

GRPR 在宫颈疾病中的表达及临床意义 *

郑 丹¹ 张志强² 谭文华^{3△}

(1 哈尔滨市红十字中心医院妇产科 黑龙江 哈尔滨 150076; 2 哈尔滨市第一医院普外科 黑龙江 哈尔滨 150010;

3 哈尔滨医科大学附属第二医院妇产科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:研究胃泌素释放肽受体(GRPR)在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤样病变(CIN)、宫颈癌中的表达,探讨 GRPR 在促癌发生和癌生长等方面的生物学功能。**方法:**采用免疫组化 SP 法检测 GRPR 在 28 例宫颈癌、51 例宫颈上皮内瘤变和 15 例正常宫颈组织中的表达情况,其中以正常宫颈组织作为对照。**结果:**在正常宫颈和宫颈癌组织中,GRPR 阳性表达率分别为 20%和 92.9%。GRPR 在 CIN I、CIN II、CIN III 中阳性表达呈上升趋势,差别无统计学意义。宫颈癌组的不同临床分期、有无淋巴结转移组间比较,GRPR 的阳性表达率均有显著性差异,并随病情严重程度的增加,阳性率增高,其表达强度呈显著正相关。**结论:**GRPR 的过度表达与宫颈癌的发生、发展有关,是宫颈癌发生的早期事件,其检测可作为评估宫颈癌恶性程度、判断预后及指导治疗的重要参考指标。

关键词:GRPR;宫颈癌;宫颈上皮内瘤变

中图分类号:R737.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-530-04

Clinical Significance and Expression of Gastrin-releasing Peptide Receptor in Cervical Diseases*

ZHENG Dan¹, ZHANG Zhi-qiang², TAN Wen-hua^{3△}

(1 Obstetrics and Gynecology, Red Cross Central Hospital of Harbin, Harbin 150076, China; 2 General Surgery, First Hospital of Harbin, Harbin, 150010, China; 3 Obstetrics and Gynecology, The Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150086, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of GRPR in normal cervical tissue, CIN and cervical cancer, and to explore the function of the GRPR during the incidence and growth in tumor promotion. **Methods:** The expression of GRPR in 28 cases of cervical cancer, 51 cases of CIN and 15 cases of normal cervical tissues was detected by immunohistochemical staining, while the normal cervical tissue were used as normal control. **Results:** In normal cervix and cervical cancer tissues, GRPR positive expression rates were 20% and 92.9%. The expression of the GRPR in CIN I, CIN II, CIN III showed an upward trend, and the difference was no significant. Between the groups of different clinical stages of cervical cancer, availability of lymph node metastasis, the positive expression rate of GRPR had significant difference, and with the increasing in the severity of the disease, the positive rate increased. And both intensity of expression was significantly positively related to. **Conclusions:** The over-expression of GRPR was associated with the occurrence and the development of cervical cancer, and the two indexes joint-detection can be used as assessment of the degree of malignancy of cervical cancer.

Key words: GRPR; Cervical cancer; CIN

Chinese Library Classification: R737.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-530-04

前言

宫颈疾病是常见的妇科疾病,而宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,在全球妇女恶性肿瘤中居第 2 位。每年全球约有 50 万宫颈癌新发病例,其中大约有 1/2 死于此病^[1]。宫颈癌前病变的筛查直接关系到宫颈癌的治疗及预后,早期诊断、治疗宫颈癌前病变可阻断宫颈癌的发生,从而有效减低宫颈癌的发病率和死亡率。

流行病学证据证实绝大多数的宫颈癌变归因于人乳头瘤状病毒感染,但并不是所有感染 HPV 的患者都经历从最初的

非侵袭性感染到肿瘤发生的过程。宫颈癌前驱病变漫长,其发生还有许多其他因子的参与^[2-3]。因此,检测某些特异性生物分子,有望提高诊断的特异性,降低漏诊率。学者们多从细胞周期调节相关蛋白和细胞凋亡相关因子等方面进行研究^[4-5],而对于胃泌素释放肽受体(gastrin-releasing peptide receptor, GRPR)与宫颈癌的关系则研究甚少。本研究力求通过免疫组化法观察正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤样病变、宫颈癌中 GRPR 的表达,从而进一步探索 GRPR 在促癌发生和癌生长等方面的生物学功能。以期从一个崭新的角度探讨宫颈癌的发生发展过程,由此启发我们可获得另一有效的肿瘤诊断策略,为肿瘤的治疗和预

