

【临床研究】

通信作者:王焱(1965-),男,河南洛阳人,学士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:妇科肿瘤;E-mail:WY_hnedu@163.com。

宫颈癌是常见的妇科肿瘤,发病率居女性恶性肿瘤的第2位,居女性生殖器官恶性肿瘤之首,其病理学分型以鳞状细胞癌为主,占80%~85%^[1-2]。由于宫颈鳞状细胞癌早期缺乏明显症状,早期诊断及预后评估不尽人意。有研究发现,受体酪氨酸激酶-丝裂原活化蛋白激酶信号通路(receptor tyrosine kinases-Ras GTPase-mitogen activated protein kinase, RTK-RAS-MAPK)与宫颈鳞状细胞癌的发生有关,Raf是该通路的上游因子,其激活或突变可改变细胞周期,引起细胞永生,促使肿瘤发生^[3];Spry是该通路的抑制因子,可抑制细胞的分化、表达及肿瘤的发生^[4]。本研究通过检测不同宫颈组织中Raf、Spry蛋白的表达情况,分析Raf、Spry在宫颈鳞状细胞癌发生、发展中的作用,为宫颈癌的早期诊断与预后评估提供线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2013年1月至2015年12月河南科技大学第一附属医院手术切除并于病理科保存的宫颈组织石蜡切块133例,患者年龄22~70(48.9±11.5)岁;宫颈鳞状细胞癌50例,高度上皮内病变32例,低度上皮内病变22例,正常宫颈组织29例;所有患者经病理学检查确诊,术前未进行任何治疗,且临床资料完整。

1.2 主要试剂与仪器 兔抗人Raf抗体(英国Abcam公司),兔抗人Spry抗体(美国Proteintech公司),免疫组织化学染色试剂盒、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(江苏康为世纪生物科技有限公司);切片机(德国LEICA公司),离心机(美国Beckman公司),烘烤箱(德国HeraSafe公司)。

1.3 免疫组织化学法检测不同宫颈组织中Raf和

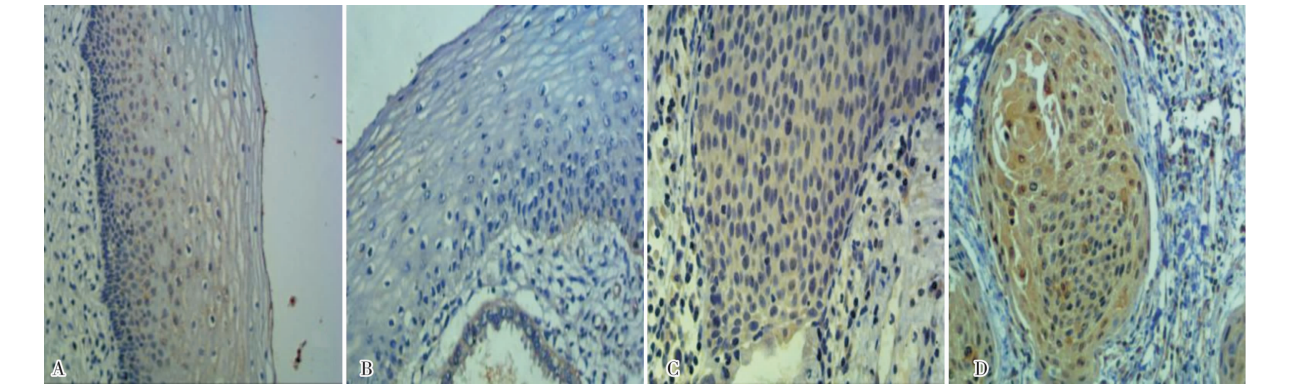
Spry蛋白表达 取宫颈组织蜡块切片,脱蜡,水化,高压修复,体积分数3%过氧化氢酶室温孵育10 min,磷酸盐缓冲液冲洗,加一抗,4℃过夜孵育(Raf抗体工作浓度为1:150, Spry抗体工作浓度为1:50),次日取出,滴加二抗羊抗兔多克隆抗体孵育30 min,磷酸盐缓冲液冲洗,滴加辣根过氧化物酶标志链霉卵白素工作液孵育20 min,磷酸盐缓冲液冲洗,DAB显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶固定封片,显微镜下观察。

