

### 【临床研究】

作者简介:严 浩(1974-),男,湖北武汉人,硕士,主治医师,研究方向:妇科肿瘤。

肿瘤的发生和发展是多阶段、多因素及多基因作用的过程。相关研究显示,宫颈癌的发生和发展与细胞凋亡的控制、调节及人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)感染有密切的关联<sup>[1]</sup>。Bcl-2 基因是细胞凋亡中最早发现的一种抑制型基因,是目前研究最广泛、深入的一种凋亡调控基因<sup>[2]</sup>;而 Survivin 是目前所发现的有最强抗凋亡作用的基因<sup>[3]</sup>。本实验旨在通过在核酸水平采用原位杂交法检测宫颈癌、宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈正常组织中 HPV16/18 DNA、Survivin mRNA 的表达,以及在蛋白水平采用免疫组织化学法检测 Bcl-2 的表达,探讨 HPV16/18、Bcl-2 及 Survivin 与宫颈癌发生、发展的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2010 年 4 月至 2012 年 7 月在湖北省肿瘤医院手术切除并经病理学检查确诊的宫颈癌组织标本 80 例,年龄 31 ~ 62 岁,平均(45.3 ± 15.1)岁;组织类型:鳞状细胞癌 69 例,腺癌 11 例;临床分期:ⅠA 期 10 例,ⅠB 期 16 例,ⅡA 期 34 例,ⅡB 期 11 例,Ⅲ期 9 例;组织分化:低分化 37 例,中分化 30 例,高分化 13 例;肿瘤生长类型:外生型 38 例,内生型 15 例,溃疡型 15 例,颈管型 12 例;有淋巴结转移 35 例。患者术前均未接受放射治疗和化学治疗。CIN 组织标本 70 例,年龄 29 ~ 63 岁,平均(44.8 ± 16.2)岁;CIN Ⅰ级 15 例,Ⅱ级 25 例,Ⅲ级 30 例。并选取同期宫颈正常组织标本 32 例,年龄 28 ~ 62 岁,平均(44.7 ± 20.1)岁。

**1.2 主要试剂** Survivin 原位杂交检测试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司),HPV16/18 原位杂交试剂盒(福建泰普生物科学有限公司),免疫组织化学试剂盒和 Bcl-2 多克隆抗体(北京中杉生物技术公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 标本处理** 用 40 g · L<sup>-1</sup> 多聚甲醛溶液固定标本,包埋于石蜡中,将标本组织连续切成 4 μm 厚切片。

**1.3.2 原位杂交法检测 Survivin mRNA 表达** Survivin mRNA 序列采用 Survivin mRNA 寡核苷酸探针进行检测,切片后脱蜡、脱水,滴注 5 g · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 新鲜配制液,室温放置 30 min;加入经 30 g · L<sup>-1</sup> 柠檬酸稀释过的胃蛋白酶,在 37 °C 下消化,暴露 Survivin mRNA 核酸片段;滴注预杂交液,于 42 °C 的恒温箱中恒温 4 h;再次滴加杂交液,在 42 °C 的恒温箱中过夜;用梯度的柠檬酸缓冲液洗涤,然后依次加入封闭液、生物素化鼠抗地高辛及链霉亲和素-生物素过氧化物酶复合物,二氨基联苯胺(diaminobenzidine,

DAB)显色,苏木精复染,透明后封片以备镜检。阴性对照:只加预杂交液,不加 Survivin 探针。

**1.3.3 免疫组织化学法检测 Bcl-2 蛋白表达** 即用型免疫组织化学二步法染色,将组织切片包埋于石蜡中,常规脱蜡、脱水,然后使用微波修复抗原,经 30 g · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断剂溶液孵育 10 min 后,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)冲洗。滴加稀释后浓度为 1 : 50 的 Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体,4 °C 冰箱过夜。PBS 冲洗后进行常规 DAB 显色反应,复染、透明,最后封片镜检。阴性对照:PBS 缓冲液;阳性对照:已知的阳性片。切片全部在相同条件下进行操作。

