

# CXXC指蛋白5在上皮性卵巢癌中的表达及其临床意义

汪景灏<sup>1,2</sup>, 任渊<sup>3</sup>, 张蓉<sup>1,2</sup>, 韩英<sup>2</sup>, 盛友华<sup>4</sup>, 侯文静<sup>2</sup>, 敖洪峰<sup>4</sup>

1. 南方医科大学第三临床医学院, 广东 广州 510665;
2. 南方医科大学附属奉贤医院妇产科, 上海 奉贤 201499;
3. 常州市妇幼保健院妇产科, 江苏 常州 213003;
4. 南方医科大学附属奉贤医院病理科, 上海 奉贤 201499

**[摘要]** 背景与目的: 上皮性卵巢癌是最常见的卵巢肿瘤类型, 发病率高, 治疗效果不满意, 生存率低。CXXC指蛋白5(CXXC finger protein 5, CXXC5)在上皮性卵巢癌中的研究鲜见报道, 该研究通过对CXXC5在上皮性卵巢癌中的表达和对上皮性卵巢癌细胞功能的研究, 旨在探讨CXXC5在上皮性卵巢癌中可能的作用和临床意义。方法: ①通过肿瘤基因组集(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库提供的数据分析CXXC5在上皮性卵巢癌基因组中的变异; ②通过免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)检测CXXC5在上皮性卵巢癌组织芯片中的表达情况, 并分析CXXC5的表达与临床病理特征之间的关系; ③通过蛋白[质]印迹法(Western blot)和实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测CXXC5在5株上皮性卵巢癌细胞系中的表达情况, 选取表达量最高的ES-2细胞株; ④使用慢病毒包装质粒转染ES-2细胞株, 经嘌呤霉素筛选后构建稳定转染干扰细胞株; 使用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK8)检测细胞增殖能力的变化。结果: ①CXXC5在TCGA提供的上皮性卵巢癌基因组中以表达为主; ②CXXC5在上皮性卵巢和卵巢良性上皮性囊肿中的高表达率分别为39.3%和13.5%, 差异有统计学意义( $P=0.003$ ); CXXC5在浆液性卵巢癌、黏液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌和卵巢透明细胞癌中的高表达率分别为43.0%、22.9%、23.5%和66.7%, 两两比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $=0.014$ ); CXXC5在有淋巴结转移和无淋巴结转移的上皮性卵巢癌中表达率为60.0%和35.8%, 差异有统计学意义( $P=0.022$ ); ③CXXC5稳定干扰后, 卵巢癌透明细胞株ES-2的增殖能力明显减弱, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: CXXC5基因可能有促进卵巢癌细胞增殖的作用, 可能是上皮性卵巢癌预后不良的生物标志物。

**[关键词]** CXXC指蛋白5; 上皮性卵巢癌; 组织微阵列; 免疫组织化学; 增殖

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.04.004

中图分类号: R737.31 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)04-0260-09

**Effects of CXXC finger protein 5 up-regulated expression in epithelial ovarian cancer** WANG Jing-hao<sup>1,2</sup>, REN Yuan<sup>3</sup>, ZHANG Rong<sup>1,2</sup>, HAN Ying<sup>2</sup>, SHENG Youhua<sup>4</sup>, HOU Wenjing<sup>2</sup>, AO Hongfeng<sup>4</sup> (1.The Third Clinical Medical College of Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510665, China; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, Fengxian Hospital, Southern Medical University, Shanghai 201400, China; 3.Department of Obstetrics and Gynecology, Changzhou Maternal and Child Care Hospital, Changzhou Jiangsu 213003, China; 4.Department of Pathology, Fengxian Hospital, Southern Medical University, Shanghai 201400, China)

Correspondence to: ZHANG Rong E-mail: rongzhang@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Epithelial ovarian cancer has the highest mortality rate of gynecologic cancers and overall survival rates have improved little in the last 20 to 30 years. CXXC finger protein 5 (CXXC5) plays an important role in AML (acute myeloid leukemia) and MDS (myelodysplasia). However, little is known about its clinical significance and biological function in epithelial ovarian cancer. This study aimed to investigate the expression of the CXXC5 in ovarian cancer and the effect of the CXXC5 on ES-2 cell proliferation. **Methods:** ①The alteration of CXXC5 in cancer genomics data of TCGA (Cancer Genome Atlas) was analyzed. ②The CXXC5 protein in the tissue chips was detected containing 37 benign ovarian cyst and 173 malignant tumor samples. The relationship between the

expression of the CXXC5 with the clinicopathological features of patients with ovarian cancer was analyzed by SPSS software; ③The cells with the highest CXXC5 expression quantity from 5 ovarian cancer cells were selected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot. ④ES-2 cells with shRNA stable transfection were constructed using the strategy of lentivirus infection and analyzed cell proliferation by cell counting kit-8(CCK8). **Results:** ①Through the TCGA database, CXXC5 amplification was found in 7 of 563 cases. ②The CXXC5 expression in ovarian malignant carcinoma (39.3%) was higher than that in benign ovarian cyst (13.5%,  $P=0.003$ ), the histologic type was highly associated with CXXC5 (43% in serous, 22.9% in mucinous, 23.5% in endometrioid, 67% in clear cell,  $P=0.014$ ) and there was a significant correlation between CXXC5 and lymph node metastasis (positive vs negative,  $P=0.022$ ). ③The ES-2 cells with shRNA stable transfection had a growth disadvantage ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The CXXC5 gene might have an advantage in proliferation of epithelial ovarian carcinoma and be expected to become the biomarker of poor prognosis.

