新的卵巢癌治疗的靶基因是目前卵巢癌研究的热点之一。Dyrk1b 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 属于 Dyrk 家族。研究发现, Dyrk1b 除在人类的脑组织及肌肉组织中有表达外, 在大多数正常组织中呈低表达或不表达<sup>(1)</sup>, 但在某些恶性肿瘤组织中呈高水平表达, 如胰腺癌、大肠癌、非小细胞肺癌、骨肉瘤等<sup>(1-4)</sup>。而在卵巢癌中的表达状况及其作用机制目前尚无定论, 该研究采用免疫组化方法检测了卵巢癌组织中 Dyrk1b 的表达情况, 及其与一般病理资料、临床分期等之间的关系, 以探讨 Dyrk1b 在卵巢癌发生中的作用及其临床意义。

### 1 材料与方法

①福建省自然科学基金计划项目 (2010J01236)

②福建医科大学教学医院妇产科

③厦门大学医学院在读硕士研究生

④通讯作者

**1.1 标本来源** 收集 2004 年 ~ 2009 年 12 月期间厦门大学附属中山医院妇产科收治的并经病理检查确诊的上皮性卵巢癌患者 30 例 (包括浆液性 25 例和黏液性 5 例), 良性囊腺瘤 20 例 (包括浆液性和黏液性各 10 例), 卵巢滤泡囊肿 10 例。

**1.2 主要试剂** 一抗为兔抗人 DYRK1B 多克隆抗体 (AP7538b) 购自 ABGENT 公司。抗体稀释浓度为 1:100。二抗选用福州迈新生物技术开发有限公司的即用型快速免疫组化 MaxVision™ 检测试剂盒。柠檬酸抗原修复液、DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

**1.3 方法** 采用 SP 免疫组化染色法。①石蜡组织标本 5 μm 切片, 60 度烤片, 二甲苯脱蜡、梯度酒精水化, 自来水冲洗; ②用柠檬酸抗原修复液进行抗原修复 20 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; ③3% 过氧化氢室温孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶的活性, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; ④5% 的非免疫动物血清进行抗原封闭, 室温孵育 10 min, 弃血清; ⑤每张切片滴加 100 μl 一抗, 置 4℃ 冰箱内过夜; ⑥PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 每张切片加 100 μl 即用型 MaxVision™ 试剂, 室温下孵育 15 min; ⑦ DAB 显色, 显微镜下观察控制显色时间, 每张切片约显色 4 ~ 5 min, 自来水冲洗; ⑧苏木素复染, PBS

或自来水冲洗返蓝，梯度酒精脱水后，用二甲苯透明，中性树脂封片固定。

1.4 对照设置 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性对照选用平滑肌瘤组织切片。HE 染色作组织学对照。阴性对照和阳性对照采用同样的实验步骤。

1.5 结果评定 根据阳性细胞所占比例评定。在 400 倍显微镜下每张切片至少计数 5 个视野，计数每个视野中癌细胞总数及阳性癌细胞数，结果用平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

①染色强度: 0 分为无着色, 1 分为淡黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色。②阳性细胞的百分比: 1 分为阳性细胞 ≤ 10%, 2 分为 11% ~ 50%, 3 分为 51% ~ 75%, 4 分为 > 76%。按染色强度与阳性细胞所占百分比的乘积的高低分: 0 分为阴性 (-), 1 ~ 4 分为阳性 (+), 4 分以上为强阳性 (++)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计学分析软件, 应用  $\chi^2$  检验, Fisher 确切概率法。

