

芳香化酶 P450Arom 在卵巢浆液性腺癌的表达及临床意义

马爱清, 张 秦, 刘 琦

(南京军区南京总医院, 南京大学医学院临床学院, 江苏 南京 210002)

摘 要: [目的] 探讨芳香化酶 P450Arom 与卵巢浆液性腺癌的相关性及对患者预后的影响。[方法] 采用免疫组织化学方法检测 57 例卵巢浆液性腺癌标本中 P450Arom 的表达, 并分析其与患者临床病理特征及预后的相关性。[结果] 57 例卵巢浆液性腺癌组织中 P450Arom 阳性率为 61.40%, 不同分期以及不同分级的患者之间表达有差异 ($P=0.016$; $P=0.000$), 肿瘤分期越高、分化越差, P450Arom 表达阳性率越高。P450Arom 阳性表达患者预后差, P450Arom 表达状况与患者年龄无关 ($P>0.05$)。Cox 多因素回归分析显示卵巢浆液性腺癌中 P450Arom 表达可增加患者死亡风险。[结论] 卵巢浆液性腺癌组织中存在 P450Arom 表达, 且与患者的预后差可能相关, 可为芳香化酶抑制剂在卵巢浆液性腺癌上的应用提供一定参考依据。

主题词: P450Arom; 卵巢肿瘤; 浆液性腺癌; 免疫组织化学; 预后

中图分类号: R737-31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)01-0006-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.01.B002

Expression of P450Arom in Ovarian Serous Adenocarcinoma and Its Clinical Significance

MA Ai-qing, ZHANG Qin, LIU Qi

(Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the correlation between P450Arom and ovarian serous adenocarcinoma, and the impact of expression of P450Arom on prognosis of the patients. [Methods] Expression of P450Arom was detected immunohistochemically in 57 samples of ovarian serous adenocarcinoma, and correlation between expression of P450Arom and clinicopathological features or prognosis was analyzed. [Results] In the 57 cases, the positive rate of P450Arom was 61.40%. There was significant difference of expression of P450Arom in patients with various stages ($P=0.016$) or in patients with various grades ($P=0.006$). The higher the stage, or the poor the differentiation, the higher the positive expression of P450Arom was found. Poor prognosis was found in P450Arom positive expression patients. There was no relationship between P450Arom expression and age ($P>0.05$). Multivariate survival analysis showed that P450Arom positive expression increased the risk of death. [Conclusion] Positive expression of P450Arom in the ovarian serous carcinoma might be associated with poor prognosis, which might provide evidence for the application of P450 enzyme inhibitors in patients with ovarian serous adenocarcinoma.

Subject words: P450Arom; ovarian neoplasms; serous adenocarcinoma; immunohistochemistry; prognosis

芳香化酶 P450 (P450 aromatase, P450Arom) 是雄激素向雌激素转化的关键酶, 位于相关细胞内质网膜和微粒体膜上并与膜紧密结合^[1,2], 它与 NADPH-细胞色素 P450 还原酶合称为芳香化酶。P450Arom 在

雌激素依赖性肿瘤如乳腺癌及子宫内膜癌中的研究已不罕见, 认为 P450Arom 与肿瘤发生及预后有相关性, 目前临床上已使用芳香化酶抑制剂来治疗乳腺癌。卵巢是女性性腺, 有研究认为卵巢癌也有雌激素相关性, 与 P450Arom 也可能存在关联, 因此芳香化酶抑制剂也有望用于一些难治性及复发性卵巢癌的治疗。基于此观点, 本研究首先选取治疗上最棘手的卵巢浆液性腺癌患者作为研究对象, 调取 57 例患

通讯作者: 刘琦, 主任医师, 硕士生导师; 南京军区南京总医院妇产科, 江苏省南京市玄武区中山东路 305 号 (210002); E-mail: liuqi02003@aliyun.com

马爱清为南京大学医学院硕士研究生

收稿日期: 2013-09-02; **修回日期:** 2013-11-25

者的石蜡标本,采用免疫组化方法检测 P450Arom 的表达,探讨 P450Arom 与卵巢浆液性癌的相关性及对患者预后的影响。

1 资料与方法

1.1 资料

收集 1997 年 10 月至 2007 年 1 月期间在南京军区总医院妇科住院初次手术经病理学确诊并排除其他重大疾病的卵巢浆液性腺癌患者共 57 例,进行临床病例资料的收集及术后生存时间随访。

