

Oct4 在宫颈癌中的表达及与人乳头瘤病毒感染的关系*

黄 平, 黄 慧, 李 蓉, 陈光元, 敬宗玉, 谢家滨(广东省深圳市宝安区松岗人民医院 518105)

【摘要】 目的 探讨宫颈癌细胞中干细胞关键转录因子 Oct4 的表达情况及意义,并探讨 Oct4 表达与人乳头瘤病毒感染的关系。**方法** 采用免疫组织化学法和反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 20 例宫颈癌组织、30 例宫颈上皮内瘤变(CIN)组织及 20 例正常宫颈组织标本中 Oct4 的表达及 PCR 检测所有标本中人乳头瘤病毒(HPV)16/18 DNA 感染情况。**结果** 宫颈癌组织 Oct4 阳性表达率为 90%(18/20),CIN 中为 50%,和正常宫颈组织中相比两者差异均具有统计学意义。而且宫颈癌组织中 Oct4 的表达不仅与其肿瘤分化程度密切相关,与 HPV 感染也有关,表现为 HPV16/18 DNA 阳性个体中 Oct4 阳性率高,而 HPV16/18 DNA 阴性个体中 Oct4 阳性率低。**结论** 联合检测 Oct4 和高危型 HPV DNA 可作为宫颈癌一个敏感性、特异性的标志和治疗靶点。

【关键词】 宫颈癌; 宫颈上皮内瘤变; Oct4

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.20.008 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)20-2655-02

Expression of Oct4 in cervical carcinoma and its association with HPV infection* HUANG Ping, HUANG Hui, LI Rong, CHEN Guang-yuan, JING Zong-yu, XIE Jia-bin (Songgang People's Hospital of Baoan, Shenzhen, Guangdong 518105, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression and the correlation of Oct4 and human papilloma virus (HPV) in cervical carcinoma. **Methods** Immunohistochemical analysis and reverse transcript polymerase chain reaction(RT-PCT) were used to detect the expression of Oct4 in tissue samples from 20 cases of cervical carcinoma, 30 cases of cervical intraepithelial neoplasia(CIN) and 20 cases of normal cervix. HPV 16/18 DNA was detected by PCR. **Results** The positive rates of Oct4 in cervical carcinoma was 90%(18/20), obviously higher than CIN(50%) and normal cases(5%). Moreover, the expression of Oct4 in cervical carcinoma was also associated with poor differentiation and HPV16/18 infection. The positive rate of Oct4 in HPV16/18 infective patients was higher than patients without HPV16/18 infection. **Conclusion** High expression of Oct4 in cervical carcinoma might be associated with the degree of differentiation and HPV16/18 infection, which could be an useful target for diagnosis and treatment of cervical carcinoma.

【Key words】 cervical carcinoma; cervical intraepithelial neoplasia; Oct4

最新研究表明,肿瘤的发生和进展是由于其中存在一小部分具有不断自我更新分化和高度致瘤能力的细胞及肿瘤干细胞。Oct4 作为维持干细胞状态的标志,在维持肿瘤干细胞的性质和抵抗方面同样具有重要作用^[1-2]。除了在生殖细胞肿瘤中检测到 Oct4 的表达外,在膀胱癌、肺癌、前列腺癌、胶质瘤等中均检测到其表达。为了明确其在宫颈癌中作用,作者采用免疫组织化学技术和反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Oct4 在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的表达,并分析其与人乳头瘤病毒(HPV)16/18 感染的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2011 年 1 月至 2012 年 5 月经病理科诊断的宫颈病变组织切片 50 例,包括宫颈鳞癌 14 例、腺癌 6 例、CIN I ~ II 15 例及 CIN III 15 例,以及 20 例正常宫颈组织做对照。根据最新国际妇产科联盟分期进行临床分期:I ~ II a 期 16 例,II b ~ III 期 4 例。病理学分级:高中分化 6 例,低分化 14 例。取材前均未接受任何治疗。

1.2 方法

1.2.1 Oct4 蛋白检测 采用免疫组织化学方法,鼠抗人 bcl-2 多克隆抗体和免疫组织化学试剂盒(购自东盛生物有限公司)检测正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中 Oct4 的

表达,严格按照试剂盒操作说明进行。结果判断:细胞核中出现棕黄色颗粒 Oct4 阳性,高倍镜下随机观察 10 个视野,记录阳性细胞百分比,<10%为阴性,>10%为阳性。

