

卵巢上皮性癌组织中 DNAJB11 的表达及临床意义

姚国荣^{1,3}, 傅云峰¹, 李艳丽¹, 周彩云², 吕卫国¹

1. 浙江大学医学院附属妇产科医院肿瘤科, 浙江 杭州 310006

2. 浙江大学医学院附属妇产科医院病理科, 浙江 杭州 310006

3. 湖州市中心医院妇产科, 浙江 湖州 313000

[摘要] **目的:**探讨 DNAJB11 蛋白在卵巢上皮性癌组织中的表达及其临床价值。**方法:**采用免疫组织化学 EnVision 法检测 105 份卵巢上皮性癌的石蜡包埋组织 DNAJB11 蛋白的表达情况,并与 23 份正常卵巢组织、17 份卵巢良性肿瘤组织、13 份卵巢交界性肿瘤组织对比,用 χ^2 检验分析其与临床病理特征的关系,用 Kaplan-Meier 法及 COX 比例风险回归模型分析其与患者生存预后的关系。**结果:**DNAJB11 蛋白在正常卵巢组织及卵巢良性肿瘤中几乎不表达,在交界性肿瘤组织中阳性率为 7.7%,在卵巢上皮性癌组织中阳性率为 78.1%,卵巢上皮性癌组织中 DNAJB11 表达均高于其余各卵巢病变和正常卵巢组织(均 $P < 0.01$)。在细胞分化程度为 G2~G3、临床分期为 III~IV 期、组织学类型为浆液性、术前外周血 CA125 水平大于 500 IU/L 的卵巢上皮性癌患者中,卵巢上皮性癌组织 DNAJB11 蛋白表达均高于细胞分化程度为 G1、临床分期为 I~II 期、组织学类型为非浆液性癌和血 CA125 水平不超过 500 IU/L 的患者(均 $P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲线显示,DNAJB11 强阳性表达与卵巢上皮性癌患者的总生存预后及无瘤生存预后相关($P < 0.01$);多因素分析结果显示,DNAJB11 蛋白强阳性表达是卵巢上皮性癌无瘤生存及总生存的独立预后因素。**结论:**DNAJB11 蛋白可能在卵巢上皮性癌发生发展过程中起重要作用;卵巢上皮性癌组织 DNAJB11 蛋白强阳性表达是卵巢上皮性癌患者的独立预后因素。



[关键词] 卵巢肿瘤/病理学;蛋白质组学;免疫组织化学;预后

[中图分类号] R711.75 **[文献标志码]** A

Expression and clinical significance of DNAJB11 in epithelial ovarian cancer

YAO Guorong^{1,3}, FU Yunfeng¹, LI Yanli¹, ZHOU Caiyun², LUY Weiguo¹

(1. Department of Gynecologic Oncology, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang

收稿日期:2016-09-30 接受日期:2017-03-10

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20110101120142);国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA02A507);浙江省卫生高层次创新人才培养工程

第一作者:姚国荣(1980—),男,硕士研究生,主治医师,主要从事妇科肿瘤研究;E-mail: 110790470@qq.com; <http://orcid.org/0000-0001-5514-5125>

通讯作者:吕卫国(1965—),男,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事妇科肿瘤临床和基础研究;E-mail: lbwg@zju.edu.cn; <http://orcid.org/0000-0002-8570-7317>

University, Hangzhou 310006, China; 2. Department of Pathology, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China)

Corresponding author: LUY Weiguo, E-mail: lbwg@zju.edu.cn, http://orcid.org/0000-0002-8570-7317

[Abstract] **Objective:** To study the expression of DNAJB11 protein in epithelial ovarian cancer tissues and its clinical significance. **Methods:** Immunohistochemistry was used to examine DNAJB11 expressions in 105 tissue specimens of ovarian epithelial carcinoma, 23 normal ovarian tissues, 17 tissues of benign tumor, and 13 tissues of borderline tumor. The correlations between protein expression and clinicopathological factors were analyzed by Chi square test. The correlations between protein expression and survival were analyzed by Kaplan-Meier and Cox regression. **Results:** Positive expression of DNAJB11 protein was observed in 0.0% in normal ovary and benign tumor, 7.69% in borderline tumor, and 78.10% in epithelial ovarian cancer, respectively. Positive expression of DNAJB11 protein was significantly higher in normal ovary and benign tumor than in the rest of the ovarian tissues and normal ovarian tissues ($P < 0.001$). Higher expression of DNAJB11 was more prevalent in tissues from patients with advanced FIGO stages, high serum CA125, poor histological differentiation, and serous cancer. Kaplan-Meier curves revealed that higher expression of DNAJB11 was significantly associated with poor disease-free survival and overall survival. Multivariate survival analysis revealed that strong positive expression of DNAJB11 was an independent prognostic factor for disease-free survival and overall survival. **Conclusion:** DNAJB11 may play a role in tumorigenesis and progression of epithelial ovarian cancer. Strong positive expression of DNAJB11 was an independent prognostic factor in epithelial ovarian cancer.

