

## GPC3 在卵巢透明细胞腺癌中的表达及临床意义

李雪洁,李红霞,李霄,宋国新,张炜明,张智弘\*

(南京医科大学第一附属医院病理科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**探讨磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(glypican-3, GPC3)在卵巢透明细胞腺癌中的表达及临床意义。**方法:**采用免疫组织化学方法分别检测 83 例卵巢癌组织(透明细胞腺癌 45 例、浆液性癌 20 例、黏液性癌 18 例)、20 例浆液性囊腺瘤及 20 例正常卵巢组织中 GPC3 蛋白的表达情况,实时荧光定量 PCR 法检测 38 例卵巢癌组织(透明细胞腺癌 20 例、浆液性癌 10 例、黏液性癌 8 例)、5 例浆液性囊腺瘤和 5 例正常卵巢组织中 mRNA 的表达情况,并分析 GPC3 与卵巢透明细胞腺癌临床病理学参数及预后的相关性。**结果:**①卵巢透明细胞腺癌中 GPC3 蛋白阳性表达率和 mRNA 表达量(82.2%; $1.326 1 \pm 0.493 6$ )均明显高于浆液性癌(20%; $0.426 5 \pm 0.029 4$ )、黏液性癌(5%; $0.265 2 \pm 0.103 9$ )、浆液性囊腺瘤(0%; $0.141 3 \pm 0.011 3$ )、正常卵巢组织(0%; $0.291 4 \pm 0.048 1$ ),差异有统计学意义( $P$ 均  $< 0.01$ );②GPC3 蛋白阳性表达率及 GPC3 mRNA 表达量与卵巢透明细胞腺癌的临床分期有相关性,Ⅲ~Ⅳ期患者中的表达(100%; $1.808 1 \pm 0.265 7$ )显著高于Ⅰ~Ⅱ期患者(71.4%; $1.045 8 \pm 0.403 6$ )( $P$ 值  $< 0.01$ );③卵巢透明细胞腺癌铂类药物耐药患者 GPC3 蛋白阳性表达率及 mRNA 表达量(100%; $1.808 1 \pm 0.265 7$ )均高于铂类药物敏感型患者(70.3%; $0.991 8 \pm 0.330 3$ )( $P < 0.05$ );④GPC3 蛋白阳性表达率与卵巢透明细胞腺癌患者的预后相关,预后差的患者中阳性率及表达量高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),Kaplan-Meier 单因素生存分析亦显示 GPC3 蛋白为影响预后的因素( $P=0.048$ );⑤卵巢透明细胞腺癌中 GPC3 蛋白阳性表达率和 mRNA 表达量与患者的淋巴结转移和远处器官转移无相关性( $P > 0.05$ )。**结论:**GPC3 在病理鉴别诊断中有重要意义,GPC3 与卵巢透明细胞腺癌患者的临床分期和铂类耐药相关,提示其可能在卵巢透明细胞腺癌的发生发展起重要作用,有望成为卵巢透明细胞腺癌的预后指标和潜在治疗靶标。

**[关键词]** 卵巢透明细胞腺癌;磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3;免疫组织化学;实时荧光定量 PCR;预后分析

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)05-631-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150507

## Expression of glypican-3 and its clinical significance in ovarian clear cell adenocarcinoma

Li Xuejie, Li Hongxia, Li Xiao, Song Guoxin, Zhang Weiming, Zhang Zhihong\*

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of glypican-3(GPC3) protein and mRNA in ovarian clear cell adenocarcinoma and its correlation with clinical pathologic parameters. **Methods:** The expression of GPC3 protein was detected by immunohistochemistry in 83 cases of ovarian cancer including 45 clear cell adenocarcinoma, 20 serous cystadenocarcinoma, 18 mucinous cystadenocarcinoma, 20 cases of serous cystadenoma and 20 cases of normal ovary. The expression of GPC3 mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) in 20 clear cell adenocarcinoma, 10 serous cystadenocarcinoma, 8 mucinous cystadenocarcinoma, 5 serous cystadenoma and 5 normal ovary tissues. The correlation between GPC3 expression and relative clinical pathologic parameters was analyzed. **Results:** ① In ovarian clear cell adenocarcinoma, the positive rate of GPC3 protein and the mRNA expression (82.2%; $1.326 1 \pm 0.493 6$ ) were significantly higher than those in ovarian serous cystadenocarcinoma (20%; $0.426 5 \pm 0.029 4$ ), mucinous cystadenocarcinoma (5%; $0.265 2 \pm 0.103 9$ ), serous cystadenoma (0;  $0.141 3 \pm 0.011 3$ ) and normal ovarian tissue (0;  $0.291 4 \pm 0.048 1$ )( $P < 0.01$ ); ② Both the expression of GPC3 protein and the mRNA were relevant to the clinical stage of ovarian clear cell adenocarcinoma. GPC3 expression in stage Ⅲ or Ⅳ( $100\%$ ; $1.808 1 \pm 0.265 7$ ) was significantly higher than that in stage Ⅰ or Ⅱ(71.4%; $1.045 8 \pm 0.403 6$ )( $P < 0.01$ ); ③ Both the expression of GPC3 protein and mRNA were relevant to the status of cisplatin resistance. GPC3 expression in cisplatin-resistant patients (100%; $1.808 1 \pm 0.265 7$ ) was higher than that in cisplatin-sensitive patients(70.3%; $0.991 8 \pm 0.330 3$ )( $P < 0.05$ ); ④ GPC3 protein expression was

