

多个生物标志物预测宫颈上皮内瘤和宫颈癌的风险

张蕴霞¹ 姜君仪² 刘俊江³ 戴琪¹ 牛建清¹ 王健¹

(1 唐山市开滦有限责任公司医院妇产科 河北 唐山 063000 ;

2 上海长海医院泌尿外科实验室 上海 200433 3 唐山市开滦有限责任公司医院泌尿外科 河北 唐山 063000)

摘要 目的: 研究生物蛋白指标是否可以作为宫颈癌和高分级宫颈上皮内瘤样病变(CIN)的肿瘤标志物。方法: 采用免疫组织化学方法检测包括宫颈内皮瘤和宫颈癌在内的 292 例标本中 9 个蛋白指标的表达, 包括 E- 钙粘素(E-cadherin), 细胞外信号调节激酶-1(ERK-1), 基质金属蛋白酶-2(MMP-2), nm23-H1, 核因子 NF- κ B, p16INK4A, 存活素(survivin), 人端粒酶逆转录酶(hTERT), 血管内皮生长因子(VEGF-C), 然后采用统计方法进行分析, 构建变量模型, 计算反映指标与靶受体反应的特征曲线进行比较, 确定上述蛋白标记物在预测宫颈癌存活率以及高分级 CIN 的作用。结果: 所有个标记物中, nm23-H1 及 p16 INK4a 对宫颈癌的生存率的单变量分析有明显的意义, 在对所有标记物做细致详尽的分析后发现, 其中 3 个标记物(E- 钙粘素、VEGF-C、survivin)可对高分级的 CIN 进行预测。宫颈癌的生存率的有效预测因子中, 只有 nm23-H1 可以作为有效的预测因素。结论: 联合检测多个生物蛋白, 如 E- 钙粘素、VEGF-C、survivin 指标可以有效的预测高危 CIN 的恶变风险, 同时 nm23-H1 则可以为宫颈癌的预后提供参考。

关键词: 宫颈癌; 生物标志物; 宫颈上皮内瘤

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2012)10-1930-04

Predicting Progression of Cervical Intraepithelial Neoplasia, and Prognosis of Cervical Cancer with a Panel of Biomarkers Tested in Multivariate Modeling

ZHANG Yun-xia¹, JIANG Jun-yi², LIU Jun-jiang³, DAI Qi¹, NIU Jian-qing¹, WANG Jian¹

(1 Dept. of Obstetrics and Gynecology, The Hospital Kailuan Ltd, Tangshan 063000, China;

2 Dept. of Urology, The Hospital Changhai, Shanghai, 200433, China;

3 Dept. of Urology, The Hospital Kailuan Ltd, Tangshan, 063000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate if the 9 markers would be independent predictors of intermediate end point markers in cervical carcinogenesis. **Methods:** 9 markers (E-cadherin, ERK-1, MMP-2, nm23-H1, NF- κ B, p16INK4A, survivin, hTERT, VEGF-C) were Immunohistochemical (IHC) stained, then multivariate models were constructed to test predictive power of the markers for 2 outcomes. **Results:** In all the markers, the most powerful predictors of CIN2 (and above) lesions were E-cadherin, VEGF-C, survivin. The nm23-H1 was significant predictor of CC survival in univariate analysis. **Conclusions:** Combining multiple markers can accurate detection of high-grade CIN in a clinical setting, and the markers could be the indicators for the survival of cervical cancer.

Key words: Cervical cancer; Biomarkers; CIN

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1930-04

前言

生物标志物是可以衡量发病, 易感性或疾病状况的指标, 并广泛应用于监测肿瘤的发生和治疗效果。国内外许多专家都认为分子标志物在肿瘤的诊断方面具有广阔的前景, 因为其较细胞学检查而言, 在准确性和可重复性方面都有较大的提高, 而且还能用于对治疗效果进行监测^[1]。

