

新疆维吾尔族宫颈癌组织中 Bcl-2、Bcl-xl 和 c-IAP1 的检测及临床意义

朱明玥^{1,2}, 隋霜³, 玛依努尔·尼牙孜³, 陈帆⁴

(1. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆肿瘤医院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆维吾尔自治区人民医院, 新疆 乌鲁木齐 830001; 4. 兰州军区乌鲁木齐总医院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: [目的] 通过比较维吾尔族宫颈癌与宫颈非病变组织中 Bcl-2、Bcl-xl、c-IAP1 表达的差异, 了解维吾尔族宫颈癌与凋亡基因的关系及意义。[方法] 采用含 20 000 条 Oligo DNA 的人类全基因组寡核苷酸芯片, 对 5 例维吾尔族宫颈癌与宫颈非病变组织成组检测差异表达基因, 通过 MAS 分析得到两组间凋亡相关的差异表达基因: Bcl-2、Bcl-xl、c-IAP1, 并采用 RT-PCR 及免疫组化验证芯片检测其 mRNA 和蛋白的表达。[结果] 与宫颈非病变组织相比, 维吾尔族宫颈癌患者中凋亡相关基因 Bcl-2、Bcl-xl 和 c-IAP1 mRNA 和蛋白表达均上调。[结论] 基因芯片筛选出的肿瘤差异基因, 对于研究新疆宫颈癌发生的分子机制及宫颈癌的临床早期诊疗具有重要意义, 有利于宫颈癌的易感性预测、早期诊断及疾病监测。维吾尔族宫颈癌的发生与细胞增殖、凋亡的动态平衡密切相关, IAP 家族和 Bcl-2 家族抗凋亡基因在维吾尔族宫颈癌组织中高表达可能在宫颈癌抗凋亡机制中起着重要作用。

关键词: 宫颈肿瘤; 全基因组寡核苷酸芯片; RT-PCR; 免疫组化; Bcl-2; Bcl-xl; c-IAP1

中图分类号: R735.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)12-0982-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.12.B004

Expression of Bcl-2, Bcl-xl and c-IAP1 in Xinjiang Uygur Patients with Cervical Cancer and Its Significance

ZHU Ming-yue^{1,2}, SUI Shuang³, Mayinuer·niyazi³, et al.

(1. Xinjiang Medical University, Wulumuqi 830011, China; 2. Tumor Hospital of Xinjiang, Wulumuqi 830011, China; 3. Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Wulumuqi 830001, China)

Abstract: [Purpose] By comparing genome-wide expression in cervical cancer and normal cervix, to clarify the molecular tumorigenesis mechanism of Bcl-2, Bcl-xl and c-IAP1. [Methods] Gene-expression profiles of 5 samples of cervical cancer and 5 samples of normal cervix were analyzed using oligo microarray containing 20 000 genes. The differentially expressed genes between the two groups were analyzed using the Significance Analysis of Microarrays (MAS) in order to get the specifically differentially expressed apoptosis related genes: Bcl-2, Bcl-xl and c-IAP1. The apoptosis gene expression presence was verified by real-time PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry (IHC). [Results] Compared to normal cervix, 3 genes of apoptosis signaling pathway, including Bcl-2, Bcl-xl and c-IAP1 up-regulated in cervical cancer. [Conclusions] Proving the occurrence of invasive cervical cancer is a multistep genetic pathways regulated more complex process of biological molecular marker spectrum of cervical cancer and screening of tumor marker gene, to study the molecular mechanism of cervical cancer occurred in Xinjiang and the early clinical diagnosis and treatment of cervical cancer has important significance. It is helpful for us to get further understanding on the molecular mechanism of development for study of common differentially expressed genes between them. High expression of IAP family and Bcl2 family anti-apoptotic proteins in cervical cancer tissues may play an important role in cervical cancer anti-apoptotic mechanisms, and these genes can be used for cervical cancer susceptibility prediction not only early diagnosis but also disease monitoring.

Subject words: cervical neoplasms; oligo microarray; real-time PCR; immunohistochemistry (IHC); Bcl-2; Bcl-xl; c-IAP1

在全球范围内, 每年约有 20 多万女性死于宫颈癌, 其中发展中国家死亡率超过 80%。在发展中国家宫颈癌属于常见多发的妇科肿瘤, 而在我国每年新发病例约 13.15 万人。因此, 宫颈癌是严重威胁

我国妇女健康的重大疾病。宫颈癌的发生是一个多因素过程且具有疾病遗传异质性的特点, 仅仅检测一个或一些基因是不够的, 全基因组分析将更有效地解释宫颈癌的复杂性。近年来, 基因芯片大量应用于包括宫颈癌在内的妇科各种恶性肿瘤中, 利用基因表达谱数据可以获取肿瘤细胞生长各期与肿瘤相关基因的表达模式, 为研究肿瘤发生发展中多

