

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.02.028

GSK-3 β 和 E-cadherin 在子宫内膜腺癌中的表达和意义

李家平¹, 何涛¹, 袁红瑛^{2 Δ}

(1. 河南科技大学第一附属医院妇科, 河南洛阳 471003; 2. 河南科技大学临床医学院, 河南洛阳 471003)

[摘要] **目的** 研究糖原合成酶激酶-3(GSK-3 β)和 E-钙粘蛋白(E-cadherin)在子宫内膜腺癌组织中的表达水平,了解其表达水平与生物学特性、预后的关联。**方法** 应用免疫组织化学 SP 技术检测 55 例子宫内膜腺癌组织,19 例子宫内膜不典型增生组织,12 例正常增殖期子宫内膜组织中 GSK-3 β 和 E-cadherin 的表达。**结果** 在子宫内膜腺癌组织、子宫内膜不典型增生组织和正常增殖期子宫内膜组织中 GSK-3 β 和 E-cadherin 的阳性表达呈逐渐增高趋势,差异有统计学意义($\chi^2=15.640, P=0.000$)。GSK-3 β 在子宫内膜腺癌组织中的表达随患者 FIGO 分期的进展呈下降趋势($P<0.05$),而与组织学病理分级、是否浸润肌层、淋巴结转移、年龄无明显相关($P>0.05$);E-cadherin 在子宫内膜腺癌组织中的表达随患者组织学病理分级的增高呈下降趋势($P<0.05$),而与临床分期、淋巴结转移、是否浸润肌层、年龄无明显相关($P>0.05$)。GSK-3 β 和 E-cadherin 的表达呈正相关($r=0.516, P=0.000$)。**结论** GSK-3 β 和 E-cadherin 可能在子宫内膜腺癌发生、发展中发挥着既独立又协同的抑癌基因作用。

[关键词] 子宫内膜肿瘤;糖原合成酶激酶 3;桥粒钙黏蛋白质类

[中图法分类号] R737.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0288-05

Expression of GSK-3 β and E-cadherin in endometrial cancer and its significance

LI Jiaping¹, HE Tao¹, YUAN Hongying^{2 Δ}

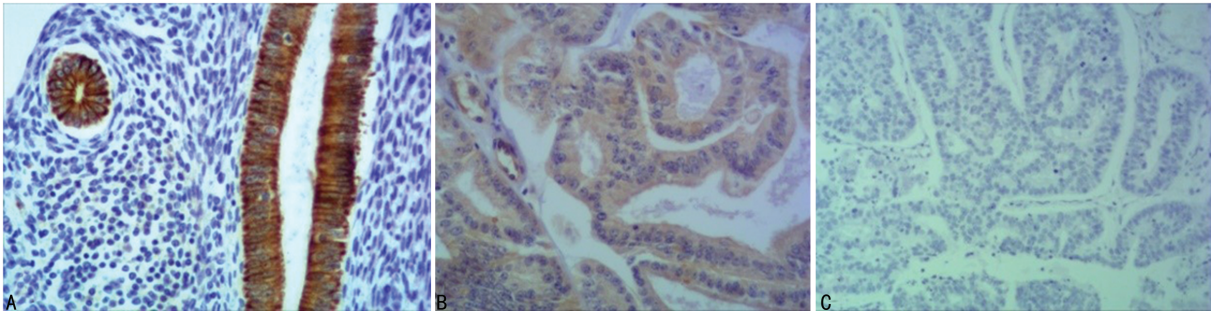
(1. Department of Gynaecology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; 2. College of Clinical Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of GSK-3 β and E-cadherin in human endometrial adenocarcinoma (EAC) and analyze their relationship with clinicopathological features. **Methods** The GSK-3 β and E-cadherin protein in normal proliferative endometrium group (12 cases), endometrial atypical hyperplasia group (19 cases), endometrial adenocarcinoma group (55 cases) were detected by immunohistochemical SP technique. **Results** The positive expression rates of GSK-3 β protein and E-cadherin protein increased gradually in normal proliferative endometrium, endometrial atypical hyperplasia, endometrial adenocarcinoma tissues, and there were statistically significant differences among three groups ($\chi^2=15.640, P=0.000$). The positive expression of GSK-3 β decreased with the increasing clinical stages ($P<0.05$), and no difference among pathological grading, age, lymph node metastasis and cancerous tissue infiltration depth ($P>0.05$). The positive expression of E-cadherin decreased with the increasing histological grade ($P<0.05$), and no difference between the expression of E-cadherin and clinical stages, myometrial invasion, lymph node metastasis and age ($P>0.05$). GSK-3 β and E-cadherin expression in endometrial carcinoma showed a positive correlation ($r=0.516, P=0.000$). **Conclusion** GSK-3 β and E-cadherin may play an independent and congenerous anti-oncogene role in the incidence and development of endometrial carcinogenesis.