[ **Key words** ] CXXC finger protein 5; Epithelial ovarian cancer; Tissue microarray; Immunohistochemistry; Proliferation

卵巢癌是女性生殖道常见的恶性肿瘤之一。据2014年全球肿瘤统计数据显示,全球发达地区卵巢癌新发患者21 980例,死亡患者14 270例<sup>[1]</sup>,占女性生殖道肿瘤病死率的第一位。卵巢肿瘤组织类型复杂,以上皮性卵巢癌最常见,组织学分类包括浆液性肿瘤、黏液性肿瘤、子宫内膜样肿瘤、透明细胞肿瘤、移行细胞肿瘤和鳞状细胞肿瘤等。有文献报道,卵巢透明细胞癌在西方国家占卵巢肿瘤的5%<sup>[2]</sup>。卵巢透明细胞癌的发病机制尚不清楚,其具有预后差,对传统的顺铂和紫杉醇化疗药物耐药,缺乏特异性生物学标志物等特点。因此,我们迫切需要在其发病机制上有所突破,研究其特异性生物学标志物和治疗靶标。

CXXC指蛋白5(CXXC finger protein 5, CXXC5),又名RINF(retinoid-inducible nuclear factor),定位于染色体5q31.2,全长为35.5 kb,开放阅读框(open reading frame, ORF)的核苷酸291~1 259 bp,包含5个外显子和4个内含子<sup>[3]</sup>。它在神经干细胞中调节非经典Wnt信号通路,间接激活NF-kappa-B和MAPK信号通路,参与DNA损伤诱导的ATM磷酸化,参与p53激活和细胞周期捕获,参与骨髓细胞的生成<sup>[3]</sup>。CXXC5与急性髓性白血病(acute myelocytic leukemia, AML)<sup>[4-6]</sup>、骨髓增生异常综合征<sup>[5-6]</sup>和神经干细胞<sup>[7]</sup>相关。CXXC5在恶性肿瘤的研究尚处于起始阶段,有文献报道,CXXC5在晚期乳腺癌、

转移性恶性黑色素瘤和甲乳癌中的表达明显上调,并且CXXC5与乳腺癌的不良预后相关<sup>[8-9]</sup>。目前CXXC5在上皮性卵巢癌中的研究鲜见报道,因此,本研究采用免疫组织化学方法检测CXXC5在上皮性卵巢癌中的表达情况,分析CXXC5的表达与患者临床病理特征之间的关系,并在细胞水平上观察CXXC5对上皮性卵巢癌细胞生物学行为的影响,从而为探寻上皮性卵巢癌新的治疗靶标提供思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 生物信息学分析

数据来源于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA),实验对象为563例上皮性卵巢癌患者组织样本,包括肿瘤分期、肿瘤分级和总生存期等临床资料(图1),患者全部为美国人,其中90%以上为白种人,年龄为40~81岁,平均年龄为60岁。使用cBioPortal工具(<http://www.cbioportal.org/public-portal/>)对其进行生物信息学分析。

### 1.2 主要试剂

上皮性卵巢癌细胞系COV504、ES-2、NIHOVCAR3、OV90和OVISE购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库和美国ATCC公司;工具细胞293T细胞购自美国ATCC公司;对照空载pLKO.1/TRC购自广州复能基因有限公司;过表达质粒pLKO.1/short hairpin RNA

[ shRNA ] /CXXC5购自美国Sigma公司 (CXXC5-ShRNA1: 5'-CCGGGAAAGACTGG-CCATCAGATTTCTCGAGAAATCTGATGGC-CAGTCTTTCTTTTTTG-3'; CXXC5-ShRNA2: 5'-CCGGCCTTTGATTCTTTCCGAC-CATCTCGAGATGGTCGGAAAGAAT-CAAAGGTTTTTTG-3'; CXXC5-ShRNA3: 5'-CCGGCCGACCATGAAATAGTGCAT-ACTCGAGTATGCACTATTTTCATGGTCG-GTTTTTTG-3'); 质粒抽提试剂盒购自德国Qiagen公司; TRIzol试剂、Lipofectamine™ 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司; BCA蛋白分析试剂盒购自美国HyClone-Pierce公司; RNA提取试剂盒购于德国Qiagen公司; PCR引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司, Prime Script RT reagent Kit SYBR Premix Ex Taq试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; CXXC5兔抗人多克隆抗体和GAPDH鼠抗人单克隆抗体分别购自英国Abcam公司和美国Proteintech公司; 山羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; IRDye 800兔二抗和IRDye 680鼠二抗购自美国LI-COR公司; 细胞培养DMEM/F12培养基、McCoy's 5A培养基、RPMI-1640培养基、胎牛血清以及胰蛋白酶购自美国GIBCO公司; 硝酸纤维素(NC)膜、蛋白[质]印迹法(Western blot)Marker购自美国Millipore公司; CCK8试剂购自日本Dojindo化学研究所。