1.2.2 Oct4 mRNA 的检测 Trizol 法提取组织总 RNA,以 20 μ L 焦碳酸二乙酯水溶解,RNA 定量为 110 g/L 在紫外分光光度计下测得波长为 260、280 nm 处的吸光度(A),其 A 值均在 1.8~2.0。反转录合成 cDNA 第一链,反转录反应体系(20 μ L)如下:DEPC 水 7.1 μ L、5 $\times$ 反应缓冲液 4.0 μ L、dNTPs (10 mmol/L)1.0 μ L、Oligo(dT) 18(0.5 g/L) 1.0 μ L、RNA 酶抑制剂 0.5 μ L、总 RNA 5.6 μ L、反转录酶 MuLV 0.8 μ L,反应条件:70 $^{\circ}$ C 5 min,速置于冰上;42 $^{\circ}$ C 1 h;95 $^{\circ}$ C 10 min 灭活反转录酶。Oct4 引物:上游 5'-AAC AAT GAG AAC CTT CA-3',下游 5'-CTG GCG CCG GTT ACA GAA CCA-3',产物 484 bp。内参照引物 β -肌动蛋白:上游 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3',下游 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TA-ACA GTC 2CG-3',产物 228 bp。PCR 反应体系(25 μ L):cDNA 模板 2.5 μ L、上下游引物(25 mmol/L)各 0.5 μ L、Taq 聚合酶 0.15 μ L、dNTPs(10 mmol/L) 0.5 μ L、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μ L、10 $\times$ Buffer 2.5 μ L、ddH₂O 16 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C、45~57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 6

* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(201003382)。

min。15 g/L 琼脂糖电泳鉴定产物,数码照相并行灰度值分析。

1.2.3 HPV16/18 DNA PCR 的检测 按照 Alhajj^[3] 设计 HPV16、18 型特异性引物并送公司合成。脱蜡水化,经蛋白酶 K 消化。取 10 μL 标本加入 100 μL PCR 体系。PCR 反应条件为:95 ℃ 8 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,循环 35 次;72 ℃ 7 min。产物经 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,在 395、116 bp 处出现条带为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件,样本率差异比较采用卡方检验及 Fisher 精确概率法,两者相关性采用 Spearman 秩相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Oct4 蛋白和 HPV16/18 DNA 在不同宫颈组织中的表达
Oct4 蛋白阳性定位主要在细胞核中,呈棕黄色颗粒。Oct4 在正常宫颈组织中的阳性表达率为 5%,在 CIN 中为 50%,而在宫颈癌中高达 90%。在正常宫颈组织,CIN 及宫颈癌中的表达呈现逐渐增强的趋势,且在 CIN Ⅲ中表达高于 CIN Ⅰ和 Ⅱ。宫颈癌组织中 Oct4 的表达与宫颈癌的病理类型、临床期别无关,但与其分化程度呈负相关。同样,HPV 16/18 在上述 3 种组织中逐渐增加,且差异具有统计学意义,HPV 阳性率与临床分期、病理类型等无关。见表 1。

表 1 不同临床病理特征的宫颈组织 Oct4 基因和 HPV16/18 阳性表达情况

临床病理情况	n	Oct4 蛋白		HPV16/18DNA	
		[n(%)]	P	[n(%)]	P
正常宫颈组织	20	2(5.0)	<0.01 ^a	1(5.0)	<0.00 ^a
CIN	30	15(50.0)	<0.01 ^b	15(50.0)	0.001 ^b
宫颈癌	20	18(90.0)	0.003 ^b	15(75.0)	0.041 ^b
CIN 分级	Ⅰ~Ⅱ	15	0.011	6(40.0)	0.273
	Ⅲ	15		9(60.0)	
宫颈癌	原位癌	10	0.211	6(60.0)	0.303
	浸润癌	10		9(90.0)	
组织类型	鳞癌	14	1.000	11(91.6)	0.613
	腺癌	6		4(66.7)	
组织分化	高中分化	6	0.010	3(50.0)	0.131
	低分化	47		12(85.7)	
临床分期	Ⅰ~Ⅱa 期	16	1.000	12(75.0)	1.000
	Ⅱb~Ⅲ期	4		3(75.0)	

注:^a 宫颈癌、CIN 及正常宫颈组织三者之间的比较;^b 宫颈癌、CIN 与正常宫颈组织两者之间的比较。

2.2 Oct4 mRNA 在宫颈癌、CIN 及正常宫颈组织中的表达
15 例宫颈癌标本扩增出 Oct4 mRNA 条带,其中浸润癌 9 例;CIN 中 18 例,CIN Ⅲ中 10 例;正常宫颈组织表达率为 25%,Oct4 基因在宫颈癌组织中的阳性表达率明显高于 CIN 组和正常宫颈组织。Oct4 mRNA 相对表达量在宫颈癌组织中为 2.10±0.32,在 CIN 中为 1.50±0.30,在正常宫颈组织中为 0.30±0.26,三种组织中 Oct4 mRNA 的表达量依次降低,差异有统计学意义;同样宫颈癌组织中 Oct4 mRNA 的表达量与其临床分期及病理特征等无明显相关性。见表 2。