[Key words] Ovarian neoplasms/pathology; Proteomics; Immunohistochemistry; Prognosis

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2017,46(2):173-178.]

早期卵巢上皮性癌患者缺乏特异性症状及体征,因此早期诊断非常困难,确诊时70%患者已属晚期。近年来手术、化疗等治疗手段有了长足进展,但晚期患者五年存活率仍徘徊在30%左右^[1],严重影响女性的健康和生命。因此,寻找新的与卵巢癌发生、发展和预后相关的生物学标志是一项重要而紧迫的任务。我们在前期的卵巢浆液性癌和正常卵巢组织的差异蛋白质组学研究中,发现了近百个差异表达的蛋白质,其中包括DNAJB11蛋白在卵巢癌中表达较正常卵巢组织显著上调^[2],但迄今尚未见卵巢肿瘤组织中有关DNAJB11蛋白表达特征与临床意义的研究报道。因此,本研究通过免疫组织化学方法检测其在卵巢上皮性癌组织中的表达,并探讨其与患者临床

病理特征和预后的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集2003年1月至2005年12月在浙江大学医学院附属妇产科医院行初次手术治疗的105份卵巢上皮性癌患者的存档组织标本,患者年龄19~74岁,平均年龄(50.60±8.84)岁,组织学类型分别为:浆液性腺癌60例、黏液性腺癌7例、混合型腺癌23例、子宫内膜样癌3例、透明细胞癌8例和未分化癌4例;按2000年国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)手术病理分期标准:Ⅰ~Ⅱ期40例,Ⅲ~Ⅳ期65例;细胞分化G1为14例,G2

为 25 例, G3 为 66 例。其中卵巢癌分期手术或满意的肿瘤细胞减灭术 75 例, 非满意的肿瘤细胞减灭术(残余灶大于 1 cm) 30 例。所有患者术后初次化疗均接受以铂类为基础的联合化疗, 其中 TP(紫杉醇 + 铂类) 方案 65 例, PC(顺铂 + 环磷酰胺) 方案 35 例, PAC(顺铂 + 表阿霉素 + 环磷酰胺) 方案 5 例; 疗程 3 ~ 9 个, 其中六个疗程以下 31 例, 至少六个疗程 74 例。所有卵巢上皮性癌患者术前均未接受任何治疗(如放疗、化疗或激素治疗), 手术为初次治疗, 并经组织病理学诊断证实。

选择同期 13 份卵巢交界性肿瘤、17 份卵巢良性肿瘤及 23 份卵巢正常患者的存档组织标本作为对照。

1.2 免疫组织化学检测 DNAJB11 蛋白表达

标本经 4% 甲醛溶液固定 12 ~ 24 h 后, 自来水冲洗 2 h, 改为 70% 乙醇溶液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片。将已烤免疫组织化学石蜡切片浸于二甲苯中脱蜡, 取出切片置于 100% 无水乙醇中, 再依次置于 95% ~ 75% 各浓度乙醇溶液各 5 min, 取出置于蒸馏水中。继而采用 EnVision 法(俗称二步法) 进行免疫组织化学检测。具体步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。

结果判断及分析: 光学显微镜下观察组织切片的显色反应, DNAJB11 蛋白阳性显色为棕色, 表达多位于细胞浆内, 偶见于细胞核内。用免疫组织化学半定量积分法^[3] 计数阳性细胞, 每张切片随机计数 5 个高倍视野(400 倍), 每个视野计数 100 个细胞, 根据染色阳性细胞数占总细胞数百分比评分(0 分: 阴性; 1 分: $\leq 10\%$; 2 分: $> 10\% \sim 50\%$; 3 分: $> 50\% \sim 80\%$; 4 分: $> 80\%$); 染色强度按肿瘤细胞着色的深浅计分(0 分: 无着色; 1 分: 黄色; 2 分: 浅棕色; 3 分: 棕褐色)。总分为阳性细胞数评分和染色强度评分之积(0 ~ 12), 取总分 0 ~ 4 分为阴性; 5 ~ 8 分为阳性; 9 ~ 12 分为强阳性。