[Key words] endometrial neoplasms; glycogen synthase kinase 3; desmosomal cadherins

近 20 年子宫内膜癌发病率呈逐年上升趋势,且逐渐向年轻人群迈进^[1-3],在欧美发达国家其发病率高居生殖系统肿瘤首位^[4]。子宫内膜癌的发病原因,机制目前尚无明确定论,给治疗带来诸多困难。近年来人们认为 Wnt 信号通路的上游分子糖原合成酶激

酶-3(GSK-3 β)可能影响肿瘤细胞的形成、迁移和自我更新,起着促进细胞程序性死亡,限制细胞增殖,发挥负性调控行为^[5-6]。SOKOLOSKY 等^[7]研究显示 GSK-3 β 在胃癌组织中阳性表达水平较正常胃组织明显下调。E-钙粘蛋白(E-cadherin)在正常微环境中起



A:正常增殖期内膜组(SP×200);B:子宫内膜不典型增生组(SP×200);C:子宫内膜腺癌组(SP×100)

图1 3组GSK-3β的表达

着维持细胞之间结构的稳定性,防止它们随意迁移、黏附,其表达水平降低易导致上皮-间质转化事件发生。许多研究显示 E-cadherin 下调与上皮肿瘤关系密切,在口腔癌^[8]、乳腺癌等上皮癌中 E-cadherin 表达较正常组织明显下调。肿瘤的形成、进展涉及微环境的变化和细胞内部结构的改变等繁杂的程序^[9],本研究试图应用免疫组织化学技术,检测 GSK-3β 和 E-cadherin 在子宫内膜腺癌中的表达情况,旨在分析该基因与子宫内膜腺癌的关系,有助于子宫内膜腺癌的治疗,为临床预后提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本试验 86 例标本来自 2010 年 1 月至 2012 年 12 月河南科技大学第一附属医院妇科手术切除子宫内膜组织,分为正常增殖期内膜组(12 例),子宫内膜不典型增生组(19 例)和子宫内膜腺癌组(55 例)。采用免疫组织化学 SP 技术探测 GSK-3β、E-cadherin 在 3 组标本中表达情况。参照国际妇产科联盟规定的手术病理分期,18 例Ⅲ~Ⅳ期和 37 例Ⅰ~Ⅱ期子宫内膜腺癌标本,其中 17 例淋巴结被癌细胞浸润。纳入标本的患者术前未进行放化疗、激素治疗,且无其他恶性肿瘤,切除标本被病理证实。纳选标本均按免疫组织化学试验要求制作。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 SP 法 试剂:兔抗人 GSK-3β 单克隆抗体(美国 Abcam 公司),试验浓度 1:200;兔抗人 E-cadherin 单克隆抗体(中国福建迈新公司)工作液,试验依照免疫组织化学 SP-0023 试剂盒(美国 ZYMED 公司)说明书步骤进行。

1.2.2 免疫组织化学结果判定 GSK-3β 阳性表达位于细胞质或细胞核,E-cadherin 阳性表达位于细胞膜或细胞质。依据着色深浅和阳性细胞比例分析评定,a 是着色水平:不着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;b 是阳性细胞比例:阴性为 0 分,<1/4 为 1 分,1/4~3/4 为 2 分,>3/4 为 3 分;统计 a+b 之和:0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++),>4 分为强阳性(+++)

+)。本研究阳性等级依照+~+++标准。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精准性检验分析,Spearman 秩和法进行相关性分析,Kaplan-meier 法进行生存分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