2.3 Oct4 的表达与 HPV16/18 感染的相关性 经 Spearman

等级相关分析,宫颈癌组织 Oct4 蛋白表达阳性者(42 例),有 32 HPV16/18 阳性,Oct 蛋白表达阳性者 35 例,均未感染 HPV 16/18,说明 Oct 4 蛋白表达与 HPV 16/18 感染具有正相关性($r=0.918,P<0.01$)。

表 2 不同临床病理特征的宫颈组织 Oct4 mRNA 的表达情况

临床病理情况	n	Oct4 mRNA		P
		[n(%)]	表达量($\bar{x}\pm s$)	
正常宫颈组织	20	5(25.0)	0.30±0.26	
CIN	30	18(60.0)	1.50±0.30	<0.01
宫颈癌	20	15(75.0)	2.10±0.32	0.032
CIN 分级	Ⅰ~Ⅱ	15	8(53.3)	<0.05
	Ⅲ	15	10(66.7)	
宫颈癌	原位癌	10	6(60.0)	>0.05
	浸润癌	10	9(90.0)	
组织类型	鳞癌	14	10(71.4)	>0.05
	腺癌	6	5(83.3)	
组织分化	高中分化	6	3(50.0)	>0.05
	低分化	14	12(85.7)	
临床分期	Ⅰ~Ⅱa 期	16	12(75.0)	>0.05
	Ⅱb~Ⅲ期	4	3(75.0)	

3 讨 论

肿瘤干细胞理论认为,肿瘤组织中的瘤细胞由绝大多数表型不同的肿瘤分化细胞和少数肿瘤干细胞组成,而维持和促使肿瘤生长、转移及复发则主要是因为这些为数不多的肿瘤干细胞^[3]。Feng 等^[4]从宫颈癌组织中分离出宫颈癌肿瘤干细胞,并证实其表达 Oct4 等干细胞相关基因。Oct4 的持续表达,使得组织中部分细胞保留了干细胞的异常自我更新能力,并无限制的扩增,最终导致肿瘤的发生^[5]。本研究结果发现,Oct4 在正常宫颈组织中的表达为 5%(1/20),CIN 中表达率为 50%(15/30),且以 CIN Ⅲ中阳性率较高 73.3%(11/15);宫颈癌中为 90%(18/20)。Oct4 的表达与宫颈癌的分化有关,这与以前在胃癌中的研究相一致^[6]。提示 Oct4 可能参与肿瘤干细胞的存活,以 Oct4 为治疗靶点,针对肿瘤干细胞的治疗将具有重要临床意义。

高危型 HPV 感染与宫颈癌的发生、临床进展和预后密切相关。本研究结果也发现,在正常宫颈组织、CIN 及宫颈癌组织中高危型 HPV16/18 的阳性率逐渐升高。高危型 HPV 16/18 感染参与正常宫颈组织-CIN-宫颈癌发病的机制为:HPV 病毒整合于宿主基因组,其中的 E6、E7 蛋白可使癌基因激活、抑癌基因失活及抗凋亡基因过表达,从而导致细胞的恶性生物学行为。但有研究报道,感染 HPV 的个体中仅少部分最终发展为宫颈癌,这就意味着不同个体感染 HPV 后可能还存在着其他机制导致宫颈癌的发生。通过关联分析发现,HPV 阳性宫颈癌细胞中 Oct4 表达水平较高,而 HPV 阴性个体中 Oct4 表达水平较低,且这种差异具有统计学意义,这与文献^[5,7]的研究结果一致。这些结果表明,HPV16/18 可能与 Oct4 的表达相关,进而 Oct4 促进宫颈癌细胞的克隆形成。

总之,干细胞标志性基因 Oct4 在宫颈癌组织中的表达一方面说明了恶性肿瘤的发生与干细胞具有密切(下转第 2658 页)

COPD 组与健康对照组比较,其中 FIB、FDP 和 D-D 值明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

2.2 不同类型 COPD 患者及健康对照组 FIB、FDP 和 D-D 比较 (1)AECOPD 组分别与 COPD 稳定组和健康对照组比较, FIB、FDP 和 D-D 水平差异均有统计学意义($P<0.01$);(2) COPD 稳定组与健康对照组比较,除 D-D 升高明显外($P<0.01$),FIB 和 FDP 水平较健康对照组轻度升高($P<0.05$),见表 1。

表 1 COPD 患者和健康对照组测定的结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FIB(g/L)	FDP(mg/L)	D-D(mg/L)
COPD 组	350	5.18±1.51 ^a	6.95±3.17 ^a	2.38±1.12 ^a
AECOPD 组	190	5.97±1.85 ^{ac}	7.53±3.25 ^{ac}	3.17±1.52 ^{ac}
COPD 稳定组	160	3.51±0.87 ^b	4.71±1.38 ^b	0.87±0.43 ^a
健康对照组	50	3.27±0.54	3.98±1.24	0.23±0.20