### 1.3 细胞培养

COV504、OV90和OVISE细胞培养于DMEM/F12培养基; ES-2细胞培养于McCoy's 5A培养基, OVCAR-3细胞培养于RPMI-1640培养基, 并且所有这些细胞的培养基都含有10%或20%(V/V)胎牛血清(FBS)、100 U/mL的青霉素和100 μg/mL的链霉素。在37 ℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%、100%湿度培养箱内温育。

### 1.4 样本收集

收集2006年1月—2012年12月南方医科大学附属奉贤医院和江苏省常州市妇幼保健院诊治的210例卵巢石蜡组织样本, 随访信息和临床数据完整, 术前均未接受过放疗或化疗, 所有样

本经2位资深病理医师进行组织病理学确诊。患者的临床资料和特征见表1。患者均已签署知情同意书, 并且经南方医科大学附属奉贤医院人体研究伦理委员会伦理审核许可。

表1 卵巢癌患者基本临床信息

Tab. 13 Clinical characteristics of patients with ovarian cancer

Item	[n(%)]	
	Carcinoma	Benign cyst
Cases	173	37
Age/year		
$\bar{x} \pm s$	54.26 ± 11.74	42.78 ± 12.61
Min, max	17,81	22,69
Median	54	42
Histologic type		
Serous	93(53.76)	
Mucinous	48(27.75)	
Endometrioid	17(9.82)	
Clear cell	15(8.67)	
FIGO stage		
I	75(43.35)	
II	28(16.19)	
III	62(35.84)	
IV	8(4.62)	

### 1.5 组织芯片的构建

210例上皮性卵巢癌及卵巢良性囊肿组织样本经4%甲醛固定、常规石蜡包埋制片, HE染色后, 在显微镜下标记定位、对应找出石蜡块上标记的肿瘤组织。

### 1.6 免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)

经常规脱蜡, 使用0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液抗原修复10 min。1:50稀释的CXXC5兔抗人多克隆抗体4 ℃温育过夜, PBS清洗后1:200山羊抗兔二抗室温温育1 h, 再经PBS清洗, DAB显色, 苏木精复染, 封片。由2位资深病理医师双盲评分, 结果一致者为最后判定结果。首先按阳性强度评分: 0分为无色, 1分为淡黄色, 2分为黄色, 3分为棕黄色; 再将阳性细胞数评分: 阳性细胞占0~<10%为0分, 10%~<30%为1分, 30%~<60%为2分, ≥60%为3分。最后综合阳性强度和阳性细胞数评分: 两者的乘积为最后得分。肿瘤2个点染色不一致时以高评分为准。<3分为低表达, ≥3分为高表达。

### 1.7 实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)

TRIzol试剂提取细胞总RNA,经逆转录PCR反应获得cDNA,反应条件:37℃,30 min;85℃,5 s。qRT-PCR采用特异性引物序列:CXXC5上游引物5'-AACCCAGG-CCTCTTCATTATGACC-3',CXXC5下游引物5'-TTCCTACAACCTGCTGCACTGCT-3';GAPDH上游引物5'-TGCGAGTACTCAACACCAACA-3';GAPDH下游引物5'-GCATATCTTCGGCCACA-3'。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火31 s,40个循环。采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法进行相对定量并计算CXXC5/18S的Ct比值。实验重复3次。

### 1.8 Western blot检测

收集细胞加入含有100 μmol/L PMSF的细胞裂解,4℃,6 042.6 ×g离心10 min,取上清液采用BCA法测定蛋白浓度。取30 μg蛋白,经10%SDS-PAGE电泳分离后电转至NC膜上,5%脱脂奶室温封闭1 h后,加入一抗4℃过夜,洗膜后,加入二抗室温温育1 h。Odyssey红外成像系统检测。实验重复3次。

### 1.9 慢病毒转染人上皮性卵巢癌细胞及稳定表达株的筛选鉴定

取对数生长期的293T细胞开始转染。200 μL空培稀释15 μL Lipofectamine™ 2000试剂室温温育5 min,为A液;取包装质粒pPACK-GAG、pPACK-REV和pVSV-G各1 700 ng与表达载体1 μg进行混合,混合后加至200 μL空培室温温育15 min,为B液;将A、B液体混合室温温育15 min。将其加入至细胞培养皿中,8 h后换液;继续培养48 h后收集病毒浓缩液,采用逐孔稀释法测定病毒的滴度。待ES-2细胞以每孔2 000个细胞接种于6孔板贴壁后,加入病毒液上清液和全培,8 h后换液,1周后用1 μg/mL嘌呤霉素的完全培养基筛选。Western blot和qRT-PCR鉴定CXXC5干扰人上皮性卵巢癌细胞株。

