

ProEx C 在宫颈癌及其癌前病变中的表达及意义

张 蕾¹ 王 霞² 张 珊³ 杨彦华^{2△} 石纳玉³ 蔡广彦³

(1 青岛大学医学院 山东 青岛 266000 ; 2 青岛市市立医院 山东 青岛 266001 ; 3 青岛市第八人民医院 山东 青岛 266000)

摘要 目的 探讨 ProEx C 在宫颈癌及其癌前病变中的表达及意义。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测 ProEx C 在不同宫颈病变组织芯片中的表达。结果 ProEx C 在宫颈炎、CINI、CINII、CINIII 及宫颈癌中的阳性表达率分别是 25%、51.7%、77.9%、90%、93.8%, 且其表达在宫颈癌及 CINIII 级病变与宫颈炎及 CINI 级病变相比较差异具有统计学意义($P < 0.05$), ProEx C 在 CINII 级组织中表达低于 CINII 级, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), ProEx C 在浸润性宫颈癌中的表达与临床病理因素无关($P > 0.05$)。结论: ProEx C 反映了细胞的增殖活性, 促进宫颈癌的发生发展, 可作为诊断及监测预后的指标。

关键词 子宫颈癌 子宫颈癌前病变 ProEx C 组织芯片 免疫组化

中图分类号: R737.33 **文献标识码**: A **文章编号**: 1673-6273 (2011) 20-3878-04

Expression and Significance of ProEx C in Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia

ZHANG Lei¹, WANG Xia², ZHANG Shan³, YANG Yan-hua^{2△}, SHI Na-yu³, CAI Guang-yan³

(1 The Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2 Qingdao Municipal Hospital, 266011, Qingdao, China;

3 The Eighth hospital of Qingdao, 2666000, Qingdao, China)

ABSTRACT **Objective:** To explore the expression and significance of ProEx C in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. **Methods:** The expressions of ProEx C in the cervical tissue microarray were detected by immunohistochemical SP methods. **Results:** The positive rate of ProEx C in chronic cervicitis, CINI, CINII, CINIII and cervical cancer were 25%, 51.7%, 77.9%, 90%, 93.8% respectively. The expression levels of ProEx C in cervical cancer and CINIII were significantly higher than those in cervicitis and CINI tissues ($P < 0.05$). ProEx C expression was higher in CINII lesions than in CINI lesions ($P < 0.05$). There were no significant differences between ProEx C expressions and clinicopathologic factors ($P > 0.05$). **Conclusions:** The expression of ProEx C reflect the proliferative activity and it play an important role in the carcinogenesis of cervical cancer. Moreover it could be useful in diagnosing the degree of cervical lesions and monitoring the prognosis.

Key words: Cervical cancer; Cervical intraepithelial neoplasia; ProEx C; Tissue microarray; Immunohistochemistry

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

Article ID: 1673-6273(2011)20-3878-04

前言

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 具有较长时间的癌前病变阶段, 在此前驱阶段进行疾病的治疗和监测可以降低宫颈癌的发生率和死亡率。细胞的无限增殖是肿瘤发生发展的核心特征, 增殖活性的高低则是反映肿瘤的良恶性及恶性程度的重要指征。微小染色体维持蛋白 2 (MCM2) 是微小染色体蛋白家族中的一员, 在 DNA 的复制起始及延伸过程中起重要作用, 与细胞增殖密切相关, 是近年发现的一种能较好的反映细胞增殖活性的指标^[1]。TOPII-A 是一种细胞基质酶蛋白, 参与 DNA 空间构型的变化, 有研究表明在肿瘤中 TOPII-A 可促进肿瘤的增殖与肿瘤的进展与预后有关。本实验应用免疫组织化学的方法研究 ProEx C (TOPII-A+MCM2) 在宫颈癌及其癌前病变中的表达并探讨其临床意义。

1 材料与方法

作者简介 张蕾 (1977), 女, 硕士研究生

△通讯作者 杨彦华, 电话: 13808994880,

E-mail: yangyanhua198102@126.com。

(收稿日期: 2011-02-23 接受日期: 2011-03-22)

1.1 研究对象

收集青岛市市立医院 2008.01~2010.01 手术及活检标本 274 例, 包括慢性炎症 12 例, CINI 级 58 例, CINII 级 68 例, CINIII 级 40 例, 浸润癌 96 例, 包括鳞癌 81 例 (高分化 26 例, 中分化 50 例, 低分化 5 例), 腺癌 15 例。均经病理确诊, 且术前未经任何治疗。浸润性宫颈癌标本中, 年龄在 31-86 岁之间, 平均年龄 58.5。根据 (FIGO) 临床分期标准进行临床分期 I 期: 64 例, II 期 26 例, III 期 6 例, 盆腔淋巴结转移者 5 例。