* 基金项目:黑龙江省重点科技攻关指导项目计划(GZ09C112)

作者简介:郑丹(1976),女,硕士研究生,主要研究方向:妇产科的手术操作,

电话:13019000147 E-mail:947417091@qq.com

△通讯作者:谭文华(1962),男,教授, E-mail:tanwenhua1962@126.com

(收稿日期:2010-11-02 接受日期:2010-11-28)

后奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究随机选取了哈尔滨医科大学第二临床医学院 2009 年 6 月至 2010 年 6 月间手术切除的宫颈组织石蜡包埋标本 94 例为研究对象。包括正常宫颈 15 例, 宫颈上皮内瘤变 51 例, 宫颈癌 28 例。宫颈上皮内瘤变包括 CIN I 16 例, CIN II 13 例, CIN III 22 例。FIGO(2000)标准分期: 宫颈癌 I 期 10 例, II 期 16 例, III 期 2 例; 肿瘤病理分化程度: 高度分化(G1) 16 例, 中低度分化(G2-G3) 12 例; 有腹腔淋巴结转移 6 例, 无转移 22 例; 肌层浸润($\leq 1/2$) 16 例, ($> 1/2$) 12 例。患者年龄 33~70 岁, 平均 50.5 岁。另取正常宫颈组织作对照, 来源于因子宫肌瘤行子宫全切术后的标本。以上全部标本均经过病理证实, 术前未进行过放、化疗及肿瘤药物治疗。

1.2 方法

GRPR OPA1-15619; 兔抗人多克隆抗体购自上海优维宁生物科技有限公司。SP 免疫组化试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司。实验方法采用免疫组化(SP 法)染色, 严格按照试剂盒说明书求操作, 石蜡包埋连续切片, 脱蜡水化, 3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶, 0.01mol/L 柠檬酸缓冲液高压修复抗原, 然后加

入一抗、二抗, 孵育反应, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封固。兔抗人 GRPR 单克隆抗体为美国 ABR 公司产品, 抗体的稀释浓度为 1:50。每次实验均以已知阳性片作阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

显微镜下观察 GRPR 的表达情况。每份标本在高倍镜下($\times 400$)或($\times 200$)随机选择 5 个视野($\times 200$), 共计 1000 个, 阳性细胞数 $< 5\%$ 为阴性(-), 5-10% 为弱阳性(+), 11-50% 为中度阳性(++), $> 50\%$ 为强阳性(+++)。免疫组化中分别用试剂公司提供的 GRPR 的阳性对照作对照, 用 PBS 代替一抗做阴性对照, 用已知阳性切片做阳性对照。在石蜡切片中 GRPR 阳性染色主要定位于细胞浆, 呈现棕黄色颗粒。

1.4 统计学处理

数据处理采用统计软件 SPSS13.0 软件进行处理, 采用 χ^2 检验及 spearman 等级相关分析。检验水平以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

GRPR 阳性表达主要分布于细胞浆内, 细胞核少量表达, 镜下棕黄色颗粒, 其阳性表达细胞主要出现在肿瘤浸润边缘或坏死明显的区域。GRPR 在正常宫颈组织可见少量表达。