### 1.10 使用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK8)检测细胞增殖能力

将稳定干扰CXXC5的ES-2细胞接种于96孔

板,每孔细胞数 $3 \times 10^3$ 个,每孔设5个对照,分别培养0、24、48、72和96 h后每孔加入CCK8 10 μL,培养2 h。酶标仪测定450 nm处吸光度(D)值,最后根据结果绘制细胞增殖曲线。实验重复3次。

### 1.11 统计学处理

实验数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析,采用 $\chi^2$ 检验,Fisher确切概率法以及t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 CXXC5在TCGA上皮性卵巢癌基因组中主要以扩增为主

TCGA是美国政府发起的由美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)和国家人类基因组研究所(National Human Genome Research Institute, NHGRI)联合进行的针对不同癌症所有基因变异进行系统分析的研究网络。使用cBioPortal工具以TCGA提供的大量样本<sup>[10-11]</sup>分析CXXC5在多种肿瘤基因组中的表达,发现CXXC5以突变和扩增为主,而在上皮性卵巢癌基因组中以扩增为主(图1A)。使用TCGA提供的上皮性卵巢癌数据库对CXXC5变异进行分析。该数据库患者563例,包括肿瘤分期、肿瘤分级和总生存期等临床资料(图1B~D)。其中有7例患者发生CXXC5基因变异,基因变异率为1%(图1E)。

### 2.2 不同临床病理情况下上皮性卵巢癌患者的CXXC5水平

我们构建了含有173例上皮性卵巢癌和37例卵巢良性上皮性囊肿组织芯片,利用IHC检测了CXXC5在组织芯片中的表达情况。CXXC5的典型染色评分分别为0、1、2和3分(图2)。结果显示,CXXC5在上皮性卵巢癌和卵巢良性上皮性囊肿的高表达率分别为39.3%和13.5%,差异有统计学意义( $P=0.003$ ,表2,图3)。分析CXXC5表达情况与上皮性卵巢癌临床病理参数之间的关系,我们发现其在浆液性卵巢癌、黏液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌和卵巢透明细胞癌中的高表达率分别为22.9%、23.5%、43.0%和