1.2 方法

所有标本均经 10% 中性福尔马林固定, 常规脱水、包埋、切片染色后, 对照 HE 切片在蜡块上标注所选区域, 利用组织芯片仪制作成 6×7 的微阵列组织芯片蜡块, 并且连续切片用作 SP 法免疫组织化学和 HE 染色。ProEx C 鼠抗人单克隆抗体购自美国 BD 公司, 染色步骤严格按照说明书进行。所有的标本均经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋。以宫颈 HELA 细胞作为阳性对照, 同种动物的非免疫血清代替一抗作阴性对照。每一张切片均经两位病理医师进行观察评估, 取其均值作为最后的结果。

1.3 结果判定

ProEX C 阳性表达部位位于细胞核,呈棕黄色颗粒。每张切片于病变区随机观察 10 个高倍镜视野,计数 1000 个细胞,根据阳性肿瘤细胞的百分比进行判读分级:阴性:无阳性的肿瘤细胞;-:阳性瘤细胞小于 10%;+:阳性瘤细胞在 10%-29%;++:阳性肿瘤细胞 30%-59%;+++ :阳性肿瘤细胞大于等于 60%。

1.4 统计学处理

运用 SPSS13.0 统计软件进行卡方检验。

2 结果

2.1 组织芯片结果

排除组织芯片中 4 例未取到宫颈 CIN 病变组织,2 例免疫组织化学过程中脱片的病例,最终获得可分析的有效病例 220 例。

2.2 ProEX C 在宫颈癌、宫颈癌前病变及宫颈炎中的表达

ProEX C 表达于细胞核呈棕黄色颗粒,随着病变程度增加表达的强度和阳性率逐渐提高,在慢性子宫颈炎的组织标本中仅表达于部分基底细胞,低级别 CIN 呈散在表达,而在 CINIII 和宫颈癌中则是弥漫强阳性表达(图 1-5),其具体表达强度及阳性率如表 1 所示,宫颈癌和 CINIII 级病变中 ProEX C 的阳性表达率明显高于慢性子宫颈炎和 CINI 级病变组织,且差异具有统计学意义 ($P<0.05$),ProEX C 的阳性表达率在 CINI 与 CINII 相比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$),而 CINII 级和 CINIII 级病变相比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),宫颈癌和 CINIII 级病变相比较差异亦无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 ProEX C 在宫颈癌中的表达与临床病理因素的关系

ProEx C 在浸润性宫颈癌中的表达与临床病理因素无关 ($P>0.05$) 见表 2。

表 1 ProEX C 在宫颈组织中的表达

Table1 The expression of ProEX C in cervical tissue

Classification	ProEX C					Positive rate (%)
	N	-	+/-	++	+++	
Cervicitis	12	9	1	2	0	25
CINI	58	28	9	17	4	51.7
CINII	68	15	4	27	22	77.9
CINIII	40	6	2	14	18	90
Cervical cancer	96	6	3	50	37	93.8

表 2 ProEX C 在宫颈癌中的表达与临床病理因素的关系

Table2 The relationship between the expression of ProEX C in cervical cancer and the clinicopathologic factors

ProEX C				
Group	N	Positive rate (%)	X ²	P
Age				
>50	45	42 (93.3)	0.07	0.79
50≤	51	48 (94.1)		
Stage				
I	56	53 (94.7)	Exact propability	0.16*
II	28	27 (96.4)	0.033	0.86 [#]
III	12	10 (83.3)		
Differentiation				
H	34	31 (91.2)	Exact propability	0.12 [☆]
M	52	51 (98.1)	0.93	0.34 [★]
L	10	8 (80)		
Histological type				
ScC	81	76 (93.8)	Exact propability	1.00
ACA	15	14 (93.3)		
Lymph Node Metastasis				
Yes	5	5 (100)	Exact propability	1.00
No	85	81 (95.3)		

*I+II vs III, # I vs II, ☆LvsH+M, ★ HvsM

H:high,M:middle,L low,SCC: squamous cell cancer,ACA adenocarcinoma

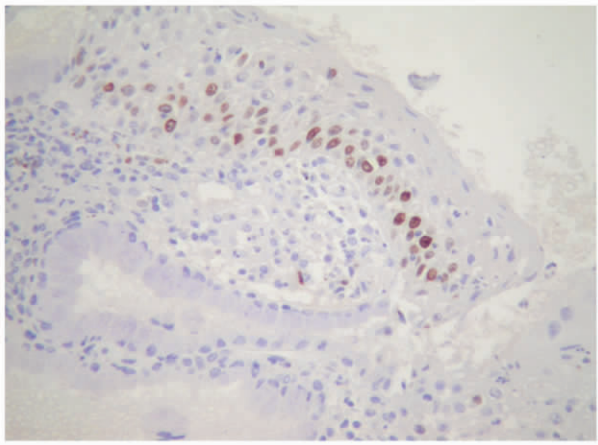


图 1 ProEX C 在慢性宫颈炎中的表达 (× 200)
Fig. 1The expression of ProEX C in cervicitis (× 200)