研究结果表明不同的分子机制, 不同的蛋白表达, 其发生宫颈癌的危险性是不同的, 对宫颈癌来说, 一些分子蛋白的表达, 与肿瘤的预后也有十分密切的关系。所以对这些分子生物学指标进行深入的分析, 对宫颈癌的发病风险进行科学的预测, 以期对高风险患者进行监测和早期诊断治疗, 将会明显提

高肿瘤的诊治水平^[2-4]。

本研究分析了包括细胞粘附, 侵袭, 血管生成, 转移, 细胞增殖, 细胞周期, 细胞调控等方面的 9 个分子生物学指标, 以了解这些指标的表达是否能够预测高分级 CIN 患者的发生宫颈癌的危险性, 以及是否能够在宫颈癌的预后研究方面, 提供有效的参考指标。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究选择我院 2008-2009 年间的 292 例诊断为宫颈鳞状细胞癌或 CIN 的宫颈组织标本。所有入选患者在接受治疗以后, 每 6 个月随访一次, 随访的方法为阴道窥镜检查, 宫颈刮片, 巴氏细胞学分析, 组织活检。所有的患者中, 宫颈鳞癌 150 例, CIN142 例, 由病理科医师分为 CIN Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级, 其中 Ⅰ级 20 例、Ⅱ级 21 例、Ⅲ级 101 例。另外 10 例正常宫颈组织标本作为

作者简介: 张蕴霞(1967-), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤。E-mail: zhangyunxia67@163.com

(收稿日期: 2011-08-09 接受日期: 2011-09-01)

对照。

1.2 方法

采用免疫组织化学检查方法对所获得的 292 例组织进行 9 个标记物的染色,分别为 E-钙粘素(E-cadherin) 细胞外信号调节激酶-1(ERK-1) 基质金属蛋白酶-2(MMP-2), nm23-H1, 核因子 NF- κ B, p16INK4A, 存活素(survivin), 人端粒酶逆转录酶(hTERT), 血管内皮生长因子(VEGF-C)。采用免疫组化的方法, SP 法试剂盒(康为世纪公司试剂盒), 首先进行抗原修复, 内源性过氧化物酶封闭、蛋白封闭非特异性结合位点, 滴加鼠抗人或者兔抗人单克隆抗体(1:100 稀释), 然后按照试剂盒说明操作, 进行染色。对所有免疫组化染色结果进行评估, 由两名有经验的病理科医师分别进行评估, 最后取二者的平均值作为最终的免疫组化染色结果。

1.3 统计方法

统计分析采用 SPSS14.0 统计软件。采用 Spearman 相关分析。对数回归模型使用逐步向后推进统计方法。单个标记物或一组标记物的反应指标(敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和 95% 置信区间)在预测高分级 CIN 和宫颈癌存活时, 由 Stata9.2 统计软件计算, 并且计算了其特征曲线下的面积, 用来比较不同单个标记物在预测疾病的差别。存活率表(宫颈癌整体存活率)是基于 Kaplan-Meier 法计算而得。通过 Cox 比例风险模型在一个滞后的对数似然环境下, 运行多变量存活率分析测试。在所有测试中 $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

免疫组织化学染色的结果发现, 由肿瘤组织到高级别 CIN, 到低级别 CIN, E-钙粘素、ERK-1、MMP-2、NF- κ B、hTERT、VEGF-C 表达都明显下降, 而 nm23-H1 表达上升, 其他 P16 INK4a 表达下降, survivin 表达减弱。宫颈组织 CIN3 中 survivin 表达见图 1, P16 INK4a 在 CIN2 和宫颈癌组织中的表达见图 2。