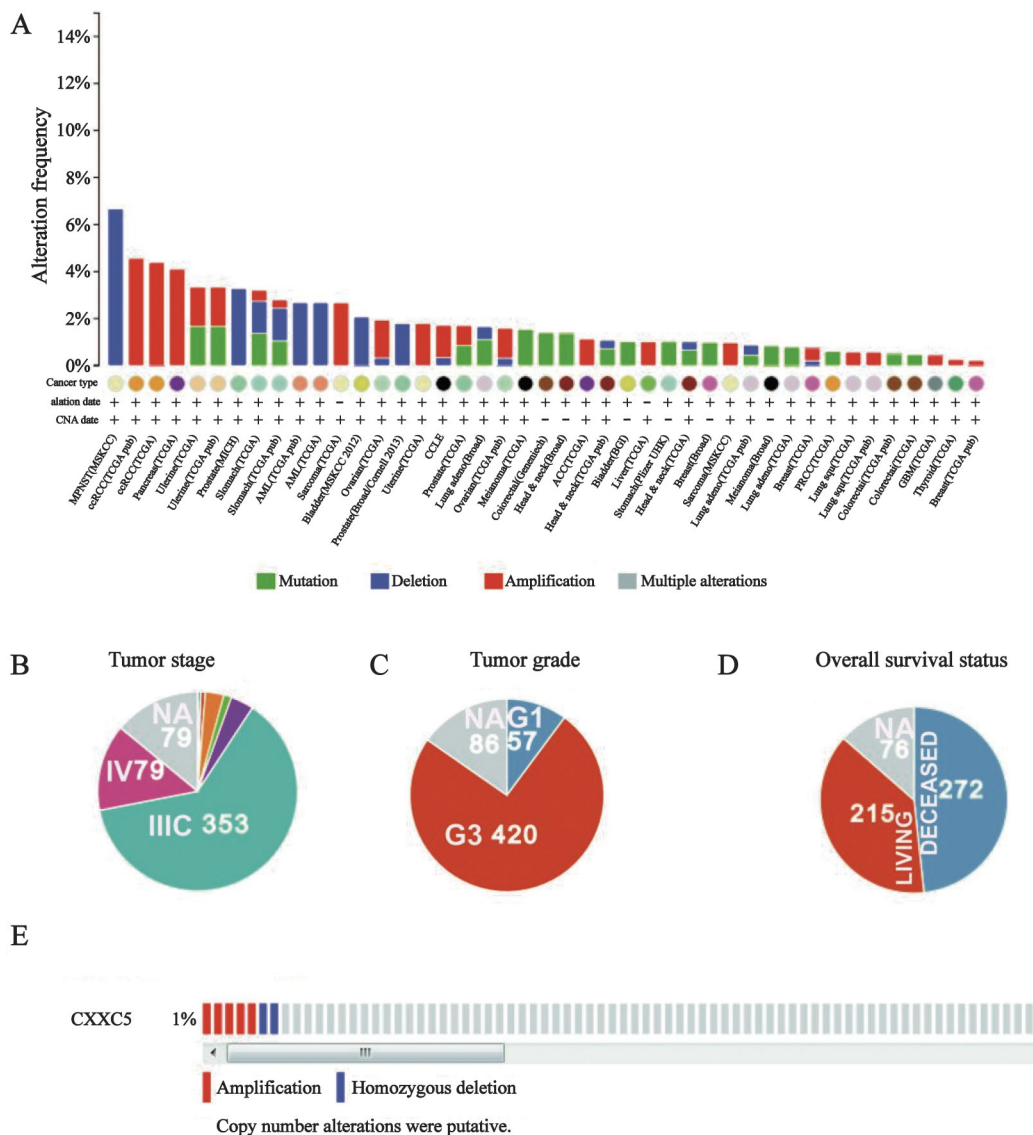


图 1 CXXC5基因在TCGA 数据库肿瘤基因组中的变异

Fig. 1 The alteration of CXXC5 gene in cancer genomics data of TCGA

A: Gene application was primary among the alteration of CXXC5 in cancer genomics data of TCGA. B-D: Clinical characteristics of patients with the ovarian serous cystadenocarcinoma (TCGA, Nature 2011) included tumor stage, tumor grade and overall survival status. E: CXXC5 altered in 7 of 563 cases.

66.7%，两两比较差异有统计学意义( $P=0.014$ )。CXXC5在有淋巴结转移和无淋巴结转移的上皮性卵巢癌中表达率分别为60%和35.8%，差异有统计学意义( $P=0.022$ )。我们发现CXXC5在年龄 $\leq 50$ 岁和 $> 50$ 岁的患者组织样本中表达率分别为32.8%和43.4%，差异无统计学意义( $P=0.166$ )；CXXC5在临床I、II、III和IV期的患者组织样本中表达率分别为32.0%、42.9%、45.2%和50.0%，差异无统计学意义( $P=0.376$ )；

CXXC5在浆液性卵巢癌低分化和高分化的组织样本中表达率分别为39.4%和45%，差异无统计学意义( $P=0.601$ )；CXXC5在黏液性卵巢癌1、2和3级组织样本中的表达率分别为20.0%、27.3%和23.5%，差异无统计学意义( $P=0.897$ )；CXXC5在子宫内膜样卵巢癌1、2和3级组织样本中的表达率分别为20.0%、33.3%和100.0%，差异无统计学意义( $P=0.897$ ，表3)。

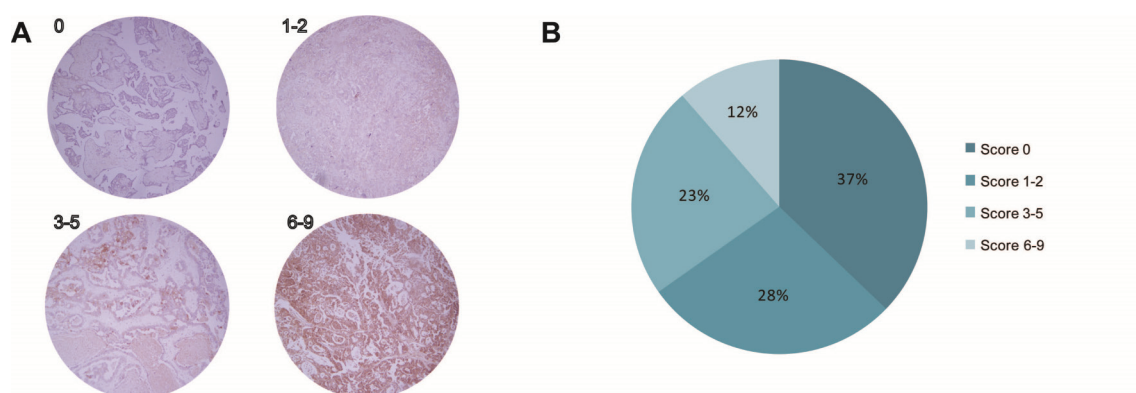


图2 免疫组织化学法检测组织芯片中CXXC5在卵巢肿瘤中的表达评分

Fig. 2 Representative immunohistochemical stains for CXXC5 in ovarian cancer

### 2.3 卵巢癌透明细胞株ES-2中CXXC5表达水平最高，CXXC5稳定转染干扰后mRNA和蛋白表达水平明显降低

为了进一步研究CXXC5在上皮性卵巢癌细胞株中的表达情况，我们选择了COV504、ES-2、NIHOVCAR3、OV90和OVISE 5株上皮性卵巢癌细胞株，采用Western blot和qRT-PCR检测CXXC5在这5株上皮性卵巢癌细胞株中的表达情况。结果显示，在mRNA和蛋白表达水平上，上皮性卵巢癌细胞株ES-2中的CXXC5表达水平最高(图4A、B)。与免疫组化检测结果提示的CXXC5在卵巢透明细胞癌中高表达相一致，因此，我们选择卵巢癌透明细胞株ES-2进行稳定转染干扰。

