

HMGB1 在卵巢癌中的表达及临床意义

贺小燕¹ 王海琳^{2△} 陈晓红¹ 陈丑彦¹

(1 兰州大学第一临床医学院 甘肃 兰州 730000; 2 甘肃省人民医院 妇产科 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:探讨高迁移率蛋白 B1(HMGB1)在卵巢癌患者血清及组织中的表达及临床意义。**方法:**采用 ELISA 技术检测 96 例女性血清中 HMGB1 水平,其中盆腔肿物住院患者 66 例按照术后病理结果分为卵巢良性肿瘤组 40 例和卵巢癌组 26 例,健康女性 30 例作为正常对照组,并通过免疫组织化学技术进一步检测卵巢癌、卵巢良性肿瘤组织中的表达情况。**结果:**卵巢癌组 HMGB1 水平明显高于其他两组,差异有统计学意义($P<0.05$),正常对照组和卵巢良性肿瘤组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**HMGB1 测定有助于鉴别卵巢良恶性肿瘤。

关键词:HMGB1;卵巢癌;肿瘤标志物;免疫组织化学

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文献标识码:**1673-6273(2011)04-695-03

Expression and clinical significance of HMGB1 in ovarian carcinoma

HE Xiao-yan¹, WANG Hai-lin^{2△}, CHEN Xiao-hong¹, CHEN Chou-yan¹

(1 The first clinical medicine college of Lan zhou University, 730000 Lanzhou, China;

2 The people Hospital of Gansu province, 730000, Labzhou, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression and clinical significance of HMGB1 in ovarian carcinoma. **Methods:** ELISA method was used to detect the expression of serum HMGB1 in 26 ovarian carcinoma, 40 benign ovarian tumor and 30 healthy women. Moreover, Immunohistochemical SABC method was used to detect the expression of HMGB1 in 26 ovarian carcinoma tissues and 40 benign ovarian tumor tissues. **Results:** The expression of HMGB1 were higher in ovarian carcinoma than that in the others, showing a significant difference ($P<0.05$). There were no significant difference between normal control group and benign ovarian tumor group ($P>0.05$). **Conclusion:** The expression of HMGB1 might be as one of the parameters for identifying benign ovarian tumor and ovarian carcinoma.

Key words: HMGB1; Ovarian cancer; Tumor markers; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification: R737.31 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-695-03

前言

卵巢为一对扁椭圆形性腺,位于女性盆腔深部,具有生殖和分泌作用。卵巢癌是女性生殖器常见的三大恶性肿瘤之一,其中上皮卵巢癌最多见,占卵巢恶性肿瘤的 80%-90%^[1]。由于卵巢组织成分非常复杂,是全身原发肿瘤组织类型最多的部位。目前国内外尚缺乏卵巢癌的早期诊断手段,临床初诊患者 70%-80%已是中晚期,5 年生存率大约在 20%-40%左右^[2],且其复发率很高,因此卵巢癌死亡率居妇科恶性肿瘤首位。已成为严重威胁妇女生命与健康的主要肿瘤。

目前国内外广泛用于卵巢癌筛查和初步诊断的主要肿瘤标志物是癌抗原 CA125,但是其特异度不高,盆腔良性肿瘤及子宫内膜异位也可以引起 CA125 升高。HMGB1 是高迁移率蛋白(HMG)成员之一,20 世纪 60 年代被发现的^[3],与肿瘤侵袭和转移有密切关系。最近研究报道多种肿瘤中 HMGB1 成高表达,但是妇科肿瘤中目前国内外研究甚少。本实验对 26 例卵巢癌、40 例卵巢良性肿瘤及 30 例正常健康女性进行检测 HMGB1 变化水平,以探讨其在卵巢癌中的表达情况及临床意

义。

1 材料与方法

1.1 一般资料

66 名卵巢肿瘤患者来自甘肃省人民医院妇产科 2009 年 10 月至 2010 年 10 月住院病人,手术后通过病理诊断确诊 26 名为卵巢癌,年龄 32 岁~75 岁,平均年龄 45 岁。其中卵巢浆液性囊腺癌 16 例,粘液性囊腺癌 8 例,子宫内膜样腺癌 2 例;按照 FIGO 分期:I 期-II 期 8 例,III 期-IV 期 18 例;伴有淋巴结和远处转移者 20 例,无转移者 6 例。40 名卵巢良性肿瘤,年龄 23 岁~56 岁。平均年龄 30 岁,都排除身体其他部位肿瘤。30 名健康对照女性来源于甘肃省人民医院体检人群,未发现妇科及其它部位肿瘤。