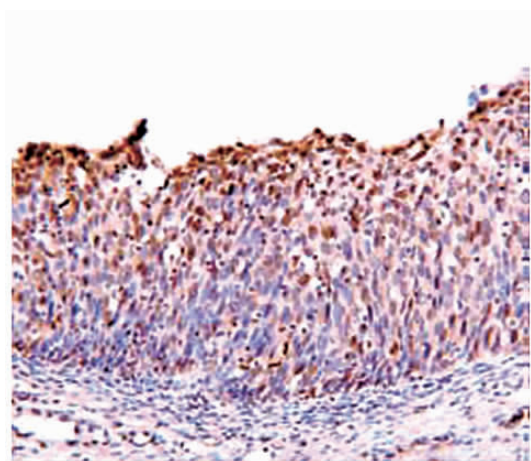


图 1 CIN3 宫颈组织中 survivin 表达

Figure 1 The survivin expression in the cervical tissues with CIN3

通过使用使用双变量相关性(Spearman)测试, 计算 9 个生物标记物的相关值。大部分的标记物都集中在 $P = 0.0001$ 左右。有几个标记物之间没有显著相关性, E-钙粘素不与

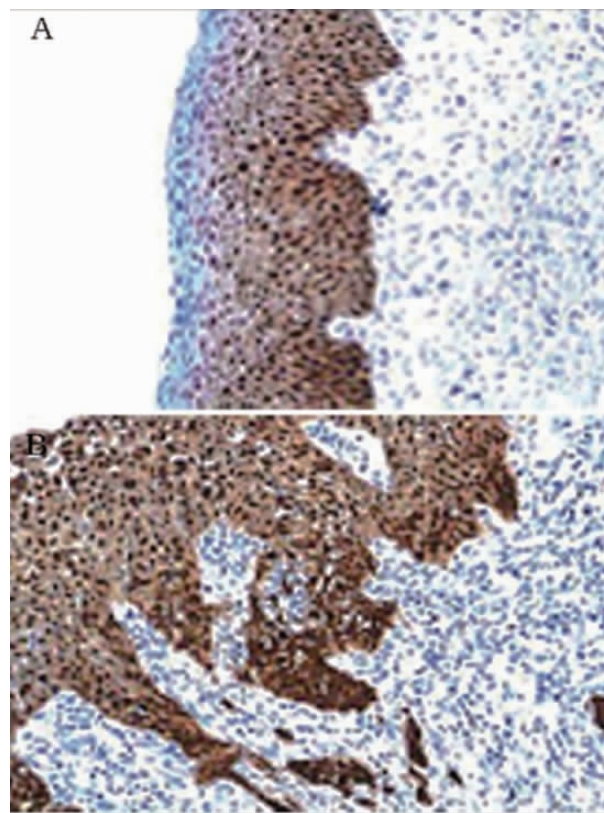


图 2 CIN2 和宫颈癌组织中 P16 的表达(A 宫颈组织 CIN2; B 宫颈癌组织)

Figure 2 The p16 expression in the cervical tissues with CIN2 and cervical cancer

nm23-H1 相关, NF- κ B 与 nm23-H1 没有关联性, 且 nm23-H1 是与 survivin 无关。生物标记物在预测高分级 CIN (CIN2 和 CIN3) 及宫颈癌存活率的水平总结于表 1。对所有标记物而言, CIN2 的 cutoff 值比 CIN3 的 cutoff 值有更高的比值比。针对 CIN2 和更高级别的病变, 最有效的预测因子为 VEGF-C (OR, 78)。但是, 由于所有 CIN2 病变中 MMP-2 是阳性, 所以无法计算其比值比。

所有个标记物中, nm23-H1 及 p16 INK4a 对宫颈癌的生存率的单变量分析有明显的意义。前者的表达提示宫颈癌患者生存率较好(OR 值分别为 0.38 和 0.35), 而 p16INK4a 过量表达通常提示有良好的预后(OR 值为 2.7), 虽然这个结果难以合理的进行解释^[5]。在对所有标记物做细致详尽的分析后发现, 其中 3 个标记物可对高分级的 CIN 进行预测。(见表 2)。尽管这 3 个因子的 OR 值较高, 但是在多变量分析中, 其他的因子并不具有对疾病的预测能力。宫颈癌的生存率的 3 个有效的预测因子中, 只有 nm23-H1 可以作为有效的预测因素(见表 2)。

