

宫颈鳞癌患者癌组织 Nemo 样激酶的表达 与临床病理特征及预后关系研究*

蒋秋丽¹, 王佩红¹, 苗群英¹, 白 宁¹, 樊阳阳²

(1. 汉中市中心医院妇科, 陕西汉中 723000; 2. 陕西省人民医院妇产科, 西安 710068)

摘要:目的 探讨宫颈鳞癌患者癌组织 Nemo 样激酶(NLK)的表达与临床病理特征及预后关系。方法 收集 2016~2017 年汉中市中心医院 172 例宫颈鳞癌患者的肿瘤组织标本, 采用免疫组织化学方法检测病理组织中 Nemo 样激酶的表达。应用 Log-Rank 检验比较低表达患者与高表达患者间的生存时间差异。应用 COX 模型探索宫颈鳞癌患者预后的影响因素。结果 所有肿瘤组织标本中, 有 76 例(44.19%)为 NLK 低表达, 96 例(55.81%)为高表达。NLK 表达情况在不同血管/淋巴结浸润状态、不同淋巴结转移情况及不同肿瘤复发情况的人群间进行比较, 差异均有统计学意义($\chi^2=9.01$, $P=0.003$; $\chi^2=9.11$, $P=0.003$; $\chi^2=7.81$, $P=0.005$)。NLK 低表达水平的患者平均无疾病生存时间为 76.41 个月, NLK 高表达水平的患者平均无疾病生存时间为 53.24 个月, NLK 低表达水平患者与高表达水平患者间无疾病生存时间比较, 差异有统计学意义($\chi^2=12.36$, $P<0.001$); NLK 低表达水平的患者总体生存时间为 76.41 个月, NLK 高表达水平的患者总体生存时间为 56.05 个月, NLK 低表达水平患者与高表达水平患者间总体生存时间比较, 差异有统计学意义($\chi^2=7.84$, $P=0.005$)。COX 模型结果表明宫颈鳞癌患者病理组织中 NLK 高度表达是患者预后的危险因素($HR=2.91$)。结论 Nemo 样激酶的表达在宫颈鳞癌发生、发展中起重要的作用, 并且与患者预后有密切的关系。这提示干预 Nemo 样激酶的表达可能成为延缓或控制宫颈鳞癌发展的可行方法。

关键词: 宫颈鳞癌; Nemo 样激酶; 预后

中图分类号: R737.33; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)05-072-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.05.018

Expression of NLK in Cervical Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance

JIANG Qiu-li¹, WANG Pei-hong¹, MIAO Qun-ying¹, BAI Ning¹, FAN Yang-yang² (1. Department of Gynaecology, Hanzhong Central Hospital, Shaanxi Hanzhong 723000, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the expression of Nemo-like kinase (NLK) in cervical squamous cell carcinoma and its clinical features and prognosis. **Methods** From 2016 to 2017, tumor tissue samples of 172 patients with cervical cancer were collected in Hanzhong Central Hospital, and the expression of NLK in pathological tissues was detected by immunohistochemistry. Log-Rank test was used to compare the survival time between patients with low expression of NLK and those with high expression of NLK. The COX model was applied to investigate the prognostic factors of cervical squamous cell carcinoma. **Results** Among all tumor tissue specimens, 76 cases (44.19%) showed low expression of NLK. High expression was observed in 96 cases (55.81%). NLK expression was compared among patients with different vascular/lymph node infiltration, lymph node metastasis and tumor recurrence, and the differences were statistically significant ($\chi^2=9.01$, $P=0.003$; $\chi^2=9.11$, $P=0.003$; $\chi^2=7.81$, $P=0.005$). Patients with low NLK expression had an average disease-free survival time of 76.41 months. Patients with high expression level of NLK had an average disease-free survival time of 53.24 months. Disease-free survival time of patients with low expression level of NLK was compared with those with high expression level, and the difference was statistically significant ($\chi^2=12.36$, $P<0.001$). The overall survival time of patients with low NLK expression was 76.41 months, and that of patients with high NLK expression was 56.05 months. The differences in the overall survival time between patients with low NLK expression and those with high NLK expression were statistically significant ($\chi^2=7.84$, $P=0.005$). COX model results indicated that the high expression of NLK in the pathological tissues of patients with cervical squamous cell carcinoma was a risk factor for the prognosis of patients ($HR=2.91$). **Conclusion** The expression of Nemo-like kinase in the hair of cervical squamous cell carcinoma health and development play an important role and are closely related to the prognosis of patients. This suggests that intervention of Nemo-like kinase expression may be a feasible method for delaying or controlling the development of cervical squamous cell carcinoma.