血清标本收集:所有患者都在术前未接受任何治疗的情况下,清晨空腹抽取静脉血 5ml,使用转速为 3000r/min 离心机离心 15 分钟,将血清吸出后分装于 -70℃ 冰箱保存,直至实验测试时。健康女性于体检空腹抽血时同时抽取静脉血,离心与保存方法同上。

组织标本收集:卵巢肿瘤组织标本均在患者手术时收集被切除的肿瘤组织,立即于 10%甲醛中固定并在 24 小时之内石蜡包埋后保存至实验时。

人高迁移率蛋白 B1 (HMGB1)ELISA 试剂盒由美国

作者简介:贺小燕(1978-),女,硕士研究生,研究方向:妇科肿瘤,电话:0931-8626940,E-mail:xiaoyanhe2010@163.com
△通讯作者:王海琳,E-mail:wanghailinyx@163.com
(收稿日期:2010-11-03 接受日期:2010-11-28)

R&D 公司生产; 免疫组化兔抗人 HMGB1 单克隆抗体为博奥森产品, 二抗试剂盒购于武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 检测方法严格按照 HMGB1 试剂说明书步骤进行操作

1.2.2 免疫组织化学法 常规切片(4um), HE 染色。免疫组织化学染色: 采用链霉亲和素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物技术 (SABC 法), 将防脱片处理过的组织捞片, 切片经 62℃ 烤片 12h, 二甲苯及梯度酒精脱蜡至水。将切片放入有枸橼酸盐缓冲液 (PH: 6.0) 的容器中, 置微波炉中加热, 中低火持续 20min, 取出容器冷却至室温, 用蒸馏水对本切片清洗 1~2 次, PBS 清洗 3 次, 每次 3min; H₂O₂ 消化 10min; 在室温下用山羊血清封闭 20min, 一抗 (兔抗人 HMGB1) 4℃ 过夜; PBS 液漂洗 3 次, 每次 3min; 20~30℃ 下二抗 (生物素化羊抗兔 IgG) 20min; PBS 液漂洗 3 次, 每次 3min; 20~30℃ 下 SABC 法处理 20min; PBS 液漂洗 3 次, 每次 3min; DAB 显色 5~30min; 苏木素复染; 脱水、透明、封片后光镜下观察。PBS 代替一抗作为阴性对照。染色结果以细胞核内出现淡黄色至棕褐色颗粒, 定位明确, 染色

明显, 平均 20 % 以上的细胞染色的组织切片视为表达阳性。每个切片采集 5 个视野, 采用图像分析系统分析其表达强度。

1.3 统计学分析

应用 SPSS17.0 软件进行分析, 计量资料以 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 多组间均数比较采用方差分析, 两组间均数比较用 t 检验; P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 检测结果

三组资料比较, 卵巢癌组 HMGB1 水平明显高于其它两组 (P<0.05), 而正常对照组和卵巢良性肿瘤组比较差异无统计学意义 (P>0.05); 见表 1。

在卵巢癌患者中有淋巴结及远处转移者 HMGB1 表达水平也高于无转移者, 二者比较差异有统计学意义 (P<0.05); FIGO 分期为 III-IV 期患者 HMGB1 水平高于 I-II 期, 二者比较差异有统计学意义 (P<0.05); 而病理类型不同的患者 HMGB1 表达不同, 但是三组比较差异无统计学意义 (P>0.05)。见表 2

表 1 三组中 HMGB1 含量比较 ($\bar{X} \pm S$)
Table 1 Comparison of HMGB1 in the three groups

Group	case	HMGB1(ug/ml)
Control group	30	101.08± 17.43*
Benign ovarian tumor	40	104.90± 24.82*
Ovarian carcinoma	26	218.44± 28.52

Note: Ovarian carcinoma group compared with control group and benign ovarian tumor, *P<0.05;
Benign ovarian tumor compared with Control group, P>0.05

表 2 不同临床病理特征患者 HMGB1 含量比较 ($\bar{X} \pm S$)
Table 2 Comparison of HMGB1 in clinical cases with different pathology characteristics

