



宫颈癌前病变和宫颈癌组织中凋亡相关基因survivin的表达及其与人乳头状瘤病毒感染的关系

宫颈癌是女性最常见的生殖道恶性肿瘤,全世界每年约有45万~50万妇女患病,我国每年新增宫颈癌病人13.51万左右[1],是仅次于乳腺癌而引起妇女癌症相关死亡的重要疾病。大多研究表明,人乳头状瘤病毒(HPV)感染与其发生、发展有密切关系,特别是高危型HPV[2]。近年来研究发现,细胞凋亡的抑制也参与了宫颈癌的发生、发展。survivin是新近发现的一种凋亡抑制基因,其独特的结构、特殊的组织分布和作用机制及明显的抗凋亡作用尤为引人注目。本研究着重探讨新的细胞凋亡基因survivin在宫颈癌前病变和宫颈癌组织中的表达及其与高危型HPV感染的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取2004年5月~11月手术切除或活检的宫颈上皮内瘤变(CIN)标本45例、宫颈癌标本31例,其中CIN I级23例、II~III级(包括原位癌)22例。宫颈浸润癌31例(鳞癌25例、腺癌6例);病理分级:高分化12例,中分化11例,低分化8例;临床分期: I期16例, II期10例, III~IV期5例。另选择10例正常宫颈组织作为对照。

1.2 主要试剂

浓缩型兔抗人survivin多克隆抗体购自美国Neomarker公司,即用型S-P免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司, Taq DNA酶购自Promega公司, dNTP购自晶美生物工程有限公司, 高危型HPV引物序列购自晶美生物工程有限公司, DNAMarker购自MBI公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化S-P法检测survivin的表达 采用S-P法,严格按照试剂盒说明书步骤进行。结果判断: survivin染色阳性信号为棕褐色颗粒,定位于细胞质或细胞核。用乳腺癌阳性片作为阳性对照, PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3.2 PCR法检测高危型HPV的感染率 实验步骤: (1)宫颈组织抽提DNA; (2)溶解模板DNA; (3)PCR扩增; (4)制胶、点样、电泳、染色; (5)扫胶、分析结果。阳性标本经扩增后可形成230~270 bp长度的特异条带,取10份阳性扩增产物经测序分析进一步证实。另外以正常胎盘组织DNA代替模板DNA为阴性对照,以生理盐水代替模板DNA为空白对照。

1.4 统计学处理

实验数据采用SPSS11.0 统计软件进行处理。统计学方法采用成组设计多个样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis法)、多个样本两两比较的秩和检验(Nemenyi法)、成组设计两样本比较的秩和检验(Wilcoxon两样本比较法)、 χ^2 检验及秩相关分析,以 $\alpha=0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 临床特点

(1)发病年龄：CIN I 级患者年龄26~56岁，中位年龄30.5岁；CIN II~III级患者年龄22~52岁，中位年龄36.0岁；宫颈浸润癌患者年龄25~66岁，中位年龄43.5岁。(2)临床症状：CIN I~III级患者以性交出血和(或)白带多为主(33/45, 73.3%)，无症状患者也占一定比例(12/45, 26.7%)；宫颈癌患者症状较明显，包括不规则阴道出血16例(51.6%)、性交出血11例(35.5%)，其他如白带增多、阴道排液、月经紊乱等4例(12.9%)。