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81201703)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangzhih2001@aliyun.com

associated with survival of clear cell adenocarcinoma, which was higher in patients with poor prognosis ( $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier analysis showed that GPC3 protein expression was a prognostic factor ( $P=0.048$ ); ⑤GPC3 protein expression in ovarian clear cell adenocarcinoma had no relevance with the lymph node metastasis or distant metastasis ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** GPC3 has an important significance in the differential diagnosis. There was a significant relationship between GPC3 expression and clinical stage and cisplatin resistance in ovarian clear cell adenocarcinoma. GPC3 may play an important role in the development of ovarian clear cell adenocarcinoma and could be used as a helpful prognostic marker and potential target.

[Key words] ovarian clear cell adenocarcinoma; GPC3 (glypican-3); immunohistochemistry; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR); prognostic analysis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 631-637]

卵巢癌是死亡率最高的女性生殖器官恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。2008年全世界范围内共有卵巢癌新发病例数22.5万例<sup>[2]</sup>，在美国，2014年新增病例21 980例，死亡14 270例<sup>[3]</sup>。卵巢癌有很多种病理分型，透明细胞腺癌是其中预后最差的卵巢上皮性癌，易误诊为良性病变或误诊为浆液性癌或黏液性癌，组织学诊断困难，且起病隐匿，病情进展迅速，手术治疗难以彻底清除病灶，易远处转移，预后差，对现有的以铂类为主的化疗药物耐药性强<sup>[4]</sup>。因此寻找新的分子标志物以协助诊断，早期治疗以及探索新的有效的治疗方法意义重大。

Glypicans 是锚定在细胞表面的蛋白聚糖家族，它是由蛋白质、脂类和糖共同组成的复杂复合物。目前在哺乳动物中共发现6种(GPC1~GPC6)，它们通过调节多种信号通路参与了机体的多种生理与病理过程。磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3, GPC3)是 Glypicans 家族的一员。GPC3通过糖基锚定在细胞外膜上，结合生长因子、细胞外基质、细胞黏附分子和与降解通路有关的分子，调控着细胞分化、增殖等行为，在机体的生长发育、肿瘤的发生发展中起着重要的作用。

GPC3在卵巢癌中的研究较少，且不同的研究结果尚存在争议，机制不明确。本研究通过研究卵巢透明细胞腺癌、浆液性癌、黏液性癌、浆液性囊腺瘤、正常卵巢组织中GPC3表达情况分析其在病理鉴别诊断中的重要意义并初步探讨其在卵巢透明细胞腺癌的发生发展、侵袭转移及其耐药机制中的作用以及GPC3对预后的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

收集南京医科大学第一附属医院2009年8月~2014年1月住院并手术治疗的卵巢肿瘤患者，均经病理确诊。按照世界卫生组织(WHO, 2014)制

定的卵巢肿瘤组织学分类法：透明细胞腺癌45例(年龄42~75岁，平均50.2岁)、卵巢浆液性癌20例(年龄35~70岁，平均56.3岁)、卵巢黏液性癌18例(48~72岁，平均57.9岁)、浆液性囊腺瘤20例(年龄20~77岁，平均42.5岁)及正常卵巢组织20例(40~66岁，平均48.2岁，因子宫病变行卵巢切除术)，患者均有完整临床资料以及随访资料。临床分期按FIGO(2014)标准：卵巢透明细胞腺癌I~II期28例，III~IV期17例。所有肿瘤患者均行肿瘤减灭术，术前均未行化疗或放疗，卵巢透明细胞腺癌患者术后均接受以铂类为主的化疗药物治疗。所有标本均经4%甲醛充分固定，蜡块封存。