通讯作者: 玛依努尔·尼牙孜, 主任医师, 博士; 新疆维吾尔自治区人民医院妇科, 新疆乌鲁木齐市天山区天池路 91 号 (830001); E-mail: 1269628592@qq.com

收稿日期: 2014-04-07; **修回日期:** 2014-07-01

基因改变的分子机制提供了有力的工具。本研究采用含有全基因组表达谱芯片检测 5 例宫颈癌组织基因差异表达谱, 其中许多基因与宫颈癌的相互关系还尚未见报道, 也存在一些基因在其他肿瘤中不一致的现象, 说明利用基因芯片对基因表达谱进行分析, 能够有效筛选出新的宫颈癌相关基因。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2012 年 6 月至 2013 年 3 月活检及手术切除的维吾尔族宫颈癌标本 (均经病理证实为宫颈癌)、宫颈非病变组织标本 (因子宫肌瘤切除子宫) 共 76 例。其中宫颈癌标本 50 例, 宫颈非病变组织标本 26 例 (子宫肌瘤) 作为阴性对照。收集的标本详细登记后, 一份立即液氮速冻, -80°C 冰箱保存, 另一份用中性福尔马林液浸泡, 送病理科。其中宫颈癌组织及宫颈非病变组织各 5 例寄往北京博奥公司行基因芯片检测。

宫颈癌患者, 年龄 27~65 岁, 中位年龄 46 岁。所有病例术前均未行放、化疗, 按照世界抗癌组织 (UICC) 2009 年宫颈癌 TNM 分期标准对全部病例进行统一命名和分类, 其中 I 期 11 例, II 期 17 例, III 期 17 例。患者入选标准: ①术前活检经病理证实诊断为宫颈癌; ②所有患者检查前没有接受化疗或放疗; ③所有患者既往无宫颈癌或其他恶性肿瘤病史。

1.2 方法

1.2.1 全基因组表达谱分析

芯片采用北京博奥公司人类全基因组寡核苷酸芯片 Affymetrix GeneChip® PrimeView™ Human Gene Expression Array 型号的基因芯片, 共有 20 000 条 70met 长度的寡核苷酸, 每条寡核苷酸代表人的一个基因, 核苷酸序列购自美国 Qiagen 公司。检测 5 例病例组 (宫颈癌) 和 5 例对照组的组织标本。对 RMA 算法预处理后的数据进行差异表达基因分析: 有 3 个及以上生物学重复的实验设计, 利用 (significance analysis of microarray) R 程序包分析差异基因, 差异基因的筛选标准是: $q\text{-value} \leq 5\%$ 且 $\text{Fold Change} \geq 2$ 或 ≤ 0.5 ; 利用 MAS 软件分析差异基因功能状态; 使用 Cluster 及 TreeView 软件, 对 5 例宫颈癌和 5 例对照标本组织中的差异表达基因进行聚类分析。

采用 Trizol 一步法提取组织块中的总 RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 并进一步采用 Nucleo-Spin RNA clean-up 试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, Germany) 对总 RNA 进行过柱纯化, 测定浓度和 $\text{OD}_{260/280}$, 并电泳检测 RNA 的完整性。RNA 分光光度计进行 RNA 定量时, $\text{OD}_{260/280}$ 在 1.8~2.0 之间, 甲醛变性凝胶电泳 28S 和 18S rRNA 比值在 2.0 左右。

人类全基因组寡核苷酸芯片检测主要包括如下步骤:

(1) 反转录合成 First strand cDNA: 以 Total RNA 起始, 含有 T7 启动子序列的 T7 Oligo(dT) Primer 为引物, 使用 First Strand Enzyme Mix 合成 First strand cDNA。

(2) 合成 Second strand DNA: 用 Second Strand Enzyme Mix 将 DNA-RNA 杂合体中的 RNA 链转化为 Second Strand cDNA, 合成双链 DNA。

(3) 体外转录合成 cRNA: 以 Second Strand cDNA 为模板, 利用 T7 Enzyme Mix 合成 cRNA, 掺入生物素 biotin。

(4) cRNA 纯化: 使用磁珠纯化 cRNA, 除去盐、酶等杂质, 并对 cRNA 进行定量。

(5) cRNA 片段化: 将 cRNA 片段化成适宜杂交的大小。

(6) 芯片杂交、清洗、扫描: 芯片杂交、清洗扫描甩干后用 $40\mu\text{m}$ 的 Cy3 通道扫描, 扫描时间由芯片类型不同而异, 一般在 5~15min。

