

嗅觉介导素 4 与醌氧化还原酶在 宫颈癌组织中的表达及意义

王小丽, 蒲丽梅, 杨军

重庆市永川区集爱医院, 重庆市永川区生殖健康中心, 402160

摘要:目的 探讨宫颈癌组织中嗅觉介导素 4 (Olfactomedin, OLFM4) 和醌氧化还原酶 (Quinone oxidoreductase-1, NQO1) 的表达及临床意义。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 40 例宫颈癌组织、20 例正常宫颈组织、20 例癌旁组织中 OLFM4 和 NQO1 的表达。**结果** 宫颈癌组织中 OLFM4 和 NQO1 的阳性表达率分别为 92.5% (37/40) 和 77.5% (31/40), 在正常的宫颈组织中的表达分别为 20% (4/20) 和 30% (6/20); 在癌旁组织中的表达分别为 25% (5/20) 和 40% (8/20), 均明显低于癌组织中的表达。同时, OLFM4 的表达与其年龄大小、肿瘤分级、肿瘤大小、浸润深度, 以及有无淋巴结转移无关, 但是与分化程度有关; 而 NQO1 的表达与年龄、分级、肿瘤大小、浸润深度无关, 但与分化程度和淋巴结转移有关; OLFM4 和 NQO1 的表达呈正相关 ($r=0.355, P<0.05$)。**结论** OLFM4 和 NQO1 在宫颈癌组织中表达明显上调, 可能与宫颈癌的发生、发展密切相关, 在一定程度上可反应宫颈癌患者的预后。

关键词: 宫颈癌; 嗅觉介导素; 醌氧化还原酶; 免疫组织化学

Expression and clinical significance of OLFM4 and NQO1 in cervical carcinoma

WANG Xiao Li, PU Li Mei, YANG Jun

Ji ai Hospital of Yongchuan Distract, Reproductive Health Center of Yongchuan Distract, Chongqing 402160, China

Abstract: **Objective** To detect the expression and clinical significance of Olfactomedin 4 (OLFM4) and Quinone Oxidoreductase-1 (NQO1) in cervical carcinoma and to explore their relationships. **Methods** Immunohistochemistry SP was used to evaluate the expression of OLFM4 and NQO1 in 40 cervical carcinoma tissues, 20 normal cervical tissues, 20 samples from adjacent tissues. **Results** In cervical carcinoma tissues, the positive expression of OLFM4 and NQO1 were 92.5% (37/40) and 77.5% (31/40), respectively. In normal cervical tissues, the positive rates were 20% (4/20) and 30% (6/40), respectively. In the adjacent tissues, the positive rates were 25% (5/20) and 40% (8/20), respectively. They were both significantly lower than those in normal cervical carcinoma tissues. Meanwhile, the expression level of OLFM4 was correlated with histological differentiation, but was not correlated with age, clinical stage, tumor size, invasion depth or lymph node metastasis. The expression of NQO1 was correlated with differentiation and lymph node metastasis, but was not correlated with age, clinical grade, tumor size, invasion depth. A positive correlation between the expression of OLFM4 and NQO1 was observed ($r=0.355, P<0.05$). **Conclusions** In cervical carcinoma tissues, the expression of OLFM4 and NQO1 were up-regulated, which were tightly related with the genesis and development of cervical carcinoma. And they were considered as markers for estimating the prognosis of cervical carcinoma in some extent.

Key words: cervical carcinoma; olfactomedin 4 (OLFM4); quinone oxidoreductase-1 (NQO1); immunohistochemistry

嗅觉介导素 4 (Olfactomedin 4, OLFM4) 是一种新发现的糖蛋白, 广泛分布于骨髓、小肠、结肠和胰腺等器官^[1]。OLFM4 在肿瘤的形成和发展过程中发挥着重要作用: 可减弱细胞的凋亡^[2]; 调控细胞的周期, 促进肿瘤细胞的生长^[3]; 能够与细胞外粘

附分子相互作用, 参与肿瘤细胞的转移^[4], 是肿瘤分化的标志物之一^[5]。

依赖还原型辅酶 I / II : 醌氧化还原酶 (NQO1 NADPH: quinone oxida-reductase 1) 是一种黄素酶, 广泛分布于人体各个组织器官。作为一种可诱导的