对所有卵巢透明细胞腺癌患者术后进行随访，随访至2014年8月，随访7~60个月；参照国际妇科肿瘤学组(GOG)以化疗6个月为期限，分为化疗耐药型及非耐药型两组，参照国际妇科癌症组织标准和相关文献<sup>[5]</sup>：①化疗敏感性卵巢癌指以铂类为基础的化疗获得临床缓解(临床症状消失，盆腔检查和B超检查均未见肿块，血清CA125值下降至正常)，停药6个月未出现复发；②耐药型卵巢癌指完成化疗后6个月之内出现复发；或对化疗无效，在初期化疗期间肿瘤稳定或者肿瘤进展。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组织化学

所有标本经过4%的甲醛充分固定，石蜡包埋封存。免疫组织化学方法为Envision两步法：一抗GPC3(鼠抗人单克隆抗体，产品号：140211617E，福州迈新生物技术有限公司)。免疫组织化学结果评分：GPC3免疫组织化学染色评分由细胞着色部位、着色强度及阳性百分率综合评估。

标准如下：阳性为细胞质或细胞膜着色，黄色(1分)，棕黄色(2分)，棕褐色(3分)；细胞阳性百分率：5%~14%(1分)；15%~49%(2分)；≥50%(3分)。阴性：细胞阳性率<5%，细胞膜或细胞

质不着色(0分)。免疫组化结果为染色强度和阳性细胞百分率的乘积,定义0分为“-”,1~2分为“+”,3~5分为“++”,6~9分为“+++”。表达水平的判断标准:“-~+”为蛋白低表达,“++~+++”为蛋白高表达。

### 1.2.2 实时荧光定量 PCR

从蜡块中分别提取 20 例卵巢透明细胞腺癌、10 例浆液性癌、8 例黏液性癌、5 例浆液性囊腺瘤、5 例正常卵巢组织中的 mRNA。cDNA 的合成采用 RT 逆转录试剂盒,PCR 反应体系为 ABI 公司 PCR 仪,均按照说明书操作,引物序列如下:上游引物:5'-GAT-ACAGCCAAAAGGC-3',下游引物:5'-ATCATTCCAT-CACCAGAG-3',PCR 扩增条件 95℃ 15 s,60℃ 1 min,内参为  $\beta$ -actin;上游引物:5'-GACTACCTCATGAAGATCCTCACG-3',下游引物:5'-TCTCCTEAATGT-CACGCACGAT-3',引物均由中国上海生工生物工程公司合成,40 个循环后熔解曲线分析证实扩增的特异性,分析扩增曲线及 CT 值,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 GPC3 mRNA 经内参  $\beta$ -actin 标化后的相对浓度。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS18.0 软件处理数据。卵巢组织类型之间和临床参数的 GPC3 阳性表达率的差异采用  $\chi^2$  检

验,卵巢组织类型之间和临床参数与 GPC3 mRNA 值的差异采用秩和检验进行统计分析,影响预后的单因素分析采用 Kapla-Meier 生存曲线,生存时间差异应用 Long-rank 检验,卵巢透明细胞腺癌预后的独立因素采用 Cox 比例风险模型分析。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同卵巢组织中 GPC3 蛋白免疫组织化学的表达结果

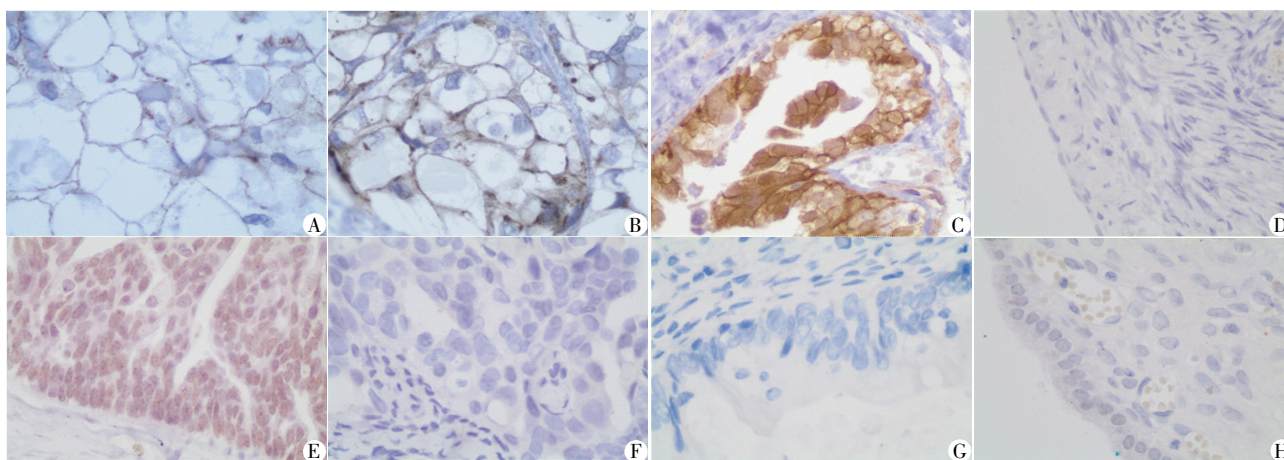
卵巢透明细胞腺癌中 GPC3 的阳性表达率为 82.2%(37/45),显著高于卵巢浆液性癌 20%(4/20),黏液性癌 0.5%(1/18),浆液性囊腺瘤(0/20),正常卵巢组织(0/20)。首先各个组织类型多组率的总体比较,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),然后进行率的两两比较,卵巢透明细胞腺癌与其他组织类型 GPC3 的阳性表达率有显著差异( $P$  均  $< 0.01$ ),卵巢浆液性癌、黏液性癌、浆液性囊腺瘤、正常卵巢组织之间无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ,表 1,图 1)。