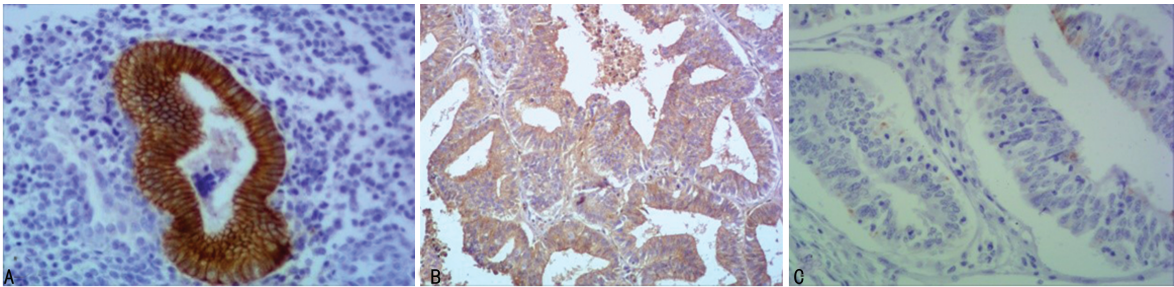
2.1 GSK-3β 和 E-cadherin 在子宫内膜不同病变中的表达

2.1.1 GSK-3β 表达 3 组均可见 GSK-3β 表达,阳性表达主要定位于细胞质,表现为棕褐色、棕黄色、黄色,见图 1。GSK-3β 在正常增殖期内膜组、子宫内膜不典型增生组、子宫内膜腺癌组中阳性率分别为 83.3%、78.9%、36.4%,3 组比较差异有统计意义($\chi^2=15.640,P=0.000$)。子宫内膜不典型增生组 GSK-3β 表达水平较子宫内膜腺癌组显著增高($\chi^2=10.273,P=0.001$),较正常增殖期内膜组差异无统计意义($P=1.00$),正常增殖期内膜组 GSK-3β 表达水平较子宫内膜腺癌组明显增高($\chi^2=8.789,P=0.003$),见表 1。

表1 GSK-3β在3组组织中的比较[n(%)]

组别	n	阳性	阴性
正常增殖期内膜组	12	10(83.3)	2(16.7)
子宫内膜不典型增生组	19	15(78.9)	4(21.1)
子宫内膜腺癌组	55	20(36.4)	35(63.3)

2.1.2 E-cadherin 表达 3 组均可见 E-cadherin 表达,阳性表达主要定位细胞膜,表现为棕褐色、棕黄色、黄色,见图 2。E-cadherin 在正常增殖期子宫内膜组、子宫内膜不典型增生组、子宫内膜腺癌组中阳性率分别为 91.7%、73.7%、21.8%,差异有统计意义($\chi^2=28.959,P=0.000$)。子宫内膜不典型增生组 GSK-3β 表达水平较子宫内膜腺癌组显著增高($\chi^2=16.669,P=0.000$),较正常增殖期内膜组差异无统计意义($P=0.363$),正常增殖期内膜组 GSK-3β 表达水平较子宫内膜腺癌组显著增高($\chi^2=18.333,P=0.000$),见表 2。



A:正常增殖期内膜组(SP×200);B:子宫内膜不典型增生组(SP×200);C:子宫内膜腺癌组(SP×100)

图 2 3 组 E-cadherin 的表达

表 2 E-cadherin 在 3 组中的比较[n(%)]			
组别	n	阳性	阴性
正常增殖期内膜组	12	11(91.7)	1(8.3)
子宫内膜不典型增生组	19	14(73.7)	5(26.3)
子宫内膜腺癌组	55	12(21.8)	43(78.2)

2.2 GSK-3β 和 E-cadherin 的表达与子宫内膜腺癌临床病理特征的关系 GSK-3β 在 FIGO 分期标准:Ⅲ~Ⅳ期、Ⅰ~Ⅱ期阳性表达率分别为 16.7%,45.9%,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。E-cadherin 阳性表达率在低分化组、中分化组,高分化组分别为 9.1%、9.4%、66.7%,3 组比较差异有统计学

意义($P<0.05$);高分化组和中分化组比较及高分化组和低分化组比较差异有统计学意义($P<0.05$),中分化组和低分化组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。随着肿瘤侵犯组织范围的扩大,GSK-3β 的阳性表达率明显减弱,差异有统计学意义($P<0.05$);E-cadherin 的阳性表达率减弱,差异无统计学意义($P>0.05$);随着病理分级的增高,GSK-3β 的阳性表达率减弱,而差异无统计学意义($P>0.05$);但 E-cadherin 的阳性表达率呈明显减弱趋势,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 GSK-3β 和 E-cadherin 的表达与癌细胞浸润子宫肌层深度、是否转移到淋巴结、患者的年龄无明显相关性($P>0.05$),见表 3。