1.3 化疗疗效评估

所有患者术后均接受以铂类为基础的联合化疗, 根据化疗疗效分为敏感型和耐药型^[4]。敏感型: 对初期铂类为基础的化疗有明确反应, 且已达到临床缓解, 停用化疗 6 个月以后出现肿瘤复发征象, 如血 CA125 水平升高、影像学检查或盆腔检查出现可测量的病灶。耐药型: 包括患者对初期以铂类为基础的化疗有反应, 但在完成化疗后 6 个月前复发或在治疗过程中出现病灶或停止化

疗后“二探”阳性者, 以及对化疗没有产生最小有效反应的患者。

1.4 随访方法及结果

对所有卵巢上皮性癌患者进行门诊及电话随访, 统计无瘤生存时间及总生存时间。随访截止日期 2015 年 11 月 30 日, 随访时间 5 ~ 154 个月, 中位随访时间 77 个月。随访期间 105 例卵巢上皮性癌患者中 56 例死亡, 病死率 53.33%。失访 19 例, 失访率 18.10%。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 计数资料采用 χ^2 检验, 对生存率曲线的比较采用 Kaplan-Meier 法检验, 单因素及多因素生存分析采用 COX 比例风险回归模型。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 卵巢上皮性癌组织中 DNAJB11 蛋白的表达

卵巢上皮性癌组织中 DNAJB11 蛋白表达阳性 82 例, 其阳性率为 78.1%; 卵巢交界性肿瘤组织中 DNAJB11 蛋白表达阳性 1 例, 阳性率为 7.7%; 而在正常卵巢组织中及良性卵巢肿瘤组织中无一例 DNAJB11 蛋白表达阳性(表 1、图 1)。卵巢上皮性癌组织中 DNAJB11 表达与其余各卵巢病变和正常卵巢组织中表达差异具有统计学意义($\chi^2 = 56.728, P < 0.01$)。提示卵巢上皮性癌组织中 DNAJB11 表达增加。

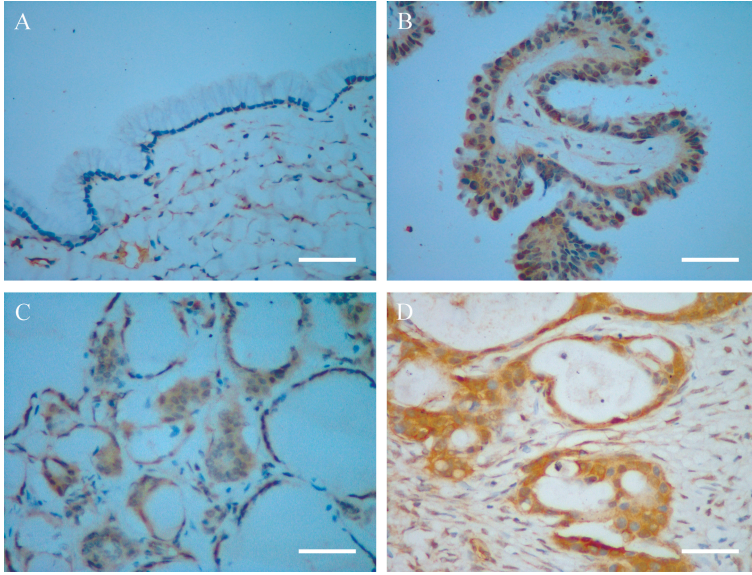
表 1 不同卵巢病变组织中 DNAJB11 蛋白表达的比较

Table 1 Comparison of DNAJB11 protein expressions in different ovarian tissues

组织类型	n	[n(%)]		
		阴性	阳性	强阳性
正常卵巢组织	23	23	0(0)	0(0)
卵巢良性肿瘤	17	17	0(0)	0(0)
卵巢交界性肿瘤	13	12	1(7.7)	0(0)
卵巢上皮性癌	105	23	48(45.7)	34(32.4)

2.2 卵巢上皮性癌组织中 DNAJB11 蛋白表达与患者临床病理特征间的关系

卵巢上皮性癌组织中 DNAJB11 蛋白表达在不同临床分期、血 CA125 水平患者和肿瘤组织分化、组织学类型间差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。提示卵巢上皮性癌患者 DNAJB11 蛋白表达