2.2 正常宫颈、CIN及宫颈癌中survivin的表达

45例CIN病例中，有21例survivin表达阳性(图1)，其中CIN I 级7例，CIN II~III级14例；31例宫颈癌中，有26例survivin表达阳性(图2)，其中20例为鳞状细胞癌，6例为腺癌；10例正常对照宫颈组织中均无阳性表达。在正常宫颈组织中survivin的表达显著低于CIN II~III级及宫颈癌的表达($P < 0.05$)，而与CIN I 级的表达无统计学差别($P > 0.05$)。宫颈癌中survivin的阳性表达明显增高，与正常宫颈及CIN I 级的表达有统计学差异($P < 0.05$)；但与CIN II~III级的survivin表达却无显著差异($P > 0.05$)。将正常宫颈、CIN及宫颈癌中的survivin表达相比较，发现三者之间均有显著性差异($P < 0.05$)，从正常宫颈→CIN→宫颈癌，survivin表达逐渐增强。survivin表达在宫颈癌不同组织学分级之间具有显著性差异($P < 0.05$)，低分化的宫颈癌中survivin阳性表达显著高于高、中分化宫颈癌；而在不同年龄、临床分期及组织学分型中，survivin表达无统计学差异($P > 0.05$)，见表1。

表 1 survivin 表达与宫颈癌临床病理特征的关系

Tab.1 Relationship between survivin expression and clinicopathological characteristics of uterine cervical cancer

Item	Case	Survivin		Positivity rate (%)	P value
		(-)	(+)		
Age (year)					
>50	10	2	8	80.0	>0.05
≤ 50	21	4	17	81.0	
Clinical stages					
I	16	4	12	75.0	>0.05
II	10	1	9	90.0	
III-IV	5	1	4	80.0	
Histological grade					
Well differentiated	12	2	10	83.3	<0.05
Moderately differentiated	11	3	8	72.7	
Poorly differentiated	8	0	8	100	
Histological classification					
Squama	25	5	20	80.0	
Gland	6	0	6	100	

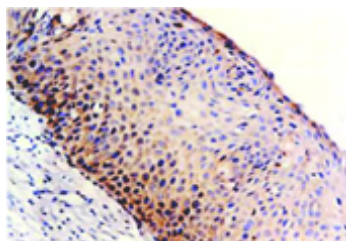


图1 survivin在CIN III级宫颈上皮异性细胞中阳性表达

Fig.1 Positive survivin expression in heterologous cells of cervical epithelium of CIN III grade (HE staining, original magnification: $\times 200$)

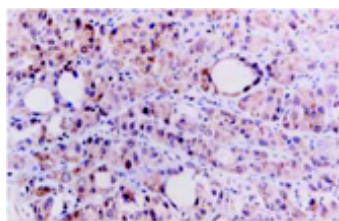


图2 survivin在宫颈腺癌癌细胞中阳性表达

Fig.2 Positive survivin expression in the cancer cells of cervical adenocarcinoma (HE staining, original magnification: $\times 200$)

2.3 正常宫颈、CIN及宫颈癌中高危型HPV的感染情况

高危型HPV在正常宫颈、CIN及宫颈癌的阳性表达率分别为10.0%、51.1%(CIN I级26.1%、CIN II~III级77.3%)和87.1%。正常宫颈与CIN II~III级及宫颈癌高危型HPV表达有显著差异($P < 0.05$)，同样CIN I级与CIN II~III级及宫颈癌的高危型HPV表达也存在显著差异($P < 0.05$)，而在正常宫颈与CIN I级、CIN II~III级与宫颈癌之间高危型HPV表达无统计学差别($P > 0.05$)。比较正常宫颈、CIN及宫颈癌中的高危型HPV感染情况，发现三者之间存在显著差异($P < 0.05$)，高危型HPV阳性率随着病理分级的加重而升高，见图3。高危型HPV感染率在宫颈癌不同年龄、临床分期、组织学分级及组织分型中均无统计学差异($P > 0.05$ ，表2)。

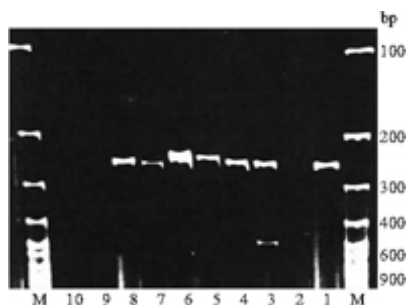


图3 高危型HPV-PCR扩增产物电泳图

Fig.3 Electrophoresis of PCR amplification product of high-risk HPV
Lanes 1, 3-8: Positive sample of high-risk HPV; Lane 2: Negative sample of high-risk HPV; Lane 9: Negative control; Lane 10: Blank control; M: DNA marker

