

宫颈癌患者 5 项相关指标的表达式研究

侯文权¹, 侯文锋², 周凌云³, 徐 胜³ (1. 江苏省沭阳县人民医院 223600; 2. 山西省太原康明眼科医院 030006; 3. 江苏省沭阳县中心医院住院部 223600)

【摘要】 目的 探讨宫颈癌患者缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、凋亡抑制因子(survivin)、B 细胞淋巴瘤-2(bcl-2)的表达、相互关系及临床意义。**方法** 选取宫颈病变组织 169 例、正常对照组 25 例。采用免疫组化法检测组织中上述 5 项指标的表达。**结果** 宫颈癌组织内存在 HIF-1 α 、VEGF、MMP-13、survivin、bcl-2 的表达, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与预后呈负相关; 但与年龄、性别、肿块类型无关。HIF-1 α 、VEGF、survivin、bcl-2 与临床分期有关, 随着临床分期的增高表达增强, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。VEGF、MMP-13、survivin 的表达与淋巴结转移有关, 有淋巴结转移组阳性率明显高于无淋巴结转移组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。肿瘤中央区 HIF-1 α 、VEGF 的表达水平较周边区高, 肿瘤表达水平与微血管密度密切相关, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。HIF-1 α 与 VEGF、survivin 与 bcl-2 呈正相关, 其余无直接相关性。**结论** HIF-1 α 、VEGF、MMP-13、survivin、bcl-2 的异常表达参与了宫颈癌的发生和发展, 联合检测上述 5 项指标有望为宫颈癌的早期诊断、手术化疗疗效的评价、预后的判断提供有力的临床指导。

【关键词】 宫颈癌; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶-13; survivin; bcl-2

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.21.015

中图分类号:R446.1;R737.33

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)21-2332-03

Study on the HIF - 1 alpha, VEGF, MMP - 13, survivin and BCL - 2 of the cervical cancer patients HOU Wen-quan¹, HOU Wen-feng², ZHOU Ling-yun³, XU Sheng³. 1. Shuyang People's Hospital of Jiangsu, 223600, China; 2. Taiyuan Kangming Eye Hospital of Shanxi, 030006, China; 3. Shuyang central hospital of Jiangsu, 223600, China

【Abstract】 Objective To investigate the cervical cancer patients' hypoxia factor -1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinases - 13 (MMP - 13), survivin, bcl-2 expression, relationship and the clinical significance. **Methods** 169 cases of abnormal cervical lesions were selected to compare with 25 cases of normal ones. The organization of expression was detected by immunohistochemical method. **Results** Cervical cancer tissue exists within 1 - HIF alpha, VEGF, MMP - 13, survivin, bcl-2, and there was a significant difference ($P < 0.05$). It was negatively correlated with prognosis, but not correlated with age, sex and mass type. HIF-1 α , VEGF, survivin and bcl-2 had correlation with clinical stages, with expressing enhance increased ($P < 0.05$). As to VEGF, MMP-13, survivin of lymph node metastasis, the group with lymph node metastasis showed significantly higher than the one without lymph node metastasis ($P < 0.05$). HIF-1 α and VEGF central h. tumor expression level is high, and the peripheral area and the expression level tumor microvascular density (MVD) closely related with each other ($P < 0.05$). HIF-1 α and VEGF with survivin and bcl-2 had a direct correlation with each other. **Conclusion** HIF-1 α , VEGF, MMP-13, survivin, and bcl-2 can be found in the development of abnormal cervical cancer, and the joint test of the 5 indexes mentioned above may help to detect and early diagnose the cancer as well as provide clinical guidance for the chemotherapy.

【Key words】 cervical carcinoma; HIF-1 α ; VEGF; MMP-13; survivin; bcl-2

宫颈癌是发病率和病死率仅次于乳腺癌的最常见的女性恶性肿瘤。全球宫颈癌发患者数逐年增加, 且呈年轻化趋势^[1]。宫颈癌细胞的侵袭和转移是一个复杂过程, 涉及到血管、淋巴管新生、细胞外基质降解和细胞凋亡调控等很多因素。肿瘤细胞的不断增殖使该部位处于缺氧状态, 导致缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)大量表达, 进一步产生血管内皮生长因子(VEGF), 产生新淋巴管和血管, 新的淋巴管和血管细胞产生基质金属蛋白酶-13(MMP-13)。肿瘤的过度增殖引发凋亡抑制因子(survivin)和 B 细胞淋巴瘤-2(bcl-2)的表达。本研究采用免疫组化法观察上述 5 项指标在宫颈病变组织中的表达, 以