表 3 GSK-3β 和 E-cadherin 的表达和子宫内膜腺癌的临床病理特征的关系[<i>n</i> (%)]							
项目	<i>n</i>	GSK-3β			E-cadherin		
		阳性表达	χ^2	<i>P</i>	阳性表达	χ^2	<i>P</i>
组织学分类			4.751	0.093		18.099	0.000
高分化	12	6(50.0)			8(66.7)		
中分化	32	13(40.6)			3(9.4)		
低分化	11	1(7.7)			1(9.1)		
FIGO(2009)分期			4.486	0.034		2.852	0.091
Ⅰ～Ⅱ	37	17(45.9)			11(29.7)		
Ⅲ～Ⅳ	18	3(16.7)			1(5.6)		
肌层浸润			0.169	0.681		2.167	0.141
<1/2	31	12(38.7)			9(29.0)		
≥1/2	24	8(33.3)			3(12.5)		
淋巴结转移			1.751	0.186		2.436	0.119
有	17	4(23.5)			1(5.9)		
无	38	16(42.1)			11(28.9)		
年龄(岁)			0.210	0.646		0.005	0.943
<50	27	9(33.3)			6(22.2)		
≥50	28	11(39.3)			6(21.4)		

2.3 子宫内膜腺癌中 GSK-3β 和 E-cadherin 表达的关系 相关性采用 Spearman 等级分析显示 GSK-3β 和 E-cadherin 表达呈正相关($r=0.516,P=0.000$),

见表 4。
2.4 子宫内膜腺癌中 GSK-3β 和 E-cadherin 蛋白表达与预后 纳入 55 例子宫内膜癌,从手术后病理证

实日期开始至 2017 年 12 月,随访 36 例,中途有 3 例患者因其他疾病死亡,2 例患者未复发。经 Log-rank 检验,GSK-3 β 阳性表达组临床预后较阴性组好,E-cadherin 阳性表达组临床预后较阴性组好,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3、4。

表 4 GSK-3 β 和 E-cadherin 在子宫内膜腺癌中的表达水平关系(n)