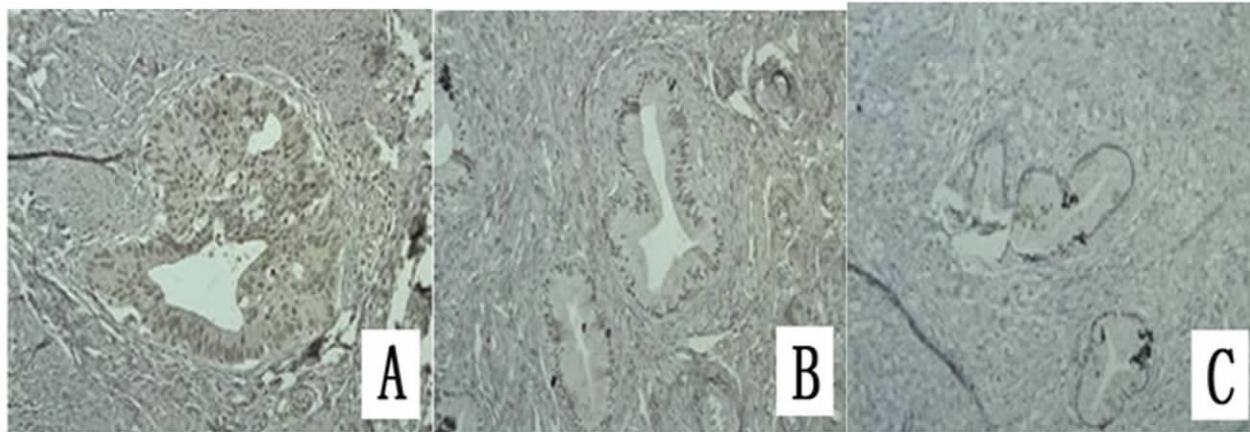


图 1 S-P 染色显示 GRPR 在宫颈组织的表达:A:GRPR 在宫颈癌中呈阳性表达($sp \times 200$);B:GRPR 在宫颈上皮内瘤变中呈阳性表达($sp \times 400$);C:GRPR 在正常宫颈组织中呈阴性表达($sp \times 400$);

Fig.1 SP staining showed GRPR expression in cervical tissue:A:positive for GRPR expression in cervical cancer($sp \times 200$);B:positive for GRPR expression in CIN ($sp \times 400$); C:GRPR in normal cervical tissue were negative expression($sp \times 400$)

2.1 GRPR 在宫颈上皮内瘤变、宫颈癌及正常对照中的表达

GRPR 在正常宫颈组织、CIN 和宫颈癌中的阳性表达率分别为 20%、78.4%、92.9%, 三者呈逐渐上升的趋势, 三者之间存在显著性差异($p < 0.05$)。正常宫颈组织中 GRPR 极少量表达, 在 CIN 中有中等量表达, 二者明显低于宫颈癌组($p < 0.01$)。宫颈癌组 GRPR 的阳性表达与正常对照组间差异显著($p < 0.01$), 且与 CIN 组差异显著($p < 0.05$)。GRPR 在 CIN I、CIN II、CIN III 中表达率分别为 75%、76.9%、81.8%, 呈逐渐上升趋势, 但无统计学

差异($p > 0.05$)(表 1)。

2.2 GRPR 和在宫颈癌中的表达

GRPR 阳性表达表现为随肿瘤恶性程度的增加和病变的进展而上升。随着临床分期的进展, GRPR 阳性表达率逐渐升高, 分别为 80%、87.5%、100%, 三者之间存在显著性差异($p < 0.05$); GRPR 的高表达与组织学分化程度有关($p < 0.05$), 差异有统计学意义 ($p < 0.05$); GRPR 与肌层浸润无关 ($p > 0.05$); GRPR 与淋巴结转移有关($p < 0.05$)(表 2)。

表 1 GRPR 在宫颈上皮内瘤变、宫颈癌及正常对照中的表达

Table 1 GRPR in cervical intraepithelial neoplasia ,cervical cancer and normal control of expression

Group	Number	Expression of GRPR				Positive rates(%)
		-	+	++	+++	
Normal control	15	12	3	0	0	20
CIN	51	11	25	13	2	78.4
CIN I	16	4	8	4	0	75
CIN II	13	3	5	5	0	76.9
CIN III	22	4	12	4	2	81.8
Cervical cancer	28	2	14	8	4	92.9

表 2 GRPR 在宫颈癌中的表达

Tabel 2 GRPR in cervical cancer of expression

Clinical pathology parameters	Number	GRPR		Positive rates(%)
Clinical stages		+	-	
I	18	8	2	80
II	16	14	2	87.5
III	2	2	0	100
Pathology classification				
G1	16	14	2	87.5
G2~G3	12	12	0	100
Lymph node metastasis				
Have	6	6	0	100
Not have	22	20	2	90.9
Muscular layer infiltration				
≤ 1/2	16	10	6	62.5
>1/2	12	10	2	83.3

3 讨论

胃泌素释放肽受体 GRPR 是一种蛙皮素样肽受体,位于细胞膜上,由 384 个氨基酸构成,属于含 7 个疏水跨膜区的 G 蛋白偶联受体。GRPR 分布于整个胃肠道及中枢神经系统等处。在中枢神经系统、消化系统、胎儿肺细胞增生和分化及免疫学方面有许多重要的生理功能^[6-9]。