表 2 高危型 HPV 表达与宫颈癌临床病理特征的关系

Tab.2 Relationship between high-risk HPV infection and clinicopathological characteristics of uterine cervical cancer

Item	Case	HPV[case(%)]		P value
		(-)	(+)	
Age (year)				
>50	10	8(80.0)	2(20.0)	>0.05
≤ 50	21	19(90.5)	2(9.5)	
Clinical stages				
I	16	13(81.3)	3(18.7)	>0.05
II	10	10(100.0)	0(0.0)	
III-IV	5	4(80.0)	1(20.0)	
Histological grade				
Well differentiated	12	9(75.0)	3(25.0)	>0.05
Moderately differentiated	11	10(90.9)	1(9.1)	
Poorly differentiated	8	8(100.0)	0(0.0)	
Histological classification				
Squama	25	23(96.0)	2(4.0)	>0.05
Gland	6	4(66.7)	2(33.3)	

2.4 高危型HPV感染与survivin表达的相关性

对31例宫颈癌中survivin与高危型HPV的表达进行等级相关分析, 结果表明两者表达呈正相关, Spearman相关系数为0.403, $P < 0.05$ 。

3 讨论

3.1 survivin在CIN及宫颈癌中的表达

在胚胎及胎儿期, survivin表达丰富, 而在正常成人终末分化组织中, 除了胎盘和胸腺微弱表达外, 其他组织基本很难检测到survivin的表达[3]。这与本实验结果是一致的。在10例正常对照宫颈组织中, 我们均未发现survivin阳性表达。本实验中检测survivin的表达, 其中CIN I级阳性表达率为30.4%, II~III级表达明显高于正常宫颈($P < 0.05$), 但与宫颈癌的表达无显著差异($P > 0.05$), 提示survivin的表达可能出现在宫颈癌恶性转化的早期, 并可能具有促进这些损伤恶性转化的作用。大量研究表明, survivin的表达可能与肿瘤的发生、发展和预后密切相关[4]。本组宫颈癌survivin阳性表达率83.8%, 显著高于在正常宫颈及CIN中的表达($P < 0.01$)。与王梅等[5]研究结果类似。同时本实验发现, 从正常宫颈→CIN→宫颈癌的演变中, survivin的表达率是逐渐升高的, 而且差别均有显著意义($P < 0.05$)。这表明survivin的再激活可能与宫颈癌的发生、发展密切相关。在对宫颈癌与survivin表达的关系研究中, 郑洪等[6]认为survivin表达与宫颈癌的组织学分级和临床分期有关。而本实验结果显示, survivin的表达与宫颈癌的组织学分级显著相关($P < 0.05$), 但在不同年龄、临床分期及组织学分型中, survivin的表达却无统计学差异($P > 0.05$)。本实验中6例宫颈腺癌病例中survivin均表达阳性, 阳性率为100%, 与Yoshida等[7]提出恶性程度更高的腺癌中survivin表达率更高的报道相一致。但由于本实验腺癌样本量相对较少, 故其统计学意义不大。

