

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.013

· 临床研究 ·

## KLK10 和 VEGF 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义

周明<sup>1</sup>, 张玉泉<sup>2</sup> (1. 阜宁县人民医院 妇产科, 江苏 盐城 224401; 2. 南通大学附属医院 妇产科, 江苏 南通 226001)

**[摘要]** **目的:** 分析激肽释放酶 10(kallikrein 10, KLK10) 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 在卵巢癌组织中的表达, 探讨两者在卵巢癌临床诊断、治疗及预后中的意义。**方法:** 收集 2004 年 1 月至 2009 年 1 月在南通大学附属医院妇科收治的 45 例卵巢癌、10 例良性和 12 例交界性卵巢肿瘤组织石蜡切片标本, 应用免疫组化法检测标本中 KLK10 蛋白和 VEGF 的表达, 并分析两者表达的相关性及与卵巢癌各临床病理指标和预后的关系。**结果:** KLK10 [86.7% (39/45) vs 10.0% (1/10), 58.3% (7/12),  $P < 0.05$ ] 和 VEGF [82.2% (37/45) vs 20.0% (2/10), 41.4% (5/12),  $P < 0.05$ ] 在卵巢癌组织中的阳性表达率均明显高于卵巢良性、交界性肿瘤组织。KLK10 和 VEGF 表达阳性率分别与分期、肿瘤分化、淋巴结转移、5 年生存率有关 ( $P < 0.05$ ), 与患者年龄、病理分型、血清 CA125 水平、腹水及残余肿瘤直径无关 ( $P > 0.05$ ); KLK10 和 VEGF 蛋白在卵巢癌中的表达呈正相关性 ( $r = 0.5279, P = 0.043$ )。**结论:** KLK10 和 VEGF 蛋白在卵巢癌中均为高表达, 两者表达呈正相关, 两者均似可作为卵巢癌诊断、治疗及预后的标志物。

**[关键词]** 激肽释放酶 10; 血管内皮生长因子; 卵巢癌; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R737.31; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)06-0675-05

## Clinicopathological, diagnostic and prognostic significance of kallikrein 10 and vascular endothelial growth factor expression in ovarian carcinoma

Zhou Ming<sup>1</sup>, Zhang Yuquan<sup>2</sup> (1. Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital of Funing County, Yancheng 224400, Jiangsu, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Nantong University-Affiliated Hospital, Nantong 226001, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the clinicopathological, diagnostic and prognostic significance of kallikrein (KLK) 10 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in ovarian carcinoma. **Methods:** Paraffin-embedded sections were prepared from 45 malignant, 10 benign and 12 borderline ovarian tumor tissue specimens collected from patients seeking care in the Department of Gynecology and Obstetrics of Nantong University-Affiliated Hospital between January 2004 and January 2009. Immunohistochemical staining was performed to detect KLK10 and VEGF proteins in these tissue sections. The correlation of KLK10 and VEGF protein levels with the clinicopathological features and prognosis of ovarian carcinoma were analysed. **Results:** Malignant ovarian tumor specimens, as compared with benign and borderline tumor specimens, had significantly higher percentages of KLK10-positive staining (86.7% vs 10.0%, 58.3%;  $P < 0.05$ ) and VEGF-positive staining (82.2% vs 20.0%, 41.7%,  $P < 0.05$ ). The proportion of KLK10- and VEGF-positive cells in the xxx tissue was significantly correlated with clinical stage, pathologic grade, lymphatic metastasis and 5-year survival rate ( $P < 0.05$ ), but was independent of age, histological type, serum level of CA125, ascetic fluid or remnant tumor diameter ( $P > 0.05$ ). The expression of KLK10 was positively correlated with the expression of VEGF ( $r = 0.5279, P = 0.043$ ). **Conclusion:** Both KLK10 and VEGF are highly expressed and positively correlated in ovarian carcinoma and thereby may serve as putative prognostic markers of the disease.