3 讨论

子宫颈癌是全球妇女最常见的恶性肿瘤^[6,7], 因此, 宫颈癌前病变的筛查和宫颈癌预后的监测对预防宫颈癌具有重要意义。常规宫颈涂片法, 由于制片受多种因素影响, 阳性率很低^[8], 而近年来随着分子生物研究的深入发现, 一些分子蛋白的表达, 与宫颈癌的发病和预后有着密切的关系^[9-12]。本研究选择了近年来在宫颈癌方面研究比较多的分子蛋白, 通过免疫组化的

表 1 单变量分析预测高分级 CIN、高危 HPV 感染以及宫颈癌存活率的结果

Table 1 The univariate analysis results of survival rate of in the cervical cancer patients with high grade CIN & HPV infection

	Results		
	CIN2	CIN3	Survival rate
	OR value		
E-cadherin	9.62± 6.46**	6.92± 8.41**	1.73± 1.24
Survivin	24.53± 16.2**	15.16± 11.44**	0.95± 1.21
MMP - 2	NC	20.76± 18.42**	0.49± 0.37
NF-κ B	7.72± 4.33**	3.58± 4.26**	1.17± 0.65
nm23	12.39± 8.93**	8.78± 4.27**	0.3± 0.42*
p16INK4a	16.06± 11.07**	8.13± 3.79**	2.12± 1.33*
ERK-1	14.77± 9.78**	13.06± 8.79**	1.22± 0.86
hTERT	28.52± 18.69**	18.83± 9.27**	0.76± 0.63
VEGF-C	78.18± 23.27**	20.37± 12.48**	0.93± 0.36

Note:*P<0.05 **P<0.01

表 2 多变量分析预测高分级 CIN 以及宫颈癌存活率的结果

Table 2 The multivariate analysis results of survival rate of in the cervical cancer patients with high grade CIN

	Results	
	Adjusted OR value	P 值
	High grade CIN	
E-cadherin	20	0.008
VEGF-C	34	0.005
Survivin	17	0.001
Cervical cancer patients survival rate		
nm23	2.1	0.03

方法对宫颈组织中这些蛋白的表达进行检测,再通过统计学分析,找出一些更能预测肿瘤发病和进展的指标。

本研究结果表明, survivin、VEGF-C 和 E- 钙粘素是能有效的预测高分级 CIN 的疾病进展。有研究表明, CIN 病变中出现 survivin 表达上调, survivin 能够抑制 P53 蛋白的表达,而后者是目前公认的抑癌基因^[13,14]。也有研究发现, survivin 的表达提高了端粒酶的活性,而端粒酶与肿瘤的发生、进展具有明显的相关性^[15]。而在宫颈癌细胞系 HeLa 的研究中表明, ρ -Myc 基因介导 hTERT 的转录,而 hTERT 则能够导致 survivin 的降解^[16]。Nm23 基因定位于 17 号染色体长臂 22 区,该位点被认为非常靠近 p53 基因位点,是许多肿瘤形成基因定位及易发生等位基因杂合性缺失的区^[17]。研究发现,癌细胞转移能力与该基因 mRNA 水平呈负相关,因而将其命名为肿瘤转移抑制基因,而且 nm23 与肿瘤细胞转移关系非常密切。

在所有研究的因子中,只有 nm23-H1 与宫颈癌的预后有关, nm23-H1 与宫颈癌的进展关系密切,在高分级的 CIN 和晚期肿瘤中表达下降。

本研究结果表明,除了目前比较公认的病理分期、CIN 病

变等可以用于诊断和预测宫颈恶性疾病的发病和进展以外,一些细胞蛋白的表达也与肿瘤的发病和进展关系十分密切,比如 nm23 的表达可以有效的预测宫颈癌的预后,联合进行多个蛋白的检测,可以有效的预测高分级 CIN 的宫颈癌的发病风险,而对于宫颈癌患者,可以预测其预后。因此,随着宫颈癌研究的进一步深入,诊断治疗水平进一步的提高,上述蛋白会在未来的宫颈癌的预防和预后方面发挥更重要的作用。

参考文献(References)