GSK-3 β	E-cadherin	
	阳性	阴性
阳性表达	10	10
阴性表达	2	33

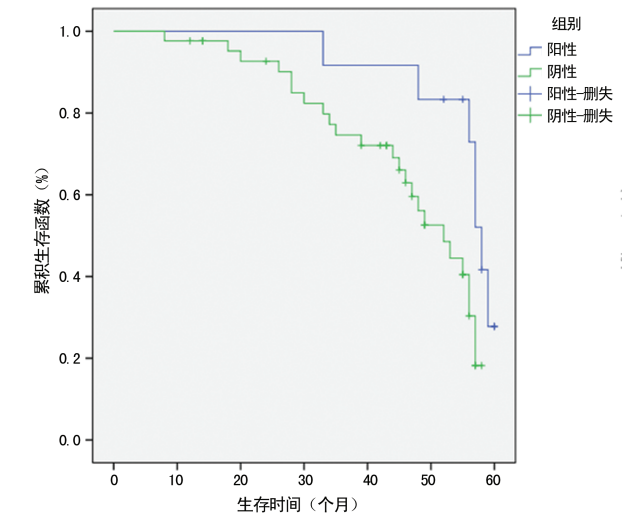


图 3 GSK-3 β 的表达与子宫内膜腺癌临床预后的 Kaplan-meier 分析

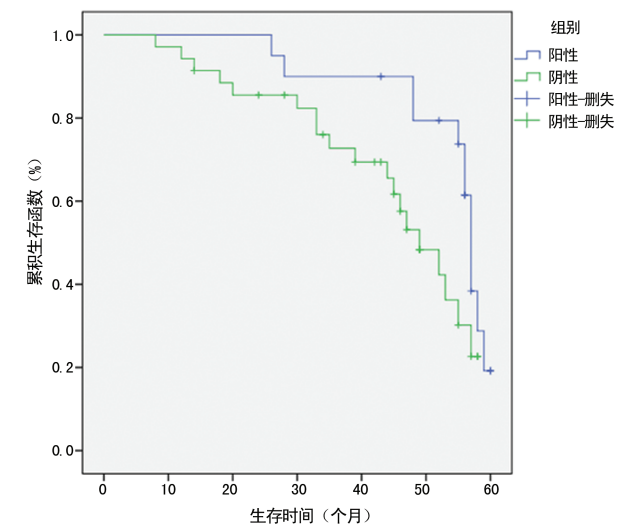


图 4 E-cadherin 的表达与子宫内膜腺癌临床预后的 Kaplan-meier 分析

3 讨 论

Wnt/GSK-3 β 信号通路是用来调控细胞增殖、细胞极性及控制细胞命运的基础通路。通路关闭时,

GSK-3 β 与相关蛋白形成复合物抑制 β -catenin 入细胞核,从而阻止了细胞的癌变过程。GSK-3 β 由于具有“ β ”折叠的 N 端和“ α ”螺旋的 C 端结构域,因此拥有独特的磷酸化,亚细胞定位和 GSK-3 β 结合蛋白之间的相互影响,协助在体内实现精准调控。磷酸化 GSK-3 β 氨基端的丝氨酸(Ser9)导致其失活,Wnt 等信号通路可磷酸化此位点,而磷酸化 GSK-3 β 酪氨酸位点(Tyr216)导致其被激活。因此,GSK-3 β 与相关蛋白形成复合物后通过各个途径或规避或促进肿瘤的形成。胡福清^[10] 研究发现 GSK-3 β 被激活可以抑制乳腺癌干细胞扩增,失活型 GSK-3 β 可以导致乳腺癌细胞系 MCF-7 的耐药,同样高表达持续激活型 GSK-3 β 可以抑制乳腺癌的成瘤^[11-13];而梁爽爽^[14] 的研究发现,GSK-3 β 可抑制凋亡,认为肿瘤中可能存在如下机制:GSK-3 β 过度表达促使 Wnt/ β 连环蛋白通路下游信号分子 WISP-1 过度表达,进而使半胱天冬酶(caspase)-3 表达受抑,导致癌细胞增殖。本研究表明 GSK-3 β 在正常和不典型增生子宫内膜呈高表达,而在子宫内膜腺癌呈低表达,提示可能是在癌组织中 GSK-3 β 氨基端的一个丝氨酸(Ser9)磷酸化后其活性被抑制,导致 GSK-3 β 与相关蛋白形成的复合物崩解, β -catenin 逃逸被磷酸化而在细胞质集聚并入核,本研究发现子宫内膜癌组织中,随着分期增加,阳性表达逐渐降低;随着病理分级的增高,淋巴结的转移,阳性表达有下降趋势,进一步论证试验的推测:入核后的 β -catenin 促进靶基因的转录,促进细胞增殖、转移,提示 GSK-3 β 的低表达在肿瘤进行性发展中,扮演重要生物学角色,预兆着肿瘤的侵袭力和恶性程度。但对于肿瘤早期诊断有局限性,可能需要扩大样本量进一步进行研究验证。

人类 E-cadherin 基因定位于 16q22.1,主要分布于上皮细胞,与细胞骨架、 β -catenin 等连接形成复合体,与周围的组织细胞相互辨别、黏附,形成特定的组织^[5],其表达降低易导致细胞刚性改变,进而变性、游走、定植,从而导致肿瘤细胞侵袭能力增强。在乳腺肿瘤、消化道肿瘤、泌尿系肿瘤中,E-cadherin 基因的突变或减弱均被检测到。本研究结果显示 E-cadherin 在正常和非典型增生子宫内膜呈现高表达,而在子宫内膜腺癌显示低表达,随着病理分级的增高呈明显下降趋势($P<0.05$),随着浸入肌层深度的增加、肿瘤分期的增高和淋巴结的转移,阳性表达也降低,更进一步验证试验推测:入核后的 β -catenin 结合 LEF/TCF 转录因子家族,启动下游基因转录,转录因子反过来抑制 E-cadherin 表达,导致细胞膜 E-cadherin 降低,一方面降低细胞极性、黏附性,触发上皮-间质转化事件,肿瘤细胞发生浸润、转移;另一方面,与细胞膜上

E-cadherin 蛋白结合的 β -catenin 从细胞骨架蛋白肌动蛋白附着处游离,在细胞质集聚,激活 Wnt 信号通路,进一步加剧上皮-间质转化现象。在本研究 55 例子宫内膜癌中,GSK-3 β 和 E-cadherin 有 10 例共为阳性,33 例共为阴性,说明它们在子宫内膜癌的发生、发展中有相互协同作用。Wnt/GSK-3 β 信号如何与 E-cadherin 黏附复合物相互作用知之甚少,仍然需要大量的研究进行论证阐释,