**[Key words]** kallikrein 10; vascular endothelial growth factor (VEGF); ovarian carcinoma; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 675-679]

**[作者简介]** 周明(1971-), 女, 江苏省盐城市人, 硕士, 主要从事妇科肿瘤临床研究, E-mail: zhouming9966@126.com

**[通信作者]** 张玉泉(Zhang Yuquan, corresponding author), E-mail: jsnt\_zhangyuquan@tom.com

卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤,其发病率在妇科恶性肿瘤中位居第三,病死率却居首位,5 年生存率一直徘徊在 20% ~ 30%。人类组织激肽释放酶(kallikrein, KLK)是一组丝氨酸蛋白酶的家族,由 15 个成员组成,与卵巢癌关系密切的成员有 KLK4 ~ KLK15,它们可能会成为卵巢癌的生物标志物<sup>[1-3]</sup>。El Sherbini 等<sup>[3]</sup>研究认为, KLK10 在卵巢癌中高表达,且这种高表达提示预后不良。KLK10 蛋白与卵巢癌的关系在国内研究不多。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能够刺激血管内皮细胞增殖、促进肿瘤血管生成,促进肿瘤增殖、侵袭及转移<sup>[4]</sup>。Rosen 等<sup>[5]</sup>研究发现,在卵巢癌中, KLK 的表达受 VEGF 的调控,但具体的调控机制尚不清楚。本研究采用免疫组织化学的方法检测 KLK10 蛋白和 VEGF 在卵巢癌中的表达以及相关性和预后,分析其与卵巢癌的临床病理特征及预后的关系,以期对卵巢癌的诊断和治疗寻找新的标志物。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本及主要试剂

选取 2004 年 1 月至 2009 年 1 月在南通大学附属医院妇科手术切除卵巢癌组织石蜡标本 45 例,所选用的患者术前均未行放化疗,术后标本经南通大学附属医院病理科确诊为卵巢癌,有完整的临床病理资料。患者年龄 32 ~ 71 岁,中位年龄 53.34 岁,其中 <40 岁 4 例,40 ~ 50 岁 13 例,51 ~ 60 岁 17 例, >60 岁 11 例;病理分级:高分化 8 例,中分化 18 例,低分化 19 例,分为高分化组和中低分化组;临床分期:按照 FIGO 2000 年分期标准, I 期 9 例, II 期 2 例, III 期 32 例, IV 期 2 例, I 和 II 期为早期组, III 和 IV 期为晚期组;淋巴结转移:有淋巴结转移 29 例,无淋巴结转移 16 例;血清 CA125 的水平:血清 CA125 的水平介于 9.9 ~ 4633  $\mu\text{g/ml}$ ,中位 1 083.37  $\mu\text{g/ml}$ ,其中 <200  $\mu\text{g/ml}$  6 例,200 ~ 400  $\mu\text{g/ml}$  11 例,401 ~ 600  $\mu\text{g/ml}$  10 例,601 ~ 800  $\mu\text{g/ml}$  3 例, >800  $\mu\text{g/ml}$  25 例;腹水量:腹水量 0 ~ 7 000 ml,26 例有腹水,19 例无腹水;残余肿瘤直径:残余肿瘤直径 0 ~ 2.5 cm,33 例残余肿瘤直径 <1 cm,12 例残余肿瘤直径  $\geq 1$  cm;生存时间:生存时间 6 ~ 68 个月,33 例生存时间 <5 年(其中中位生存期为 25.6 个月),12 例生存时间  $\geq 5$  年,中位生存时间 3.43 年。选取同期手术的 10 例良性和 12 例交界性卵巢肿瘤组织石蜡块作对照。45 例患者均获得完全随访资料,均采用电话随访方式,随访截至时间 2014 年 1 月 1 日。

羊抗人 KLK10、兔抗人 VEGF 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司, KLK10 二抗取自抗羊 S-P 试剂盒,购自福州迈新公司。