还原酶,NQO1 可催化醌的双电子反应,避免 DNA 的损伤,降低氧化活性物质对细胞和胞内遗传物质的损伤。因此,NQO1 与肿瘤的关系也日益受到重视。

宫颈癌一直以来高居女性恶性肿瘤的首位^[6],其防治已成为一个迫切需要解决的全球性的公共卫生问题。目前,国内外关于 OLFM4 和 NQO1 在上皮来源的恶性肿瘤^[7-8]中的相关研究有大量报道,但是它们在宫颈癌中的表达情况以及它们在宫颈癌中的相互关系的研究报道较少。因此,本文采用免疫组织化学方法检测 OLFM4 和 NQO1 在宫颈癌组织、正常宫颈组织中的表达水平,联系其临床病理特征,探讨二者与宫颈癌发生发展的关系。

1 资料与方法

1.1 资料

选取重庆市永川区集爱医院 2013 年 8 月 - 2016 年 3 月明确诊断宫颈癌的术后石蜡标本 40 例,其中鳞癌标本 30 例、腺鳞癌标本 10 例;同时选取癌旁组织(距离病灶 2cm 的范围内取材)20 例和其他来源的正常宫颈组织 20 例为对照。收集手术患者所有的临床资料(年龄、肿瘤大小、分级、肿瘤病理分型、有无浸润、有无淋巴结转移情况等)。

1.2 试剂

OLFM4 兔抗人多克隆抗体(ab85046)以及 NQO1 兔抗人多克隆抗体(ab28947)购自 Abcam 公司,SP 免疫组织化学试剂盒(兔鼠通用型)和 DAB 染色试剂购自北京康为试剂生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化染色:所有切片脱蜡、梯度酒精脱水后,PBS 冲洗、枸橼酸高温修复并冷却至室温,然后用 3% 过氧化氢溶液封闭阻断内源性过氧化物酶活性,PBS 冲洗后用血清封闭 1 h 后,滴加 OLFM4 (1:100)和 NQO1 (1:100)孵育过夜。第二天复温 PBS 冲洗后,滴加生物素标记二抗孵育 15 min,冲洗后再滴加辣根过氧化物酶标记的三抗孵育 15 min。PBS 冲洗后行 DAB 染色,终止后使用苏木素复染,然后不同浓度梯度酒精脱水,再用二甲苯透明,最后中性树胶封片。每次实验均设置相应的阴性和

阳性对照:阴性对照以一抗替代,用已知阳性标本(结肠癌)作阳性对照。

1.3.2 结果判定:OLFM4 和 NQO1 的表达形式均以细胞胞浆中出现棕黄色颗粒标记为阳性细胞。采用半定量积分法来判断,再结合阳性细胞率以及细胞着色强度两个方面进行综合评分(IHS)。IHS = a × b,a 表示阳性细胞率,b 表示细胞着色强度。所有切片均由两位资深的病理医师进行观察判断:每张切片随机选取 5 个高倍视野进行观察,每个视野计数 100 个细胞,并计数阳性细胞,计算阳性细胞率,后取平均值。无阳性细胞计数为 0 分、1% ~ 10% 为 1 分、10% ~ 50% 为 2 分、50% ~ 80% 为 3 分、> 80% 为 4 分。染色强度标准:无着色 0 分、淡黄色 1 分、棕黄色 2 分、棕褐色 3 分。采取两者的乘积作为判断结果的标准:0 分为阴性(-)、1 ~ 4 分为弱阳性(+)、5 ~ 8 分为阳性(+ +)、9 ~ 12 分为强阳性(+ + +)。总的阳性表达率 = 阳性例数(+ ~ + + +)/总例数^[9]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS18.8 统计软件进行统计学分析,计数资料使用 χ^2 检验;关联性分析采用 Spearman 相关性分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OLFM4、NQO1 在宫颈癌组织中的表达及其相关性

OLFM4 阳性染色位于癌细胞的胞浆内,呈棕黄色颗粒。40 例宫颈癌组织中有 37 例 OLFM4 表达阳性,阳性率为 92.5%。40 例正常宫颈组织中有 9 例 OLFM4 表达阳性,阳性表达率为 22.5%,两组比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 47.9, P < 0.001$)。NQO1 阳性染色位于癌细胞的胞浆内,呈棕黄色颗粒。40 例宫颈癌组织中有 31 例 NQO1 表达阳性,阳性率为 77.5%。40 例正常宫颈组织中有 14 例 NQO1 表达阳性,阳性表达率为 35.0%,两组比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 18.4, P < 0.005$),见表 1、图 1 和 2。而 OLFM4 和 NQO1 蛋白在宫颈癌组织中的表达呈正相关($r = 0.355, P < 0.01$),见表 2。