我们使用表达CXXC5-shRNA及Control-shRNA的慢病毒转染卵巢癌透明细胞株ES-2，经嘌呤霉素筛选后得到稳转干扰细胞株。qRT-PCR检测结果显示，sh1组、sh2组和sh3组中的CXXC5 mRNA的表达量分别为12.0%、20.6%和35.7%(图4C)。说明3组CXXC5-shRNA对CXXC5均有抑制作用，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Western blot结果显示，3组CXXC5-shRNA均能显著降低CXXC5在卵巢癌透明细胞株ES-2中的蛋白表达水平(图4D)。

### 2.4 卵巢癌透明细胞株ES-2稳定转染干扰CXXC5后增殖能力明显减弱

为了观察对上皮性卵巢癌细胞株功能的影响，本研究使用CCK8检测ES-2对照组、sh1组

和sh2组的增殖能力，结果显示，使用慢病毒稳定转染卵巢癌透明细胞株ES-2后，在24、48、72和96 h时，sh1组与对照组细胞比较增殖能力下降( $P$ 值分别为0.838、0.033、0.006和0.042)；sh2组与对照组细胞比较增殖能力下降( $P$ 值分别为0.018、0.005、0.005和0.003，图5)。提示卵巢癌透明细胞株稳定转染干扰CXXC5后，在48、72、96 h时增殖能力明显减弱，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表2 CXXC5的表达水平与卵巢肿瘤患者临床病理特征关系的分析

Tab. 2 Patients' clinical and pathological parameters and their association with CXXC5 expression

Characteristics	CXXC5 expression level		$\chi^2$	P value
	Low	High		
Samples			8.942	0.003
Carcinoma	105	68		
Benign cyst	32	5		
Age/year			1.919	0.166
$\leq 50$	45	22		
$> 50$	60	46		
Histologic type			10.671	0.014
Serous	53	40		
Mucinous	37	11		
Endometrioid	10	7		
Clear cell	5	10		
Lymph node metastasis			5.246	0.022
Positive	10	15		
Negative	95	53		
Clinical stage			3.101	0.376
I	51	24		
II	16	12		
III	34	28		
IV	4	4		

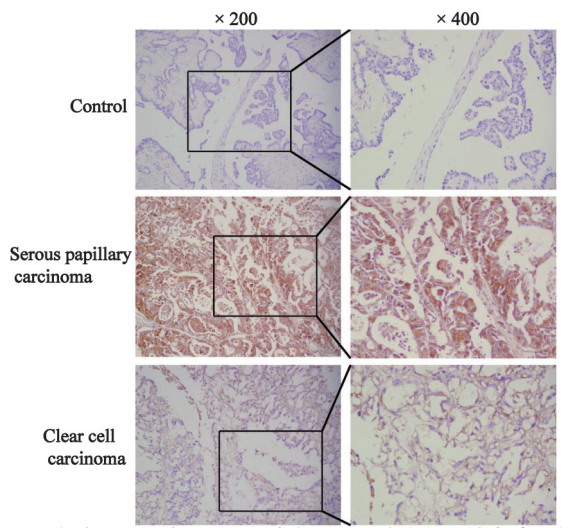


图3 免疫组化法检测组织芯片中CXXC5在卵巢良性囊肿和卵巢肿瘤中的表达

Fig. 3 The expression of CXXC5 in benign ovarian cyst and malignant tumor samples detected by immunohistochemistry

表3 CXXC5的表达水平与浆液性卵巢癌、黏液性卵巢癌及子宫内膜样卵巢癌患者的病理分级关系的分析

Tab. 3 Patients' pathological grade in serous, mucinous and endometrioid ovarian cancer and their association with CXXC5 expression

Histologic type	Histologic grade	CXXC5 expression level		$\chi^2$	P value
		Low	High		
Serous	Low	20	13	0.273	0.601
	High	33	27		
Mucinous	1	16	4	0.218	0.897
	2	8	3		
	3	13	4		
Endometrioid	1	4	1	5.44	0.066
	2	6	3		
	3	0	3		