### 2.2 卵巢透明细胞腺癌各个临床参数间与 GPC3 蛋白表达结果的关系

表 1 GPC3 蛋白在不同类型卵巢癌、浆液性囊腺瘤、正常卵巢组织内的表达情况

Table 1 The expression of GPC3 protein in different kinds of ovarian cancer, serous cystadenoma and normal ovary (n)

组织类型	例数	GPC3(-)	GPC3(+)	GPC3(++)	GPC3(+++)
透明细胞腺癌	45	8	6	21	10
浆液性癌	20	16	0	4	0
黏液性癌	18	17	0	1	0
浆液性囊腺瘤	20	20	0	0	0
正常卵巢	20	20	0	0	0



A:卵巢透明细胞癌 GPC3(+);B:卵巢透明细胞癌 GPC3(++);C:卵巢透明细胞癌 GPC3(+++);D:正常卵巢组织 GPC3(-);E:卵巢浆液性癌 GPC3(++);F:卵巢浆液性癌 GPC3(-);G:卵巢黏液性癌 GPC3(-);H:卵巢浆液性囊腺瘤 GPC3(-)。

图 1 GPC3 蛋白在卵巢透明细胞癌、正常卵巢组织、卵巢浆液性癌、黏液性癌、浆液性囊腺瘤组织中的表达情况( $\times 400$ )

Figure 1 The expression of GPC3 protein in clear cell adenocarcinoma, normal ovary, serous carcinoma mucinous carcinoma, and serous cystadenoma ( $\times 400$ )

透明细胞腺癌Ⅲ~Ⅳ期阳性率 100%，Ⅰ~Ⅱ期阳性率 71.4%，GPC3 蛋白阳性表达率在Ⅲ~Ⅳ期高于Ⅰ~Ⅱ期，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。铂类药物耐药患者阳性率 100%，铂类药物非耐药患者阳性率 29.6%，GPC3 蛋白阳性表达率铂类药物耐药患者高于铂类药物非耐药型患者，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。远处转移和淋巴结转移差异无统计学意义( $P > 0.05$ ，表 2)。

表 2 GPC3 蛋白在卵巢透明细胞腺癌临床参数间的表达情况  
Table 2 The relationship between GPC3 protein expression and clinicopathologic factors of ovarion clear cell adenocarcinoma (n)

临床参数	例数	GPC3				P 值
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
FIGO 分期						0.015
Ⅰ~Ⅱ期	28	8	5	15	0	
Ⅲ~Ⅳ期	17	0	1	6	10	
淋巴结转移						0.095
是	10	0	0	5	5	
否	35	8	6	16	5	
盆腔外转移						0.095
是	10	1	0	0	9	
否	35	7	6	21	1	
耐药						0.011
是	18	0	4	9	5	
否	27	8	2	12	5	

2.3 GPC3 mRNA 在各类卵巢组织中的表达含量

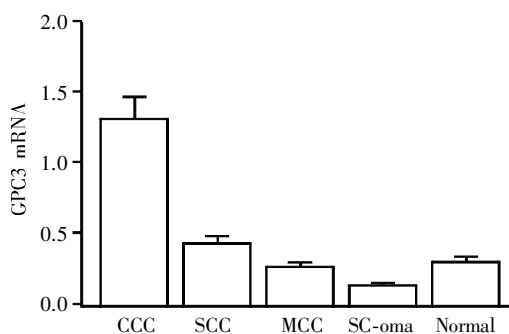
从标本中分别选取 20 例卵巢透明细胞癌、10 例卵巢浆液性癌、8 例卵巢黏液性癌、5 例卵巢浆液性囊腺瘤、5 例正常卵巢组织测 GPC3 mRNA 含量。首先进行均数的总体比较，差异有统计学意义( $P < 0.001$ )，然后进行均数的两两比较，卵巢透明细胞腺癌明显高于浆液性癌、黏液性癌、浆液性囊腺瘤、正常卵巢组织，差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.001$ )，而浆液性癌、黏液性癌、浆液性囊腺瘤、正常卵巢组织之间无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ，图 2)。