Pathology characteristics	case	HMGB1(ug/ml)
Metastasis		
yes	20	230.76± 17.87*
no	6	177.40± 14.97*
FIGO stage		
I - II	8	234.12± 15.40*
III - IV	18	183.18± 16.58*
Pathology type		
Serous cystadenocarcinoma	16	223.31± 31.93▲
Mucinous cystadenocarcinoma	8	206.57± 21.90▲
Endometrioid carcinoma	2	227.05± 4.26▲

Note: The comparison among groups, *P<0.05; ▲P>0.05

2.2 免疫组化结果显示

卵巢癌组织中 HMGB1 表达呈强阳性, 主要表达于组织细胞核内, 阳性染色呈淡黄色至棕黄色颗粒状 (图 1), 卵巢癌组中阳性表达率为 76.9 % (20/26); 而卵巢良性肿瘤组织细胞核表达微量或几乎没有表达, 阳性表达率为 12.5 % (5/40), 两者比较差异有统计学意义 (P<0.05)。

3 讨论

人高迁移率组蛋白 B-1 (HMGB1) 是与染色体结合的非组蛋白成员之一, 分子量约 30ku, 其蛋白基因定位于染色体 13q12 带, 编码含 215 个氨基酸。HMGB1 是一种广泛存在的核蛋白, 为高度保守的序列。与 DNA 结合可以稳定核小体的形状, 有调节转录活性的作用^[9]。近年研究表明, HMGB1 与肿瘤的生长、浸润、转移有密切关系, 在多种肿瘤和未成熟细胞内表达较丰富^[5]。

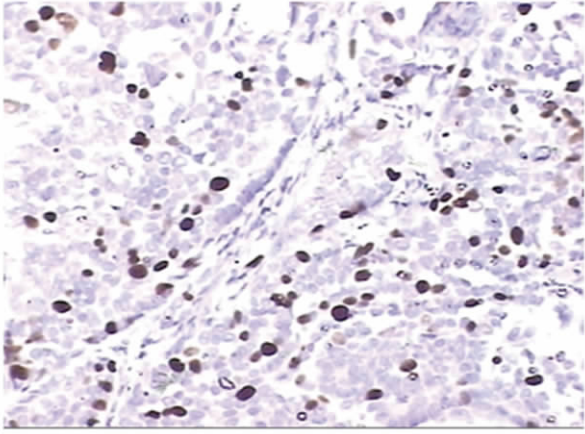


图1 HMGB1 在卵巢癌组织中的表达(SP× 400)

Fig.1 Expression of HMGB1 in ovarian carcinoma

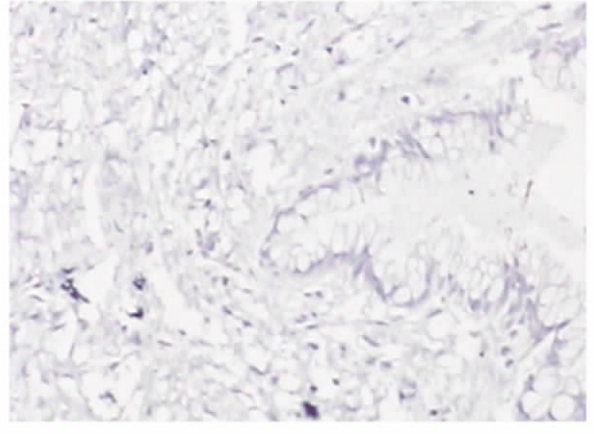


图2 HMGB1 在卵巢良性肿瘤组织中的表达(SP× 400)

Fig.2 Expression of HMGB1 in ovarian benign tumor

有学者研究发现, HMGB1 在多种肿瘤中高度表达, 已有研究证实在直肠癌、胰腺癌、乳腺癌以及宫颈癌中都存在 HMGB1 表达过高。黄庆先等人实验证明 HMGB1 在胰腺癌中表达与肿瘤的大小以及浸润和转移呈正相关, 而在正常胰腺组织中无表达^[6]。天津医科大学附属肿瘤医院的付欣^[7]等人应用 Western blot 技术检测了 HMGB1 在宫颈鳞癌组织中的表达情况。结果表明 HMGB1 与肿瘤的分化程度无关, 而与肿瘤的大小以及浸润和转移成正相关。这与在其它肿瘤方面研究结果相符。