### 1.2 免疫组化法检测卵巢癌组织内 KLK10 和 VEGF 蛋白的表达

实验方法常规切片,采用 ZYMED 公司推荐的 EnVision™-Kits 二步染色法,检测两组细胞中 KLK10 蛋白和 VEGF 的表达。KLK10 和 VEGF 抗体用 PBS 1:400 稀释为工作液, PBS 代替一抗作阴性对照,用已知乳腺癌阳性切片作对照。

### 1.3 免疫组化结果判定标准

KLK10 蛋白和 VEGF 均以细胞质或细胞膜内呈棕黄色细颗粒状着色为表达阳性,综合染色强度和阳性细胞数(占总细胞数的百分比)进行半定量判定:(1)染色强度评分,细胞无显色者为 0 分,呈浅黄色者为 1 分,呈棕黄色者为 2 分,呈棕褐色者为 3 分;(2)阳性细胞数比例,阳性细胞占总细胞数 10% ~ 50% 者为 2 分,51% ~ 80% 者为 3 分, >80% 者为 4 分。上述两项评分之和 1 ~ 3 分为(+);4 ~ 5 分为(++);6 ~ 7 分为(+++)。

### 1.4 统计学处理

采用 Stata7.0 软件分析,计数资料采用百分比表示,组间差异性比较采用  $\chi^2$  检验,相关性分析采用 Pearson 相关检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 卵巢肿瘤组织中 KLK10 和 VEGF 蛋白的表达

KLK10 和 VEGF 蛋白阳性染色颗粒主要位于肿瘤细胞的胞质内,少量在细胞膜上,为棕黄色颗粒状(图 1)。卵巢癌组织中 KLK10 蛋白的表达显著高于良性、交界性卵巢肿瘤(86.7% vs 10.0%、58.3%,  $P < 0.05$ ), VEGF 的表达显著高于良性、交界性卵巢肿瘤(82.2% vs 20.0%、41.7%,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 KLK10 及 VEGF 蛋白表达与卵巢癌患者临床病理参数间的关系

KLK10 及 VEGF 蛋白表达与卵巢癌患者临床病理参数间关系的分析(表 2)显示, KLK10 蛋白及 VEGF 蛋白在不同的年龄、组织类型、血清 CA125 水平、残余肿瘤直径和有无腹水组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而在卵巢癌不同临床分期、肿瘤高低分化、是否淋巴结转移、5 年生存率各分组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

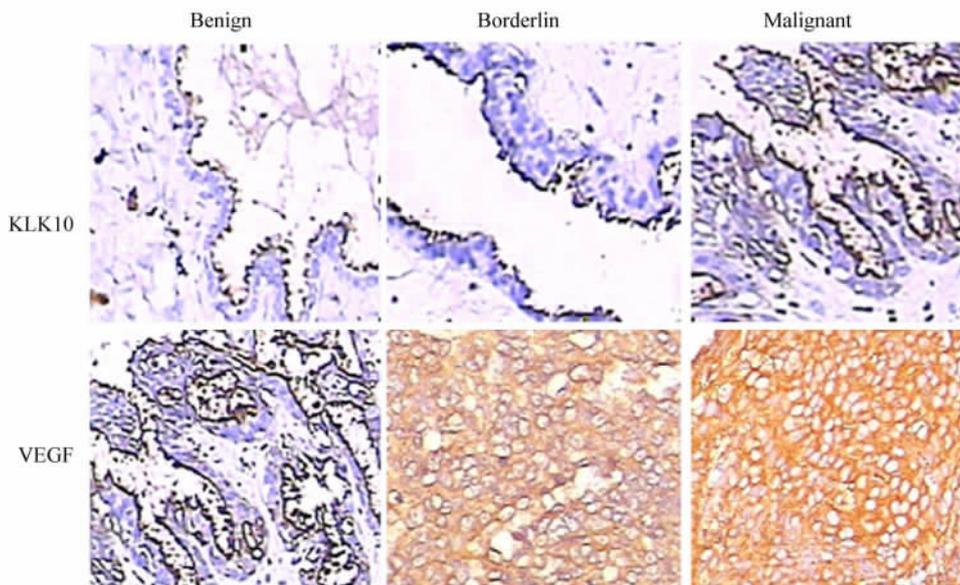


图1 良性、交界性及恶性卵巢组织免疫组化检测( AP, ×200 )