DNAJB11 蛋白 EnVision 法染色呈棕色,主要表达于细胞浆。A:DNAJB11 在正常卵巢组织中呈阴性表达;B:DNAJB11 在卵巢交界性肿瘤组织中呈阳性表达;C:DNAJB11 在卵巢上皮性癌组织中呈阳性表达;D:DNAJB11 在卵巢上皮性癌组织中呈强阳性表达。标尺 = 50 μm。

图1 上皮性卵巢组织 DNAJB11 蛋白免疫组织化学检测结果

Figure 1 Results of immunohistochemistry in epithelial ovarian tissues

表2 不同临床病理特征患者卵巢上皮性癌组织表达 DNAJB11 比较

Table 2 Expressions of DNAJB11 in epithelial ovarian cancer tissues and its relationship with clinical pathological features

特征	n	阴性	阳性	强阳性	χ ² 值	P 值
年龄(岁)						
≤50	52	11	26	15	0.838	0.658
>50	53	12	22	19		
临床分期						
I ~ II	40	18	15	7	21.107	0.000
III ~ IV	65	5	33	27		
残余灶直径(cm)						
≤1	75	20	32	23	3.489	0.175
>1	30	3	16	11		
细胞分化程度						
G1	14	7	5	2	7.808	0.020
G2-3	91	16	43	32		
组织学类型						
浆液性	60	8	32	20	6.513	0.039
非浆液性	45	15	16	14		
外周血 CA125 水平(IU/L)						
≤500	60	18	27	15	6.559	0.038
>500	45	5	21	19		
化疗敏感性						
敏感	77	19	35	23	1.578	0.454
耐药	28	4	13	11		

阳性者临床分期为 III ~ IV 期多、外周血 CA125 水平高、肿瘤组织分化 G2-3 多、浆液性组织学类型多。
2.3 卵巢上皮性癌患者预后的相关因素分析

Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,在不同 DNAJB11 表达的卵巢上皮性癌患者之间其无瘤生存时间和总生存时间差异具有统计学意义($P < 0.001$),见图 2、图 3。

COX 比例风险回归模型单因素分析显示,临床分期、化疗敏感性和 DNAJB11 强阳性表达与卵巢上皮性癌患者总生存相关,化疗敏感性和 DNAJB11 强阳性表达与卵巢上皮性癌患者无瘤生存相关,见表 3。进一步应用 COX 回归模型多因素分析结果发现,卵巢癌患者临床分期、化疗敏感性及 DNAJB11 强阳性表达是影响卵巢

上皮性癌患者总生存及无瘤生存的独立预后因素,见表 4。

3 讨论

DNAJB11 是人类蛋白质编码基因,系 Dnaj 同族 B 型亚家族 11 成员^[5-6],分子量约为 40 000 u,

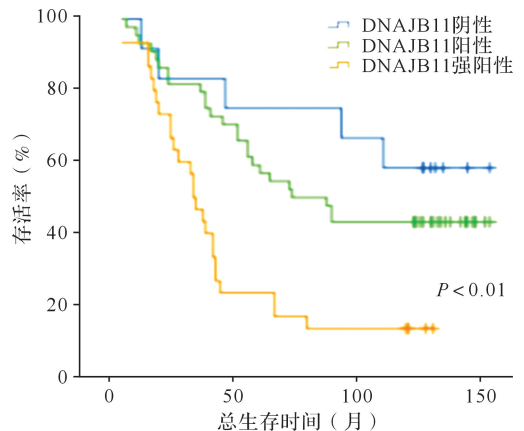


图2 卵巢上皮性癌组织中不同 DNAJB11 蛋白表达患者的总生存曲线比较

Figure 2 Overall survival curves of patients with different DNAJB11 protein expressions of DNAJB11 protein in epithelial ovarian cancer tissues