入选病例的临床及病理资料:患者年龄 22~79 岁,平均年龄 52 岁;FIGO 分期:Ⅰ期 6 例、Ⅱ期 7 例、Ⅲ期 39 例、Ⅳ期 5 例;高级别组 34 例、低级别组 23 例。除Ⅰ期需要保留生育能力行患侧附件切除+健侧卵巢活检术外,所有患者均行全面手术分期,Ⅰc 期以上患者术后均行 PT 或 PAC 方案化疗至少 6 个疗程。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学试剂及方法

P450Arom 蛋白为兔抗人单克隆抗体购自福州迈新公司,稀释度 1:100。调出 57 例卵巢浆液性腺癌组织蜡块,4 μ m 厚连续切片,分别作常规 HE 染色和免疫组化染色。免疫组化二步法:二甲苯脱蜡,柠檬酸盐修复抗原,加入一抗后 4℃过夜,PBS 冲洗 3 次,加入二抗,20min 后 PBS 冲洗 3 次,DAB 显色,冷水终止,苏木素衬染,脱水后封片处理。实验步骤严格按照提供试剂盒操作说明进行。

1.2.2 结果判定

光学显微镜下观察结果并采集图像,P450Arom 表达阳性为肿瘤细胞胞浆中有棕褐色颗粒出现。综合考虑切片中阳性细胞占所观察同类细胞数的百分

比和阳性细胞着色强度两项指标,半定量判断结果^[4]。将免疫组化染色切片置于显微镜($\times 400$)下观察,选取有代表性的区域(不少于 5 个高倍视野),计算每视野计数 200 个细胞中的阳性细胞数。根据显色程度判断阳性强度:标本无棕色颗粒出现即不着色为 0 分;浅棕色颗粒为 1 分;出现中度着色的棕色颗粒为 2 分;出现着色深的棕黑色或咖啡色颗粒为 3 分。根据阳性细胞在观察细胞中所占比例分为:阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为 1 分;11%~50%为 2 分;51%~75%为 3 分; $> 75\%$ 为 4 分。两类分数乘积 0~3 分为(-)即表达为阴性;4~5 分为(+);6~7 分为(++);8 分以上为高表达计为(+++)。

1.3 生存统计

资料随访截止日期为 2012 年 2 月 1 日;至随访截止日因卵巢浆液性腺癌死亡为完全数据;仍存活者归为统计学上的截尾数据;失访者和因其它原因死亡者也归为截尾数据。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行处理。P450Arom 与临床病理参数之间采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。对随访结果行 Cox 多因素回归分析并作 Kaplan-Meier 生存曲线,用 Log-rank 检验进行各组间生存率的比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢浆液性腺癌细胞中 P450Arom 的表达

镜下见肿瘤细胞胞浆中有棕褐色颗粒出现(Figure 1)。57 例卵巢浆液性腺癌 P450Arom 表达阳性率为 61.40%,Ⅰ~Ⅳ期阳性表达率分别为 33.33%、42.86%、64.10%、100.00%,不同分期间表达有显著

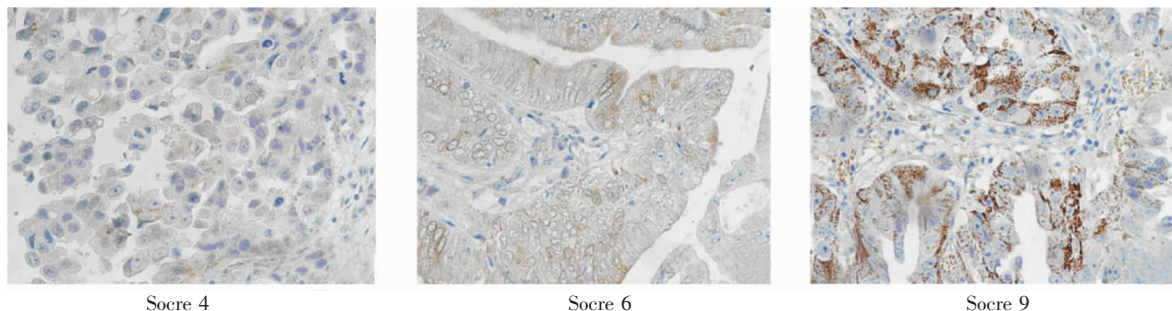


Figure 1 P450Arom expression in ovarian serous adenocarcinoma

差异($P=0.016$),分期越晚阳性表达率越高;高级别组($n=34$)阳性表达率为 73.53%,低级别组($n=23$)为 43.48%,分化程度越低 P450Arom 表达程度越高($P=0.000$)。P450Arom 表达与患者年龄及生长部位之间无明显相关性($P=0.639$; $P=0.560$)。