**1.3.4 原位杂交法检测 HPV16/18 DNA 表达** 将切片脱蜡、水化,滴加蛋白酶 K,37 °C 下孵育 18 min;用梯度乙醇脱水。将 10 μL 生物素化的探针加入每张切片中,加盖盖玻片。95 °C 下变性 10 min,湿盒 37 °C 下杂交 10 h,将切片浸泡于去垢剂洗涤液中 15 min,去盖玻片。加入结合物表面蛋白,37 °C 下孵育 25 min,滴加 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐/氯化硝基四氢唑蓝酶底物至室温暗盒中进行 15 min 的显色反应。用核固红进行复染,采用水性封片剂对组织切片进行封片。

**1.4 结果判定** 对所有切片实施双盲法,阅片由经验丰富的 2 位病理科医师完成。依据相关的半定量积分法对结果进行判断:细胞质内有淡黄色至棕黄色的颗粒出现即为 Bcl-2 和 Survivin 的阳性表现。对随机抽取的高倍镜视野(10 个)进行观察,参照每个高倍镜视野中的阳性细胞数的比例进行记分:>75% 为 4 分;51% ~ 75% 为 3 分;26% ~ 50% 为 2 分;5% ~ 25% 为 1 分;<5% 为 0 分。依据着色强度进行记分:棕黄色为 3 分;黄色为 2 分;淡黄色为 1 分。上述 2 种记分乘积为表达强度:9 ~ 12 分为强阳性(+++);5 ~ 8 分为中度阳性(++) ;1 ~ 4 分为弱阳性(+);0 分为阴性(-)。细胞核中有黑色或蓝色颗粒出现即为 HPV16/18 DNA 阳性细胞的表现。

**1.5 统计学处理** 实验数据应用 SPSS 19.0 软件进行分析,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3 种组织中 Survivin mRNA、Bcl-2 蛋白及 HPV16/18 DNA 阳性表达情况比较** 结果见表 1。Survivin mRNA 在宫颈正常组织、CIN 及宫颈癌组织中的阳性表达率分别为 6.25%、45.71% 和 77.50%,Bcl-2 蛋白在宫颈正常组织、CIN 及宫颈癌组织中的阳性表达率分别为 3.13%、40.00% 和 71.25%,

HPV16/18 DNA 在宫颈正常组织、CIN 及宫颈癌组织中的阳性表达率分别为 3. 13%、51. 43% 和 83. 75% ,3 种组织中 Survivin mRNA、Bcl-2 蛋白、HPV16/18 DNA 阳性表达率比较差异均有统计学意义( $P < 0. 01$ )。

表 1 Survivin mRNA、Bcl-2 蛋白和 HPV16/18 DNA 在宫颈癌、CIN 及宫颈正常组织中的表达

Tab.1 Expressions of Survivin mRNA,Bcl-2 and HPV16/18 DNA in cervical cancer tissues,CIN tissues and normal cervical tissues例( %)

组织类型	n	Survivin mRNA		Bcl-2 蛋白		HPV16/18 DNA	
		阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
宫颈正常组织	32	30(93. 75)	2(6. 25)	31(96. 87)	1(3. 13)	31(96. 87)	1(3. 13)
CIN	70	38(54. 29)	32(45. 71) <sup>a</sup>	42(60. 00)	28(40. 00) <sup>a</sup>	34(48. 57)	36(51. 43) <sup>a</sup>
宫颈癌	80	18(22. 50)	62(77. 50) <sup>ab</sup>	23(28. 75)	57(71. 25) <sup>ab</sup>	13(16. 25)	67(83. 75) <sup>ab</sup>
$\chi^2$		48. 812		30. 431		62. 194	
P		<0. 01		<0. 01		<0. 01	

注:与宫颈正常组织比较<sup>a</sup> $P < 0. 01$ ;与 CIN 比较<sup>b</sup> $P < 0. 01$ 。

2. 2 Survivin mRNA、Bcl-2 蛋白及 HPV16/18 DNA 表达与 CIN 分级的相关性

结果见表 2。Survivin mRNA、Bcl-2 蛋白及 HPV16/18 DNA 在 CIN 组织中的表达与 CIN 分级有相关性,Survivin mRNA

NA、Bcl-2 蛋白及 HPV16/18 DNA 在 CINⅢ级中的阳性表达率显著高于 CINⅠ、Ⅱ级,差异均有统计学意义( $P < 0. 01$ )。

表 2 Survivin mRNA、Bcl-2 蛋白及 HPV16/18 DNA 表达与 CIN 分级的相关性

Tab.2 Correlation between the expressions of Survivin mRNA,Bcl-2 and HPV16/18 DNA and CIN stages