表 1 嗅觉介导素 4 和醌氧化还原酶在宫颈癌与正常宫颈组织中的表达

组织/指标	嗅觉介导素 4					醌氧化还原酶				
	-	+	++	+++	P 值	-	+	++	+++	P 值
正常宫颈组织	31	6	2	1	26	9	3	2		
宫颈癌组织	3	8	20	9	<0.001	9	10	14	7	<0.005

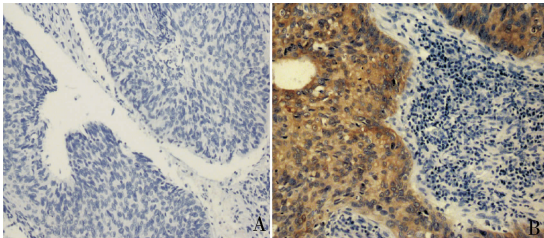


图 1 OLFM4 在宫颈癌组织中的表达

A: OLFM4 在宫颈癌组织中的阴性表达 (X200, SP 法);
B: OLFM4 在宫颈癌组织中的阳性表达 (X200, SP 法)

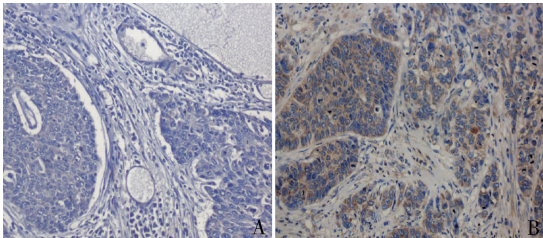


图 2 NQO1 在宫颈癌组织中的表达

A: NQO1 在宫颈癌组织中的阴性表达 (X200, SP 法);
B: NQO1 在宫颈癌组织中的阳性表达 (X200, SP 法)

表 2 OLFM4 和 NQO1 在宫颈癌组织中表达的相关性

嗅觉介导素 4	醌氧化还原酶		χ^2 值	r 值	P 值
	+	-			
+	35	2	5.766	0.355	<0.01
-	1	2			

注: P 值表示正常宫颈组织和宫颈癌组织之间 OLFM4 和 NQO1 阳性表达率之间的差异性

2.2 OLFM4 和 NQO1 阳性表达和其临床病例特征的联系

分析结果显示, OLFM4 在宫颈癌中的表达与其年龄大小、肿瘤分级、肿瘤大小、浸润深度, 及有无淋巴结转移无关, 但是与分化程度有关; 而 NQO1 的表达与年龄、分级、浸润深度、肿瘤大小无关, 但与肿瘤的分化程度以及有无淋巴结转移有关(表 3)。

表 3 嗅觉介导素 4 和醌氧化还原酶的阳性表达情况与临床病例特征的相关性

病例指标	例数	嗅觉介导素 4 阳性表达			醌氧化还原酶阳性表达		
		n	χ^2 值	P 值	n	χ^2 值	P 值
年龄(岁)							
<50	26	24	0.312	>0.5	20	0.678	>0.25
≥50	14	13			11		
病理类型							
鳞癌	30	28	0.121	>0.75	25	0.765	>0.25
腺鳞癌	10	9			6		
肿瘤直径(cm)							
<3	19	17	0.008	>0.9	12	2.846	>0.05
≥3	21	20			19		
浸润深度							
浅肌层	23	20	0.179	>0.05	18	0.062	>0.9
深肌层	17	17			13		
淋巴结转移							
无	24	23	0.135	>0.75	16	4.038	<0.05
有	16	14			15		
分期							
<II	30	29	1.081	>0.25	24	0.047	>0.5
III~	10	8			7		
分化程度							
高分化	7	5	8.24	<0.025	4	9.6	<0.01
中分化	14	13			10		
低分化	19	19			7		

3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一, 且发病率逐年攀升。根据 WHO 报道, 世界每年宫颈癌新发病例约 44 万人, 而我国新发病例 13.5 万人, 占世界新发病人数的 28.7%。目前治疗宫颈

癌的方法主要是通过手术结合化疗, 但其效果仍然不令人满意。如果能够找到更好的肿瘤预后标志物, 并且尽早用于预测肿瘤预后或指导外科医生是否需要配合药物治疗, 这将为肿瘤患者延长生存时间和提高其生活质量带来福音。