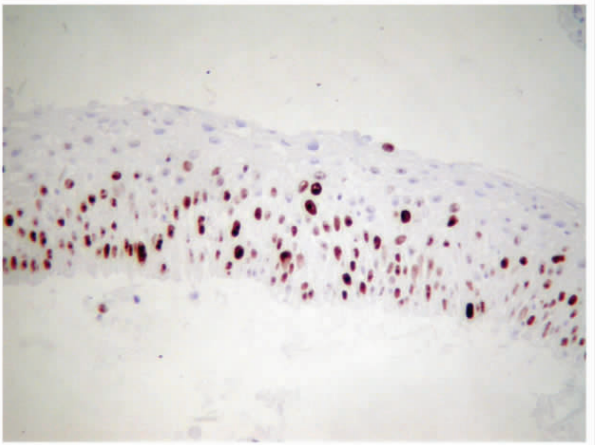


图 3 ProEX C CINII 中的表达 (× 200)
Fig. 3The expression of ProEX C in CINII (× 200)

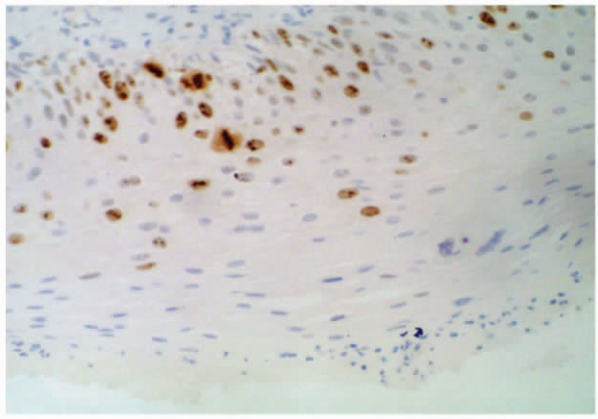


图 2 ProEX C 在 CIN I 中的表达 (× 200)
Fig. 2The expression of ProEX C in CIN I (× 200)

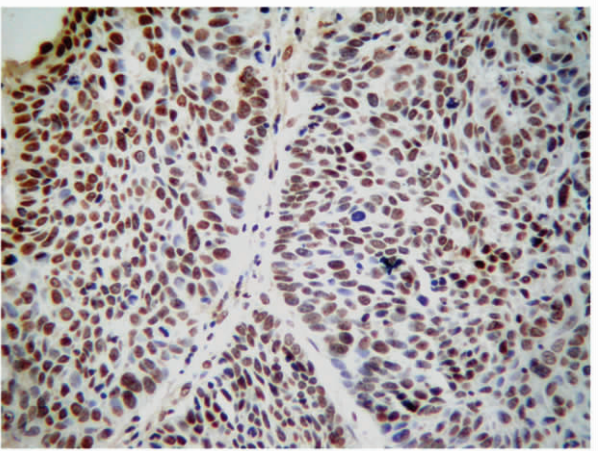


图 4 ProEX C 在 CINIII 中的表达(× 200)
Fig. 4The expression of ProEX C in CINIII (× 200)

3 讨论

大量流行病学和生物学资料已证明生殖道持续感染 HR-HPV 是宫颈癌和宫颈上皮内瘤变高发的主要危险因素^[2]目前众多的研究表明 HPV 癌基因蛋白可引起细胞周期的变化,从而导致宫颈上皮发生一系列的病变,该机制所涉及的生物学标志物逐渐被众多学者重视,并且作为宫颈癌及其癌前病变的诊断与预后的判读指标。HPV 通过 E6/E7 蛋白作用于细胞周期的多种调节蛋白,从而引起细胞的增殖,导致癌变。目前众多的控制细胞周期的调节蛋白中,宫颈上皮密切相关且研究最多的是 p16,ki-67,cyclin 细胞周期蛋白及 MCM 和 TOP-I-I。在我们的研究中应用免疫组织化学的方法研究组织芯片中宫颈癌及其癌前病变中 ProEx C 的表达。

