

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.017

结缔组织生长因子在卵巢癌中的表达及其临床意义

柏秀玉^{1,2},丁朝霞¹,姚玉霜¹,杨红娟¹,于剑虹^{1,2},李聪颖^{1,2},陈爱平¹(1. 青岛大学附属医院 妇科, 山东 青岛 266003; 2. 青岛大学 研究生学院, 山东 青岛 266003)

[摘要] **目的:** 探讨结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在卵巢癌组织中的表达及临床意义。**方法:** 采用免疫组化和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 105 例卵巢癌、20 例正常卵巢组织和 30 例良性卵巢肿瘤组织中 CTGF 的表达,并分析 CTGF 与卵巢癌临床病理参数的关系。**结果:** 免疫组化检测观察到 CTGF 主要定位于细胞质内,卵巢癌、正常卵巢组织和良性卵巢肿瘤中 CTGF 的阳性表达率分别为 53.33%(56/105)、95.00%(19/20)、93.33%(28/30),卵巢癌中 CTGF 阳性表达率低于正常卵巢($\chi^2 = 12.15, P = 0.00$)及良性卵巢肿瘤组织($\chi^2 = 15.88, P = 0.00$),正常卵巢与良性卵巢肿瘤组织相比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.05, P = 0.80$),RT-PCR 检测结果显示卵巢癌中 CTGF mRNA 的表达明显低于正常卵巢组织和良性卵巢肿瘤组织($F = 3.39, P = 0.039$)。进一步采用 χ^2 检验统计分析得出 CTGF 与卵巢癌的临床分期、淋巴转移相关($P < 0.05$),而与年龄、病理分级、病理类型及腹水癌细胞阳性率无相关性($P > 0.05$)。**结论:** CTGF 在卵巢癌中低表达,与卵巢癌的发生、发展相关。

[关键词] 结缔组织生长因子;卵巢癌;免疫组化;逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] R737.31; R730.22

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0102-04

Expression and clinical significance of connective tissue growth factor in ovarian carcinoma

BAI Xiuyu^{1,2}, DING Zhaoxia¹, YAO Yushuang¹, YANG Hongjuan¹, YU Jianhong^{1,2}, LI Congying^{1,2}, CHEN Aiping¹(1. Department of Gynaecology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China; 2. Graduate School, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of connective tissue growth factor (CTGF) in ovarian cancer. **Methods:** The expression levels of CTGF in 20 cases of normal ovarian tissues, 30 cases of benign ovarian tumor tissues and 105 cases of ovarian cancer tissues were examined by RT-PCR and immunohistochemical staining, and the correlation between CTGF expression and clinicopathological significance of ovarian cancer was analyzed. **Results:** The positive rate of CTGF expression in normal ovarian tissues, benign ovarian tumor tissues and ovarian cancer tissues were 95.00% (19/20), 93.33% (28/30) and 53.33% (56/105) respectively; the positive rate of CTGF in ovarian cancer tissues was significantly lower than that of normal ovarian tissues ($\chi^2 = 12.15, P = 0.00$) and benign ovarian tumor tissues ($\chi^2 = 15.88, P = 0.00$); there was no significant difference in the positive rate between normal ovarian tissues and benign ovarian tumor tissues ($\chi^2 = 15.88, P = 0.00$). The CTGF mRNA expression in ovarian cancer tissue was lower than that in normal ovarian tissue and benign ovarian tumor tissue showed by RT-PCR ($F = 3.39, P = 0.039$). Data was processed by χ^2 analysis, and the results showed that the expression of CTGF was correlated with clinical stages, lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not correlated with age, pathologic type, pathologic grade and positive rate of ascites tumor cells ($P > 0.05$). **Conclusion:** CTGF was low expressed in ovarian cancer tissues and correlate with the occurrence and progression of ovarian cancer.

[Key words] connective tissue growth factor (CTGF); ovarian cancer; immunohistochemistry; RT-PCR

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(1): 102-105. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.017]

[基金项目] 青岛市公共领域科技支撑计划资助项目(No.13-1-3-62-nsh)。Project supported by the Science and Technology Support Plan of Qingdao Public Domain(No.13-1-3-62-nsh)