肿瘤的发生机制目前仍不清楚, 但通常都被认

为是由于细胞的增殖和凋亡失衡所致。OLFM 是一种于 1991 年在蛙的嗅觉神经上皮中首次发现并报道的新型糖蛋白^[10]。OLFM4 为 OLFM 相关的糖蛋白,拥有 490 个氨基酸和 6 个均匀分布的 N-链接糖基化序列,大部分定位在线粒体,小部分在细胞核内表达。据研究报道,OLFM4 可通过多种机制参与细胞凋亡和生长的调控,在肿瘤的形成及发展转移过程中发挥着重要的作用:①加速细胞周期的进程^[11];②减弱 H_2O_2 和 $TNF-\alpha$ 等诱导的细胞凋亡^[12];③通过 GRIM-19 产生抗凋亡作用^[13]等。然而有意思的是,应用不同的研究方法对不同肿瘤组织细胞进行的研究发现,OLFM4 的表达并不一致:①Li 等人^[14]在前列腺癌细胞使用激光捕获显微切割技术、DNA 测序、荧光原位杂交等方法进行研究,其结果显示在人类前列腺癌细胞中,OLFM4 存在程度不同的基因缺失,但其结果却与 Zhang 等^[2]报道的 OLFM4 可以促进前列腺癌生长的效应截然相反,究其原因可能是他们所采取的研究方法不同所致;②而在人髓性白血病系 HL-60 细胞的研究中^[15],OLFM4 则表现为抑制肿瘤细胞的生长和转移,并且促进细胞凋亡和分化作用。因此,在宫颈癌组织中 OLFM4 表达究竟怎样值得研究。

蛋白 NQO1 是一种胞质黄素酶,其基因定位于染色体 16q22,其表达于肝脏以外所有组织器官中。它以 NADH/NADPH 为受体,催化醌双电子的还原反应,对醌及其衍生物起生物解毒作用。由于醌是一种能够诱导哺乳动物细胞的癌变和坏死的毒性化合物,因而 NQO1 与肿瘤的关系也日益受到大家重视。大量报道表明,NQO1 蛋白和 mRNA 在多种实体肿瘤中异常高表达,且 NQO1 也被认为是胰腺癌的生物学标志物之一^[16]。通过检测 NQO1 在癌细胞中的表达可降低假阳性诊断风险。Li 等人^[17]认为 NQO1 是一种值得大家利用的肿瘤特异性标记物之一,它既不受抑癌基因 p53 和 Rb 的调控,也不受正常细胞周期的调节。因此,NQO1 有望成为一个新的潜在的肿瘤生物标志物,其在宫颈癌中的表达也值得期待。

本研究通过免疫组化法检测在宫颈癌组织中 OLFM 与 NQO1 的表达情况及探索它与临床病理特征的相关性。结果显示相较于正常宫颈组织,OLFM4 和 NQO1 在宫颈癌组织中都呈高表达,且随着宫颈癌组织分化程度的降低,OLFM4 与 NQO1 的阳性率呈增高趋势,且差异均有统计学意义($P < 0.01$)。NQO1 还与肿瘤大小及淋巴结转移相关,提

示 OLFM4 与 NQO1 的高表达与宫颈癌的发生及恶性程度有相关性。

综上所述,本研究认为 OLFM4 与 NQO1 均是宫颈癌发生发展的危险因素,在一定程度上可反映宫颈癌的恶性程度、转移能力以及预后,对评价患者病情和指导预后有一定的意义。同时,本研究还显示,OLFM4 与 NQO1 二者成正相关($r = 0.355, P < 0.01$),由此我们可以推测 OLFM4 和 NQO1 在宫颈癌的发生发展中可能存在协同作用。因此,联合检测 OLFM4 和 NQO1 可能是预测宫颈癌临床预后的有效手段之一,也为进一步研究宫颈癌的形成机制与防治宫颈癌提供了新的思路。