ProEx C 包含 MCM2 和 TOP-II2a 两种抗体,是细胞周期 S 期的异常表达物。已有研究证明,宫颈癌中 HPV E7 癌蛋白可通过转录因子 E2F 途径,引发基因转录失控和细胞周期 S 期诱导异常,引起这两种蛋白的异常高表达^[3,4,5]。本研究在 CIN I CINII CINIII 和浸润性宫颈癌中阳性表达率分别是 51.7%, 77.9%,90%,93.8%,除 CINII 级病变中表达较高外与 Maria D^[6]的研究结果基本一致。MCM2 是 MCM 家族中的一员,包括 MCM2-7 六个成员,在细胞 DNA 复制的早期是不可缺少的,参与细胞 DNA 的复制与延伸。4 种 MCM 蛋白 MCM2、MCM4、

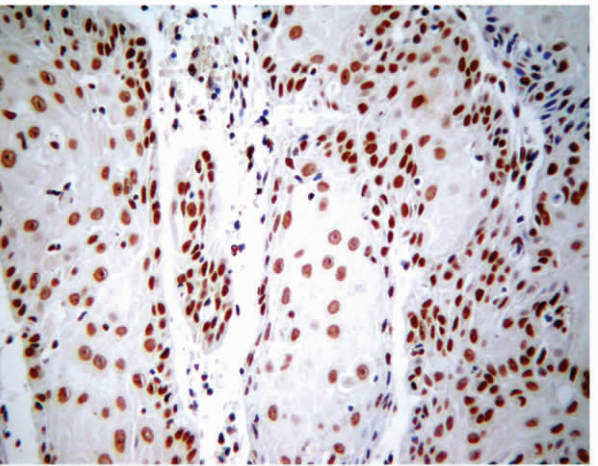


图 5 ProEX C 在鳞癌中的表达 × 200
Fig. 5The expression of ProEX C in scc (× 200)

MCM6 和 MCM7 中均保留一个锌指基序,在蛋白质 - 蛋白质和 DNA - 蛋白质的相互作用中有重要作用,有利于 MCM 复合物的募集和发挥 ATPase 活性^[7,8]。MCM 蛋白除参与 DNA 复制外,在 DNA 转录、染色质重建及维持基因组稳定方面也发挥了重要作用。MCM 蛋白的表达调控与 E - 2F 转录因子有关, Sterner^[9]等发现 MCM7 羧基末端 137 个氨基酸可与 RB 相关因子 P107 和 p130 结合,继而影响 E- 2F 转录水平,抑制 DNA 复

制。E6 蛋白可与 MCM7 的羧基末端紧密连接,高危型 HPV 的 E6 蛋白与 MCM7 的结合比低危型别要更加紧密。E6 蛋白与 MCM7 的结合导致了染色体的畸变,通过转录因子 E2F 途径引发基因转录失控和 S-期诱导异常,使得微小染色体维持蛋白 MCM2 在宫颈癌中高表达。MCM 作为一种细胞增殖指标,Singleton 通过研究其和 KI-67 在 51 例纤维粘液肉瘤中的表达,提出 MCM 蛋白在恶性肿瘤预后评价方面是一有效指标,优于 Ki67^[10]。

TOP-II2a 是一种细胞核基质酶蛋白,通过解开 DNA 双链,导致 DNA 的断裂,形成 DNA-酶复合物,在细胞内参与 DNA 空间构型变化^[11]。研究显示, TOP II 在细胞周期的 S 期、G2 期、M 期、部分 G0 期和 G1 期均有表达。TOP-II2a 的过表达与高危 HPV 密切相关,并且在宫颈病变从 CIN2 进展到 CIN3 的过程中起重要作用^[12]。有实验证实 TOP-II2a 的表达与肿瘤细胞的增殖有关,可反应细胞的增殖活性,促进肿瘤的进展^[13]。有学者做了 TOP II 与胶质瘤的研究,认为 TOP II 的表达也与患者的预后相关,高表达 TOP II 的患者生存期短^[14,15]。以上研究结果均表明两种指标的高表达均与高危型 HPV 密切相关,而高危型 HPV 的持续感染可促进宫颈病变的进展,导致宫颈癌的发生。复合抗体 ProEx C 的检测可显示肿瘤细胞的增殖活性、提示疾病的进展程度还可对是否为高危型 HPV 感染有一定的提示作用,可对临床医师采取相关的治疗措施起到辅助作用。从宫颈的癌前病变到宫颈癌是一个长期的过程,部分 CINI 级病变可以转归并且自愈。目前宫颈癌的筛查和诊断有很多的方法并有相应的辅助诊断手段。但是活检的证实仍旧是最终的诊断金标准,但是仍旧有部分病例仅靠组织学检测无法确切的判定其是低级别 CIN 还是高级别 CIN。本实验结果显示在宫颈癌和高级别 CIN 中 ProEx C 有较高的阳性表达率,且从宫颈炎到宫颈癌随着宫颈病变的进展阳性表达率越来越高,宫颈癌及高级别 CIN 中 ProEx C 的高表达率与宫颈炎及低级别 CIN 病变相比较差异具有显著性。表明 ProEx C 在宫颈的良恶性病变中作用不同,在宫颈癌的进展中有促进作用。并可筛检出部分组织学难以判定的高级别病变。Ozaki S^[16]等做了宫颈癌及其癌前病变中 ProEx C、p16INK4a 和 HPV 的研究亦证实了 ProEx C 在宫颈低级别向高级别进展的过程中起重要作用,且具有较高的敏感性和特异度。