1.4 结果判定 Raf与Spry蛋白均定位于细胞质中,阳性表达呈棕褐色、棕黄色或黄色颗粒,由2位专业的病理科医师采用盲审法进行阅片,依据组织中出现的阳性细胞数及染色强度进行评分,评分未达到一致者由第3位病理学专家重新评估。染色强度:未染色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,深黄色或褐色为3分。阳性细胞的百分比评分:阳性细胞<25%为1分,25%~50%为2分,51%~75%为3分,76%~100%为4分。最后将染色强度得分和阳性细胞百分比得分相乘作为最终评分,≥3分为阳性,<3分为阴性。

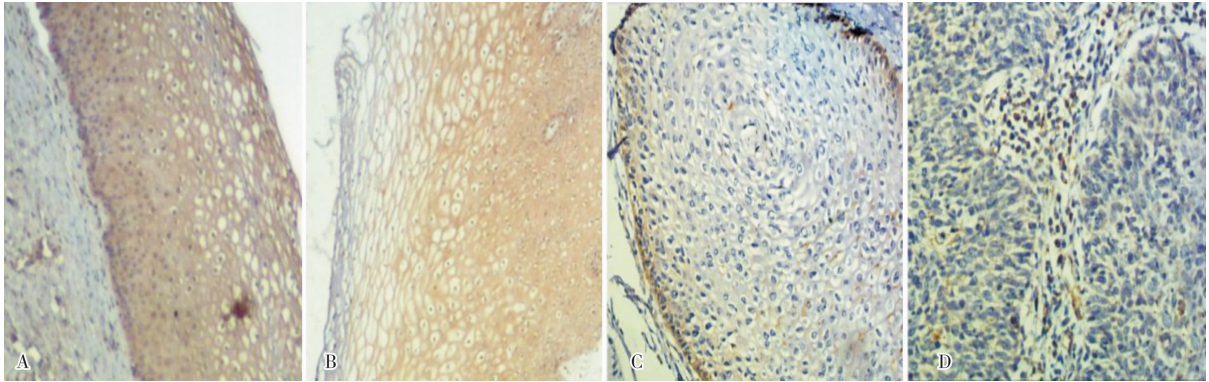
1.5 统计学处理 应用SPSS 21.0软件进行统计学分析。计数资料用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用Spearman秩相关进行相关性分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同宫颈组织中Raf和Spry蛋白的表达 结果见图1、图2和表1。Raf蛋白在正常宫颈组织、低度上皮内病变组织、高度上皮内病变组织、鳞状细胞癌组织中的阳性表达率呈逐渐升高趋势, Spry蛋白在上述宫颈组织中的阳性表达率呈逐渐降低趋势,两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。



A:正常宫颈组织;B:低度上皮内病变组织;C:高度上皮内病变组织;D:宫颈鳞状细胞癌组织。
图1 不同宫颈组织中Raf蛋白的表达(免疫组织化学,×200)
Fig.1 Expression of Raf protein in different cervical tissues (immunohistochemistry, ×200)



A: 正常宫颈组织;B:低度上皮内病变组织;C:高度上皮内病变组织;D:宫颈鳞状细胞癌组织。

图 2 不同宫颈组织中 Spry 蛋白的表达(免疫组织化学, ×200)

Fig.2 Expression of Spry protein in different cervical tissues (immunohistochemistry, ×200)

表 1 不同宫颈组织中 Raf、Spry 蛋白表达

Tab.1 Expression of Raf and Spry proteins in different cervical tissues

宫颈组织	n	Raf 蛋白		Spry 蛋白	
		阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)
正常宫颈组织	29	2(6.89)	27(93.11)	28(96.55)	1(3.45)
低度上皮内病变组织	22	7(31.82) ^a	15(68.18)	16(72.73) ^a	6(27.27)
高度上皮内病变组织	32	20(62.50) ^{ab}	12(37.50)	13(40.63) ^{ab}	19(59.37)
鳞状细胞癌组织	50	44(88.00) ^{abc}	6(12.00)	9(18.00) ^{abc}	41(82.00)

注:与正常宫颈组织比较^a $P < 0.05$;与低度上皮内病变组织比较^b $P < 0.05$;与高度上皮内病变组织比较^c $P < 0.05$ 。

2.2 Raf 和 Spry 蛋白表达与宫颈鳞状细胞癌患者临床病理特征的关系 结果见表 2。Raf 蛋白表达与宫颈鳞状细胞癌的临床分期、淋巴结转移有关($P < 0.05$),与患者年龄、病理分级无关($P >$

0.05);Spry 蛋白表达与宫颈鳞状细胞癌的病理分级有关($P < 0.05$),与患者年龄、临床分期及淋巴结转移无关($P > 0.05$)。

表 2 Raf、Spry 蛋白表达与宫颈鳞状细胞癌患者临床病理特征的关系

Tab.2 Relationship between Raf and Spry protein expression and clinicopathological features of cervical squamous cell carcinoma