[作者简介] 柏秀玉(1987-)女,山东省邹城市人,硕士生,主要从事妇科肿瘤基础与临床研究, E-mail:baixiuyu526@sina.com

[通信作者] 陈爱平(CHEN Aiping, corresponding author), Email:chenaiping516@163.com

卵巢癌在妇科恶性肿瘤中死亡率最高^[1],由于缺乏有效早期诊断筛查手段,且早期无明显症状,多数患者就诊时已为晚期,其中上皮性卵巢癌占卵巢恶性肿瘤的85%~90%。近年研究显示,结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)除在慢性炎症、血管和纤维化生成方面起到重要作用外,也可参与肿瘤的发生发展。有学者^[2]报道,CTGF是卵巢癌增殖和侵袭的重要调节因子,有望成为预测卵巢癌患者预后的指标。本研究通过免疫组化和RT-PCR检测卵巢癌中CTGF的表达并分析其与卵巢癌病理因素的关系,探讨CTGF与卵巢癌发生、发展的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集青岛大学附属医院2009年1月至2014年9月期间经手术切除并经病理证实的卵巢组织标本,其中卵巢癌105例(浆液性81例,黏液性15例,透明细胞癌7例,子宫内膜样腺癌2例),卵巢良性肿瘤30例(浆液性24例,黏液性6例),并以20例因宫颈癌行附件切除的正常卵巢作为对照。新鲜标本分两部分保存,一部分置于RNA later液保存于-80℃冰箱中用于RNA提取及RT-PCR检测;另一部分用4%甲醛固定后,石蜡包埋切片用于免疫组化。纳入标准:(1)研究组为卵巢癌患者,有明确的术后病理石蜡切片诊断,不受患者年龄、种族的限制;(2)文献中测定的表达水平的检测方法及试剂来源明确;(3)获得的研究结果中含有或通过计算可获得四格表的数据。排除标准:(1)诊断金标准无术后病理石蜡切片、达不到统计差异性要求的小样本(<15例),非原始研究;(2)仅仅以健康人群作对照的研究;(3)研究结果中未含有或不能通过计算可得四格表数据;(4)QUADAS评为价低质量的研究(<7分);(5)排除主题研究原发于其他部分如胃肠道等而转移到卵巢的肿瘤。本研究155例患者均已签署知情同意书并得到医院伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂

组织RNA提取试剂盒、cDNA试剂盒、RT-PCR购于天根生化科技有限公司,羊抗人CTGF多克隆抗体购于Millipore公司。

1.3 RT-PCR法检测卵巢癌中CTGF mRNA的表达

组织RNA提取依照RNA提取试剂盒步骤进行,引物由上海Invitrogen公司合成,CTGF上游引物为5'-CCCAAATCTCCAAGCCTATCA-3',下游引物

为5'-TCGCCGTCAGGGCACTT-3',扩增产物长度为155 bp, GAPDH上游引物为5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3',下游引物为5'-GAGGAGTGGGTGTCGCTGTT-3',扩增产物长度为150 bp。反应条件:94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 72℃ 5 min, 循环30次。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, UVP凝胶成像系统拍照, Quantity One软件进行灰度分析。

1.4 免疫组化法检测卵巢癌中CTGF的表达

石蜡切片,烤片,逐级脱蜡、水化,采用Envision二部染色法检测,二甲苯5 min×3,无水乙醇5 min×3, PBS 2 min×3,高压修复2 min, PBS 2 min×3, 2%过氧化氢10 min, PBS 5 min×3,加入一抗(CTGF, 1:200)室温1 h, PBS 5 min×3,加入IgG生物素连接二抗室温30 min, PBS 5 min×3, DAB染色,苏木素染色4 s,自来水冲洗5 min,乙醇2 min×3,二甲苯2 min×2,中性树胶封片、观察。用已知的人乳腺癌组织CTGF阳性表达作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。结果判定:胞浆中有明显棕黄色颗粒为CTGF阳性表达,以阳性细胞率评分与细胞着色程度评分之和作为病理切片CTGF评分值,细胞着色程度评分标准(无着色或者整个背景淡棕色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分),阳性细胞率评分(<5%为0分,5%~20%为1分,20%~50%为2分,50%~75%为3分,>75%为4分),评分值>2分为阳性病例,≤2为阴性病例。

1.5 统计学处理

采用SPSS 12.0软件进行统计学分析,计数资料组间比较应用 χ^2 检验和Fisher确切概率法,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均重复3次,均数比较采用单因素方差分析,多组间两两组间比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR法检测CTGF mRNA在卵巢癌组织中低表达

各组RT-PCR反应产物条带见图1,统计学分析后显示CTGF mRNA在卵巢癌中表达(0.523 ± 0.043)明显低于正常卵巢组织(1.23 ± 0.22)和良性卵巢肿瘤组织(1.18 ± 0.07),差异具有统计学意义($F = 3.39, P = 0.039$)。正常卵巢组织与良性卵巢肿瘤组织相比较差异无统计学意义($F = 12.56, P = 0.86$)。

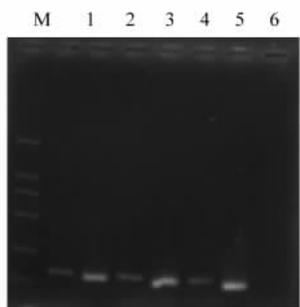


图1 RT-PCR 检测 CTGF mRNA 的表达

Fig. 1 CTGF mRNA expression examined by RT-PCR

M:2 000 bp DNA marker;1:Normal ovarian epithelium;3:Ovarian serous cystadenoma;5:Ovarian serous cystadenocarcinoma;2,4,6:GAPDH