- [1] Sardi JE, Boixadera MA, Sardi JJ. A critical overview of concurrent chemoradiotherapy in cervical cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2004,6: 463-470
- [2] Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, et al. Versican expression in human cervical cancer[J]. Eur J Cancer, 2007, 43:1460-1466
- [3] Yim EK, Park JS. Role of proteomics in translational research in cervical cancer[J]. Expert Rev Proteomics, 2006, 3: 21-36
- [4] Bhattacharya P, Sengupta S. Predisposition to HPV16/18-related cervical cancer because of proline homozygosity at codon 72 of p53 among Indian women is influenced by HLA-B*07 and homozygosity of HLA-DQB1*03[J]. Tissue Antigens, 2007, 70(4): 283-293

- [5] Branca M, Ciotti M, Santini D, et al. p16INK4A expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome [J]. Int J Gynecol Pathol, 2004, 23: 35-Y65
- [6] World Health Organization Reproductive Health and Research, Chronic Diseases and Health Promotion, et al. Comprehensive cervical cancer control : A guide to essential practice [C]. Geneva: World Health Organization, 2006, 15
- [7] De Vuyst H, Gichangi P, Estambale B, et al. Human papillomavirus types in women with invasive cervical carcinoma by HIV status in Kenya[J]. Int J Cancer, 2008, 122(1): 244-246
- [8] Rouzier R, Uzan C, Collinet P. HPV vaccination: principles, results and future perspectives [J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2007, 36(1): 13-18
- [9] Cheng Q, Lau WM, Chew SH, et al. Identification of molecular markers for the early detection of human squamous cell carcinoma of the uterine cervix[J]. Br J Cancer, 2002, 86: 274-281
- [10] Gray LJ, Herington CS. Molecular markers for the prediction of progression of CIN lesions[J]. Int J Gynecol Pathol, 2004, 23: 95-96
- [11] Suh DH, Kim JW, Kim K, et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2010[J]. J Gynecol Oncol, 2010, 21(4): 209-218
- [12] Branca M, Giorgi C, Santini D, et al. Aberrant expression of a novel inhibitor of apoptosis (Survivin) is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but does not predict virus clearance after cone or prognosis in cervical cancer [J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124: 113-121
- [13] Li QX, Zhao J, Liu JY. Survivin Stable Knockdown by siRNA Inhibits Tumor Cell Growth and Angiogenesis in Breast and Cervical Cancers[J]. Cancer Biology & Therapy, 2006, (5): 860-866
- [14] Tu SP, Jiang XH, Lin MC. Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63: 7724-7732
- [15] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 127-134
- [16] Branca M, Giorgi C, Ciotti M, et al. Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus (HPV), virus persistence or disease outcome in cervical cancer [J]. Diagn Cytopathol, 2006, 34: 739-748
- [17] Tessema M, Yu YY, Stidley CA, et al. Concomitant promoter methylation of multiple genes in lung adenocarcinomas from current, former and never smokers[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(7): 1132-1138

(上接第 1942 页)

- Yang Wen-feng, Zhang Bai-jiang, Li Dao-tang, et al. Expression of transforming growth factor beta one (TGF- β 1) protein in esophageal tumor tissue [J]. China Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2005, 12(21): 1629-1631
- [7] 史加海, 刘俊华, 施公胜, 等. 食管鳞癌中 TGF- β 1、CDK 4 与临床病理因素关系的研究[J]. 临床消化病杂志, 2004, 16(2): 73-75
- Shi Jia-hai, Liu Jun-hua, Shi Gong-sheng, et al. Expression of TGF- β 1 and CDK 4 in Normal Esophageal Mucosa and Esophageal Squamous Cell Carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical Gastroenterology, 2004, 16(2): 73-75
- [8] 王强, 张斌, 胡维昱, 等. TGF- α 和 TGF- β 1 在胰腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2010, 13(5): 360-363
- Wang Qiang, Zhang Bin, Hu Wei-yu, et al. Expression and clinical implication of TGF- α and TGF- β 1 in pancreatic carcinoma [J]. Chinese Journal of Current Advances in General Surgery, 2010, 13(5): 360-363