Keywords: cervical squamous cell carcinoma; nemo-like kinase; prognosis

* 作者简介: 蒋秋丽, 女(1972-), 本科, 副主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: hanjiangqiul@163.com。

宫颈癌是危害女性身心健康的重要疾病之一,其发病率仅次于乳腺癌,并位居女性生殖系统恶性肿瘤第二位^[1]。每年在全球约有50万新增宫颈癌患者,其中在中国新发病例约有13.15万,占全球总发病人数的1/4^[2]。根据组织病理特征,宫颈癌可以分为鳞状细胞癌和腺癌,其中鳞状细胞癌占宫颈癌全部组织类型的80%^[3]。宫颈鳞癌5年生存率为70%^[4],严重威胁女性身体健康,并给患者带来巨大经济负担^[5]。由于宫颈癌早期发病隐匿,大多数患者就诊时疾病已进展至晚期,因此寻找可以预示疾病进展的肿瘤标志物对宫颈癌的防治意义重大,也是宫颈癌相关临床研究的热点。

Nemo样激酶(nemo-like kinase, NLK)是丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶,与胞外信号调节激酶及细胞周期蛋白依赖性激酶同源。有研究报道, NLK在肝癌、结肠癌及前列腺癌的发生发展中扮演着重要的角色^[6-8]。近年来, NLK与肿瘤细胞的增殖关系已成为肿瘤相关研究的热点,但其在宫颈鳞癌发生发展中的研究尚未见报道。因此,本次研究的目的是探索宫颈鳞癌患者癌组织 Nemo样激酶的表达与临床病理特征及预后关系,为宫颈鳞癌患者的诊治及疾病预后的判断提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 在2016年6月~2017年8月,共收集了172例于我院住院治疗的宫颈鳞癌患者,所有病例均由病理诊断确诊。所有纳入患者均接受根治性子宫切除术和盆腔淋巴结切除术,且在术前均未接受过任何形式的化疗及放疗,仅部分高危患者接受了术后放疗。本研究中所有患者均按照国际妇产科联合会所推荐的标准(FIGO)进行术前分期^[9],并收集相关的临床资料。本研究纳入的患者年龄32~70岁,平均年龄为51.24岁;所有患者均采取门诊或电话的方式进行长期随访。本研究中所有患者的随访中位时间达64个月(16~82个月)。用于评价患者预后的总体生存时间(overall survival time, OS)定义为术后至患者死亡经历时间;无病生存时间(disease-free survival time, DFS)定义为手术成功完成至疾病复发所经历时间,患者是否复发均需影像学及病理学证据判断。本次研究报经本院伦理委员会审核批准,并且所有患者均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 电泳槽,蛋白标准品, Western杂交仪,硝化纤维素滤膜购自伯乐生命医学产品有限公司;倒置荧光显微镜购自德国徕卡公司; NLK抗体,鼠二抗购自Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 Western Blot 将宫颈鳞癌病理组织置于