## 2 结果

2.1 Dyrk1b 的分布 Dyrk1b 主要分布于卵巢肿瘤细胞的胞浆中, 呈棕黄色染色。见图 1、图 2。

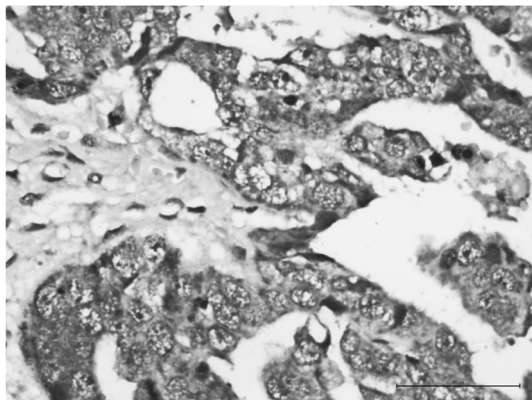


图 1 Dyrk1b 在浆液性卵巢癌中的表达 × 400

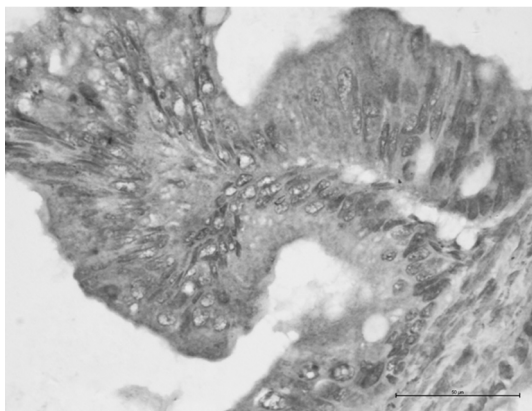


图 2 Dyrk1b 在黏液性卵巢癌中的表达 × 400

2.2 Dyrk1b 在卵巢肿瘤中的表达 见表 1。Dyrk1b 在上皮性卵巢癌中的表达明显高于上皮性卵巢囊腺瘤及正常卵巢组织

( $P < 0.05$ ), 而其在正常的卵巢组织中几乎不表达。

2.3 Dyrk1b 阳性者的临床资料 Dyrk1b 表达与上皮性卵巢癌的组织学分化程度有明显的相关性 ( $P < 0.01$ ), 与卵巢癌的临床分期、淋巴结转移等无明显相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 1 Dyrk1b 在不同卵巢组织中的表达

组别	n	Dyrk1b			总阳性率 (%)	强阳性率 (%)
		-	+	++		
卵巢滤泡囊肿	10	8	2	0	20.0 <sup>①</sup>	0 <sup>①</sup>
上皮性卵巢囊腺瘤	20	12	7	1	40.0 <sup>①</sup>	5.0 <sup>①</sup>
上皮性卵巢癌	30	8	10	12	73.3	40.0

注: 与上皮性卵巢癌组织相比, ① $P < 0.05$ 。

表 2 Dyrk1b 在不同上皮性卵巢癌中的临床病理资料

临床资料	n	Dyrk1b 阳性		P 值
		n	%	
年龄(岁)				0.195 4
≤50	9	5	55.5	
>50	21	17	80.9	
组织学分化				
高	9	3	33.3	
中	6	4	66.7	0.204 9 <sup>①</sup>
低	15	15	100.0	0.000 6 <sup>②</sup>
临床分期				0.311 9
I ~ II	12	10	83.3	
III ~ IV	18	12	66.7	
淋巴结转移				0.311 9
无	12	10	83.3	
有	18	12	66.7	

注: 与高分化组相比, ① $P > 0.05$ , ② $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

在过去的 20 多年里, 虽然血清中的肿瘤抗原 CA125 被临床用于预测卵巢癌患者预后以及手术前后化疗效果评估的指标, 但是最近的大样本回顾性研究发现, 血清 CA125 的监测并不能帮助临床早期诊断卵巢癌<sup>(5)</sup>。Mirk/Dyrk1b 定位于人类第 19 号染色体的 q12 - q13.11 上, 自 1999 年 Leder 等发现了 Dyrk 家族的新成员 Dyrk1b 后, 已在胰腺癌、非小细胞肺癌、骨肉瘤等恶性肿瘤中检测出高表达。有研究都最新报道, Dyrk1b 在 28 例卵巢癌患者中有 21 例呈阳性表达。该研究中 30 例卵巢癌中有 22 例呈阳性表达, 其概率与之前报道基本一致。研究发现, Dyrk1b 在卵巢上皮性恶性肿瘤组织中的表达明显高于在良性卵巢上皮性囊腺瘤中的表达 ( $P < 0.05$ ), 其表达量与卵巢癌的组织学分化程度有一定的相关性, 其中高分化组与低分化组之间 Dyrk1b 的表达有明显统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 表明 Dyrk1b 有可能与卵巢癌的发生和发展有关。该研究未发现 Dyrk1b 与患者年龄、疾病临床分期以及有无淋巴结转移有明显的相关性, 考虑到研究例数有限, 在今后的研究中将加大样本数, 利用基础到临床的转化研究手段进一步研究和探讨 Dyrk1b 在卵巢癌中的作用。Jin K 等<sup>(6)</sup>报道 Mirk/Dyrk1b 可以调节肿瘤细胞由 G<sub>0</sub> 期进入 G<sub>1</sub> 期, 并且发现 Dyrk1b 基因沉默后可诱发细胞凋亡以及相关的蛋白, 如 PARP、caspase - 3<sup>(7)</sup>、bcl - 2 等的

表达改变,说明 Dyrk1b 基因有望成为临床早期诊断的肿瘤标志物和新的肿瘤治疗的靶基因。

4 参考文献

1 Lee K, Den X, Friedman E. Mirk protein kinase is a mitogen - activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells (J) . Cancer Research , 2000 , 60: 3631

2 Deng X, Ewton DZ, L S *et al.* The kinase Mirk/Dyrk1b mediates cell survival in non - small cell lung cancer cells (J) . Cancer Research , 2006 , 66: 4149

3 Gao J, Zheng Z, Rawal B *et al.* Mirk/Dyrk1b , a novel therapeutic target , mediates cell survival in non - small cell lung cancer cells (J) .