3.2 高危型HPV在CIN及宫颈癌中的表达

HPV是一种双链DNA病毒,可感染人的皮肤和粘膜上皮细胞并诱发细胞增生。有学者在对宫颈HPV感染者进行前瞻性研究发现,宫颈感染HPV16/18型者在1年内有1/3将会发展为CIN,而CIN中约有15%会发展为宫颈癌[8]。本实验结果显示,高危型HPV感染与宫颈癌的病理演进过程有关。在正常宫颈组织中仅发现1例阳性患者;而CIN I级阳性率为26.1%,II~III级感染率显著升高达到77.3%;在宫颈浸润癌中更是达到87.1%,显著高于CIN及正常对照宫颈组织($P < 0.05$)。从正常宫颈→CIN→宫颈癌,HPV阳性率明显升高($P < 0.05$)。这与国内外研究结果一致,进一步证实了高危型HPV与宫颈癌发生、发展有着密切关系。同时,在本实验中,高危型HPV感染率在不同年龄、临床分期、组织学分级及组织学分型中,均无统计学差异($P > 0.05$)。但有学者认为,宫颈腺癌与HPV的相关性和年龄有关,40岁以下的年轻宫颈腺癌患者,合并HPV感染者占89%;而60岁以上的老年患者,HPV感染率仅为43%[9]。有研究表明,宫颈鳞癌的HPV16检出率明显高于腺癌($P < 0.05$);而HPV18在腺癌中的阳性率显著高于鳞癌($P < 0.05$) [10]。本研究中腺癌组织较少,且未对高危型HPV进行具体分型,尚不能得出结论。

3.3 高危型HPV与survivin对宫颈癌的协同致病作用

长期的流行病学调查发现,高危型HPV是宫颈癌的主要的必需致病因素,但不是唯一病因,HPV感染的细胞发生恶变需要其他因子的协同作用。survivin是否是高危型HPV的一个协同因子,共同对宫颈癌的发生、发展起作用目前还很少有报道。我们的实验结果显示,在宫颈癌组织中,survivin与高危型HPV的表达呈正相关($P < 0.05$)。而Frost等[11]发现在survivin阳性表达的CIN I级组织中,同时有HPV感染的标本出现了强烈的核阳性,而无HPV感染的只是中度阳性表达;在宫颈乳头状瘤中,survivin和HPV表现出共同的核定位。因此,我们推测HPV可能直接或间接地对survivin的表达和细胞分布起着调节作用,两者对宫颈癌发生可能起着协同作用。但目前两因子协同致病机理还不清楚,大多数学者认为与P53和Rb途径相关。

参考文献:

- [1]连利娟. 林巧稚妇科肿瘤学[M]. 第3版,北京:人民卫生出版社,2000. 209.
- [2]Yoshinouch M, Hongo A, Kamoto N, et al. Alteration of the CDKN2/P16 gene is not required for HPV-positive uterine cervical cancer cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(3): 537-41.
- [3]Grossman D, McNiff JM, Li F, et al. Expression of the apoptosis inhibitor, surviving, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line[J]. *Lab Invest*, 1999, 79(9): 1121-6.
- [4]Kim HS, Shiraki K, Rark SH, et al. Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(2A): 805-8.
- [5]王梅, 王冰, 王晓丽, 等. 凋亡相关基因survivin在子宫颈癌组织中的表达及其与bcl-2、p53基因表达相关性的初步研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2001, 36(9): 546-8.
Wang M, Wang B, Wang XL, et al. A novel antiapoptosis gene, survivin, bcl-2, p53 expressed in cervical carcinoma[J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2001, 36(9): 546-8.
- [6]郑洪, 侯文, 胡琼. 凋亡调控因子survivin和Caspase-3在宫颈上皮内瘤样变及宫颈癌中的表达及意义[J]. *贵州医药*, 2003, 27(2): 105-7.
Zheng H, Hou W, Hu Q. Expression of apoptotic regulators surviving and effect or caspase-3 in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Guizhou Med J*, 2003, 27(2): 105-7.
- [7]Yoshida H, Sumi T, Hyum Y, et al. Expression of survivin and matrixmetalloproteinases in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix[J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(1): 45-9.
- [8]徐成康, 梅卓贤. 宫颈人类乳头状病毒感染的筛查及其意义[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(3): 223-6.

Xu CK, Mei ZX. Screening of human papilloma virus infection in cervix and its significance[J]. Acad J SUMS, 1998, 19(3): 223-6.

[9]Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(1): 1-17.

[10]Arends MJ, Yvonne K, Donaldson YK, et al. Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16[J]. Pathology, 1993, 24(4): 432-7.

[11]Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, et al. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma[J]. Am J Clin Pathol, 2002, 117(5): 738-44.

[回结果列表](#)