Fig. 1 Immunohistochemistry assay in benign, borderlin and malignant ovarian cancer tissues ( AP, ×200 )

### 2.3 卵巢癌组织中 KLK10 与 VEGF 蛋白表达的相关性

39 例 KLK10 阳性表达的卵巢癌病例中, VEGF 阳性表达率为 89.74% (35/39); 37 例 VEGF 阳性表达的卵巢癌病例中, KLK10 阳性表达率为 94.59% (35/37)。相关分析显示, KLK10 及 VEGF 在卵巢癌中的表达呈正相关( $r=0.5279, P=0.043$ , 表 3)。

表 1 KLK10 与 VEGF 蛋白在良性、交界性及恶性卵巢癌组织内的表达 (n)

Tab. 1 Expressions of KLK10 and VEGF in benign, borderline and ovarian carcinoma (n)

Group	N	KLK10			VEGF		
		-	+	Positive rate(%)	-	+	Positive rate(%)
Benign	10	9	1	10	8	2	20
Borderline	12	5	7	58.3	7	5	41.4
Carcinoma	45	6	39	86.7	8	37	82.2

### 3 讨论

KLK10 又称 NES 1 (normal epithelial cell-specific 1) 基因, 位于 19 号染色体 q13.4, 编码一条含 276 个氨基酸的蛋白, 其生理功能目前仍未阐明<sup>[6]</sup>。

Alexopoulou 等<sup>[7-9]</sup> 研究显示, 在激素相关性肿瘤如乳腺癌、前列腺、睾丸癌中 KLK10 起抑癌基因的作用, 当组织癌变时, KLK10 表达下降, 而在卵巢癌组织中 KLK10 蛋白的表达异常升高, 且这种高表达提示预后不良。KLK10 在卵巢癌中高表达, 可能的机制是 KLK10 基因外显子 3 的 CPG 岛甲基化导致其在卵巢肿瘤中异常表达, 肿瘤组织中 KLK10 mRNA 及蛋白合成失调。研究<sup>[10-12]</sup> 发现, 在肾癌、膀胱癌、乳腺癌及胃肠道腺癌中 VEGF 呈高水平表达, 且这种高表达提示预后不良。Oh 等<sup>[13]</sup> 发现, 卵巢癌中 VEGF 表达增加, 且 VEGF 强染区的微血管密度明显增强, 推测卵巢癌中肿瘤血管形成可能是一个早发事件。Batra 等<sup>[14]</sup> 应用免疫组化法发现 KLK10 蛋白在卵巢中表达, 但并未报道在正常卵巢中表达阳性率。本研究结果显示, 在卵巢交界性肿瘤组织 KLK10 蛋白表达较良性病变显著升高, 提示 KLK10 蛋白在卵巢恶性肿瘤形成的早期阶段, 在卵巢肿瘤由良性向恶性转化发展过程中可能起作用, 并对鉴别卵巢肿瘤的性质有意义。Steinhoff 等<sup>[15]</sup> 认为, KLK10 与 VEGF 在卵巢癌的发生发展中有协同的作用, 可一起作为卵巢癌的标志物, 具体的机制、在卵巢癌的预后方面及其两者的相关性均未阐明。本研究发现, 在卵巢癌瘤细胞中 VEGF 的表达与 KLK10 呈正相关, 佐证了以上观点。