GRP 与肿瘤中的受体 GRPR 结合后,可启动一系列信号传导通路及基因调控机制,从而促进肿瘤细胞的增殖。GRPR 在正常组织和肿瘤组织中的激活作用有重要的生长效应,且在恶性肿瘤中的表达比在正常的人体组织更为普遍^[10]。GRPR 在多种肿瘤细胞系表达^[11-14],约 62%的肿瘤同时表达 GRP 和 GR-PR,它们总是共同存在于早期或晚期癌组织中,并且在转移灶很少能检测到。GRP 与 GRPR 的共同表达被认为是在所有分化良好的肿瘤中,反之在分化不良的肿瘤中无共同表达。因此,在肿瘤的诊断与治疗方面 GRPR 已得到了广泛的应用^[15-17]。

研究证实卵巢肿瘤^[18-19]、正常子宫组织以及子宫良恶性肿瘤^[20]中 GRPR 均有不同程度的表达。最近 Cornelio DB 等首次

成功论证了 GRPR 可广泛表达在人类宫颈癌中^[21]。他们选择宫颈肿瘤样本 88 例(包括 CIN I 22 例、CIN II 19 例,CINIII 26 例,鳞癌 13 例,腺癌 8 例)和非肿瘤宫颈组织 14 例。用免疫组化方法证实 GRPR 在 99%的肿瘤样本中(从侵袭前的 CIN I 到侵袭性癌)可被检测到,大多显示弥漫性强染色。肿瘤样本的宫颈内膜只有 15%呈现弱染色,因而被认为阴性。邻近肿瘤的宫颈阴道部 63.8%表达 GRPR,且均不显示强染色。非肿瘤宫颈样本分析 85.7%宫颈内膜无 GRPR 表达,100%宫颈阴道部 GRPR 阴性。此研究也证实了非肿瘤样本中 GRPR 存在于子宫基质细胞和子宫肌层,而非正常宫颈组织。存在于肿瘤和周围组织的 GRPR 可以促进宫颈癌发生过程。GRPR 的表达与侵袭前和侵袭性肿瘤无相关性。

这是人类宫颈癌研究一个新的突破,但目前 GRPR 与宫颈癌的相关研究甚少,还有诸多未解之谜有待我们进一步探讨。因此我们也进行了相关的研究,期望能够有助于宫颈癌的早期诊断和治疗。

本研究采用免疫组化法对 GRPR 进行研究,结果显示在 28 例宫颈癌组织中有 26 例(92.9%)GRPR 表达呈阳性,明显高

于正常宫颈组织及 CIN, 这与 Lango MN^[2]等报道一致。表达部位主要集中在肿瘤坏死明显的区域和肿瘤浸润的边缘, 阳性细胞表达集中在细胞浆内, GRPR 在癌旁组织中少表达, 在正常宫颈组织中极少量表达, 良性与恶性之间存在显著性差异 ($p < 0.01$), 这与 Cornelio DB 等报道一致; GRPR 阳性表达率在 CINI→CINII→CINIII 之间逐渐升高, 但无显著差异 ($P > 0.05$); GRPR 阳性表达与肿瘤的临床分期、组织分化程度和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 与肌层浸润无关 ($P > 0.05$)。并且 GRPR 阳性表达与组织分化程度呈正相关, 恶性程度越高其阳性率越高, 随着临床分期、宫颈浸润深度的增加, GRPR 的表达也有明显升高。因此可以推测 GRPR 与其特异性配体 GRP 结合后, 发生磷酸化, 可能通过激活其特定的信号传导通路, 对淋巴管内皮细胞产生特异性的致分裂作用, 促使淋巴管内皮细胞分裂增殖, 诱导淋巴管生成, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移。本研究发现在肿瘤组织中可见肿瘤周边的新生淋巴管、扩张的淋巴管、有癌栓的淋巴管内皮细胞 GRPR 呈高表达。由此可得出结论: 生长因子 GRP 及其受体 GRPR 是信号传导通路中的基本组成部分, 它对促进细胞生长、分化、增殖起重要作用。一种生长因子与受体结合后, 大多数都能激活不同的传导通路。在宫颈癌的发生、发展过程中, 如果 GRP 和 GRPR 处于异常活化状态, 导致细胞信号传递网络的异常, 则出现细胞增殖失控、凋亡受阻、细胞具有侵袭与转移能力等变化。

综上所述, ①GRPR 的过度表达, 在宫颈癌的发生发展过程中具有重要作用, 其表达水平随着宫颈癌恶性程度的增加而增加。②GRPR 在宫颈癌中的表达与临床分期、组织分化程度和淋巴结转移有关, 和肌层浸润无关, 说明 GRPR 是参与宫颈癌发生的早期事件, 并和恶变转移有关。