CIN 分级	n	Bcl-2 蛋白				Survivin mRNA				HPV16/18 DNA			
		阴性/例	阳性/例	$\chi^2$	P	阴性/例	阳性/例	$\chi^2$	P	阴性/例	阳性/例	$\chi^2$	P
Ⅰ、Ⅱ级	40	31	9	11. 914	<0. 01	28	12	9. 287	<0. 01	27	13	13. 392	<0. 01
Ⅲ级	30	11	19			10	20			7	23		

2. 3 Bcl-2 表达与宫颈癌临床病理特征的相关性

结果见表 3。Bcl-2 蛋白的表达与宫颈癌组织分化程度及淋巴结转移有相关性( $P < 0. 01$ ),但与宫颈癌组织类型、临床分期及肿瘤生长类型无显著相关性( $P > 0. 05$ )。

表 3 Bcl-2 表达与宫颈癌临床病理特征的关系

Tab.3 Relationship between the expression of Bcl-2 and the clinical pathological features of cervical cancer

临床病理特征	n	Bcl-2 蛋白		$\chi^2$	P
		阴性/例	阳性/例		
组织类型				0. 361	>0. 05
鳞状细胞癌	69	19	50		
腺癌	11	4	7		
组织分化				7. 172	<0. 01
低分化	37	6	31		
中、高分化	43	17	26		
临床分期				2. 461	>0. 05
ⅠA、ⅠB、ⅡA 期	60	20	40		
ⅡB、Ⅲ期	20	3	17		
肿瘤生长类型				3. 901	>0. 05
外生型	38	8	30		
内生型	15	4	11		
溃疡型	15	5	10		
颈管型	12	6	6		
淋巴结转移				13. 370	<0. 01
有	35	3	32		
无	45	20	25		

2. 4 Survivin mRNA 表达与宫颈癌临床病理特征的相关性

结果见表 4。Survivin mRNA 表达与宫

颈癌的组织分化程度、临床分期及淋巴结转移有相关性( $P < 0. 01$ , $P < 0. 05$ ),但与宫颈癌的组织类型及肿瘤生长类型无相关性( $P > 0. 05$ )。

表 4 Survivin mRNA 表达与宫颈组织临床病理特征的相关性

Tab.4 Relationship between the expression of Survivin mRNA and the clinical pathological features of cervical cancer

临床病理特征	n	Survivin mRNA		$\chi^2$	P
		阴性/例	阳性/例		
组织类型				0. 225	>0. 05
鳞状细胞癌	69	15	54		
腺癌	11	3	8		
组织分化				8. 177	<0. 01
低分化	37	3	34		
中、高分化	43	15	28		
临床分期				4. 683	<0. 05
ⅠA、ⅠB、ⅡA 期	60	17	43		
ⅡB、Ⅲ期	20	1	19		
肿瘤生长类型				2. 113	>0. 05
外生型	38	6	32		
内生型	15	3	12		
溃疡型	15	4	11		
颈管型	12	4	8		
淋巴结转移				13. 770	<0. 01
有	35	1	34		
无	45	17	28		

2. 5 HPV16/18 DNA 表达与宫颈癌临床病理特征的相关性

结果见表 5。HPV16/18 DNA 的表达与宫颈癌的组织分化程度、临床分期及淋巴结转移有相关性( $P < 0. 01$ , $P < 0. 05$ ),但与宫颈癌的组织类型及肿瘤生长类型无相关性( $P > 0. 05$ )。

表 5 HPV16/18 DNA 表达与宫颈癌临床病理特征的相关性  
Tab.5 Relationship between the expression of HPV16/18 DNA and the clinical pathological features of cervical cancer

临床病理特征	n	HPV16/18 DNA		$\chi^2$	P
		阴性/例	阳性/例		
组织类型					
鳞状细胞癌	69	11	58	0.035	>0.05
腺癌	11	2	9		
组织分化					
低分化	37	2	35	6.975	<0.01
中、高分化	43	12	31		
临床分期					
I A、I B、II A 期	60	13	47	5.174	<0.05
II B、III 期	20	0	20		
肿瘤生长类型					
外生型	38	4	34	0.985	>0.05
内生型	15	2	13		
溃疡型	15	3	12		
颈管型	12	3	9		
淋巴结转移					
有	35	0	35	12.070	<0.01
无	45	13	32		

