本文引用:李晓丹,费晓莺,韩敏,等. 整合素连接激酶和黏着斑激酶在宫颈癌组织中的表达及其与人乳头瘤病毒感染的关系[J]. 新乡医学院学报,2022,39(3):218-221. DOI:10.7683/xxyxyxb.2022.03.004.

【临床研究】

整合素连接激酶和黏着斑激酶在宫颈癌组织中的表达及其与人乳头瘤病毒感染的关系

李晓丹[1], 费晓莺[2], 韩 敏[1], 张香玲[1], 赵 静[1]
(1. 邯郸市第一医院妇科,河北 邯郸 056002;2. 邯郸市第一医院手术室,河北 邯郸 056002)

摘要: **目的** 探讨整合素连接激酶(ILK)和黏着斑激酶(FAK)在宫颈鳞状细胞癌(CSCC)组织中的表达及其与CSCC临床病理特征、人乳头状瘤病毒(HPV)感染的关系。**方法** 选择2015年10月至2019年8月邯郸市第一医院保存的30例正常宫颈组织、30例宫颈上皮内瘤变(CIN)组织和60例CSCC组织标本,采用实时荧光定量聚合酶链式反应检测正常宫颈组织、CIN组织、CSCC组织中ILK和FAK mRNA的表达,采用免疫组织化学法检测正常宫颈组织、CIN组织、CSCC组织中ILK和FAK蛋白的表达,并分析ILK和FAK蛋白表达与CSCC患者临床病理特征及HPV感染的关系。**结果** CSCC组织中ILK、FAK mRNA的相对表达量分别为12.37±1.26、17.32±3.21,CIN组织中ILK、FAK mRNA的相对表达量分别为8.39±3.20、13.35±2.34,正常宫颈组织中ILK、FAK mRNA的相对表达量分别为3.67±2.40、5.47±2.10;CIN组织和CSCC组织中ILK、FAK mRNA的相对表达量显著高于正常宫颈组织($P<0.05$),CSCC组织中ILK、FAK mRNA的相对表达量显著高于CIN组织($P<0.05$)。正常宫颈组织中ILK、FAK蛋白阳性表达率分别为6.67%(2/30)、3.33%(1/30),CIN组织中ILK、FAK蛋白阳性表达率分别为63.33%(19/30)、56.67%(17/30),CSCC组织中ILK、FAK蛋白阳性表达率分别为85.00%(51/60)、71.67%(43/60);CSCC组织中ILK、FAK蛋白阳性表达率显著高于CIN组织和正常宫颈组织($P<0.05$),CIN组织中ILK、FAK蛋白阳性表达率显著高于正常宫颈组织($P<0.05$)。ILK和FAK蛋白表达与CSCC的临床分期、淋巴结转移有关($P<0.05$),而ILK和FAK蛋白表达与CSCC患者年龄无关($P>0.05$)。CSCC和CIN组织中HPV-DNA阳性75例,HPV-DNA阴性15例。HPV-DNA阳性者ILK蛋白阳性表达率为86.67%(65/75),HPV-DNA阴性者ILK蛋白阳性表达率为33.33%(5/15),HPV-DNA阳性者ILK蛋白阳性表达率显著高于HPV-DNA阴性者($P<0.05$)。HPV-DNA阳性者FAK蛋白阳性表达率为76.0%(57/75),HPV-DNA阴性者FAK蛋白阳性表达率为20.0%(3/15),HPV-DNA阳性者FAK蛋白阳性表达率显著高于HPV-DNA阴性者($P<0.05$)。**结论** CSCC组织中ILK和FAK蛋白表达上调,ILK和FAK蛋白表达与CSCC病变程度、HPV感染有相关性,ILK和FAK可能参与了CSCC的发生和发展。

关键词: 宫颈癌;整合素连接激酶;黏着斑激酶;人乳头状瘤病毒
中图分类号: R737.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2022)03-0218-04

Expression of integrin linked kinase and focal adhesion kinase in cervical cancer tissues and their relationship with human papilloma virus infection