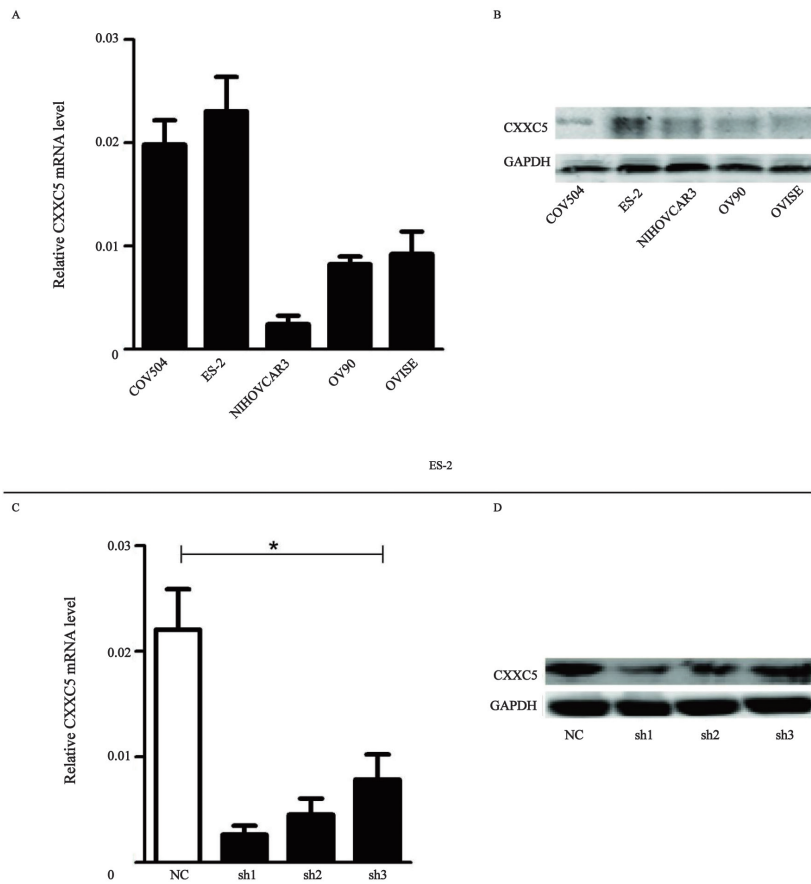


图4 CXXC5在5株卵巢癌细胞系的表达情况及稳定转染干扰ES-2细胞后CXXC5的表达效率验证

Fig. 4 The expression of CXXC5 in 5 ovarian cancer cell lines and the efficiency of ES-2 cells stably silenced the CXXC5

NC: Negative control. A: The CXXC5 expression in 5 ovarian cancer cell lines by qRT-PCR. B: The CXXC5 expression in 5 ovarian cancer cell lines by Western blot. C: The efficiency of ES-2 cells stably silenced the CXXC5 by qRT-PCR. D: The efficiency of ES-2 cells stably silenced the CXXC5 by Western blot.

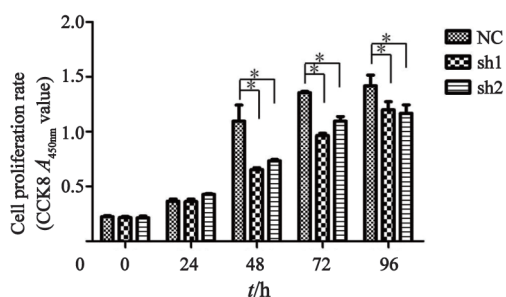


图5 干扰CXXC5后对ES-2细胞增殖能力的影响

Fig. 5 The impact of ES-2 cells stably silenced the CXXC5 on proliferation

NC: Negative control. \*:  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤之一，死亡率居妇科肿瘤之首，严重威胁妇女生命和健康<sup>[12]</sup>。卵巢癌早期病变不易发现，晚期患者缺乏有效的治疗手段。近30年来，上皮性卵巢癌患者的生存率未得到明显提高<sup>[13]</sup>，卵巢癌研究进展缓慢。越来越多的研究表明，大部分卵巢癌并非来源于卵巢组织，不同的卵巢癌组织学类型有着不同的起源。卵巢癌应该是一系列不同的疾病，它们病因不同、分子构成不同，却生长在共同的解剖学部位<sup>[13]</sup>。这为卵巢癌的研究提供了新的思路。

CXXC5基因具有典型的锌指模体CXXC结构<sup>[3]</sup>，是维甲酸应答基因，编码的维甲酸可诱导核因子参与正常骨髓细胞生成<sup>[4]</sup>。研究发现CXXC5与骨髓增生异常综合征和AML密切相关<sup>[4-6]</sup>。Knappskog等<sup>[8]</sup>检测了晚期乳腺癌、转移性恶性黑色素瘤、甲乳癌与癌旁的活检组织中的mRNA水平，结果发现与癌旁组织相比，晚期乳腺癌、转移性恶性黑色素瘤和甲乳癌中的CXXC5表达明显上调，并且CXXC5与乳腺癌的不良预后相关。

在本研究中，我们通过免疫组织化学实验观察到CXXC5在上皮性卵巢癌组织中高表达，在浆液性卵巢癌、黏液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌和卵巢透明细胞癌中的表达率分别为22.9%、23.5%、43.0%和66.7%，两两比较差异有统计学意义( $P=0.014$ )，提示CXXC5与

上皮性卵巢癌的组织学分类密切相关。我们检测CXXC5在上皮性卵巢癌细胞株中的表达情况，发现卵巢透明细胞癌来源的ES-2细胞株中CXXC5表达水平最高，与IHC结果一致。由此推测CXXC5可能可以作为上皮性卵巢癌组织学分类的生物学标志物。本研究发现CXXC5在淋巴结转移和无淋巴结转移的上皮性卵巢癌中表达率为60.0%和35.8%，差异有统计学意义( $P=0.022$ )。而淋巴结转移是卵巢癌主要的播散途径之一，淋巴结转移提示预后差<sup>[14-15]</sup>。由此表明，CXXC5可能是一个提示卵巢癌的预后不良的重要标志物。