临床特征	n	Raf 蛋白表达		χ^2	P	Spry 蛋白表达		χ^2	P
		阳性/例(%)	阴性/例(%)			阳性/例(%)	阴性/例(%)		
年龄									
<50 岁	27	24(88.89)	3(11.11)	0.044	0.834	6(22.22)	21(77.78)	0.709	0.400
≥50 岁	23	20(86.96)	3(13.04)			3(13.04)	20(86.96)		
病理分级									
高分化	29	25(86.21)	4(13.79)	0.210	0.064	8(27.59)	21(72.41)	4.299	0.038
中-低分化	21	19(90.48)	2(9.52)			1(4.76)	20(95.24)		
淋巴结转移									
无	22	17(77.27)	5(22.73)	4.479	0.034	5(22.73)	17(77.27)	0.595	0.441
有	28	27(96.43)	1(35.71)			4(14.29)	24(85.71)		
临床分期									
I ~ II 期	31	25(80.65)	6(19.35)	4.179	0.041	5(16.13)	26(83.87)	0.193	0.660
III ~ IV 期	19	19(100.00)	0(0.00)			4(21.05)	15(78.85)		

2.3 宫颈鳞状细胞癌组织中 Raf 与 Spry 蛋白表达的相关性 宫颈鳞状细胞癌组织中 Raf 与 Spry 蛋白表达呈负相关($r = -0.460, P < 0.05$)。

3 讨论

Raf 具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,分为 A-Raf、B-Raf、C-Raf,共包含 3 个保守区域,相互连接发挥作用^[5]。Raf 与 p21-活化激酶、丝氨酸蛋白酶等

结合发生磷酸化反应而被激活,经一系列相关激酶活化,启动相应的转录子进行细胞反应,调控靶细胞的功能,引起肿瘤的发生^[6]。研究发现,Raf 基因突变与甲状腺癌^[7]、结肠癌^[8]、卵巢癌^[9]等的发生密切相关。在肿瘤组织中,Raf 可上调血管内皮细胞生长因子的表达,刺激肿瘤血管的生成,促进肿瘤的发生、发展及转移等^[10],也可通过诱导基质金属蛋白酶的表达,加快细胞外基质蛋白的分解,进而加强

肿瘤的侵袭^[11],促进宫颈鳞状细胞癌的发展与转移。本研究发现,Raf蛋白阳性表达率随肿瘤的发展而升高,这与戴梦璐等^[12]的研究结果一致。

Spry是一种能够抑制受体酪氨酸激酶的蛋白质,其在多种肿瘤组织中的表达被抑制。Spry蛋白可通过调节RTK-RAS-MAPK信号通路及其他通路来调控细胞的增殖和分化^[13]。有学者发现,Spry在前列腺癌组织中表达被抑制,从而使RTK-RAS-MAPK通路被过度激活,诱导肿瘤细胞增殖,促进肿瘤的发生和发展^[14]。Spry可以通过负向调控生长因子信号通路抑制间充质细胞的生长与分化^[15]。此外,Spry蛋白可以通过负向调控RTK-RAS-MAPK信号通路进而维持组织胚胎干细胞自我更新能力^[16]。MOGHADDAM等^[17]研究发现,Spry在多种肿瘤中的表达水平与患者的预后有关,有可能成为癌症的独立预后因子。本研究结果显示,宫颈鳞状细胞癌中Spry蛋白的表达与病理分级有关。根据这一特性,希望能为宫颈鳞状细胞癌的预后判断提供帮助。

Raf与Spry在RTK-RAS-MAPK通路中相互制约,维持细胞正常运转,当Raf发生突变或被激活后,Spry表达被抑制,引起该通路平衡失调,致使细胞核中的一些转录因子如c-Jun等被磷酸化,并与其他蛋白激酶共同启动下游一系列相关基因,促进细胞周期转化,加速DNA合成,参与细胞分裂及多种生理功能产生的生物学效应^[18]。有研究发现,Spry编码的蛋白质失调可促进宫颈鳞状细胞癌Hela细胞株细胞周期的改变,加快细胞周期从G₁期进入S期,抑制细胞凋亡,致使宫颈鳞状细胞癌发生^[19]。本研究结果显示,随着宫颈病变程度的加重,Raf阳性表达率增高,Spry阳性表达率降低,二者在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达呈负相关,Raf蛋白的表达与临床分期和淋巴结转移有关,Spry蛋白的表达与病理分级有关,可能成为评估宫颈鳞状细胞癌恶性程度,预测转移及预后的指标之一。

参考文献:

[1] 张月涵,张春梅,潘云. 宫颈癌与NFκB、PI3K/AKT信号通路的研究进展[J]. 中国临床研究,2018,31(4):133-135.