探讨其与宫颈癌组织的侵袭、转移关系、临床意义以及他们之间的相关性, 提供有助于判断宫颈癌患者病情及预后的预测指标, 为宫颈癌的临床治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2004 年 11 月至 2009 年 3 月在本医院诊治的临床病理资料完整的宫颈病变患者共 169 例 (活检前均未行放、化疗), 年龄(58.9 $\pm$ 12.4)岁。所有标本均经 2 位资深病理医生给予病理诊断。包括宫颈鳞癌 79 例, 腺癌 13 例, 癌前病变(CIN) I 级 15 例, CIN II 级 28 例, CIN III 级 34 例。正常宫颈组织 25 例。2000 年修订的国际妇产科联盟分期标准进

行宫颈癌临床分期:Ⅰa 期 23 例,Ⅰb 期 21 例,Ⅱa 期 24 例,Ⅱb 期 19 例,Ⅲ期 5 例。宫颈癌患者术后有淋巴转移 41 例,无转移 51 例。随访记录患者肿瘤治疗效果缓解、复发或未控、转移、死亡的情况。随访时间为 11~60 个月。

1.2 方法 组织标本经 10%甲醛固定,石蜡包埋,常规切片 4 μm。采用免疫组化法,HIF-1α 抗体、兔抗人 VEGF 多克隆抗体、鼠抗人 MMP-13 单克隆抗体、鼠抗人 survivin 抗体、鼠抗人 bcl-2 多克隆抗体均购自北京中杉生物技术公司。按试剂盒说明书进行操作。用已知的阳性切片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液代替一抗作为空白对照,显微镜下(×400)取 5 个不同视野各计数 100 个癌细胞。HIF-1α、VEGF、MMP-13、survivin 和 bcl-2 的阳性染色标准主要为细胞质内出现黄色至棕黄色颗粒。

1.3 统计学方法 统计学处理采用 SPSS13.0 软件分析。两

均数比较用 χ^2 检验,多组均数比较用方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

宫颈癌组织内存在 HIF-1α、VEGF、MMP-13、survivin、bcl-2 的表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。HIF-1α、VEGF、MMP-13、survivin、bcl-2 的表达与年龄、性别、肿块类型无关。HIF-1α、VEGF、survivin、bcl-2 与临床分期有关,随着临床分期的增高表达增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。VEGF、MMP-13、survivin 的表达与淋巴结转移有关,有淋巴结转移组阳性率明显高于无淋巴结转移组,差异有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤中央区 HIF-1α、VEGF 的表达水平较周边区高,肿瘤表达水平与微血管密度(MVD)密切相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。HIF-1α 与 VEGF、survivin 与 bcl-2 呈正相关,其余无直接相关性。见表 2。

表 1 HIF-1α、VEGF、MMP-13、survivin 和 bcl-2 在各组的表达情况[n(%)]

组别	n	HIF-1α	VEGF	MMP-13	survivin	bcl-2
正常宫颈	25	2(8.0)	1(4.0)	1(4.0)	0(0.0)	1(4.0)
CIN	77	54(70.1)▼	61(79.2)▼	61(79.2)▼	36(46.8)▼	30(40.1)▼
宫颈癌	92	75(81.5)▼◆	75(81.5)▼	76(82.6)▼	70(76.1)▼◆	68(73.9)▼◆

注:与正常宫颈比较,▼ $P<0.05$;与 CIN 比较,◆ $P<0.05$ 。

表 2 HIF-1α、VEGF、MMP-13、survivin 和 bcl-2 在宫颈癌患者各临床病理组的表达[n(%)]