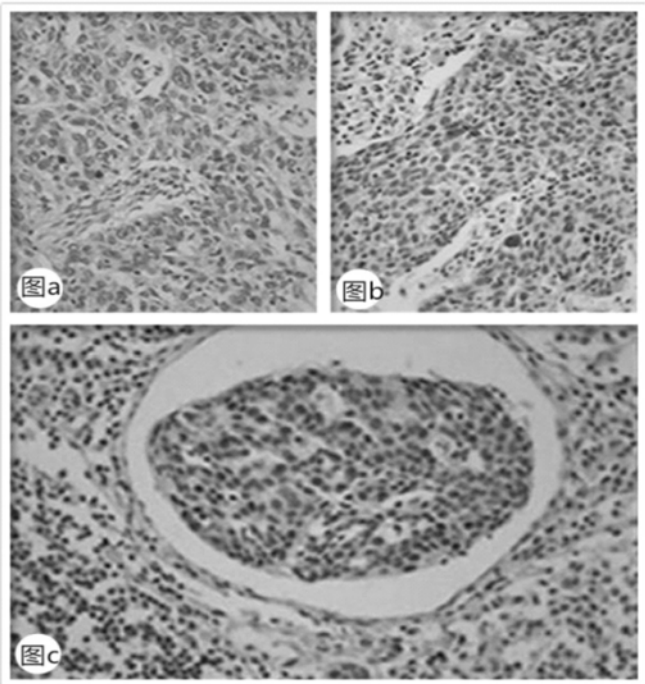
RIPA缓冲液与1 mg/dl蛋白酶抑制剂混合溶液中4℃离心15 min。分离物采用双链氨基酸蛋白试剂定量,随后取30 μg蛋白质跑SDS-PAGE,而后转移至甲醇活化的硝化纤维素滤膜。然后加入NLK抗体(1:1 000稀释)在4℃的条件下孵育过夜。加入二抗在室温下静置1 h,随后曝光显影。

1.3.2 免疫组化:将患者的病理组织石蜡标本切成4 μm的薄片并且用3 ml/dl的过氧化氢溶液在37℃的条件下处理30 min,随后加入10 mmol/L的枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)并置于高压锅中2 min。与小鼠抗人NLK单克隆抗体(1:100稀释)4℃条件下静置过夜孵育。加入鼠二抗,室温孵育20 min。随后将切片浸泡在3,3'-四盐酸二氨基联苯溶液中并用苏木紫复染。通过结合显微镜下阳性肿瘤细胞的染色强度及阳性肿瘤细胞百分比来评估NLK的免疫反应。染色结果由两名10年以上病理科工作经验的执业医师独立评价,当结果不一致时由第三名读片人员进行读片以确定最终结果。本次研究中,两位读片人员的读片结果一致率为97.67%。染色百分比按照0%(0分), <5%(1分), 5%~50%(2分)和>50%(3分)的评分标准进行;染色强度按照无染色(0分),弱染色(1分),中度染色(2分)和强染色(3分)的评分标准进行^[10]。本次研究染色总得分在0~6分之间,总得分介于0~3分则认为NLK弱表达;总得分在4~6分则认为NLK强表达。

1.4 统计学分析 所有数据均采用SPSS19.0进行统计分析。采用 χ^2 检验分析分类资料组间差异,定量资料则根据数据分布特征采用参数或非参数的方法分析组间差异。进一步采用Log-Rank检验比较不同组别患者总体生存时间(OS)及无疾病生存时间(DFS)的差异并绘制K-M生存曲线。应用COX模型探索NLK表达对总体生存时间(OS)及无疾病生存时间(DFS)的影响,首先逐一纳入不同临床特征因素,在 $\alpha=0.05$ 的水平下可以确定三个宫颈鳞癌患者总体生存时间的影响因素,分别为NLK表达情况、FIGO分期及淋巴结转移。随后,将三个因素共同纳入模型中,当 $P<0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NLK表达情况与宫颈鳞癌患者临床特征间的关系 见图1。可以看出NLK染色主要集中在肿瘤细胞的细胞核。所有肿瘤组织标本中,有76例(44.19%)为NLK低表达;96例(55.81%)为高表达。39例淋巴结转移的患者NLK处于高表达水平的有34例(87.18%)。



注:图 a 为 NLK 在肿瘤组织中低表达时免疫组化染色结果;图 b 为 NLK 在肿瘤组织中高表达时免疫组化染色结果;图 c 为转移性淋巴结组织中 NLK 高表达时免疫组化染色结果。