3 讨论

宫颈癌的发生与发展是一个多步骤、多阶段的复杂过程,与细胞凋亡、抑癌基因及多种癌基因的调控和表达有一定的关联性。Bcl-2 蛋白定位主要是粗面内质网和细胞膜内的线粒体,是较肯定的一种调控细胞凋亡的基因,在体内其主要以二聚体的形式发挥作用,一旦同聚体形成则会抑制细胞的凋亡<sup>[4]</sup>。本实验结果显示,Bcl-2 蛋白在宫颈正常组织、CIN、宫颈癌组织中的表达比较差异均有统计学意义,宫颈癌组织中表达最高,其次为 CIN,正常宫颈组织最低;且伴随宫颈癌临床分期和组织分化程度的增加,Bcl-2 蛋白阳性表达率逐渐升高;提示 Bcl-2 的表达与宫颈癌的发生、发展、浸润、增殖有相关性<sup>[5]</sup>。

病毒整合是宫颈非典型性增生向宫颈癌演变过程中的一个重要机制,其致使宿主基因不稳定、病毒基因表达失调,甚至激活细胞癌基因,进而造成细胞恶性生物学行为。本研究结果显示,HPV16/18 DNA 在宫颈癌组织中的表达显著高于 CIN 和正常宫颈组织,且 HPV16/18 DNA 在 CIN 组织中的表达也明显高于正常宫颈组织;提示 HPV16/18 感染是宫颈癌发生、发展的一个重要原因,宫颈的病变程度与其感染的程度显著相关。因此,积极预防、治疗 HPV 感染对宫颈癌的防治起重要作用<sup>[6]</sup>。

Survivin 基因定位于 17q25,通过对 caspase-7 和

caspase-3 活性的直接抑制而阻断细胞的凋亡过程。Survivin 基因只表达于胚胎中,在成年人已经分化的组织中呈不表达或低表达状态,但是在人类的多种肿瘤内均有所表达,为肿瘤的早期诊断和基因治疗提供了一个新靶点<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,Survivin mRNA 在宫颈正常组织、CIN、宫颈癌组织中的表达比较差异均有统计学意义,宫颈癌组织中表达最高,其次为 CIN,正常宫颈组织最低;且 Survivin mRNA 的阳性表达率随着肿瘤恶性程度的增加而升高,同时有淋巴结转移者宫颈癌组织中阳性表达率显著高于无淋巴结转移者;提示宫颈癌的发生、发展与 Survivin mRNA 的表达有显著相关性,预示着肿瘤的预后不良及侵袭性较高<sup>[8]</sup>。

综上所述,HPV16/18、Bcl-2 和 Survivin 可能参与了宫颈癌的发生与发展,HPV16/18、Bcl-2 和 Survivin 的检测有助于宫颈癌的早期诊断、手术疗效评价及预后判断。

参考文献:

[1] Shamanna R A, Hoque M, Pe'ery T, et al. Induction of p53, p21 and apoptosis by silencing the NF90/NF45 complex in human papilloma virus-transformed cervical carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32(43) : 5176-5185.

[2] Rana M M, Huhtala H, Apter D, et al. Understanding long-term protection of human papillomavirus vaccination against cervical carcinoma; cancer registry-based follow-up [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(12) : 2833-2838.

[3] Hall J S, Iype R, Armenoult L S, et al. Poor prognosis associated with human papillomavirus alpha7 genotypes in cervical carcinoma cannot be explained by intrinsic radiosensitivity [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 85(5) : e223-e229.

[4] Yang Y C, Chang T Y, Chen T C, et al. Genetic variants in interleukin-18 gene and risk for cervical squamous cell carcinoma [J]. *Hum Immunol*, 2013, 74(7) : 882-887.

[5] 朱华, 胡燕, 帅茨霞, 等. Survivin、bcl-2 在宫颈癌和癌前病变组织中的表达及与人乳头瘤病毒 16/18 感染的相关性 [J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(7) : 469-473.

[6] Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, et al. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(5) : 1523-1532.

[7] Tsai K H, Kuo K T, Chen C H, et al. Non HPV-related cervical squamous cell carcinoma with unusual histologic characteristics mimicking a giant immature condyloma; a case report [J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(9) : 823-825.

[8] 邢春瑶, 冷维春, 周家文. Bcl-2 和 Survivin 在宫颈癌中的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(1) : 167-169.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)