LI Xiaodan[1], FEI Xiaoying[2], HAN Min[1], ZHANG Xiangling[1], ZHAO Jing[1]
(1. *Department of Gynecology, Handan First Hospital, Handan* 056002, *Hebei Province, China*; 2. *Operating Room of Handan First Hospital, Handan* 056002, *Hebei Province, China*)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of integrin linked kinase (ILK) and focal adhesion kinase (FAK) in cervical squamous cell carcinoma (CSCC) tissues and their relationship with the clinicopathological features of CSCC and human papilloma virus (HPV) infection. **Methods** The specimens of 30 cases of normal cervical tissues, 30 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) tissues and 60 cases of CSCC tissues preserved in Handan First Hospital from October 2015 to August 2019 were selected. The expressions of ILK and FAK mRNA in normal cervical tissues, CIN tissues and CSCC tissues were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, and the expressions of ILK and FAK protein in normal cervical tissues, CIN tissues and CSCC tissues were detected by immunohistochemistry. The relationship between the expression of ILK, FAK protein and clinicopathological features and HPV infection in CSCC patients was analyzed. **Results** The relative expression levels of ILK and FAK mRNA in CSCC tissues were 12.37±1.26 and 17.32±3.21 respectively, those in CIN tissues were 8.39±3.20 and 13.35±2.34 respectively, and those in normal cervical tissues were 3.67±2.40 and 5.47±2.10 respectively. The relative expression levels of ILK and FAK mRNA in CIN and CSCC tissues were significantly higher than those in normal cervical tissues ($P<0.05$), and the relative expression levels of ILK and FAK mRNA in CSCC tissues were

DOI:10.7683/xxyxyxb.2022.03.004
收稿日期:2020-07-09
基金项目:邯郸市科学技术研究与发展计划项目(编号:1723208066-2)。
作者简介:李晓丹(1975-),女,河北邯郸人,硕士,副主任医师,研究方向:妇科肿瘤。

significantly higher than those in CIN tissues ($P<0.05$). The positive expression rates of ILK and FAK proteins in normal cervical tissues were 6.67% (2/30) and 3.33% (1/30) respectively, and those in CIN tissues were 63.33% (19/30) and 56.67% (17/30) respectively, and those in CSCC tissues were 85.00% (51/60) and 71.67% (43/60) respectively. The positive expression rates of ILK and FAK protein in CSCC tissues were significantly higher than those in CIN and normal cervical tissues ($P<0.05$), and the positive expression rates of ILK and FAK protein in CIN tissues were significantly higher than those in normal cervical tissues ($P<0.05$). The expressions of ILK and FAK protein were related to the clinical stage and lymph node metastasis of CSCC ($P<0.05$), while they were not related to the age of CSCC patients ($P>0.05$). In CSCC and CIN tissues, HPV-DNA was positive in 75 cases, and HPV-DNA was negative in 15 cases. The positive expression rate of ILK protein in HPV-DNA positive patients was 86.67% (65/75), and it in HPV-DNA negative patients was 33.33% (5/15). The positive expression rate of ILK protein in HPV-DNA positive patients was significantly higher than that in HPV-DNA negative patients ($P<0.05$). The positive expression rate of FAK protein in HPV-DNA positive patients was 76.0% (57/75), and it in HPV-DNA negative patients was 20.0% (3/15). The positive expression rate of FAK protein in HPV-DNA positive patients was significantly higher than that in HPV-DNA negative patients ($P<0.05$). **Conclusion** The expressions of ILK and FAK proteins were up-regulated in CSCC tissues, and they were correlated with the degree of CSCC lesions and HPV infection. ILK and FAK may be involved in the occurrence and development of CSCC.

Key words: cervical cancer; integrin linked kinase; focal adhesion kinase; human papilloma virus

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其最常见的病理类型是宫颈鳞状细胞癌(cervical squamous cell carcinoma,CSCC),CSCC 约占宫颈癌的 75% ~ 80%[1]。研究表明,人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)感染是宫颈癌的主要危险因素之一[2],宫颈上皮内瘤病(cervical intraepithelial neoplasia,CIN)是宫颈癌的癌前病变,因此,预防 HPV 感染对降低宫颈癌发病率具有重要意义。整合素连接激酶(integrin linked kinase,ILK)是一种细胞内蛋白激酶,其在整合素、生长因子信号传导通路中发挥重要作用,参与调控细胞增殖、生长、分化、迁移、浸润及肿瘤血管生成等过程[3]。黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)是生长因子受体和整合素介导信号的关键调节因子,可通过其激酶活性和支架功能调控正常及癌细胞的基本过程[4]。本研究旨在探讨 ILK 和 FAK 的表达与宫颈癌患者临床病理特征和 HPV 感染的关系。