图 1 宫颈鳞癌患者病理组织中 NLK 的表达情况

由表 1 可以看出,NLK 的表达情况在不同年龄、不同 FIGO 分期、不同病理分级、不同肿瘤直径及不同子宫旁组织累及状态的人群间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。而 NLK 的表达情况在不同血管/淋巴结浸润状态、不同淋巴结转移情况及不同肿瘤复发情况的人群间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 不同临床特征研究对象 NLK 表达情况差异性分析[$n=172, n(\%)$]						
类 别		总数	NLK 表达		χ^2 值	P 值
			低表达($n=76$)	高表达($n=96$)		
年龄(岁)	≤ 55	98	47(47.96)	51(52.04)	1.31	0.252
	>55	74	29(39.19)	45(60.81)		
FIGO 分期	I 期	104	43(41.35)	61(58.65)	0.86	0.354
	II 期	68	33(48.53)	35(51.47)		
分化程度	低分化	26	12(46.15)	14(53.85)	4.46	0.107
	中度分化	91	46(50.55)	45(49.45)		
	高度分化	55	18(32.73)	37(67.27)		
肿瘤直径(cm)	≤ 5	125	51(40.80)	74(59.20)	2.13	0.145
	>5	47	25(53.19)	22(46.81)		
子宫旁组织累及	有	36	15(41.67)	21(58.33)	0.12	0.732
	无	136	61(44.85)	75(55.15)		
血管/淋巴浸润	有	52	14(26.92)	38(73.08)	9.01	0.003
	无	120	62(51.67)	58(48.33)		
淋巴结转移	有	39	9(23.08)	30(76.92)	9.11	0.003
	无	133	67(50.38)	66(49.62)		
肿瘤复发	有	29	6(20.69)	23(79.31)	7.81	0.005
	无	143	70(48.95)	73(51.05)		

2.2 NLK 表达与宫颈鳞癌患者预后的关系 见表 2。NLK 低表达水平的患者平均无疾病生存时

间为 76.41 个月;NLK 高表达水平的患者平均无疾病生存时间为 53.24 个月;Log-Rank 检验结果提示 NLK 低表达水平患者与 NLK 高表达水平患者间无疾病生存时间的差异有统计学意义($P < 0.001$);NLK 低表达水平的患者总体生存时间为 76.41 个月,NLK 高表达水平的患者总体生存时间为 56.05 个月;Log-Rank 检验结果提示 NLK

低表达水平患者与 NLK 高表达水平患者间总体生存时间的差异有统计学意义($P = 0.005$)。见表 3。可以看出患者的 NLK 表达情况、FIGO 分期及淋巴结转移均是影响患者总体生存时间的风险因素。进一步进行患者无疾病生存时间的影响因素分析,可以看出患者的 NLK 表达情况及淋巴结转移均是影响患者无疾病生存时间的危险因素。