(7) 获得芯片杂交图。

1.2.2 实时荧光定量检测

所用的引物及内参照 $\beta\text{-actin}$ 引物均委托上海生工公司合成 (Table 1)。

采集后迅速放至液氮中冷冻, -80°C 保存, 使用 Trizol RNA 提取液, 按照 Promega 说明书对宫颈癌组织和正常宫颈组织提取总 RNA, 通过甲醛变性凝胶电泳定性和紫外分光光度仪定量, 取总 RNA $1\mu\text{g}$, 进行逆转录, 按照说明书进行。DNA 合成, 所得 cDNA 置于 -20°C 保存。采用 SYBER Green 嵌合发光法, 荧光定量 PCR 仪 (ABI7500) 扩增目的基因和内参基因, PCR 反应体系为 $25\mu\text{l}$, $10\times\text{PCR Buffer}$ $2.5\mu\text{l}$, 25mmol/L MgCl_2 $1.5\mu\text{l}$, 10mmol/L dNTP $0.5\mu\text{l}$, 10nmol/L Primer $1\mu\text{l}$, 1nmol/L Probe $2.5\mu\text{l}$, $5\mu\text{l/L Taq}$ $0.25\mu\text{l}$, cDNA $2.5\mu\text{l}$, 无菌蒸馏水 $15\mu\text{l}$, 反应条件: 94°C 变性 5min, 94°C 30s, 58°C 45s, 72°C 30s, 共 40 个循环, 循

Table 1 Primer sequences

Genes	Primers	Length	Bases	Annealing temperature(°C)
Beta-actin-F	ACTTAGTTGCGTTACACCGCTT	21	155bp	56.0
Beta-actin-R	GTCACCTTCACCGTTCCA	18		57.0
Bcl-2-F	CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC	25	318bp	72.0
Bcl-2-R	CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC	25		71.0
Bcl-xl-F	CTGTGCGTGGAAGCGTAG	19	159bp	60.0
Bcl-xl-R	CTCGGCTGCTGCATTGTTTC	19		60.0
c-IAP1-F	TTGTCAACTTCAGATACCACTGGAG	25	123bp	62.0
c-IAP1-R	CAAGGCAGATTTAACCACAGGTG	23		58.0

环结束后 72℃延伸 10min,所有反应均设 3 个复孔。绘制溶解曲线,采用比较阈值法对实时定量 RT-PCR 结果进行定量分析。

1.2.3 免疫组化方法

采用 Envision™ 二步法,10%中性福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋切片(厚度 4μm),常规脱蜡至水,0.3%过氧化氢甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶,高温高压修复抗原,其余步骤按试剂盒说明操作,PBS 代替一抗作为阴性对照,c-IAP1 选择已知阳性的脾脏标本为阳性对照,Bcl-2 的阳性对照取扁桃体组织,Bcl-xl 的阳性对照取前列腺癌组织。

1.3 试剂

逆转录试剂盒(德国 DBI 公司)、RNA 提取试剂盒(Promega)、琼脂糖(美国 Sigma 公司)、PCR 引物(上海生工公司合成)、DBI-2220 实时荧光定量试剂盒(德国 DBI 公司)、Envision™ 二步法免疫组化试剂盒(丹麦 DAKO 公司)、Envision™ 二步法试剂盒(二抗)(丹麦 DAKO 公司),DAB 显色剂(丹麦 DAKO 公司),c-IAP1(一抗,鼠抗人,单克隆,美国 Abcam 公司),Bcl-xl(一抗,鼠抗人,单克隆,美国 Abcam 公司),Bcl-2(一抗,鼠抗人,单克隆,丹麦 DAKO 公司)。

1.4 免疫组化结果判定

免疫组化染色在资深病理科医师指导下进行分析判断,以细胞浆染成黄色或棕褐色为阳性。选择 5 个以上高倍视野,计数不少于 500 个细胞。根据染色显色强度及阳性细胞比例相结合法进行分析评定:①根据着色深浅评分:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;②着色细胞占计数细胞百分率:≤5%为 0 分,6%~20%为 1 分,21%~50%为 2 分,≥51%为 3 分;③染色分值判断:阳性细胞着色深浅分值为①与②的乘积,结果 0 分为阴性,1~3 分为+,4~6 分为++,9 分为+++。

1.5 统计学处理

实时荧光定量采用相对定量 CT 值比较法检验基因的表达变化,行正态性检验及方差齐性检验,符合正态分布、方差齐性,单变量两组资料间用 t 检验,多组比较用单因素方差分析。临床资料中计数资料比较应用χ² 检验,所得数据均用 SPSS17.0 统计软件分析处理,以 P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 维吾尔族宫颈癌与宫颈非病变组织共同差异表达基因的聚类分析结果