2.2 生存分析

57 例患者失访 5 例,存活 17 例,死亡 35 例。最短存活 3 个月,最长存活月数为 162 个月,中位生存期为 63 个月。

Kaplan-Meier 进行生存曲线的估计,从生存曲线可以明显看出卵巢浆液性腺癌患者随着分期越晚、分化程度越差及 P450Arom 阳性表达预后越差(Figure 2~4)。Log-rank 单因素分析法检验 FIGO 分期 I、II、III、IV 的卵巢浆液性腺癌患者的预后差异, ($\chi^2=18.190, P=0.000$);不同病理分级的患者预后差异 ($\chi^2=16.957, P=0.000$);P450Arom 表达阳性组与阴性组患者预后也有差异 ($\chi^2=40.842, P=0.000$);患者的年龄及生长部位对预后的影响未见明显差异 ($\chi^2=1.882, P=0.390$; $\chi^2=0.473, P=0.492$)。

对卵巢浆液性腺癌中 P450Arom 表达情况及相关临床病理参数进行 Cox 比例风险回归模型分析,Cox 多因素分析显示 P450Arom 蛋白表达、FIGO 分期及分级与预后有关, P450Arom 表达阳性患者死亡风险是阴性患者的 4.268 倍(Table 2)。

3 讨论

P450Arom 由单拷贝基因 *CYP19* 编码,它属于细胞色素 P450 家族,其内部结构中含有亚铁血红素,并且存在类固醇激素结合位点,其功能为催化雌激素的合成,使雄烯二酮和睾酮

Table 1 Relationship between clinicopathological parameters and P450Arom in varian serous adenocarcinoma

Factors	N	Score of P450Arom expression				P
		0~3	4~5	6~7	>8	
Age(years old)	<50	23	10	1	1	0.639
	50~59	24	9	3	4	
	≥60	10	3	1	3	
FIGO stage	I	6	4	0	1	0.016
	II	7	4	1	0	
	III	39	14	14	6	
	IV	5	0	0	1	
Histological grade	High+middle	23	14	2	1	0.000
	Low	34	9	2	7	
Site	Unilateral	22	12	2	3	0.560
	Bilateral	35	10	3	5	