现阶段的研究并未发现一种理想的分子标志物为 CIN 和宫颈癌所专用, 这为目前该研究领域存在的主要问题。相信随着对 GRPR 研究的进展, 特别是对宫颈癌病因学研究的深入和科研工作者不懈的努力和探索, 在这一领域一定会有更大飞跃。本实验通过免疫组化证实 GRPR 在宫颈癌组织中确有表达, 除在恶性肿瘤组织中高表达外, 在交界性肿瘤也有表达。它在肿瘤演进中的变化显示其癌变早期可以发挥生物学功能, 故有可能用于肿瘤的早期诊断。今后可定量分析它在宫颈癌的表达, 以期成为一种有价值的肿瘤标志物。

参考文献(References)

- [1] Shibuya K, Mathers CD, Boschi PC, et al. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease[J]. BMC Cancer, 2000, 2(1):37
- [2] Appleby P, Beral V, Berrington de González A, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16, 573 women with cervical cancer and 35, 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies [J]. Lancet, 2007, 370(9599):1609-1621
- [3] International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies[J]. Int J Cancer, 2006, 119(5): 1108-1124
- [4] Ogawa E, Okuyama R, Ikawa S, et al. p51 /p63 inhibits ultraviolet B 2induced apoptosis via Akt activation [J]. Oncogene, 2008, 27 (6) : 848-856
- [5] Turkuoglu I, Tezcan S, Kaygusuz G, et al. The role of p53, Bcl2 and Ki67 in premalignant cervical lesions and cervical cancer [J]. Eur J Gynecol Oncol, 2007, 28 (4) : 290-293
- [6] Karatsoreos IN, Romeo RD, McEwen BS, et al. Diurnal regulation of the gastrin-releasing peptide receptor in the mouse circadian clock [J]. Eur Neurosci, 2006, 23:1047-1053
- [7] Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2006, 5(2):197-204
- [8] Presti TJ, de Lima MN, Scalco FS, et al. Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats: implications for an animal model of neurodevelopmental disorders[J]. Neuropharmacology, 2007, 52(3):724-732
- [9] Fekete EM, Bagi EE, Toth K, et al. Neuromedin C microinjected into the amygdala inhibits feeding[J]. Brain Res Bull, 2007, 71:386-392
- [10] Ter Beek WP, Muller ES, Van Hogezaand RA, et al. Gastrin releasing peptide receptor expression is decreased in patients with Crohn's disease but not in ulcerative colitis[J]. Clin Pathol, 2004, 157:1047-1051
- [11] Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1766(1):23-41
- [12] Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy[J]. Ann Oncol, 2007, 18(9): 1457-1466
- [13] Farias CB, Lima RC, Lima LO, et al. Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling [J]. Clin Translat Res, 2008, 75(1/2):27-31
- [14] Fleischmann A, Waser B, Reubi JC. High expression of gastrin-releasing peptide receptors in the vascular bed of urinary tract cancers: promising candidates for vascular targeting applications [J]. Endocr Relat Cancer, 2009, 16(2): 623 - 633
- [15] Cescato R, Maina T, Nock B, et al. Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting[J]. Nucl Med, 2008, 49(2):318-326
- [16] Li ZB, Wu ZH, Chen K, et al. 18F-Labeled BBN-RGD Heterodimer for Prostate [J]. Cancer Imaging Journal of Nuclear Medicine, 2008, (3):453-461
- [17] Christophe VW, Philippe Ph, Patrick P, et al. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in Human Breast Carcinoma Versus immunohistochemistry[J]. Nuclear Medicine, 2008, 49(2):260-264
- [18] Engel JB, Schally AV, Halmos G, et al. Targeted cytotoxic bombesin analog AN-215 effectively inhibits experimental human breast cancers with a low induction of multi-drug resistance proteins[J]. Endocr Relat Cancer, 2005, 12:999-1009
- [19] Fleischmann A, Waser B, Reubi JC. Overexpression of gastrin-releasing peptide receptors in tumor-associated blood vessels of human ovarian neoplasms[J]. Cell Oncol, 2007, 29(5):421-433
- [20] Fleischmann A, Waser B, Gebbers JO, et al. Gastrin-releasing peptide receptors in normal and neoplastic human uterus: involvement of multiple tissue compartments [J]. Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(8):4722-4729
- [21] Cornelio DB, Meurer L, Roesler R, et al. Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer [J]. Oncology, 2007, 73 (5/6): 340-345
- [22] Lango MN, Dyer KF, Lui VW et al. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Nat Cancer Inst, 2002, 94(5):375-383