综上所述,ProEx C 是评价肿瘤生长的有效的增殖指标,且与高危型 HPV 密切相关,在宫颈病变中的表达和其阳性率的高低可以在宫颈癌的发生发展中起到预警和辅助诊断作用,并对临床医生判断预后提供辅助作用。

参考文献(References)

[1] Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, et al. Minichromosome maintenance p roteins and in non - benign epithelial ovarian tumors : relationship with cell cycle regulators and prognostic implications[J]. Br J Cancer, 2007,97 (8) : 1124 - 1134

[2] Ho GYH , Bierman R , Beardsley L, et al. Nature history of cervicovaginal papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing

in adolescent and young women[J]. N Engl J Med , 1998 , 338 : 423 - 428

[3] Malinowski DP. Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease[J]. Biotechniques, 2005,(suppl):17-23

[4] Murphy N, Ring M, Heffron CC, et al. Quantitation of CDC6 and MC-M5 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix[J]. Mod Pathol. 2005, 18:844-849

[5] Murphy N, Ring M, Heffron CC, et al. p16INK4A, CDC6,and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer[J]. J Clin Pathol. 2005;58:525-534

[6] Beccati MD, Buriani C, Pedriali M, et al. Quantitative Detection of Molecular Markers ProEx C(Minichromosome Maintenance Protein 2 andTopoisomerase IIa) and MIB-1 in Liquid-basedCervical Squamous Cell Cytology[J].Cancer. 2008,114(3):196-203

[7] Poplawski A ,Grabowski B ,Long S E ,et al. The zinc finger domain of the archaeal minichromosome maintenance protein is required for helicase activity[J] . Biol Chem ,2001 ,276 (52) : 49 371 - 49 377

[8] You Z , Ishimi Y, Masai H ,et al. Roles of Mcm7 and Mcm4 subunitsin the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/ 6/ 7 complex [J] . BiolChem , 2002, 277 (45) : 42471- 42479

[9] Sterner J , Dew - Knight S , Musahl C ,et al. Negative regulation of D-NA replication by the retinoblastoma protein Is mediated by its association with MCM7[J] . Mol Cell Biol ,1998 ,18 (5): 2748-2757

[10] Singleton J D , Freeman A , Moris L S ,et al. Minichromosome maintenance protein in myxofibrosarcoma [J] . Mod Pathol ,2004 , 17 (2) :235 - 240

[11] Chen H, Gonzalez JL, Brennick JB, Liu M, Yan S. Immunohistochemical patterns of ProEx C in vulvar squamous lesions: detection of overexpression of MCM2 and TOP2A [J]. Am J Surg Pathol. 2010 Sep,34(9):1250-7

[12] Burden DA, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme[J].BiochimBiophys Acta, 1998,1400(1-3):139-154

[13] 孙淑清,李桂林,苏玉金. 脑胶质瘤中 P170、TOP II 表达与其增殖活性关系的研究[J].中国康复理论与实践.2008,14 (4)

SUN Shu-qing; LI Gui-lin; SU Yu-jin. Correlation of Expressions of P170,TOP II and Proliferation in Gliomas [J].Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice, 2008 ,14 (4)

[14] Taniguchi K , Wakabayashi T, Yoshida T, et al. Immunohistochemical staining of DNA topoisomerase II alpha in human gliomas[J]. J Neurosurg ,1999, 91 (3): 477 -482

[15] Miettinen HE , Jarvinen TA , Kellner U , et al. High topoisomerase II alpha expression associates with high proliferation rate and poor prognosis in oligodendrogliomas [J]. Neu ropathol Appl Neurobiol, 2000, 26 (6) :504 -512

[16] Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions[J].Hum Pathol, 2011 Feb 10. [Epub ahead of print]