

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

郎雁¹,熊永炎¹,陈惠楨²(武汉大学中南医院¹病理科,²妇瘤科,湖北武汉430010)

摘要:目的 探讨凋亡相关基因 *survivin* 在宫颈癌前病变和宫颈癌组织中的表达及其与人乳头状瘤病毒(HPV)感染的相关性。**方法** 选取76例宫颈癌前病变或宫颈癌患者,另取10例正常宫颈组织作为对照。应用免疫组织化学SP法检测各组宫颈组织中凋亡相关基因 *survivin* 的表达;设计高危型HPV(HPV16, 18, 31, 33, 58等)通用引物,以touch-down PCR法检测各组宫颈组织中高危型HPV的感染率。**结果** (1)从正常宫颈→癌前病变→宫颈癌,*survivin*表达逐渐增强($P<0.05$);(2)*survivin*表达与宫颈癌组织学分级有关($P<0.05$),而与年龄、临床分期及组织学分型无关($P>0.05$);(3)从正常宫颈→癌前病变→宫颈癌,高危型HPV阳性率逐渐升高($P<0.05$);(4)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($P>0.05$);(5)*survivin*与高危型HPV在宫颈癌组织中的表达呈正相关($P<0.05$)。**结论** *survivin*表达及高危型HPV感染可能与宫颈癌的发生、发展密切相关,两者在宫颈癌的发病机制中可能起着协同作用。

关键词: 宫颈肿瘤;宫颈上皮内瘤样病变;*survivin*;乳头状瘤病毒,人

中图分类号:R737.33 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)10-1276-04

Association between expression of *survivin* and high-risk human papillomavirus infection in cervical cancer and precancerous tissues

LANG Yan¹, XIONG Yong-yan¹, CHEN Hui-zhen²

¹Department of Pathology, ²Department of Gynecological Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430010, China

Abstract: Objective To investigate the expression of *survivin* and its association with high-risk human papillomavirus (HPV) infection in cervical cancer and precancerous tissues. **Methods** In 76 patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) or cervical carcinoma, the expression of *survivin* was detected by immunohistochemistry and the infection rates of high-risk HPV including HPV16, 18, 31, 33, 52, and 58 were assayed by touch-down PCR, with 10 cases of normal cervical specimens serving as the control. **Results** *Survivin* expression tended to increase along with the tumor progression ($P<0.05$), and was associated with the histological grade of invasive carcinoma ($P<0.05$) but not with the patients' age, clinical stage or histological classification ($P>0.05$). The positivity rate of high-risk HPV increased only in association with tumor progression ($P<0.05$) but not with the patients' age, clinical stage or histological classification ($P>0.05$). Positive correlation between the expression of *survivin* and high-risk HPV infection was observed in cervical carcinoma. **Conclusion** *Survivin* might play an important role in the occurrence and development of cervical carcinoma in coordination with high-risk HPV.

Key words: cervical neoplasms; cervical intraepithelial neoplasia; *survivin*; papilloma virus, human

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

收稿日期:2005-03-28

作者简介:郎雁(1968-),女,在读硕士研究生,主治医师,电话:027-83930433, E-mail: babyjulialang@126.com

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 购自晶美生物工程技术有限公司, 高危型 HPV 引物序列购自晶美生物工程技术有限公司, 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	

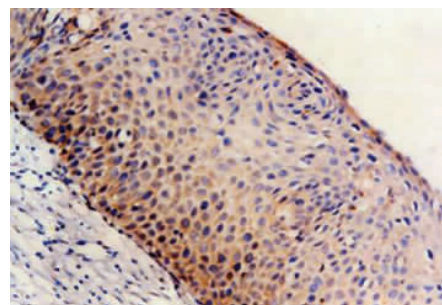


图 1 *survivin* 在 CIN III 级宫颈上皮异性细胞中阳性表达
Fig.1 Positive *survivin* expression in heterologous cells of cervical epithelium of CIN III grade (HE staining, original magnification: x200)

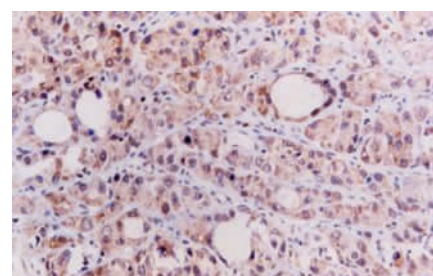


图 2 *survivin* 在宫颈腺癌癌细胞中阳性表达
Fig.2 Positive *survivin* expression in the cancer cells of cervical adenocarcinoma (HE staining, original magnification: x200)

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)。

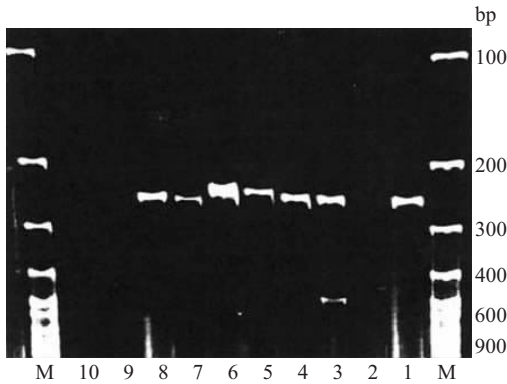


图 3 高危型 HPV-PCR 扩增产物电泳图

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 of *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 *metrixmetalloproteinases* 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.