本研究结果显示卵巢癌患者血清中 HMGB1 水平明显高于卵巢良性肿瘤和正常女性血清中, 并且应用免疫组织化学染色得到进一步证实, 在卵巢癌中呈强阳性表达, 而卵巢良性肿瘤中表达微量甚至不表达。这一点说明 HMGB1 的检测有助于卵巢良恶性肿瘤的鉴别。在卵巢癌组中有淋巴结及远处转移者 HMGB1 含量高于无转移者, 二者比较差异有统计学意义; II-IV 期患者血清中 HMGB1 水平高于 I-II 期者, 二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明 HMGB1 与卵巢癌的侵袭、浸润和转移有密切关系。这与在胰腺癌和宫颈癌中研究结果相一致。HMGB1 可能参与了肿瘤的浸润和转移, 但具体作用机制目前还不是很明显。有研究表明 HMGB1 促进肿瘤生长和转移是通过与其配体晚期糖基化终末产物 AGE 有关, 二者结合激活信号传导通路而引起 MMP-2 和 MMP-9 激活, 后两者可以使细胞外基质降解加速肿瘤的浸润和转移。另有在肺癌和结肠癌中研究显示 HMGB1 与血管内皮生长因子 (VEGF) 表达呈正相关, 推测 HMGB1 可能通过促进肿瘤血管生长而促使其浸润和转移^[8-9]。关于 HMGB1 作用机制还需要进一步的研究证实。

本实验研究结果表明血清中 HMGB1 检测有助于鉴别卵巢良恶性肿瘤, 并且通过抑制 HMGB1 的表达可能干预肿瘤的生长和浸润以及转移等生物行为, HMGB1 有望成为治疗和改善卵巢癌预后的一个靶点。

但是由于本研究中样本量相对较少, 可能与真实分布情况有误差, 对于其临床应用价值需要通过扩大样本量进一步做研究。

参考文献(References)

[1] 张丽丽, 邵淑丽, 武燕, OPN 和 B7-H4 在上皮性卵巢肿瘤中的表达

及意义 [J]. 癌症, 2010, 29(1): 25-29

Zhang Li-li, Shao Shu-li, Wu Yan, Expression of osteopontin and B7-H4 in epithelial ovarian neoplasm and their significance [J]. Chinese Journal of Cancer, 2010, 29(1): 25-29

[2] 李文, 刘彦, 金志军等, NM23-H1B 基因 mRNA 在卵巢上皮性肿瘤组织中表达的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(1): 48-51

Li Wen, Liu Jin, Jin Zhi-jun, et al. Study on mRNA expression of the human novel gene NM23-H1B in ovarian tumor [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology

[3] Muller S, Scaffidi P, Derynck B, et al. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal [J]. EMBO J, 2001, 20(16): 4337-4340.

[4] Sarac S, Ayhan A, Hosai AS, et al. Prognostic significance of PCNA expression in laryngeal cancer [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1998, 124(12): 1321.

[5] Taguchi A, Blood DC, Deltoro G, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumor growth and metastasis [J]. Nature, 2000, 405(6784): 354-360

[6] 黄庆先, 孙念峰, 王国斌等, 高迁移率族蛋白 1 基因在胰腺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 实用癌症杂志, 2004, 19(1): 19-23

Huang Qing-xian, Sun Nian-feng, Wang Guo-bin, et al. Expression of HMGB1 protein in human pancreatic carcinoma [J]. The Practical Journal of Cancer, 2004, 19(1): 19-23

[7] 付欣, 杜晓琴, 郝权, 宫颈鳞癌组织高迁移率族蛋白 HMGB1 表达及其临床意义的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(5): 357-359

Fu Xin, Du Xiao-qin, Hao Quan, Expression of HMGB1 protein in human cervical squamous epithelium carcinoma [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2008, 15(5): 357-359

[8] 徐圣葆, 梅晓冬, HMGB1、VEGF-C 在肺癌组织中的表达及临床意义 [J]. 山东医药, 2009, 49(12): 50-51

Xu Sheng-bao, Mei Xiao-dong, Expression and clinical significance of HMGB1 and VEGF-C in lung cancer [J]. Shandong Medical, 2009, 49(12): 50-51

[9] 李焱, 蒋凯, 卓文磊等, HMGB1 在结肠癌中的表达及其对 VEGF-C 的影响 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(6): 417-420

Li Yan, Jiang Kai, Zhuo Wen-lei, et al. Expression of HMGB1 in colon cancer and its effect on VEGF-C [J]. Chinese Clinical Oncology, 2007, 12(6): 417-420