2.2 免疫组化检测 CTGF 在卵巢癌组织中低表达
免疫组化检测 CTGF 在卵巢癌中表达缺少, CTGF阳性结果为胞浆中出现黄色或者棕黄色颗粒(图2),与正常卵巢组织(95.00%,19/20)、良性卵巢肿瘤组织(93.33%,28/30)相比卵巢癌 CTGF 表达率(53.33%,56/105)明显降低,差异有统计学意义($\chi^2 = 12.15, \chi^2 = 15.88, P < 0.05$)。正常卵巢与良性卵巢肿瘤组织相比较无统计学意义($\chi^2 = 0.05, P > 0.05$)。

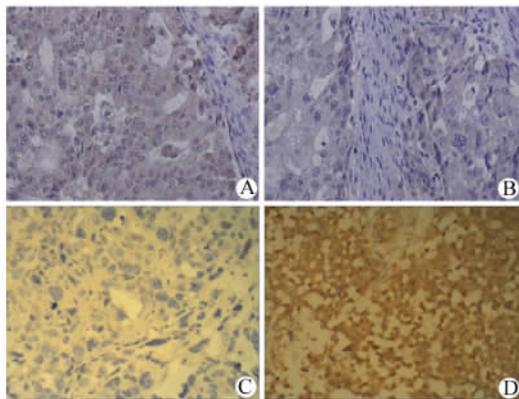


图2 CTGF 蛋白在卵巢癌中的表达
(Envision 二部染色法, ×200)

Fig. 2 Expression of CTGF protein in ovarain cancer tissues by immunohistochemistry(Envision two-step staining method, ×200)

A:Normal ovarian epithelium; B: Ovarian serous cystadenoma; C:Low differentiated ovarian serous cystadenocarcinoma I period; D:Low differentiated ovarian serous cystadenocarcinoma III period

2.3 CTGF 蛋白表达与卵巢癌临床病理特征的关系

CTGF 蛋白表达与卵巢癌临床分期、淋巴转移相关,具有统计学意义($P < 0.05$),而与年龄、病理分级、病理类型及腹水癌细胞阳性率无相关性($P > 0.05$)(表1)。

表1 CTGF 表达与卵巢癌临床病理参数的关系[n(%)]

Tab. 1 Correlation between CTGF expression and clinicopathological characteristics of ovarian cancer[n(%)]

Variables	N	Expression of CTGF	χ^2	P
Age(t/a)	105	56(53.33)		
<55	48	31(64.58)	7.56	0.326
≥ 55	57	25(43.85)		
FIGO stage				
I and II	39	19(48.71)	5.31	0.021
III and IV	99	47(71.21)		
Pathologic type				
Serous	81	39(48.14)	6.79	0.267
Mucinous	15	11(73.33)		
Clear cell	7	5(71.42)		
Endometrioid	2	1(50.00)		
Pathologic grade				
G1	30	15(50.00)	12.16	0.412
G2-G3	75	41(54.66)		
Lymph node metastasis				
No	48	20(41.66)	4.83	0.028
Yes	57	36(63.15)		
Peritoneal cytology				
Positive	47	23(48.93)	0.66	0.495
Negative	58	33(56.89)		

3 讨论

结缔组织生长因子属即刻早期基因 CNN 家族成员,是一种含半胱氨酸的分泌肽,参与体内多种生理过程,如组织创伤修复、血管生成^[3]等,同时 CTGF 也参与肿瘤发生发展的病理过程,目前成为肿瘤研究热点^[4-5]。CTGF 对不同的肿瘤具有细胞特异性和环境特异性,在不同的肿瘤组织中表达不同,作用也不同。如在胰腺癌组织中 CTGF 高表达,外源

性导入 *CTGF* 基因可促进胰腺癌细胞的增殖和侵袭、外源性导入 *CTGF* 小干扰 RNA 可减弱胰腺癌细胞的增殖和侵袭^[6]; *CTGF* 在胃癌中高表达,并可作为胃癌前病变、早期诊断和预后判定的指标^[7]; *CTGF* 也在乳腺癌、急性淋巴细胞白血病中高表达^[8-9]。以上研究表明 *CTGF* 在肿瘤发展中可作为肿瘤促进因子发挥作用。而 *CTGF* 也可作为肿瘤抑制因子影响肿瘤的进展,如在结直肠癌中,癌组织 *CTGF* mRNA 高表达组患者的 5 年生存率高于低表达组,*CTGF* 低表达的结直肠癌患者预后不良,*CTGF* 的异常表达与结直肠癌恶性生物学行为有关^[10]; *CTGF* 高表达的小细胞肺癌患者预后优于 *CTGF* 低表达组^[11]。Barbolina 等研究显示,*CTGF* 在卵巢癌组织中有表达缺失现象,通过三维培养和 DNA 微阵列分析,*CTGF* 表达量降低可促进卵巢癌细胞增殖和侵袭能力,有研究报道在卵巢癌中 *CTGF* 表达缺少,而在晚期卵巢癌患者中 *CTGF* 表达重现,*CTGF* 可能作为保护性因子抑制晚期卵巢癌的发生、发展^[12]。关于 *CTGF* 与卵巢癌发生、发展的关系需要进一步研究。