表 2 卵巢癌中 KLK10 及 VEGF 蛋白表达与临床病理参数间的关系

Tab. 2 Expressions of KLK10 and VEGF in ovarian carcinoma and it's correlation with clinicopathologic characteristics

Characteristic	N	KLK10				VEGF			
		n	%	$\chi^2$	P	n	%	$\chi^2$	P
Total case	45	39	86.67			37	82.22		
Clinical stage									
Early		7	63.6	8.23	0.043	5	45.4	7.15	0.035
Advanced		32	94.1			32	94.1		
Pathologic grade									
Higher		4	50.0	3.247	0.043	3	37.5	2.28	0.037
Lower		35	94.1			34	91.9		
Lymphatic Metastasis									
With		28	96.6	4.236	0.032	28	96.6	3.38	0.029
Without		11	68.8			9	56.3		
5-year survival rate									
<5		31	93.9	4.963	0.033	32	97.0	5.32	0.031
$\geq 5$		8	66.7			5	41.67		
Age( t/year )									
<40		3	75.0	1.378	0.656	2	50.0	1.62	0.564
40 ~ 50		12	92.3			11	84.7		
50 ~ 60		15	88.2			15	88.2		
>60		9	81.8			9	81.8		
CA125									
<200		5	83.3	0.876	0.726	4	66.7	4.83	0.623
200 ~ 400		9	81.8			9	81.8		
401 ~ 600		8	80.0			8	80.0		
601 ~ 800		3	100.0			2	66.7		
>800		14	93.3			14	93.3		
Histological type									
Serious		35	89.7	0.922	0.843	33	84.6	1.283	0.543
Not serious		4	66.7			4	66.7		
Ascetic fluid									
With		23	88.5	0.765	0.623	21	84.6	0.832	0.174
Without		16	84.2			15	79.0		
Remnant tumor diameter ( d/cm )									
$\geq 1$		28	84.8	0.396	0.563	29	87.9	0.453	0.559
<1		11	91.7			8	66.7		

表 3 KLK10 与 VEGF 在卵巢癌中表达的关系

Tab. 3 Correlation between the expression of KLK10 and VEGF in ovarian carcinoma

Expression	KLK10( + )	KLK10( - )	Total	<i>r</i>	<i>P</i>
VEGF( + )	35	2	37	0.5279	0.043
VEGF( - )	4	4	8		
Total	39	45	45		

White 等<sup>[16-18]</sup>研究发现, KLK10 蛋白在卵巢癌组织的表达越高, 则临床期别越晚、肿瘤细胞病理分级和恶性程度越高、肿瘤生长侵袭更迅速、更易转移, 预后不良, 本研究得到了相同的结果; 同时这些数据还提示, 在卵巢癌的发生发展过程中, 可能存在某种上调机制, 提高了 KLK10 在卵巢癌中的表达水平, 促进了卵巢癌的发生发展侵袭转移。通过分析发现, KLK10 和 VEGF 的在卵巢癌中的表达呈显著正相关, 提示 KLK10 和 VEGF 与卵巢癌的发生发展关系密切, 且两者的生物学效应互为促进, VEGF 可能促进 KLK10 的表达, 促进卵巢癌细胞的侵袭和转移。

综上所述, 在卵巢交界性肿瘤组织 KLK10 与 VEGF 的表达显著高于良性、交界性卵巢肿瘤, 且两者在卵巢癌中的表达呈显著正相关, 提示 KLK10 和 VEGF 与卵巢癌的发生发展关系密切检测。因此, 检测 KLK10 和 VEGF 的表达有希望为卵巢癌的诊断、疗效评定、监测复发以及预后提供信息。

#### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Lorusso D, Ratti M, Ditto A, et al. High-risk borderline ovarian tumors: Analysis of clinicopathological features and prognostic impact of different follow-up strategies [ J ]. *Oncology*, 2014, 87 ( 3 ): 183-192.