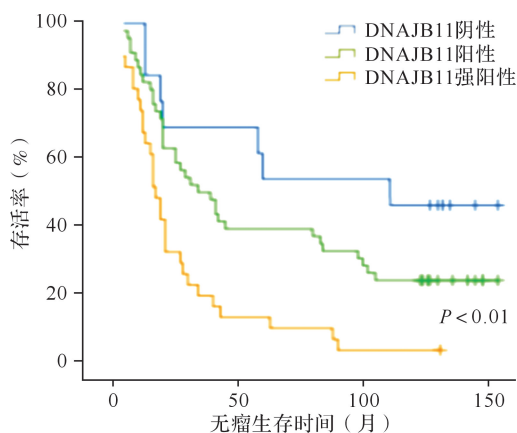


图3 卵巢上皮性癌组织中不同 DNAJB11 蛋白表达患者的无瘤生存曲线比较

Figure 3 Tumor free survival curves of patients with different DNAJB11 protein expressions of DNAJB11 protein in epithelial ovarian cancer tissues

为 HSP40 的合作伴侣分子之一,广泛存在于人类各种组织细胞的内质网上。DNAJB11 结构包含一个由约 70 个氨基酸组成的“J”功能域,此功能区域与一些内质网相关蛋白相互作用,如 HSP70 与 Bip,并能激活 ATP 酶活性^[7-8]。DNAJB11 几乎

参与了蛋白质合成、折叠及表达的所有过程^[9-11]。此前研究发现, DNAJB11 在沙门菌、霍乱毒素等一些细菌及病毒致病过程中起到了一定的促进作用^[7,12]。

有关 DNAJB11 蛋白在恶性肿瘤组织中表达及临床意义的研究迄今极少。Hsu 等^[13]利用相关分子生物学技术比较了来自口腔鳞癌与其癌周组织的细胞分泌蛋白的表达情况,发现在来自口腔鳞癌的细胞中有 64 个蛋白表达明显高于来自其癌周组织的细胞,并进一步发现其中 19 个蛋白在口腔鳞癌组织中表达显著高于癌周组织,其中包括了 DNAJB11 蛋白,但研究者没有进一步探讨 DNAJB11 蛋白在口腔鳞癌组织中表达的特征及意义。我们先前的研究以卵巢浆液性癌为模型,进行了卵巢浆液性癌与正常卵巢组织的差异蛋白质组学研究,也发现了 DNAJB11 蛋白在浆液性卵巢癌组织中表达上调^[2]。因此本研究通过免疫组织化学方法进一步探讨其在卵巢上皮性癌组织中的表达及临床意义,结果发现 DNAJB11 蛋白在正常卵巢组织中及良性卵巢肿瘤组织中表达均阴性,在各组织学类型卵巢上皮性癌组织中均呈高表达(阳性率高达 78.1%),在卵巢浆液性癌中

表3 影响卵巢上皮性癌患者预后因素的 COX 单因素生存分析结果

Table 3 Univariate survival analyses of COX in patients with epithelial ovarian cancer

因素	总生存		无瘤生存	
	HR(95% CI)	P 值	HR(95% CI)	P 值
年龄	1.582(0.875 ~ 2.861)	0.129	1.417(0.855 ~ 2.348)	0.176
组织学类型	1.037(0.547 ~ 1.967)	0.911	1.207(0.682 ~ 2.134)	0.519
细胞分化程度	1.453(0.403 ~ 5.234)	0.568	1.930(0.688 ~ 5.413)	0.211
临床分期	3.515(1.470 ~ 8.404)	0.005	1.937(0.920 ~ 4.080)	0.082
外周血 CA125 水平	1.345(0.669 ~ 2.702)	0.405	1.351(0.739 ~ 2.467)	0.328
残余灶直径	1.116(0.571 ~ 2.181)	0.749	1.113(0.616 ~ 2.012)	0.723
化疗疗程	1.011(0.509 ~ 2.007)	0.976	1.226(0.660 ~ 2.275)	0.519
化疗敏感性	3.101(1.635 ~ 5.880)	0.001	2.245(1.266 ~ 3.982)	0.006
DNAJB11 阳性	1.035(0.357 ~ 2.998)	0.950	1.372(0.569 ~ 3.307)	0.482
DNAJB11 强阳性	2.168(1.059 ~ 4.439)	0.034	2.447(1.312 ~ 4.563)	0.005

表4 影响卵巢上皮性癌患者预后因素的 COX 多因素生存分析结果

Table 4 COX multivariate survival analyses of prognoses of patients with epithelial ovarian cancer

因素	总生存		无瘤生存	
	HR(95% CI)	P 值	HR(95% CI)	P 值
临床分期	4.113(1.828 ~ 9.252)	0.001	2.560(1.321 ~ 4.960)	0.004
化疗敏感性	3.454(1.966 ~ 6.068)	<0.001	2.192(1.319 ~ 3.642)	0.002
DNAJB11 阳性	0.913(0.330 ~ 2.525)	0.861	1.333(0.573 ~ 3.101)	0.504
DNAJB11 强阳性	1.971(1.010 ~ 3.847)	0.047	2.259(1.244 ~ 4.102)	0.007