组别	n	HIF-1α	VEGF	MMP-13	survivin	bcl-2
正常宫颈	25	2(8.0)	1(4.0)	1(4.0)	0(0.0)	1(4.0)
CINⅠ+Ⅱ	43	29(67.4)	32(74.4)	33(76.7)	15(34.9)	13(32.2)
CINⅢ	34	25(73.5)	29(85.3)	28(82.4)	21(61.8)	17(50.1)
鳞癌	79	66(83.5)	65(82.3)	66(83.5)	59(74.7)	59(77.7)
腺癌	13	9(69.2)	10(76.9)	10(76.9)	11(84.6)	9(69.2)
高中分化癌	56	44(78.6)	43(76.8)	45(83.4)	37(66.1)	31(55.4)
低分化癌	36	30(83.3)	29(80.6)	28(77.8)	32(88.9)	31(86.1)
Ⅰ~Ⅱa	68	51(75.1)	52(76.5)	56(82.4)	47(69.1)	43(62.3)
Ⅱb~Ⅲ	24	21(87.5)	20(83.3)	18(75.1)	21(87.5)	22(91.7)
外生型	44	35(79.5)	36(81.8)	35(79.5)	36(81.8)	28(63.6)
内生型	20	16(80.1)	14(70.1)	16(80.1)	15(75.1)	16(80.1)
溃疡型	18	15(83.3)	14(77.8)	15(83.3)	14(77.8)	13(72.2)
颈管型	10	7(70.1)	8(80.1)	7(70.1)	7(70.1)	7(70.1)
有淋巴转移	41	25(61.1)	38(92.7)	37(90.2)	37(90.2)	18(43.9)
无淋巴转移	51	33(64.7)	39(76.5)	40(78.4)	23(45.1)	23(45.1)

3 讨论

宫颈癌组织为满足自己生长的需要可以诱导血管生成,能形成丰富的微血管网,但由于微血管网结构和功能相对不足,致使肿瘤缺氧和坏死持续存在^[2-3]。缺氧使肿瘤细胞表达 HIF-1α,进而促进 VEGF 的表达。HIF-1α 与肿瘤大小、组织学分级和淋巴结转移等临床病理特征相关^[4]。VEGF 在维持肿瘤细胞的能量代谢、新生血管形成以及促进肿瘤增殖和转移中起重要作用^[5]。本研究结果显示,HIF-1α 和 VEGF 在宫颈癌中阳性率为 81.5%、81.5%,肿瘤中央区细胞 HIF-1α 和

VEGF 表达水平及微血管密度高于肿瘤外周区,说明肿瘤中央区缺氧严重程度较比外周区更重,这可能是因为肿瘤诱导新生血管生长首先从肿瘤与宿主交界处开始,中央区新生血管功能缺陷和数量在同一时间均落后于外周区。HIF-1α 和 VEGF 的表达随着临床分期的增高表达增强,有淋巴转移的比无转移者表达强,差异有统计学意义($P<0.05$),HIF-1α 与 VEGF 呈正相关。

MMP-13 是锌离子依赖性蛋白酶家族 MMPs 的一员,在机体结缔组织的降解和重建、创伤修复、肿瘤扩散转移和缺血

缺氧损伤等过程中发挥重要的作用。研究发现, MMP-13 产生于正常组织细胞和肿瘤细胞中, 大多数以酶原形式分泌, 激活后能降解细胞外基质。在缺血缺氧的刺激下宫颈癌细胞产生大量的 MMP-13, 降解细胞外基质。另外新生血管的结构不完善, 通透性大, 容易发生淋巴结转移和血管浸润, 与本研究结果一致, 有淋巴结转移组阳性率明显高于无淋巴结转移组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

survivin 和 bcl-2 是凋亡抑制基因。本研究结果显示, survivin 和 bcl-2 在正常组织、CIN 和宫颈癌中表达逐渐增高, 随着宫颈癌临床分期和病理分级的增加阳性率显著增加^[6]。提示 survivin 和 bcl-2 的表达与宫颈癌患者的疾病进展和预后息息相关, 二者呈正相关。其机制为 survivin 和 bcl-2 通过相似的启动子共同协调而导致宫颈癌的病变; 或者是因为 survivin 所在染色体不稳定, 导致基因易位而引发 bcl-2 激活^[7], 具体有待进一步研究。survivin 有淋巴结转移组阳性率明显高于无淋巴结转移组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), bcl-2 与淋巴结转移无关, survivin 与 bcl-2 呈正相关。

综上所述, 本文认为, HIF-1 α 、VEGF、MMP-13、survivin、bcl-2 的异常表达参与了宫颈癌的发生和发展, 联合检测上述 5 项指标可为宫颈癌的早期诊断、手术化疗疗效的评价、预后的判断提供有力的临床指导。

参考文献

[1] Pilch H, Gunzel S, Schaffer U, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA in primary cervical cancer and in canaer free pelvic lymph nodes-correlation with clinico-pathological parameters and prognostic significance[J]. Zentral-

bl Gyankol, 2001, 123; 91-101.