[ 2 ] Bayani J, Marrano P, Graham C, et al. Genomic instability and copy-number heterogeneity of chromosome 19q, including the kallikrein locus, in ovarian carcinomas [ J ]. *Mol Oncol*, 2011, 5 ( 1 ): 48-60.

[ 3 ] El Sherbini, Sallam MM, Shaban EA, et al. Diagnostic value of serum kallikrein-related peptidases 6 and 10 versus CA125 in ovarian cancer [ J ]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21( 4 ):625-632.

[ 4 ] Smolle E, Taucher V, Pichler M, et al. Targeting signaling pathways in epithelial ovarian cancer [ J ]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 ( 5 ): 9536-9555.

[ 5 ] Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer [ J ].

*Gynecol Oncol*, 2005, 99( 2 ):267-277

[ 6 ] Hollenberg MD. KLKs and their hormone-like signaling actions: A new life for the PSA-KLK family [ J ]. *Biol Chem*, 2014, 395 ( 9 ): 915-929.

[ 7 ] Alexopoulou DK, Papadopoulos IN, Scorilas A, et al. Clinical significance of kallikrein-related peptidase ( KLK10 ) mRNA expression in colorectal cancer [ J ]. *Clin Biochem*, 2013, 46( 15 ): 1453-1461.

[ 8 ] Jiao X, Lu HJ, Zhai MM, et al. Overexpression of kallikrein gene 10 is a biomarker for predicting poor prognosis in gastric cancer [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19( 48 ): 9425-9431.

[ 9 ] Guillon-Munos A, Oikonomopoulou K, Michel N, et al. Kallikrein-related peptidase 12 hydrolyzes matricellular proteins of the CCN family and modifies interactions of CCN1 and CCN5 with growth factors [ J ]. *J Biol Chem*, 2011, 286 ( 29 ): 25505-25518.

[ 10 ] Javle M, Smyth EC, Chau I. Ramucirumab: Successfully targeting angiogenesis in gastric cancer [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2014, [ Epub ahead of print ].

[ 11 ] Palmieri C. Immunohistochemical expression of angiogenic factors by neoplastic epithelial cells is associated with canine prostatic carcinogenesis [ J ]. *Vet Pathol*, 2014, [ Epub ahead of print ].

[ 12 ] Fu J, Cheng L, Wang Y, et al. The RNA-binding protein RB-PMS1 represses AP-1 signaling and regulates breast cancer cell proliferation and migration [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, [ Epub ahead of print ].

[ 13 ] Oh J, Park SH, Lee TS, et al. High expression of epidermal growth factor-like domain 7 is correlated with poor differentiation and poor prognosis in patients with epithelial ovarian carcinoma [ J ]. *J Gynecol Oncol*, 2014, 25( 4 ): 334-341.

[ 14 ] Batra J, Tan OL, OMara T, et al. Kallikrein-related peptidase 10 ( KLK10 ) expression and single nucleotide polymorphisms in ovarian cancer survival [ J ]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20( 4 ): 529-536.

[ 15 ] Steinhoff M, Schaubert J, Leyden JJ. New insights into rosacea pathophysiology: A review of recent findings [ J ]. *J Am Acad Dermatol*, 2013, 69( 6 Suppl 1 ):S15-S26.

[ 16 ] White NM, Chow TF, Mejia-Guerrero S, et al. Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer [ J ]. *Br J Cancer*, 2010, 102( 8 ):1244-1253.

[ 17 ] Koh SC, Razvi K, Chan YH, et al. The association with age, human tissue kallikreins 6 and 10 and hemostatic markers for survival outcome from epithelial ovarian cancer [ J ]. *Arch Gynecol Obstet*, 2011, 284( 1 ): 183-190.

[ 18 ] Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma [ J ]. *Br J Cancer*, 2000, 83( 2 ): 196-203.

[ 收稿日期 ] 2014 - 07 - 12

[ 修回日期 ] 2014 - 10 - 23

[ 本文编辑 ] 黄静怡