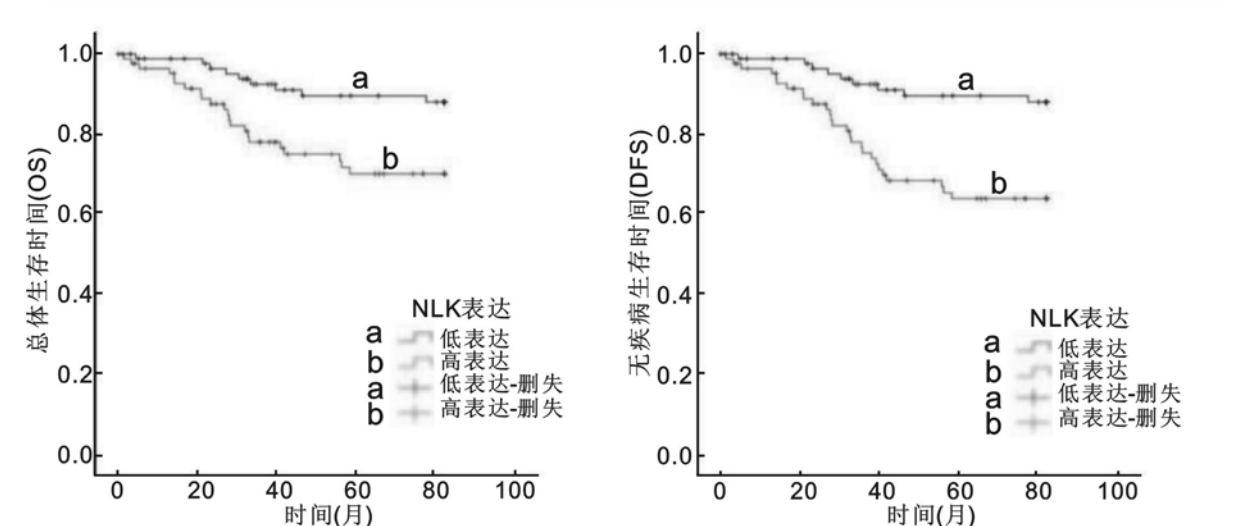


图 2 NLK 表达量对宫颈鳞癌患者总体生存时间以及无疾病生存时间的影响

表 2 不同 NLK 表达情况患者生存时间差异性分析

生存时间	NLK 表达情况	总数	均值	标准误	CV%	χ^2	P
DFS	低表达	76	76.41	1.88	72.73~80.81	12.36	<0.001
	高表达	96	53.24	3.04	47.29~59.19		
OS	低表达	76	76.41	1.88	72.73~80.09	7.84	0.005
	高表达	96	56.05	2.98	50.22~61.89		

表 3 COX 模型危险因素分析及因素 HR 估计

生存时间	因素	HR 估计	95%CI	P
OS	NLK 表达情况(低水平表达为对照)	2.94	1.34~6.74	0.021
	FIGO 分期(I 期为对照)	2.54	1.21~5.45	0.037
	淋巴结转移(无转移为对照)	3.24	1.62~7.02	0.004
DFS	NLK 表达情况(低水平表达为对照)	2.91	1.68~7.72	0.015
	淋巴结转移(无转移为对照)	3.51	1.95~7.21	0.003

3 讨论 本研究发现,NLK 的表达与患者淋巴/血管浸润、淋巴结转移及疾病复发情况有密切关系;COX 模型的结果同时表明 NLK 的表达情况是整体生存时间及无疾病生存时间的独立影响因素。总之,本次研究发现 NLK 可以作为预示宫颈鳞癌患者进展及预后的指标。通过对已有文献的查阅可以发现,NLK 的表达在不同类别肿瘤细胞中不同。其中,NLK 在 60%~70% 的 COS7 细胞及 HEK293 细胞中主要在细胞核中表达,在 30%~40% 的细胞中主要表达在细胞质中^[10]。分析鼻咽癌、肝细胞癌、胶质瘤及胆囊癌的病理组织,发现

NLK 主要在细胞核表达,在直肠癌中 NLK 主要表达在细胞质^[10-13]。在本研究中发现宫颈鳞癌患者中 NLK 的表达主要集中在细胞核。NLK 在不同肿瘤细胞中表达位置的不同可能表明 NLK 在不同肿瘤中通过不同的信号传导通路参与肿瘤细胞生理过程的调节。

有证据表明,NLK 既是原癌基因又是抑癌基因,这主要与器官/细胞类型有关。一方面,NLK 作为致癌基因,下调该基因的表达可能抑制癌症的发展。研究发现抑制 NLK 的表达可以减缓肝癌的细胞生长并增加负向调节细胞周期蛋白 D1(cy-

clinD1)的表达,达到延缓肝癌恶化的作用^[14];此外,下调 NLK 的表达可显著降低胆囊癌细胞的增殖和迁移能力^[11]。另一方面,NLK 可通过抑制细胞增殖、迁移、侵袭或诱导细胞凋亡来抑制癌症的发展。上调 NLK 的表达可以抑制雄激素受体介导的转录并减少前列腺癌细胞 PC-3 的数量^[8]。在人结直肠腺癌上皮细胞中 NLK 的过度表达可诱发细胞凋亡,抑制细胞增殖^[15]。本次研究发现,宫颈鳞癌病理组织中 NLK 的表达主要体现为致癌的作用,但还需进一步的细胞试验加以证实,这也是下一步研究的方向。