1　资料与方法

1.1　组织标本来源　选择 2015 年 10 月至 2019 年 8 月邯郸市第一医院保存的 30 例正常宫颈组织(对照组)、30 例 CIN 组织(CIN 组)和 60 例 CSCC 组织标本(CSCC 组)为研究对象,纳入对象均经病理学检查明确诊断,病历资料完整,且排除患有其他系统肿瘤及可能有影响本研究结果的不利因素者。CIN 和宫颈癌患者中 HPV-DNA 阳性 75 例,HPV-DNA 阴性 15 例。对照组、CIN 组和 CSCC 组患者的年龄分别为 41 ~ 76(58.36 ± 9.24)、40 ~ 76(57.86 ± 9.35)、42 ~ 77(59.46 ± 9.63)岁,3 组患者的年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究通过医院医学伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。

1.2　主要试剂　TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,cDNA 合成试剂盒购自美国 Promega 公司,SYBR-green 实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司,抗 ILK、抗 FAK 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology公司,山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3　实时荧光定量 PCR 法检测正常宫颈组织、CIN 组织和 CSCC 组织中 ILK、FAK mRNA 的表达　取正常宫颈组织、CIN 组织和 CSCC 组织,TRIzol 法提取总 RNA,溶于焦碳酸二乙酯水,测定浓度与纯度;以 cDNA 为模板,进行荧光定量 PCR;引物序列:ILK 的上游引物序列为 5′-GCACTCAATAGCCGTAGTG-3′,下游引物序列为 5′-CCTACTTGTCCTGCATCTTC-3′;FAK 的上游引物序列为 5′-GCGTCTAATCCGACAGCA-3′,下游引物序列为 5′-GCCGACTTCCTTCACCAT-3′;内参 β-actin 的上游引物序列为 5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′,下游引物序列为 5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′。反应条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 35 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃扩增 30 s,30 个循环;72 ℃延长 5 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算正常宫颈组织、CIN 组织和 CSCC 组织中 ILK、FAK mRNA 的相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

1.4　免疫组织化学法检测正常宫颈组织、CIN 组织、CSCC 组织中 ILK 和 FAK 蛋白的表达　取正常宫颈组织、CIN 组织和 CSCC 组织,40 g · L^{-1} 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片(厚度约为 5 μm),置于 40 ℃温水中,待组织受热展开,应用载玻片捞起,植入 37 ℃温箱中烘干;二甲苯、梯度乙醇脱蜡与水化处理;微波抗原修复,胰蛋白酶消化;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)冲洗 3 次,每次

5 min;滴加体积分数 4 % 羊血清封闭 30 min;滴加一抗(滴度 1∶100),4 ℃过夜;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加二抗(滴度 1∶200),孵育 30 min;PBS 冲洗 3 次,每次5 min;DAB 显色,苏木精复染;脱水,透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察。ILK、FAK 蛋白表达于细胞膜和(或)细胞质,黄色、棕黄色、棕褐色。高倍镜下(×200)每张切片随机选取 5 个视野,采用半定量方法判断,根据阳性细胞染色强度和阳性细胞所占百分比进行评分。阳性细胞所占百分比评分:阳性细胞率 <5% 计 0 分,5% ~25% 计 1 分,26% ~50% 计 2 分,51% ~75% 计 3 分,>75% 计 4 分。染色强度评分:未着色计 0 分,黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分。以阳性细胞染色强度评分与阳性细胞所占百分比评分的乘积为最终综合评分,综合评分≥5 判定为阳性(+),<5 分判定为阴性(-)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 11.5 软件进行数据统计与分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 t 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常宫颈组织、CIN 组织和 CSCC 组织中 ILK、FAK mRNA 表达比较 结果见表 1。CIN 组织和 CSCC 组织中 ILK、FAK mRNA的相对表达量显著高于正常宫颈组织,CSCC 组织中 ILK、FAK mRNA 的相对表达量显著高于 CIN 组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 正常宫颈组织、CIN 组织和 CSCC 组织中 ILK、FAK mRNA 的表达比较

Tab. 1 Comparison of ILK and FAK mRNA expression in normal cervical tissues, CIN tissues and CSCC tissues ($\bar{x} \pm s$)

组织类型	n	ILK mRNA	FAK mRNA
正常宫颈组织	30	3.67 ± 2.40	5.47 ± 2.10
CIN 组织	30	8.39 ± 3.20[a]	13.35 ± 2.34[a]
CSCC 组织	60	12.37 ± 1.26[ab]	17.32 ± 3.21[ab]