2.4 卵巢透明细胞腺癌各个临床参数间与 GPC3 mRNA 表达结果的关系

卵巢透明细胞腺癌Ⅲ~Ⅳ期 8 例，Ⅰ~Ⅱ期 12 例分别检测其中 GPC3 mRNA 含量，在Ⅲ~Ⅳ期显著高于Ⅰ~Ⅱ期，差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。铂类药物耐药患者高于铂类药物敏感型患者，差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。远处转移及淋巴结转移差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ，表 3)。

2.5 影响预后的单因素分析

将年龄、FIGO 分期、淋巴结转移、远处转移、铂



与正常卵巢组织相比， $P$  值均  $< 0.001$ 。

图 2 GPC3 mRNA 在卵巢透明细胞癌(CCC)、卵巢浆液性癌(SCC)、卵巢黏液性癌(MCC)、浆液性囊腺瘤(SC-oma)、正常卵巢组织(Normal)中的表达情况

Figure 2 The GPC3 mRNA expression in clear cell adenocarcinoma(CCC), serous cystadenocarcinoma (SCC), mucinous cystadenocarcinoma(MCC), serous cystadenoma(SC-oma) and normal ovary(Normal)

表 3 卵巢透明细胞腺癌各个临床参数间与 GPC3 mRNA 表达结果的关系

Table 3 The relationship between GPC3 mRNA expression and clinicopathologic factors of clear cell adenocarcinoma ( $\bar{x} \pm s$ )

临床参数	例数	mRNA 含量	P 值
FIGO 分期			$< 0.001$
Ⅰ~Ⅱ期	12	1.045 8 ± 0.116 5	
Ⅲ~Ⅳ期	8	1.808 0 ± 0.265 7	
淋巴结转移			0.091
是	17	1.336 1 ± 0.540 9	
否	3	1.914 7 ± 0.274 8	
盆腔外转移			0.064
是	4	1.204 1 ± 0.488 2	
否	16	1.757 9 ± 0.308 2	
耐药			$< 0.001$
是	8	1.808 0 ± 0.265 7	
否	12	0.991 8 ± 0.330 4	

类药物化疗耐药、GPC3 表达情况采用 Kapla-Meier 法进行单因素分析，生存率差异应用 Long-rank 检验，结果见表 4。结果表明 FIGO 分期、淋巴结转移、远处转移、铂类药物化疗耐药、GPC3 表达情况是影响预后的因素( $P$  均  $< 0.05$ )，而年龄不是影响预后的因素( $P > 0.05$ ，表 4)。

2.6 卵巢透明细胞腺癌 GPC3 蛋白表达与患者预后的关系

采用 Kaplan-Meier 生存曲线、Long-rank 检验单因素分析显示：GPC3 蛋白表达阳性的患者生存时间低于 GPC3 蛋白表达阴性的患者生存时间，经比较差异有统计学意义( $P=0.048$ ，图 3)。

2.7 影响卵巢透明细胞腺癌患者预后的多因素分析

把单因素分析中对影响预后有意义的指标纳

表 4 影响卵巢透明细胞腺癌患者预后的单因素分析  
Table 4 Prognostic factors for clear cell adenocarcinoma analyzed by single factor risk

临床病理参数	例数	平均生存时间(月)	中位生存时间(月)	P 值
年龄				0.828
<50 岁	28	40.586 ± 4.236	27.5	
≥50 岁	17	35.261 ± 3.992	24.0	
FIGO 分期				<0.001
I~II 期	28	54.889 ± 2.575	48.0	
III~IV 期	17	15.588 ± 1.600	14.0	
淋巴结转移				<0.001
是	10	47.661 ± 3.257	13.0	
否	35	19.325 ± 4.540	27.0	
盆腔外远处转移				<0.001
是	10	47.661 ± 3.257	13.0	
否	35	19.325 ± 4.540	27.0	
耐药				<0.001
耐药	18	15.119 ± 1.261	13.0	
非耐药	27	54.889 ± 2.575	34.0	
GPC3 蛋白表达				0.048
阳性	37	54.375 ± 2.845	21.0	
阴性	8	29.513 ± 2.362	48.5	