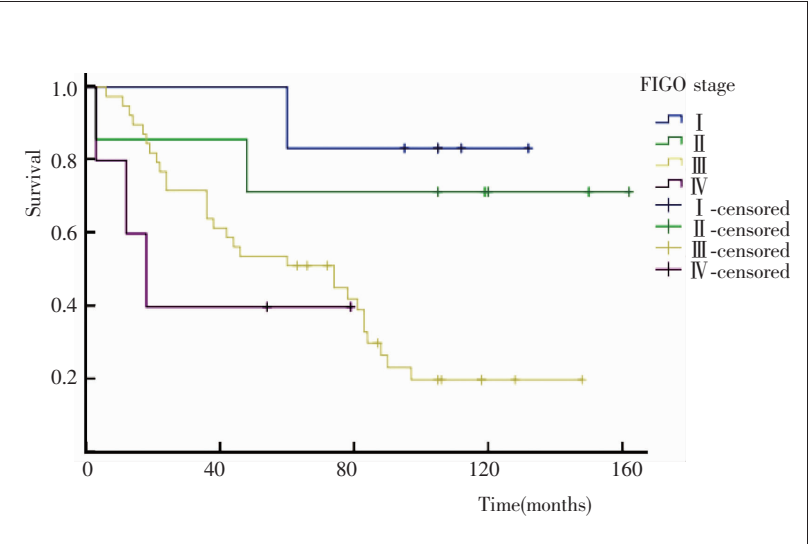


Figure 2 Survival curves of patients with various FIGO stages

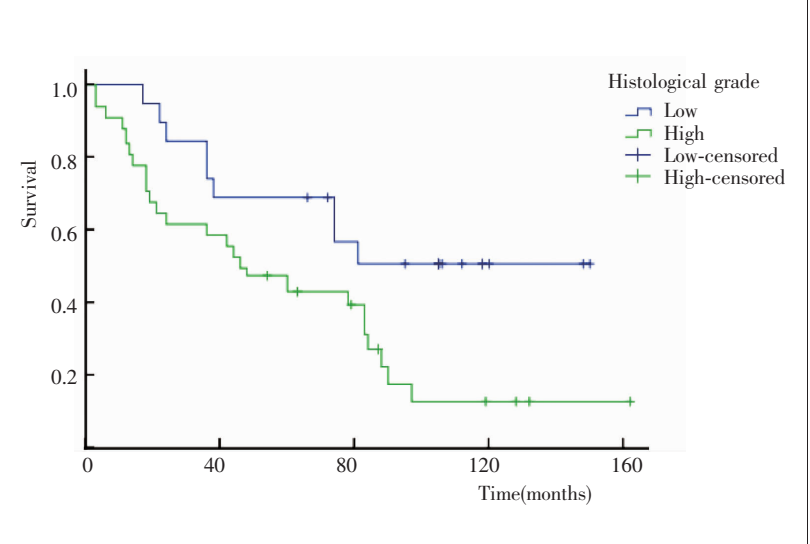


Figure 3 Survival curves of patients with various histological grades

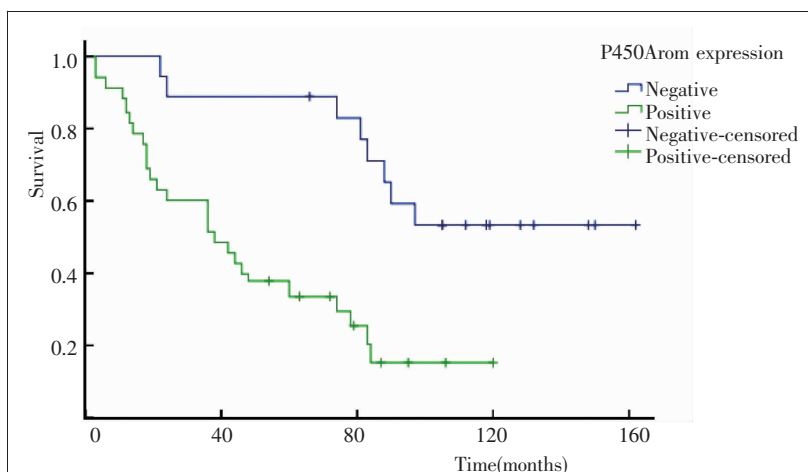


Figure 4 Survival curves of patients with positive or negative P450Arom expression

Table 2 Cox model of survival in varian serous adenocarcinoma

Factors	B	SE	P	Exp(B)	95%CI of RR
FIGO	0.819	0.198	0.000	2.268	1.538~3.340
Histological grade	0.547	0.153	0.000	1.728	1.279~2.334
P450Arom	1.451	0.246	0.000	4.268	2.634~6.914
Age	0.008	0.008	0.357	1.008	0.991~1.024
Site	0.141	0.210	0.501	1.152	0.764~1.737

脱去第 19 位的碳原子并使 A 环芳构化, 转变成含 18 个碳的具雌激素特征的苯酚 A 环, 分别形成雌酮(E1)和雌二醇(E2), 约有 33%~81% 的卵巢癌组织表达 P450Arom^[5-7]。本实验 57 例患者 P450Arom 表达阳性率为 61.40%, I~IV 期阳性表达率分别 33.33%、42.86%、64.10%、100.00%, 分期越晚表达率越高。因临床上倾向于分为高度恶性和低度恶性两组^[9], 本实验中高级别组表达率为 73.53%, 低级别组表达率为 43.48%, 分化程度越低 P450Arom 表达程度越高。虽然现在关于 P450Arom 对卵巢癌患者雌激素水平的影响机制还不清楚, 但是同本实验结果一样, 很多研究认为 P450Arom 会升高雌激素水平, 增加卵巢癌易感性。

本实验对 57 例卵巢浆液性囊腺癌患者进行生存分析, 其中单因素分析显示 P450Arom 蛋白表达、FIGO 分期及分级都能增加患者的死亡风险。从各分期的 Kaplan-Meier 生存曲线可以明显看出 I、II、III、IV 期的卵巢浆液性腺癌患者随着分期越晚预后越差, 这也是毋庸置疑的, 临床工作中多根据此来判断预后。而 P450Arom 蛋白阳性表达也影响患者预后, 在分期、分级、年龄、生长部位无差异的情况下

P450Arom 蛋白表达阳性组死亡风险是阴性组的 4.268 倍。Okubo^[8]等研究发现 HOSE17 细胞株中存在 P450Arom 表达转录和翻译水平的调节的不同, 并提示不同水平的 P450Arom 表达对卵巢上皮细胞可能发挥影响增殖分化作用, 并可能参与周期性的细胞破裂和修复过程, 使细胞对致癌因子和肿瘤转变易感。也有研究表明 CYP 基因的多态性可能导致 P450Arom 催化雌激素合成的机制不同。Goodma 等^[9]对 367 例卵巢癌患者与 602 例同种族同年龄段的正常妇女对照研究发现 CYP19A1 两个单核苷酸多态性(rs749292 和 rs727479)的遗传变异可以使绝经后妇女体内雌激素水平提高 10%~20%, 并发现 CYP19A1 变种可能影响卵巢癌的易感性。此实验结果与 Eppenberger 等^[10]研究