注:与正常宫颈组织比较[a]$P < 0.05$;与 CIN 组织比较[b]$P < 0.05$。

2.2 正常宫颈组织、CIN 组织和 CSCC 组织中 ILK、FAK 蛋白表达比较 正常宫颈组织中 ILK、FAK 蛋白阳性表达率分别为 6.67%(2/30)、3.33%(1/30),CIN 组织中 ILK、FAK 蛋白阳性表达率分别为 63.33%(19/30)、56.67%(17/30),CSCC 组织中 ILK、FAK 蛋白阳性表达率分别为 85.00%(51/60)、71.67%(43/60);CSCC 组织中 ILK、FAK 蛋白阳性表达率显著高于 CIN 组织和正常宫颈组织,CIN 组织中 ILK、FAK 蛋白阳性表达率显著高于正常宫颈组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 ILK 和 FAK 蛋白表达与 CSCC 临床病理特征的关系 结果见表 2。ILK 和 FAK 蛋白表达与 CSCC 的临床分期、淋巴结转移有关($P < 0.05$),而 ILK 和 FAK 蛋白表达与 CSCC 患者年龄无关($P > 0.05$)。

表 2 ILK 和 FAK 蛋白表达与 CSCC 患者临床病理特征的关系

Tab. 2 Relationship between the expression of ILK and FAK protein and the clinicopathological features of CSCC patients

临床病理特征	n	ILK		χ^2	P	FAK		χ^2	P
		-/例	+/例			-/例	+/例		
年龄									
≥45 岁	47	8	39	0.045	0.830	16	31	1.358	0.243
<45 岁	13	1	12			1	12		
临床分期									
Ⅰ、Ⅱ期	23	7	16	7.249	0.007	10	13	5.203	0.002
Ⅲ期	37	2	35			7	30		
淋巴结转移									
有	36	1	35	8.086	0.004	5	31	8.438	0.003
无	24	8	16			12	12		

2.4 ILK 和 FAK 蛋白表达与 HPV 感染的关系 HPV-DNA 阳性者 ILK 蛋白阳性表达率为 86.67%(65/75),HPV-DNA 阴性者 ILK 蛋白阳性表达率为 33.33%(5/15);HPV-DNA 阳性者 ILK 蛋白阳性表达率显著高于 HPV-DNA 阴性者,差异有统计学意义($\chi^2 = 20.070$,$P < 0.05$)。HPV-DNA 阳性者 FAK 蛋白阳性表达率为 76.0%(57/75),HPV-DNA 阴性者 FAK 蛋白阳性表达率为 20.0%(3/15);HPV-DNA 阳性者 FAK 蛋白阳性表达率显著高于 HPV-DNA 阴性者,差异有统计学意义($\chi^2 = 15.990$,$P < 0.05$)。

3 讨论

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤,HPV 是致癌过程中的主要致病因素,约 70% 的宫颈癌和 50% 的 CIN 3 期病变是由于 HPV16 或 HPV18 的持续感染引起的[5-7]。FAK 是一种典型的多功能蛋白,其通过整合素或生长因子受体将信号整合和转导到癌细胞中。有研究显示,ILK 在宫颈癌组织中过表达,且

与肿瘤分级、侵袭和转移有关,其也是淋巴结转移的独立预测因子[8]。本研究旨在探讨 FAK 和 ILK 在 CIN 和 CSCC 中的表达及其与 CSCC 临床病理特征、HPV 感染的相关性,以期为宫颈癌的临床诊断与治疗提供依据。

本研究结果显示,CIN 组织和 CSCC 组织中 ILK、FAK mRNA 的相对表达量显著高于正常宫颈组织,CSCC 组织中 ILK、FAK mRNA 的相对表达量显著高于 CIN 组织;CSCC 组织中 ILK、FAK 蛋白阳性表达率显著高于 CIN 组织和正常宫颈组织,CIN 组织中 ILK、FAK 蛋白阳性表达率显著高于正常宫颈组织;且 ILK 和 FAK 蛋白表达与 CSCC 的临床分期、淋巴结转移有关;提示 ILK 和 FAK 可能参与了 CSCC 的发生和发展。FAK 参与肿瘤血管的信号转导过程,介导血管通透性[9-11],FAK 和 ILK 可通过磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路共同促进肿瘤的侵袭和转移[11]。研究显示,高危型 HPV 持续感染会导致宫颈癌前病变甚至宫颈癌[12-13]。本研究结果显示,HPV-DNA 阳性者 ILK、FAK 蛋白阳性表达率显著高于 HPV-DNA 阴性者,提示 ILK 和 FAK 蛋白表达可能与 HPV 感染有相关性。整合素介导细胞与细胞外基质的黏附,并刺激参与细胞增殖、存活和迁移的信号传导,ILK 在整合素、生长因子信号传导通路中发挥重要作用,FAK 基因被认为是整合素介导的信号传导的核心基因[14-15]。