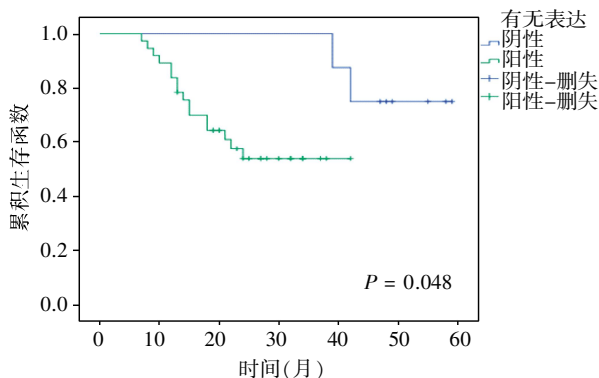


图 3 卵巢透明细胞腺癌组织中 GPC3 表达阳性和阴性患者 Kaplan-Meier 生存曲线

Figure 3 The Kaplan-meier survival curve of ovarian clear cell adenocarcinoma patients with or without GPC3 expression

入 Cox 比例风险模型,分析对于卵巢透明细胞癌患者预后的因素 FIGO 分期、淋巴结转移、远处转移、铂类药物化疗耐药、GPC3 表达情况进行 Cox 比例

表 5 Cox 比例风险模型分析影响卵巢透明细胞腺癌预后的因素

Table 5 Prognostic factors for ovarian clear cell adenocarcinoma analyzed by Cox proportion risk model

	偏回归系数	标准误	Wald	自由度	相对危险度	P 值
FIGO 分期	6.240	2.958	4.450	1	5.127	0.035
淋巴结转移	1.866	0.479	15.140	1	6.460	0.000
远处转移	1.832	0.416	14.511	1	5.766	0.000
铂类耐药	6.346	2.778	5.218	1	5.701	0.022
GPC3 蛋白表达	1.685	0.885	3.627	1	5.393	0.037

风险模型分析。结果显示,FIGO 分期、淋巴结转移、远处转移、铂类耐药、GPC3 蛋白表达均是卵巢透明细胞腺癌患者独立的预后影响因素 ( $P$  均  $< 0.05$ , 表 5)。

### 3 讨论

GPC3 蛋白是硫酸乙酰肝素糖蛋白家族中的一员,硫酸乙酰肝素糖蛋白家族是一类分布在细胞膜表面的蛋白聚糖,通过结合一些受体,例如生长因子、细胞外基质、黏附分子、酶或酶的抑制剂等调控着肿瘤的发生、发展、增殖、侵袭、转移等过程,另外还参与中胚层组织的分化。在肝癌组织中 GPC3 通过激活经典 Wnt/ $\beta$ -catenin、Hedgehog(Hh)信号通路、胰岛素样生长因子(IGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)等参与多种与肿瘤相关的信号通路的调节<sup>[6-10]</sup>。GPC3 在肝细胞癌、肝母细胞瘤、恶性黑色素瘤、卵黄囊瘤、肠癌和 Wilm 瘤呈高表达,而在乳腺癌、间皮瘤、卵巢上皮癌和肺腺癌中呈低表达或不表达, GPC3 蛋白在正常胚胎组织中(包括肝脏和胎盘)高表达,而在成年人正常组织中不表达<sup>[11-13]</sup>。GPC3 在肝细胞癌和恶性黑色素瘤可作为免疫组织化学和血清标志物,同时 GPC3 也被视为这些恶性肿瘤的免疫治疗的潜在靶标<sup>[14-19]</sup>。表明 GPC3 蛋白在一些组织中是癌蛋白,在另一些组织中作用沉默。

文献报道<sup>[20]</sup>,GPC3 蛋白在卵巢透明细胞腺癌中相对于卵巢浆液性癌、卵巢黏液性癌有着较高的特异性表达,阳性率 44%,其中 10%为强阳性表达,而且 GPC3 表达强阳性患者与 FIGO 分期中 III~IV 期的患者和以铂类为主的化疗药耐药患者均有一定的相关性,在 III~IV 的患者中 GPC3 蛋白阳性率较高,而且以铂类为主的化疗耐药患者中 GPC3 蛋白阳性率较高。Stadlmann 等<sup>[21]</sup>研究 GPC3 蛋白在 251 例卵巢癌组织中表达阳性率是 11.2%,在 11 例卵巢透明细胞癌中 7 例表达阳性,阳性率是 63.64%,而且 GPC3 蛋白与早期卵巢透明细胞腺癌的不良预后及以铂类为主的药物化疗耐药也有相关性<sup>[22]</sup>, GPC3 目前在卵巢癌中的研究较少,结果存在差异