Cancer Biol Ther , 2009 , 8 ( 17) : 1671

4 Mercer SE, Ewton DZ, Shah S *et al.* Mirk/Dyrk1b mediates cell survival in rhabdomyosarcomas (J) . Cancer Research , 2006 , 66: 5143

5 Woodward ER, Sleightholme HV, Considine AM *et al.* Annual surveillance by CA125 and transvaginal ultrasound for ovarian cancer in both high - risk and population risk women is ineffective (J). BJOG , 114( 12) :1500

6 Jin K, Ewton DZ, Park S *et al.* Mirk regulates the exit of colon cancer cells from quiescence (J). Biological Chemistry 2009 284( 34) :22916

7 Hu J, Friedman E. Depleting Mirk kinase increases cisplatin toxicity in ovarian cancer cells (J) . Genes Cancer , 2010 , 1 ( 8) : 803

(2011-08-26 收稿) (编校 邹庆红)

## 新疆地区维族、汉族妇女宫颈病变中 p16INK4a 蛋白的表达及意义<sup>①</sup>

刘莹 周瑾<sup>②③</sup> 石河子大学医学院 (新疆 石河子) 832000

中国图书分类号 R711.74 文献标识码 A 文章编号 1001-4411 (2011) 35-5616-03

**【摘要】** 目的: 探讨抑癌基因 p16INK4a 蛋白在新疆维族、汉族妇女宫颈疾病中的表达及意义。方法: 采用免疫组化 SP 法, 检测 240 例新疆地区妇女宫颈病变组织中 p16INK4a 蛋白的表达。结果: 维族、汉族妇女各 120 例, 依据病理诊断结果分为 4 组, 非瘤变组 (正常及慢性炎症组) 30 例, CIN I 组 30 例, CIN II - III 组 30 例, 宫颈鳞癌组 30 例。汉族各组 p16INK4a 蛋白阳性率分别为 0 (0/30)、26.7% (8/30)、90.0% (27/30)、100.0% (30/30), 维族各组 p16INK4a 蛋白阳性率分别为 0 (0/30)、33.3% (10/30)、76.7% (23/30)、100.0% (30/30)。两组间比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 组内比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 组内两两比较 CIN II - III 组和宫颈鳞癌组无统计学差异, 其余两两比较有统计学差异。结论: p16INK4a 蛋白过度表达与宫颈疾病及其癌变的发生关系密切; 新疆地区维族、汉族妇女宫颈病变及癌变中 p16INK4a 蛋白表达无统计学差异。

**【关键词】** 宫颈鳞癌 宫颈疾病 p16INK4a 蛋白 免疫组化法

## Expression and significance of p16INK4a protein in cervical lesions of women of Uygur nationality and Han nationality in Xinjiang region

LIU Ying, ZHOU Jin. Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

**(Abstract)** **Objective:** To explore the expression and significance of tumor suppressor gene p16INK4a protein in cervical lesions of women of Uygur nationality and Han nationality in Xinjiang. **Methods:** Immunohistochemical SP method was used to detect the expression levels of p16INK4a protein in cervical lesion tissues of 240 women in Xinjiang. **Results:** 120 women of Uygur nationality and 120 women of Han nationality were included in the study, then they were divided into four groups according to the result of pathological diagnosis: non - neoplasia group (including normal women and the women with chronic inflammation), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I group, CIN II ~ III group and cervical squamous cell carcinoma group, 30 women in each group. Among the women of Han nationality, the positive rates of p16INK4a protein in non - neoplasia group, CIN I group, CIN II ~ III group and cervical squamous cell carcinoma group were 0 (0/30), 26.7% (8/30), 90.0% (27/30) and 100.0% (30/30), respectively; and among the women of Uygur nationality, the positive rates of p16INK4a protein in non - neoplasia group, CIN I group, CIN II ~ III group and cervical squamous cell carcinoma group were 0 (0/30), 33.3% (10/30), 76.7% (23/30) and 100.0% (30/30), respectively; there was no significant difference between Uygur group and Han group ( $P > 0.05$ ), but there was significant difference among different subgroups ( $P < 0.05$ ) except in CIN II ~ III group and cervical squamous cell carcinoma group. **Conclusion:** Overexpression of p16INK4a protein is related to the occurrence of cervical lesion and cervical carcinogenesis closely; there is no significant difference in the expression level of p16INK4a protein in cervical lesion and cervical carcinogenesis tissue between the women of Uygur nationality and the women of Han nationality.

**(Key words)** Cervical squamous cell cancer; Cervical disease; p16INK4a protein; Immunohistochemistry

①兰州军区医药卫生科研基金资助项目 (LXH - 2006032)

②兰州军区乌鲁木齐总医院妇产科

③通讯作者

宫颈癌是导致女性死亡的主要恶性肿瘤之一, 其发生发展与多种抑癌基因的失活相关。p16INK4a 基因定位于人 9p21, 直接参与细胞周期从 G1 进入 S 期的调节。目前国内从