参考文献

- [1] Zhang J, Liu WL, Tang DC, et al. Identification and characterization of a novel member of olfactomedin-related protein family, hGC-1, expressed during myeloid lineage development [J]. Gene, 2002, 283 (1/2): 83-93.
- [2] Zhang X, Huang Q, Yang Z, et al. GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth [J]. Cancer Res, 2004, 64(7): 2474-2481.
- [3] Kobayashi D, Koshida S, Moriai R, et al. Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells [J]. Cancer Sci, 2007, 98 (3): 334-340.
- [4] Liu W, Chen L, Zhu J, et al. The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(10): 1785-1797.
- [5] Oue N, Sentani K, Noguchi T, et al. Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients [J]. Int J Cancer, 2009, 125(10): 2383-2392.
- [6] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130.
- [7] Guette C, Valo I, Vétillard A, et al. Olfactomedin-4 is a candidate biomarker of solid gastric, colorectal, pancreatic, head and neck, and prostate cancers [J]. Proteomics Clin Appl, 2015, 9(1/2): 58-63.
- [8] Li Z, Zhang Y, Jin T, et al. NQO1 protein expression predicts poor prognosis of non-small cell lung cancers [J]. BMC Cancer, 2015, 15: 207-215.
- [9] 田茗源, 王林辉, 张雄, 等. 肺癌组织中 E-cadherin 和 Vimentin 的表达及其与上皮-间质转化的相关性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24 (9): 1068-1071.

(下转第 18 页)

[5] Howson CP, Kinney MV, Lawn JE. Born too Soon: the Global Action Report on Preterm Birth [R]. Geneva: WorldHealth Organization, 2012.

[6] Foster JP, Psaila K, Patterson T. Non-nutritive sucking for increasing physiologic stability and nutrition in preterm infants[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016, 4; 10:CD001071.

[7] Bala P, Kaur R, Mukhopadhyay K, et al. Oromotor Stimulation for Transition from Gavage to Full Oral Feeding in Preterm Neonates: A Randomized controlled trial [J]. Indian Pediatr, 2016, 53(1):36-38.

[8] 吕天婵, 张玉侠, 胡晓静, 等. 口腔刺激和非营养性吸吮对早产儿经口喂养表现的干预效果[J]. 护理学报, 2014, 21(1):54-58.

[9] 陈喻萍, 梁丽清, 陈丹圆, 等. 口腔运动干预对早产儿经口喂养进程的影响 [J]. 广东医学, 2013, 34(4):652-653.

[10] Zhang Y, Lyu T, Hu X, et al. Effect of nonnutritive sucking and oral stimulation on feeding performance in preterm infants: a randomized controlled trial[J]. Pediatr Crit Care Med, 2014, 15(7):608-614. doi: 10.1097/PCC.000000000000182.

[11] Tian X, Yi LJ, Zhang L, et al. Oral Motor Intervention Improved the Oral Feeding in Preterm Infants: Evidence Based on a Meta-Analysis With Trial Sequential Analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(31):e1310. doi: 10.1097/MD.0000000000001310.

[12] Asadollahpour F, Yadegari F, Soleimani F, et al. The Effects of Non-Nutritive Sucking and Pre-Feeding Oral Stimulation on Time to Achieve Independent Oral Feeding for Preterm Infants [J]. Iran J Pediatr, 2015, 25(3):e809. doi: 10.5812/ijp.25(3)2015.809.

[13] 李琳琳, 陈京立, 崔国凤, 等. 经口喂养促进项目在早产儿中的应用效果[J]. 中华现代护理杂志, 2016, 22(24):3489-3493.

(上接第 13 页)

[10] Snyder DA, Rivers AM, Yokoe H, et al. Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein [J]. Biochemistry, 1991, 30(38):9143-9153.

[11] Boman BM, Wicha MS. Cancer stem cells: a step toward the cure[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(17):2795-2799.

[12] Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts[J]. Annu Rev Med, 2007, 58:267-284.

[13] Yu L, He M, Yang Z, et al. Olfactomedin 4 is a marker for progression of cervical neoplasia[J]. Int J Gynecol Cancer, 2011, 21(2):367-372.

[14] Li H, Rodriguez-Canales J, Liu W, et al. Deletion of the olfactomedin 4 gene is associated with progression of human prostate cancer [J]. Am J Pathol, 2013, 183(4):1329-1338.

[15] Liu W, Lee HW, Liu Y, et al. Olfactomedin 4 is a novel target gene of retinoic acids and 5-aza-2'-deoxycytidine involved in human myeloid leukemia cell growth, differentiation, and apoptosis [J]. Blood, 2010, 116(23):4938-4947.

[16] Lyn-Cook BD, Yan-Sanders Y, Moore S, et al. Increased levels of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in pancreatic tissues from smokers and pancreatic adenocarcinomas: A potential biomarker of early damage in the pancreas [J]. Cell Biol Toxicol, 2006, 22(2):73-80.

[17] Li LS, Bey EA, Dong Y, et al. Modulating endogenous NQO1 levels identifies key regulatory mechanisms of action of β -lapachone for pancreatic cancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(2):275-285.