和争论。

本研究结果显示 GPC3 蛋白阳性表达率和 GPC3 mRNA 表达量在卵巢透明细胞腺癌均明显高于卵巢浆液性癌、黏液性癌、浆液性囊腺瘤、正常卵巢组织,表明 GPC3 在卵巢透明细胞腺癌中特异性表达。GPC3 蛋白阳性表达率与文献的研究结果基本一致,但本研究中阳性率较高,这可能与患者分布的地区不同和样本选择的数量不同有关。前人较少研究 GPC3 基因在卵巢组织间的差别,本研究从蛋白翻译水平 mRNA 的含量比较其间的差别,发现卵巢透明细胞癌显著高于其他卵巢组织,进一步证明差异存在,表明 GPC3 可能在卵巢透明细胞腺癌发生过程中在基因水平可能已经发生改变,在透明细胞腺癌的发生过程中起到重要的作用。GPC3 蛋白阳性表达率在透明细胞腺癌(82.2%)明显高于浆液性癌(20%)、黏液性癌(5%),而在浆液性囊腺瘤、正常卵巢组织中不表达,这有着重要的临床意义。在临床病理诊断工作中,卵巢透明细胞腺癌的腺腔结构可以扩张成囊腔,内衬上皮可以很扁平,形成一种假良性结构,其乳头状的结构,不典型的细胞形态易与浆液性囊腺瘤或黏液性囊腺瘤相混淆,卵巢透明细胞腺癌容易被误诊为卵巢良性病变,或被误诊为浆液性囊腺瘤或黏液性囊腺瘤,仅靠显微镜下组织形态学特点难以鉴别,鉴别诊断缺乏特异的免疫组织化学标记抗体。本实验结果提示 GPC3 可能可以作为卵巢透明细胞腺癌病理诊断的特异免疫组织化学标记抗体,这将对病理鉴别诊断有着重要的意义。

本实验进一步研究 GPC3 蛋白阳性表达率和 GPC3 mRNA 表达量与卵巢透明细胞腺癌的临床分期有关,在Ⅲ~Ⅳ期显著高于Ⅰ~Ⅱ期且蛋白多呈高表达;在卵巢透明细胞腺癌患者铂类药物耐药患者高于铂类药物敏感型患者且蛋白多呈高表达;GPC3 蛋白阳性表达率在预后差的患者中阳性率高;表明在卵巢透明细胞腺癌发展过程中在患者的不良预后以及在铂类为主的化疗药物耐药机制中均起着重要的作用。卵巢透明细胞癌的治疗方式目前主要是肿瘤减灭术,术后辅助化疗的治疗方式,对化疗药物的耐药是卵巢透明细胞腺癌治疗失败及患者不良预后、生存时间短的主要原因。Sherman-Baust 等<sup>[23]</sup>研究卵巢癌中与紫杉醇,顺铂,阿霉素化疗耐药相关的 845 个基因,卵巢癌细胞通过介导不同的信号通路发挥耐药作用,其中与耐药正相关的基因包括 MDR1(ABCB1),GAGE5、6、7 和 XAGE1

等,目前 GPC3 基因在卵巢癌的研究较少且存在争议,本研究结果表明 GPC3 基因也与耐药相关。Suzuki 等的研究发现卵巢透明细胞腺癌中 GPC3 蛋白阳性率在铂类为主的化疗药物耐药的患者中和预后较差的患者中较高。本研究结果与其相一致,耐药是卵巢透明细胞腺癌预后差的一种重要因素,与 GPC3 相关的耐药机制尚待进一步研究。Kaplan-Meier 生存曲线和 Cox 比例风险模型分析结果显示 GPC3 蛋白为影响预后的因素,表明 GPC3 可作为判断预后的指标。因此,GPC3 对提高早期诊断率,做到早期治疗,达到改善卵巢癌患者的预后有着重要的意义。

以往研究证明了 GPC3 在不同肿瘤中表达的特异性和敏感性,对细胞生长和分化的调控机制,以及与癌症的化疗耐药和不良预后密切相关。而卵巢透明细胞癌化疗耐药及预后差,寻找有效的治疗方法更为迫切,目前有关 GPC3 免疫治疗的研究越来越深入,从实验阶段到临床研究,运用 GPC3 合成肽疫苗治疗肝癌患者,有一定的疗效<sup>[24]</sup>。另外仅有 1 例文献报道了 GPC3 肽疫苗第一次治疗 2 例卵巢透明细胞腺癌患者,疗效明显<sup>[25]</sup>。本研究结果提示 GPC3 在卵巢透明细胞癌的诊断中可作为免疫组织化学的有效标记物,高 GPC3 蛋白水平和高 mRNA 表达量与临床不良预后相关,可作为预后判断的指标,同时高 GPC3 蛋白水平和高 mRNA 表达量也是耐药的重要指标,因此 GPC3 与卵巢透明细胞癌发生发展有密切关系,也是预后耐药的重要标记物,同时也有望成为分子靶向以及肽疫苗治疗卵巢透明细胞腺癌的方法。