P450Arom 与乳腺癌预后结论相类似, 他采用 RT-PCR 方法检测了 119 例乳腺癌组织芳香化酶 mRNA 的表达, 发现芳香化酶高表达者预后差。陆劲松等^[11]研究 P450Arom 在淋巴结阴性乳腺癌中的预后价值, 发现 P450Arom 可能是淋巴结阴性乳腺癌患者的预后因素, 高表达芳香化酶患者的复发转移的相对风险高, 并且成时间依赖性。所以 P450Arom 也可能成为判断预后的一个新指标。

所以临床上有使用芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitors, ARI) 和选择性雌激素受体拮抗剂用于卵巢癌的治疗^[12], 尤其是难治性和复发性上皮性卵巢癌, 并取得了一定疗效。ARI 通过抑制 P450Arom 的活性来阻断内源性雌激素的合成, 不同于他莫昔芬, ARI 对雌激素受体无部分激活作用。因此, 在其抑制雌激素依赖性肿瘤生长的同时不会出现弱雌激素累积样不良反应。在众多 ARI 中, 来曲唑是目前研究最深应用最广泛的药物。Bowman 等^[13]应用来曲唑治疗 60 例 CA125 升高的复发性卵巢癌患者, 以 CA125 来评价, 在 54 例可评价患者中完全缓解 0 例、部分缓解 5 例、疾病稳定 14 例, 10 例(17%)的患者生存时间超过 2 年。

总之, P450Arom 作为雌激素合成的关键酶其表达与卵巢浆液性腺癌的分期及分级表达正相关, 是增加患者死亡风险的危险因素。据此推测 P450Arom 可能是卵巢浆液性腺癌的危险因子, 能促进肿瘤的发生, 并且有望成为判断患者预后的因子及临床治疗有效靶点。关于 P450Arom 在卵巢浆液性腺癌的更多作用机制还有待于更深一步的研究。

参考文献:

- [1] Kato N, Hayasaka T, Takeda J, et al. Ovarian tumors with functioning stroma: a clinicopathologic study with special reference to serum estrogen level, stromal morphology, and aromatase expression[J]. Gynecol Pathol, 2013, 32(6):556-561.
- [2] Harada N, Honda S. Analysis of spatiotemporal regulation of aromatase in the brain using transgenic mice [J]. J Steroid Biochemistry Mole Biol, 2005, 95 (1-5):49-55.
- [3] Halon A, Materna V, Drag-Zalesinska M, et al. Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(3):511-518.
- [4] Zhao C, Vinh TN, McManus K, et al. Identification of the most sensitive and robust immunohistochemical markers in different categories of ovarian sex cord-stromal tumors [J]. Am J Surg Pathol, 2009, 33(3):354-366.
- [5] Li YF, Hu W, Fu SQ, et al. Aromatase inhibitors in ovarian cancer: is there a role?[J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18 (4):600-614.
- [6] Chang HM, Klausen C, Leung PC. Antimüllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells [J]. Fertil Steril, 2013, 100(2):585-582.
- [7] Langdon SP, Smyth JF. Hormone therapy for epithelial ovarian cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2008, 20(5):548-553.
- [8] Okubo T, Mok SC, Chen S. Regulation of aromatase expression in human ovarian surface epithelial cells[J]. Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(12):4889-4899.
- [9] Goodman MT, Lurie G, Thompson PJ, et al. Association of two common single-nucleotide polymorphisms in the CYP19A1 locus and ovarian cancer risk [J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15(4):1055-1060.
- [10] Miller W, Santen R. Aromatase inhibition and breast cancer[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. 199.
- [11] Lu JS, Li HC, Cao DC, et al. Study on prognostic value of aromatase in lymph node negative breast cancer[J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2007, 34 (4): 509-512. [陆劲松, 李鹤成, 曹道成, 等. 芳香化酶表达在淋巴结阴性乳腺癌中的预后价值 [J]. 复旦学报 (医学版), 2007, 34(4):509-512.]
- [12] Smyth JF, Gourley C, Walker G, et al. Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(12):3617-3622.
- [13] Bowman A, Gabra H, Langdon SP, et al. CA125 response is associated with estrogen receptor expression in a phase II trial of letrozole in ovarian cancer: identification of an endocrine-sensitive subgroup[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8 (7):2233-2239.