总而言之,本次研究发现 NLK 的过度表达在宫颈鳞癌的发生、发展中起着重要的作用并且与患者预后有密切的关系。NLK 高表达水平的患者复发风险及死亡风险均较高,这对宫颈鳞癌患者的随访、治疗及预后的判断有重要意义,这也进一步表明通过抑制 NLK 的过表达可能成为延缓宫颈鳞癌病程发展的方法。

参考文献:

- [1] 田英,王双勇,赵雅,等. 宫颈癌组织细胞中 Numb 基因表达及相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2015,30(6):42-45.
TIAN Ying, WANG Shuangyong, ZHAO Ya, et al. Study on correlation and expression of Numb gene in cervical cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(6): 42-45.
- [2] 冯磊,常春红,管晓卿,等. 宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 的表达及其临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1): 52-55, 58.
FENG Lei, CHANG Chunhong, GUAN Xiaoqing, et al. Expression of plasma miRNA-10b in patients with cervical cancer and its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(1): 52-55, 58.
- [3] ETTINGER D S, KUETTEL M, MALIN J, et al. NCCN roundtable: what are the characteristics of an optimal clinical practice guideline? [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2015, 13(5 Suppl): 640-642.
- [4] 刘文欣,陈颖,杨广明. 144 例宫颈腺癌临床与预后相关因素分析[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(11): 664-667.
LIU Wenxin, CHEN Ying, YANG Guangming. Analysis of the clinical and prognostic correlation factors for 144 cases of invasive cervical adenocarcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2011, 38(11): 664-667.
- [5] 顾益凤,朱自力,史跃燕,等. 血浆硫氧还蛋白还原酶水平检测对宫颈癌早期诊断的价值研究[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2): 40-43.
GU Yifeng, ZHU Zili, SHI Yueyan, et al. Study on the value of plasma thioredoxin reductase level in the early diagnosis of cervical cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2): 40-43.
- [6] JUNG K H, KIM J K, NOH J H, et al. Targeted disruption of Nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(3): 687-696.
- [7] TORELLI G, VENTURELLI D, COLO A, et al. Expression of c-myc protooncogene and other cell cycle-related genes in normal and neoplastic human colonic mucosa[J]. Cancer Res, 1987, 47(20): 5266-5269.
- [8] EMAMI K H, BROWN L G, PITTS T E, et al. Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells[J]. Prostate, 2009, 69(14): 1481-1492.
- [9] 林仲秋,吴珠娜. FIGO 2009 外阴癌、宫颈癌和子宫内膜癌新分期解读[J]. 国际妇产科学杂志, 2009, 36(5): 411-412.
LIN Zhongqiu, WU Zhuna. Interpretation of new stages of vulvar cancer, cervical cancer and endometrial cancer in 2009[J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2009, 36(5): 411-412.
- [10] LI Maolan, ZHANG Shenglai, WANG Zhiqiang, et al. Prognostic significance of nemo-like kinase (NLK) expression in patients with gallbladder cancer[J]. Tumour Biol, 2013, 34(6): 3995-4000.
- [11] TAN Zhujun, LI Maolan, WU Wenguang, et al. NLK is a key regulator of proliferation and migration in gallbladder carcinoma cells[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 369(1/2): 27-33.
- [12] CHEN Size, MA Zhijian, CHEN Xuemei, et al. Prognostic significance of nemo-like kinase in nasopharyngeal carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1): 131-136.
- [13] CHEN Hongwei, QIAO Hongying, LI Hongchen, et al. Prognostic significance of nemo-like kinase expression in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol, 2015, 36(11): 8447-8453.
- [14] JUNG K H, KIM J K, NOH J H, et al. Abstract 1079: Targeted disruption of nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(3): 687-696.
- [15] YASUDA J, TSUCHIYA A, YAMADA T, et al. Nemo-like kinase induces apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 308(2): 227-233.

收稿日期: 2019-05-14

修回日期: 2019-07-01