- [2] Yu KJ, Bashirova A, Madeleine MM, et al. Evaluation of the association with cervical cancer of polymorphisms in syndecan-1, a heparan sulfate proteoglycan involved with viral cell entry[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(11): 250-281.
- [3] Banath JP, Macphail SH, Olive PL. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7144-7149.
- [4] Katsuta M, Miyashita M, Makino H, et al. Correlation of hypoxia inducible factor -1 alpha with lymphatic metastasis via vascular endothelial growth factor-C in human esophageal cancer[J]. Exp Mol Pathol, 2005, 78(2): 123-130.
- [5] Hotz HG, Hines OJ, Hotz B, et al. Evaluation of vascular endothelial growth factor blockade and matrix metalloproteinase inhibitions as a combination therapy for experimental human pancreatic cancer[J]. Gastrointest Surg, 2003, 7(2): 220-227.
- [6] Kim HS, Shiraki K, Park SH. Expression of Survivin, a member of the inhibitors cell carcinoma of uterine cervix[J]. Anticancer Res, 2002, 22: 805-808.
- [7] 王鲁文. 宫颈癌组织中 Survivin, bcl-2, P53 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(2): 331-332.

(收稿日期: 2010-06-19)

(上接第 2231 页)

研究认为, 对子宫内膜上皮细胞的纯化技术尚不成熟, 到目前为止对子宫内膜上皮细胞及间质细胞的纯化是建立体外实验模型的最大难点, 很难达到间质细胞的程度。因此提高二者的产量、保证纯度, 对后续实验非常重要。本研究在实验中发现高密度及高纯度的腺上皮细胞和间质细胞往往寿命长。实验采用胶原酶消化组织, 2 次筛网过滤并根据不同的离心速度, 分离纯化子宫内膜间质细胞和上皮细胞, 最终成功对 10 例标本的腺上皮细胞及间质细胞进行了纯化。显微镜下可见腺上皮细胞呈类圆形或蝌蚪形, 边界清楚, 排列紧密, 胞质呈颗粒状, 胞核大而圆, 核仁明显而间质细胞呈多角形, 有多个短小细胞突出, 胞质薄而透明, 核圆居中, 细胞排列无极性, 平铺生长。细胞培养体系的建立必须进行细胞鉴定。内膜间质细胞主要与腺上皮细胞鉴别, 免疫细胞化学染色方法是经典的鉴别手段^[4-5]。本研究采用抗波形蛋白抗体和抗角蛋白抗体对分离纯化的间质细胞和腺上皮细胞进行鉴定。腺上皮细胞主要表达角蛋白, 而间质细胞中不表达; 波形蛋白主要在间质细胞中高表达。实验结果显示, 分离的间质细胞中细胞角蛋白染色呈阴性, 而波形蛋白染色阳性者占 90% 以上, 表明培养的细胞纯度超过 90%。

本研究成功建立了子宫内膜细胞的体外模型, 得到纯度较高的子宫内膜上皮细胞及间质细胞, 为研究细胞之间的自分泌

或旁分泌作用在细胞水平提供了研究平台, 同时证实内膜细胞的各种培养特性在不同月经周期无明显差异。

参考文献

- [1] 史小林. 人类生殖学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 41.
- [2] Matthews CJ, Redfern PF, Hirst BH, et al. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture[J]. Fertil Steril, 1992, 57(5): 990-997.
- [3] Von Wolff M, Strowitzki T, Becker V, et al. Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window" [J]. Fertil Steril, 2001, 76(4): 775-781.
- [4] Matthews CJ, Redfern CP, Hirst BH, et al. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture[J]. Fertil Steril, 1992, 57(4): 990-997.
- [5] Brubaker DB, Ross MG, Marinoff D, et al. The function of elevated plasma fibronectin in preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 1992, 166(2): 526-531.

(收稿日期: 2010-06-09)