综上所述,GSK-3 β 和 E-cadherin 的低表达,可能相互促进 β -catenin 在细胞质内稳定性并募集入核,一方面与相关蛋白相互作用规避细胞凋亡,另一方面结合 E-cadherin 启动子部位的 E-box,促使 E-cadherin 的功能减弱而触发上皮-间质转化现象,癌细胞逃逸监管四处迁移增殖,导致肿瘤转移、复发。本试验采用 Spearman 等级相关分析,GSK-3 β 和 E-cadherin 表达呈正相关。通过随访观察,采用 Kaplan-meier 分析,发现子宫内膜癌 GSK-3 β 和 E-cadherin 阳性表达患者临床预后较好而阴性表达者较差,两者在子宫内膜癌的发生、发展中可能起着既独立又协同的作用。通过手术后对标本进行联合检测,有利于临床医生对肿瘤的生物学特性准确判断、指导治疗和预后评估。

参考文献

[1] BURKE W M,ORR J. Endometrial cancer;a review and current management strategies;part I [J]. Gynecol Oncol,2014,134(2):385-392.

[2] SIEGEL R,MA J,ZOU Z,et al. Cancer statistics,2014 [J]. CA cancer J Clin,2014,64(1):9-29.

[3] SIEGEL R L,MILLER K D,JEMAL A. Cancer statistics,2015[J]. CA Cancer J Clin,2015,65(1):5-29.

[4] SIEGEL R L,MILLER K D,JEMAL A. Cancer statistics,2016[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(1):7-30.

[5] DUZYJ C M,BUHIMSCHI I A,MOTAWEA H,et al. The invasive phenotype of placenta accreta extravillous trophoblasts associates with loss of E-cadherin[J]. Placenta,2015,36(6):645-651.

[6] YAN D,AVTANSKI D,SAXENA N K,et al. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3- and MTal/Wnt1 protein-dependent pathways [J]. J BiolChem,2012,287(11):8598-8612.

[7] SOKOLOSKY M,CHAPPELL W H,STADELMAN K,et al. Inhibition of GSK-3beta activity can result in drug and hormonal resistance and alter sensitivity to targeted therapy in MCF-7 breast cancer cells [J]. Cell Cycle,2014,13(5):820-833.

[8] 马竹君,冯红超,宋宇峰,等. GSK-3 β 、E-cadherin、Cytokeratin 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 贵州医药,2016,40(4):354-357.

[9] 侯新新,赵萌,张贵宇. PPAR7 基因表达对子宫内膜癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响[J]. 中华妇产科杂志,2014,49(5):360-365.

[10] 胡福清. GSK3 β 调控 EZH2 影响乳腺癌干细胞的机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2016.

[11] 吴秋英,吴小霞. Gsk-3 β 在卵巢浆液性肿瘤中的表达及意义[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2015,36(10):1425-1426.

[12] CHEN S,HUANG L,SUN K,et al. Enhancer of zeste homolog 2 as an independent prognostic marker for cancer;a meta-analysis[J]. PLoS One,2015,10 (5):e125480.

[13] 陶丽,盛晓波,刘玉萍,等. GSK-3 β 活性调节与肿瘤治疗 [J]. 中国药理学通报,2014,30(6):741-744.

[14] 梁爽爽. 子宫内膜癌组织中 GSK-3 β 、WISP-1 和 Caspase-3 的表达研究[D]. 广州:广州医学院,2012.

(收稿日期:2018-07-30 修回日期:2018-09-13)

(上接第 287 页)

[J]. J Surg Oncol,2017,116:583-591.

[9] TEWARI S,BHADORIA P,WADHAWAN S,et al. Entropy vs standard clinical monitoring using total intravenous anesthesia during transvaginaloocyte retrieval in patients for in vitro fertilization[J]. J Clin Anesth,2016,34:105-112.

[10] KAILASAM C H L,RYDER I,BHAKRI I,et al. Safety and effectiveness of diclofenac sodium in assisted reproduction treatment;a randomized prospective double-blind

study[J]. Reprod Biomed Online,2008,16(5):724-729.

[11] 孙晓晨,马晓冉,鞠辉,等. 氟比洛芬酯用于大鼠肠造术后镇痛与肠道安全性的研究[J]. 中国疼痛医学杂志,2017,23(9):656-661.

[12] WANG K,LUO J,ZHENG L,et al. Preoperative flurbiprofen axetil administration for acute postoperative pain;a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. J Anesth,2017,31(6):852-860.

(收稿日期:2018-08-10 修回日期:2018-09-23)