Knappskog等<sup>[8]</sup>观察到高表达的CXXC5可能代替TP53突变解释乳腺癌的发生机制并提示预后不良。TP53的突变与缺失是卵巢肿瘤中最常见的遗传学变异。在散发和家族患者中有60.0%~80.0%的TP53发生突变，而在高度恶性浆液性卵巢肿瘤中约有50.0%的TP53发生突变<sup>[16]</sup>。TP53高表达患者的生存期明显低于低表达患者的生存期，且TP53的突变与转移能力相关<sup>[17]</sup>。我们利用TCGA提供的具有患者临床资料的数据库对CXXC5的变异进行分析，结果显示，CXXC5在上皮性卵巢癌基因组中主要以扩增为主。

有文献报道CXXC5通过casepase3和casepase8诱导细胞凋亡<sup>[18]</sup>。我们成功构建CXXC5定稳染转干扰细胞株ES-2并进行细胞增殖实验，结果显示同对照组相比，稳定转染干扰株ES-2的增殖能力明显减弱，提示CXXC5有促进卵巢透明细胞癌增殖的功能。

综上所述，CXXC5在上皮性卵巢癌组织中高表达，与上皮性卵巢癌的组织学类型和淋巴结转移有关，有促进卵巢癌细胞增殖作用，有望成为评估上皮性卵巢细胞癌的组织学分类和预后的生物学标志物。

### [参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] SEIDMAN J D, HORKAYNE-SZAKALY I, HAIBA M, et al. The histologic type and stage distribution of ovarian

- carcinomas of surface epithelial origin [ J ] . *Int J Gynecol Pathol*, 2004, 23(1): 41-44.
- [ 3 ] PENDINO F, NGUYEN E, JONASSEN I, et al. Functional involvement of RINF, retinoid-inducible nuclear factor (CXXC5), in normal and tumoral human myelopoiesis [ J ] . *Blood*, 2009, 113(14): 3172-3181.
- [ 4 ] ASTORI A, FREDLY H, ALOYSIUS T A, et al. CXXC5 (retinoid-inducible nuclear factor, RINF) is a potential therapeutic target in high-risk human acute myeloid leukemia [ J ] . *Oncotarget*, 2013, 4(9): 1438-1448.
- [ 5 ] TREPPENDAHL M B, MOLLGARD L, HELLSTROM-LINDBERG E, et al. Downregulation but lack of promoter hypermethylation or somatic mutations of the potential tumor suppressor CXXC5 in MDS and AML with deletion 5q [ J ] . *Eur J Haematol*, 2013, 90(3): 259-260.
- [ 6 ] GELSI-BOYER V, TROUPLIN V, ADELAIDE J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia [ J ] . *Br J Haematol*, 2009, 145(6): 788-800.
- [ 7 ] ANDERSSON T, SODERSTEN E, DUCKWORTH J K, et al. CXXC5 is a novel BMP4-regulated modulator of Wnt signaling in neural stem cells [ J ] . *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3672-3681.
- [ 8 ] KNAPPSKOG S, MYKLEBUST L M, BUSCH C, et al. RINF (CXXC5) is overexpressed in solid tumors and is an unfavorable prognostic factor in breast cancer [ J ] . *Ann Oncol*, 2011, 22(10): 2208-2215.
- [ 9 ] MAY-PANLOUP P, FERRÉ-L'HÔTELLIER V, MORINIÈRE C, et al. Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve [ J ] . *Gynecol Obstet Fertil*, 2012, 40(9): 500-506.
- [ 10 ] CERAMI E, GAO J, DOGRUSOZ U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data [ J ] . *Cancer Discov*, 2012, 2(5): 401-404.
- [ 11 ] GAO J, AKSOY B A, DOGRUSOZ U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal [ J ] . *Sci Signal*, 2013, 6(269): p11.
- [ 12 ] KHO R M, ABRAO M S. Ovarian remnant syndrome: etiology, diagnosis, treatment and impact of endometriosis [ J ] . *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2012, 24(4): 210-214.
- [ 13 ] VAUGHAN S, COWARD J I, BAST R C Jr, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes [ J ] . *Nat Rev Cancer* 2011, 11(10): 719-725.
- [ 14 ] HENNESSY B T, COLEMAN R L, MARKMAN M. Ovarian cancer [ J ] . *Lancet*, 2009, 374(9698): 1371-1382.
- [ 15 ] ATASEVEN B, GRIMM C, HARTER P, et al. Prognostic value of lymph node ratio in patients with advanced epithelial ovarian cancer [ J ] . *Gynecol Oncol*, 2014, 135(3): 435-440.
- [ 16 ] CHAN W Y, CHEUNG K K, SCHORGE J O, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers [ J ] . *Am J Pathol*, 2000, 156(2): 409-417.
- [ 17 ] HAVRILESKY L, DARCY K M, HAMDAN H, et al. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study [ J ] . *J Clin Oncol*, 2003, 21(20): 3814-3825.
- [ 18 ] WANG X, LIAO P, FAN X, et al. CXXC5 associates with smads to mediate TNF-alpha induced apoptosis [ J ] . *Curr Mol Med*, 2013, 13(8): 1385-1396.

(收稿日期: 2014-12-24 修回日期: 2015-03-03)