[2] 邓波,易峰涛,谢俊杰,等. 地榆升白片对宫颈癌患者辅助放疗期间免疫功能的影响[J]. 医药导报,2018,37(2):193-195.

[3] PIETRANTONIO F,PETRELLI F,COINU A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab:a meta-analysis[J]. *Eur J Cancer*,2015,51(5):587-594.

[4] ZOU Y,JIANG Z,YU X, et al. Upregulation of long noncoding

RNA SPRY4-IT1 modulates proliferation,migration,apoptosis,and network formation in trophoblast cells HTR-8SV/neo[J]. *PLoS One*,2013,8(11):e79598.

[5] MOURA M M,CAVACO B M,LEITE V. RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma[J]. *Endocr Relat Cancer*,2015,22(5):235-252.

[6] 张杰东,朱传东,刘杜先. 甲状腺乳头状癌 B-raf 基因突变及 Caveolin-1 和 COX-2 蛋白表达的临床意义[J]. 临床与病理杂志,2018,38(7):1434-1439.

[7] ZALECNA I,HARTMAN M L,CZYZ M. BRAF mutation in progression and therapy of melanoma,papillary thyroid carcinoma and colorectal adenocarcinoma[J]. *Postepy Hig Med Dosw*,2015,70:471-488.

[8] THAMKACHY R,KUMAR R,RAJASEKHARAN K N, et al. ERK mediated upregulation of death receptor 5 overcomes the lack of p53 functionality in the diaminothiazole DAT1 induced apoptosis in colon cancer models:efficiency of DAT1 in Ras-Raf mutated cells[J]. *Molecular Cancer*,2016,15(1):1-17.

[9] HUNTER S M,ANGLESIO M S,RYLAND G L. Molecular profiling of low grade serous ovarian tumours identifies novel candidate driver genes[J]. *Oncotarget*,2015,6(35):37663-37677.

[10] 肖玉霞,邵乐南,黄梅靖,等. PTPIP51、p-Raf-1 及 ERK1/2 在口腔鳞状细胞癌中的表达[J]. 华中科技大学学报(医学版),2011,40(4):417-422.

[11] BAINES A T,XU D,DER C J. Inhibition of Ras for cancer treatment:the search continues[J]. *Future Med Chem*,2011,3(14):1787-1808.

[12] 戴梦璐,方炜. 多发性骨髓瘤患者 miRNA-497 和 Raf-1 的表达水平及其临床应用价值[J]. 中国卫生检验杂志,2018,28(14):1738-1740.

[13] 王珂,王国兴. Sprouty 在肿瘤中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床,2016,43(8):358-360.

[14] SCHUTZMAN J L,MARTIN G R. Sprouty genes function in suppression of prostate tumorigenesis[J]. *P Nat Acad Sci USA*,2012,109(49):20023-20028.

[15] GAO J,YANG T,HAN J, et al. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow[J]. *J Cell Biochem*,2011,112(7):1844-1856.

[16] PURCELL P,JHEON A,VIVERO M P, et al. Spry1 and Spry2 are essential for development of the temporomandibular joint[J]. *J Dent Res*,2012,91(4):387-393.

[17] MOGHADDAM S M,AMINI A,WEI A Q, et al. Initial report on differential expression of Sprouty proteins 1 and 2 in human epithelial ovarian cancer cell lines[J]. *J Oncol*,2012,2012(3):373826.

[18] 易婷,张浩,彭宜红,等. MEK1-ERKs 级联激活方式是调控单纯疱疹病毒Ⅱ型复制的重要机制[J]中国生物化学与分子生物学报,2011,27(2):142-147.

[19] 宋燕,吴琼蔚. 长链非编码 RNASPRY4-IT1 对宫颈癌细胞的生物学行为影响[J]. 现代中西医结合杂志,2018,27(8):803-806.