DNAJB11蛋白表达高于其他类型,提示DNAJB11蛋白可能系卵巢癌发生相关蛋白之一,尤其是卵巢浆液性癌。进一步分析DNAJB11蛋白表达与患者临床病理特征之间关系,发现该蛋白的表达与肿瘤临床分期、患者外周血CA125水平相关,在Ⅲ~Ⅳ期及外周血CA125 > 500 IU/L的患者组织中表达均明显上调,提示该蛋白可能与卵巢癌临床进展密切相关。卵巢癌是目前预后最差的妇科恶性肿瘤,探寻与卵巢癌预后密切相关的新的肿瘤标志物已成为研究热点。本研究生存分析结果显示,不同DNAJB11蛋白表达的上皮性卵巢癌患者总生存时间及无瘤生存时间有差异,DNAJB11蛋白阳性表达及强阳性表达患者其总生存时间及无瘤生存时间明显缩短。进一步通过多因素回归分析显示,DNAJB11蛋白强阳性表达是卵巢上皮性癌患者无瘤生存和总生存时间相关的独立预后因素。

综上所述,DNAJB11蛋白在卵巢癌组织发生、发展过程中起到了重要作用,且可能对卵巢癌具有早期诊断作用,其强阳性表达是卵巢癌独立预后因素,这可能成为卵巢上皮性癌早期诊断、预后预测的潜在肿瘤标志物。有待进一步积累病例资料观察总结以证实上述结论。

参考文献

- [1] 沈 铿,马 丁. 妇产科学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2015:321.
SHEN Keng, MA Ding. **Obstetrics and Gynecology** [M]. 3rd. Beijing: People's Health Publishing House,2015:321. (in Chinese)
- [2] LI Y L, YE F, CHENG X D, et al. Identification of glia maturation factor beta as an independent prognostic predictor for serous ovarian cancer[J]. **Eur J Cancer**,2010,46(11):2104-2118.
- [3] INNOCENZI D, ALÒ P L, BALZANI A, et al. Fatty acid synthase expression in melanoma[J]. **J Cutan Pathol**,2003,30(1):23-28.
- [4] BEREK J S, CRUM C, FRIEDLANDER M. Cancer of the ovary, fallopian tube and peritoneum[J]. **Int J**

Gynecol Obstet,2015,131(Suppl 2):S111-S122.

- [5] YU M, HASLAM R H, HASLAM D B. HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells[J]. **J Biol Chem**,2000,275(32):24984-24992.
- [6] OHTSUKA K, HATA M. Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature[J]. **Cell Stress Chaperones**,2000,5(2):98-112.
- [7] MASSEY S, BURRESS H, TAYLOR M, et al. Structural and functional interactions between the cholera toxin A1 subunit and ERdj3/HEDJ, a chaperone of the endoplasmic reticulum[J]. **Infect Immun**,2011,79(11):4739-4747.
- [8] MARCINOWSKI M, HÖLLER M, FEIGE M J, et al. Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions[J]. **Nat Struct Mol Biol**,2011,18(2):150-158.
- [9] GUO F, SNAPP E L. ERdj3 regulates BiP occupancy in living cells[J]. **J Cell Sci**,2013,126(Pt 6):1429-1439.
- [10] JIN Y, AWAD W, PETROVA K, et al. Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP[J]. **EMBO J**,2008,27(21):2873-2882.
- [11] NAKANISHI K, KAMIGUCHI K, TORIGOE T, et al. Localization and function in endoplasmic reticulum stress tolerance of ERdj3, a new member of Hsp40 family protein[J]. **Cell Stress Chaperones**,2004,9(3):253-264.
- [12] BERNAL-BAYARD J, CARDENAL-MUÑOZ E, RAMOS-MORALES F. The salmonella type III secretion effector, salmonella leucine-rich repeat protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3[J]. **J Biol Chem**,2010,285(21):16360-16368.
- [13] HSU C W, YU J S, PENG P H, et al. Secretome profiling of primary cells reveals that thbs2 is a salivary biomarker of oral cavity squamous cell carcinoma[J]. **J Proteome Res**,2014,13(11):4796-4807.

[本文编辑 沈 敏]