#### [参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917
- [3] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29
- [4] Del Carmen M G, Birrer M, Schorge JO. Clear cell carcinoma of the ovary: A review of the literature [J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 126(3): 481-490
- [5] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) [J]. *European Journal of Cancer*, 2009, 45(2): 228-247
- [6] Filmus J, Capurro M. The role of glypicans in Hedgehog

- signaling[J]. *Matrix Biol*,2014,35(8):248-252
- [7] Filmus J,Capurro M. Glypican-3;a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. *FEBS Journal*,2013,280(10):2471-2476
- [8] Avanesov A,Honeyager SM,Malicki J,et al. The role of glypicans in Wnt inhibitory factor-1 activity and the structural basis of Wif1's effects on Wnt and Hedgehog signaling[J].*PLoS Genetics*,2012,8(2):e1002503
- [9] Buchanan C,Stigliano I,Garay-Malpartida HM,et al. Glypican-3 reexpression regulates apoptosis in murine adenocarcinoma mammary cells modulating PI3K/Akt and p38MAPK signaling pathways[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*,2010,119(3):559-574
- [10] Sakurai M,Shibata K,Umezumi T,et al. Growth-suppressing function of glypican-3(GPC3) via insulin like growth factor II (IGF-II) signaling pathway in ovarian clear cell carcinoma cells[J]. *Gynecol Oncol*,2010,119(2):332-336
- [11] Castillo LF,Tascon RS,Joffé EBdK,et al. Abstract 133: Role of Glypican-3(GPC3) on tumor progression of the human mammary gland[J]. *Cancer Res*,2014,74(19):133
- [12] Tsuta K,Tanabe Y,Yoshida A,et al. Utility of 10 immunohistochemical markers including novel markers (desmocollin-3, glypican 3, S100A2, S100A7, and Sox-2) for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung[J]. *J Thorac Oncol*,2011,6(7):1190-1199
- [13] Murthy SS,Shen T,De Rienzo A,et al. Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma[J]. *Oncogene*,2000,19(3):410-416
- [14] Komori H,Beppu T,Baba H,et al. Assessment of serum GPC3 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma and malignant melanoma [J]. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*,2010,68 Suppl 7(2):833-836
- [15] Filmus J,Capurro M. The role of glypican-3 in the regulation of body size and cancer[J]. *Cell Cycle*,2008,7(18):2787-2790
- [16] Ishiguro T,Sugimoto M,Kinoshita Y,et al. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer [J].*Cancer Research*,2008,68 (23):9832-9838
- [17] Nakatsura T,Yoshitake Y,Senju S,et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,2003,306(1):16-25
- [18] Zynger D L,Gupta A,Luan C,et al. Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases[J]. *Human Pathology*,2008,39(2):224-230
- [19] Saikali Z,Sinnett D, Expression of glypican 3(GPC3) in embryonal tumors[J]. *International Journal of Cancer*,2000,89(2):418-422
- [20] Maeda D,Ota S,Takazawa Y,et al. Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary[J]. *Mod Pathol*,2009,22(6):824-832
- [21] Stadlmann S,Gueth U,Baumhoer D,et al. Glypican-3 expression in primary and recurrent ovarian carcinomas [J]. *International Journal of Gynecological Pathology*,2007,26(3):341-344
- [22] Umezumi T,Shibata K,Kajiyama H,et al. Glypican-3 expression predicts poor clinical outcome of patients with early-stage clear cell carcinoma of the ovary[J]. *Journal of Clinical Pathology*,2010,63(11):962-966
- [23] Sherman-Baust CA,Becker KG,Wood Iii WH,et al. Gene expression and pathway analysis of ovarian cancer cells selected for resistance to cisplatin, paclitaxel, or doxorubicin [J]. *Journal of Ovarian Research*,2011,4(1):21
- [24] Komori H,Nakatsura T,Senju S,et al., Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Clinical Cancer Research*,2006,12(9):2689-2697
- [25] Suzuki S,Shibata K,Kikkawa F,et al. Significant clinical response of progressive recurrent ovarian clear cell carcinoma to glypican-3-derived peptide vaccine therapy: two case reports[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*,2014,10(2):338-343

[收稿日期] 2015-01-13