本研究主要探讨了 *CTGF* 在卵巢癌中的表达及临床意义,RT-PCR 检测显示卵巢癌中 *CTGF* 的表达明显低于正常卵巢组织和卵巢良性组织,正常卵巢组织中 *CTGF* 是高表达的,而卵巢癌中 *CTGF* 可能通过某种机制表达减低,具体机制需要进一步研究。免疫组化检测结果显示,*CTGF* 在卵巢癌组织中低表达,与 Kikuchi 等^[13]研究结果一致,统计分析 *CTGF* 与卵巢癌临床病理参数的关系发现 *CTGF* 的异常表达与卵巢癌临床分期、淋巴转移相关,而与年龄、病理分级、病理类型及腹水癌细胞阳性率无相关性。

综上所述,*CTGF* 在卵巢癌组织中低表达,*CTGF* 可作为卵巢癌新的标志物,其深入的研究可为临床卵巢癌的治疗提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56 (2): 106-130. PMID: 16514137.
- [2] BARBOLINA M V, ADLEY B P, KELLY D, et al. Downregulation of connective tissue growth factor by three-dimensional matrix

enhances ovarian carcinoma cell invasion [J]. J Int Cancer, 2009, 125(4): 816-825. DOI:10. 1002/ijc. 24347.

- [3] SHIMO T, KUBOTA S, KONDO S, et al. Connective tissue growth factor a major angiogenic agent that is induced by hypoxia in a human breast cancer cell line [J]. Cancer Lett, 2001, 174(1): 57-64. PMID:11675152.
- [4] 刘燕,孔爱荣. 结缔组织生长因子与妇科肿瘤 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2007, 34(8): 615-618. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 1673-422X. 2007. 08. 018.
- [5] 吴贤敏,唐琼兰,谢贤镛,等. *CTGF* 与肿瘤的研究进展 [J]. 川北医学院学报, 2007, 22(6): 609-612. DOI:10. 3969/j. issn. 1005-3697. 2007. 06. 033.
- [6] 白玉春,康权,罗庆,等. 结缔组织生长因子对胰腺癌细胞增殖和转移的影响 [J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(10): 732-736. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 0253-3766. 2011. 10. 003.
- [7] LIU L Y, HAN Y, WU S H, LV Z H. Expression of connective tissue growth factor in tumor tissues is an independent predictor of poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(13): 2110-2114. DOI: 10. 3748/wjg. 14. 2110.
- [8] EGUCHI T, KUBOTA S, et al. Different transcriptional strategies for *ccn2/ctgf* gene induction between human chondrocytic and breast cancer cell lines [J]. Biochimie, 2007, 89(3):278-288. PMID:17291666.
- [9] LU H, KOJIMA K, Battula V L, et al. Targeting connective tissue growth factor (*CTGF*) in acute lymphoblastic leukemia preclinical models: anti-*CTGF* monoclonal antibody attenuates leukemia growth [J]. Ann Hematol, 2014, 93(3): 485-492. DOI: 10. 1007/s00277-013-1939-2.
- [10] 孙政,杨平,梁立源,等. 结缔组织生长因子在结直肠癌组织中的表达及其与患者预后的关系 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2012, 15(11): 1166-1170.
- [11] CHIEN W, YIN D, GUI D, et al. Suppression of cell proliferation and signaling transduction by connective tissue growth factor in non-small cell lung cancer cells [J]. Mol Cancer Res, 2006, 4 (8): 591-598. PMID:16877704.
- [12] CHU C Y, CHANG C C, PRAKASH E, et al. Connective tissue growth factor(*CTGF*) and cancer progression [J]. J Biomed Sci, 2008, 15(6): 675-685. DOI:10. 1007/s11373-008-9264-9.
- [13] RYOKO K, HITOSHI T, YAE K, et al. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7095-7105. DOI:10. 1158/0008-5472. CAN-06-4567.

[收稿日期] 2015 - 09 - 06

[修回日期] 2015 - 11 - 04

[本文编辑] 党瑞山

热烈庆祝《中国肿瘤生物治疗杂志》再次获评中国权威学术期刊