综上所述,ILK、FAK 在 CSCC 组织中呈高表达,且 ILK 和 FAK 蛋白表达与 CSCC 病变程度及 HPV 感染有相关性,ILK、FAK 可能参与了 CSCC 的发生和发展,其具体机制尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] SMALL J R W, BACON M A, BAJAJ A, *et al*. Cervical cancer: a global health crisis[J]. *Cancer*, 2017, 123(13): 2404-2412.

[2] DARUS C J, MUELLER J J. Development and impact of human papillomavirus vaccines[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2013, 56(1): 10-16.

[3] 李晓丹,费晓莺,王敬苗,等. 小干扰 RNA 靶向沉默整合素连接激酶基因对宫颈鳞状上皮细胞生物学行为的影响[J]. 新乡医学院学报,2020,37(5):425-429.
LI X D, FEI X Y, WANG J M, *et al*. Effect of microRNA targeted silencing integrin-linked kinase gene on biological behavior of cervical squamous epithelial cells[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2020, 37(5): 425-429.

[4] LYU P C, JIANG A Q, ZHANG W M, *et al*. FAK inhibitors in cancer: a patent review[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2018, 28(2): 139-145.

[5] ROBERT M E, FU Y S. Squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a review with emphasis on prognostic factors and unusual variants [J]. *Semin Diagn Pathol*, 1990, 7(3): 173-189.

[6] DU C X, WANG Y. Expression of P-Akt, NF-κB and their correlation with human papillomavirus infection in cervical carcinoma [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2012, 33(3): 274-277.

[7] RAMAKRISHNAN S, PARTRICIA S, MATHAN G. Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: pathogenesis to prevention [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 70(2): 103-110.

[8] SHI Q, BAO S, SONG L, *et al*. Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases[J]. *Oncogene*, 2007, 26(28): 4084-4094.

[9] XIE P, KONDETI V K, LIN S, *et al*. Role of extracellular matrix renal tubulo-interstitial nephritis antigen (TINag) in cell survival utilizing integrin αvβ3/focal adhesion kinase (FAK)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B-serine/threonine kinase (AKT) signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(26): 10379.

[10] CHEN Q, YI B, MA J B, *et al*. α_2-adrenoreceptor modulated FAK pathway induced by dexmedetomidine attenuates pulmonary microvascular hyper-permeability following kidney injury [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 55990-56001.

[11] JEAN C, CHEN X L, NAM J O, *et al*. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function [J]. *Cell Biol*, 2014, 204(2): 247-263.

[12] 邓达,王芝英,陈雪峰,等. P16 和 NOB1 在宫颈癌组织中的表达及与肿瘤发生发展和 HPV-DNA 的关系[J]. 中国妇幼保健,2020,35(23):4596-4598.
DENG D, WANG Z Y, CHEN X F, *et al*. Expression of p16 and NOB1 in cervical cancer tissues and their relationship with tumorigenesis and development and HPV-DNA[J]. *Matern Child Health Care Chin*, 2020, 35(23): 4596-4598.

[13] 刘永强,汪小玲. 肿瘤标志物和 HPV 检测在宫颈癌诊断中的价值及相互关系[J]. 中国肿瘤临床与康复,2020,27(8):956-958.
LIU Y Q, WANG X L. Significance and correlation of tumor markers and HPV detection for the diagnosis of cervical cancer[J]. *Matern Child Health Care Chin*, 2020, 27(8): 956-958.

[14] ZHENG Y, RITZENTHALER J D, SUN X J, *et al*. Prostaglandin E2 stimulates human lung carcinoma cell growth through induction of integrin-linked kinase: the involvement of EP4 and Sp1 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 896-904.

[15] OKTAY M H, OKTAY K, HAMELE-BENA D, *et al*. Focal adhesion kinase as a marker of malignant phenotype in breast and cervical carcinomas[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(3): 240-245.

(本文编辑:徐自超)