注:与健康对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与 COPD 稳定组比较,^c $P<0.01$ 。

3 讨 论

由于肺部血管存在着大量的受体和活血管性物质,当其肺部血管内皮细胞受到刺激、损伤及激活后,可导致其功能紊乱,大量的炎症介质被释放,从而激活凝血及纤溶系统。

COPD 患者存在长期气流受限及高血黏度和高碳酸血症等因素,加上肺部感染可激活肺血管平滑肌旁的内皮细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等,从而使这些细胞释放出组织因子和一系列血管活性物质(如前列腺素、白三烯、血栓素、血小板激活因子等),引起血小板黏附、聚集功能增强,使血液黏稠度增高、微血栓形成等,从而导致继发性纤溶亢进,造成 COPD 患者血浆 FIB 及 D-D 升高^[4-5]。曾有文献报道,AECOPD 患者在静脉滴注肝素后,其血浆 D-D、FIB 等凝血指标显著下降。由此认为,对 AECOPD 患者采用适当的抗凝治疗是可行的,其可能延缓慢性支气管炎向肺心病的发展过程。

本研究结果显示,COPD 患者组的 FIB、FDP 和 D-D 值较健康对照组明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$);AECO-

PD 组 FIB、FDP 和 D-D 水平较 COPD 稳定组和健康对照组的 结果升高明显,差异均有统计学意义($P<0.01$);但 COPD 稳定组与健康对照组比较,除 D-D 升高明显外($P<0.01$),FIB 和 FDP 水平较健康对照组轻度升高($P<0.05$)。以上结果表明,COPD 进展为 AECOPD 时,FIB、FDP 和 D-D 均明显升高,这说明 AECOPD 患者体内存在着高凝状态和纤溶亢进,很可能导致血栓的发生率进一步增大。

综上所述,监测 COPD 患者的体内的 FIB、FDP 和 D-D 水平,为 COPD 患者体内存在高凝状态和原发性与继发性纤溶亢进提供了可靠的依据,进一步为临床医生适当抗凝治疗控制病情的进一步发生提供可靠依据,预防 COPD 患者血栓的形成及 DIC 的发生。

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺病疾病诊治指南(2007 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2007,30(4):8.

[2] Minino AM,Xu J,Kochanek KD. Deaths:Preliminary data for 2008[J]. National Vital Statistics Reports,2010,59(2):1-71.

[3] 乔人立,Davidson BL,Marciniuk D. 有关慢性阻塞性肺疾病的几个值得关注的问题[J]. 中华结核和呼吸杂志,2012,35(1):73-74.

[4] 黄河. 慢性阻塞性肺病患者血浆纤维蛋白原、D-二聚体监测的临床意义[J]. 长江大学学报: 自科版医学卷,2009,6(4):104-105.

[5] Bisioendial RJ,Levi M,Tak PP,et al. The prothrombotic state in rheumatoid arthritis;an additive risk factor for adverse cardiovascular events[J]. Semin Thromb Hemost,2010,36(4):452-457.

(收稿日期:2013-03-25 修回日期:2013-04-12)

(上接第 2656 页)

关系,另一方面也表明 Oct4 基因在宫颈癌的发生包括感染高危型 HPV 后的结局中起着重要作用。研究干细胞相关基因在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的表达及其作用机制对探索宫颈癌发生的机制具有重要意义。

参考文献

[1] Hochedlinger K,Yamada Y,Beard C,et al. Ectopic expression of OCT-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues[J]. Cell,2005,121(3):465-477.

[2] Chen YC,Hsu HS,Chen YW,et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells[J]. PLoS One,2008,3(7):e2637.

[3] Alhajj M,Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells[J]. Oncogene,2004,23(43):7274-7282.

[4] Feng D,Peng C,Li C,et al. Identification and characterization of Cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri[J]. Oncol Rep,2009,22(5):1129-1134.

[5] Singh SK,Clarke ID,Hide T,et al. Cancer stem cells in nervous system tumors[J]. Oncogene,2004,23(43):7267-7273.

[6] 邱江锋,张志奇,尤俊,等. 胃癌组织中 Oct4 表达及其临床病理意义的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2011,18(5):342-344.

[7] Liu D,Zhou P,Zhang L,et al. Differential expression of Oct4 in HPV-positive and HPV-negative cervical Cancer cells is not regulated by DNA methyltransferase 3A[J]. Tumour Biol,2011,32(5):941-950.

(收稿日期:2013-02-23 修回日期:2013-04-18)