对 10 例标本中存在显著变化的基因进行分层

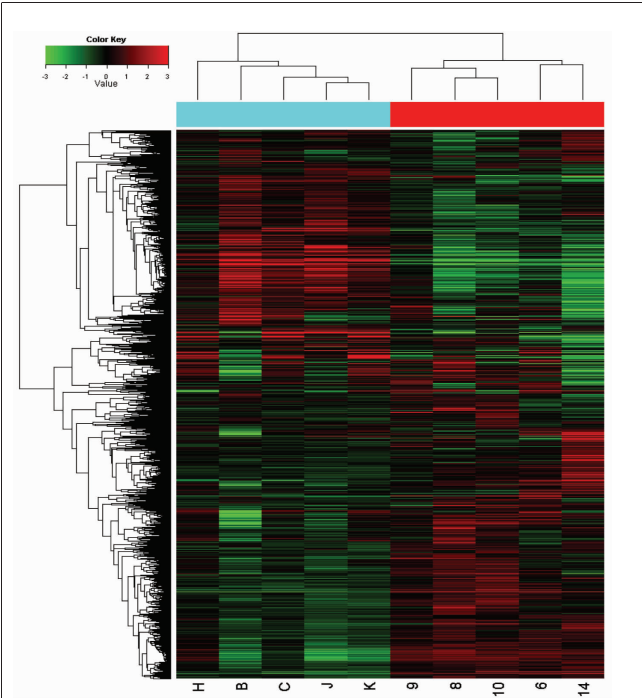


Figure 1 Cluster analysis of uygur cervical cancer and normal cervix differentially expressed genes

聚类分析。其中横排为差异表达基因,纵列为不同患者。前5列为A组(对照组),后5列为B组(宫颈癌组织),红色为上调基因,绿色为下调基因,黑色表示表达无变化,宫颈癌与宫颈非病变组织基因表达存在着明显的聚类性质不同,在凋亡相关通路基因中,宫颈癌组织中以 *Bcl-2*、*c-IAP1* 和 *Bcl-xl* 表达上调最为明显(Figure 1)。

2.2 全基因组与实时定量 PCR 检测凋亡信号通路中与宫颈癌相关基因的表达

全基因组及实时荧光定量检测宫颈癌组织及宫颈非病变组织中凋亡相关基因 *Bcl-2*、*Bcl-xl*、*c-IAP1* 的表达,其中全基因组中宫颈癌组织中 *Bcl-xl* 表达量是宫颈非病变组织中的 2.71 倍,实时荧光定量中宫颈癌组织中 *Bcl-xl* 表达量是宫颈非病变组织中的 4.68 倍;全基因组中宫颈癌组织中 *Bcl-2* 表达量是宫颈非病变组织中的 2.25 倍,实时荧光定量中宫颈癌中 *Bcl-2* 表达量是宫颈非病变组织中的 2.57 倍;全基因组中宫颈癌组织中 *c-IAP1* 表达量是宫颈非病变组织中的 3.91 倍,实时荧光定量中宫颈癌中

c-IAP1 表达量是宫颈非病变组织中的 3.39 倍。可见 *Bcl-xl*、*Bcl-2*、*c-IAP1* 在宫颈癌组织中存在一致性高表达(Table 2)。

2.3 *Bcl-2*、*Bcl-xl* 和 *c-IAP1* mRNA 的表达与临床病理参数的关系

用 qPCR 检测 45 例宫颈癌中 *Bcl-2*、*Bcl-xl* 和 *c-IAP1* mRNA 的表达,数据使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方式表示。经统计学分析,与宫颈非病变组织相比,*Bcl-xl*、*Bcl-2* 和 *c-IAP1* mRNA 在维吾尔族宫颈癌组织中的表达与肿瘤直径、病理分级、临床分期、肌层浸润及是否有淋巴结转移相关($P<0.05$)。在有淋巴结浸润组、深肌层组、临床期别较晚组及肿瘤直径较大组 *Bcl-xl*、*Bcl-2* 和 *c-IAP1* mRNA 的相对表达量均较高。随着临床分期的进展,维吾尔族宫颈癌组织中的 *Bcl-xl*、*Bcl-2* 和 *c-IAP1* mRNA 相对表达量也增加(Table 3)。

2.4 宫颈癌组织及宫颈非病变组织中 *Bcl-2*、*Bcl-xl*、*c-IAP1* 蛋白的表达

采用免疫组织化学 (IHC)Envision 二步法对 45 例宫颈癌和 21 例宫颈非病变组织中 *Bcl-2*、*Bcl-xl*、

Table 2 Quantitative real-time PCR validation of apoptosis pathways related gene expression

Affy id	Symbol	Description	Microarray		Real-time PCR	
			Fold change	P	Fold change	P
11717364_a_at	<i>Bcl-xl</i>	BCL2-like 1	2.71	0.01	4.68	0.01
11721377_x_at	<i>Bcl-2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	2.25	0.03	2.57	0.03
11732804_x_at	<i>c-IAP1</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 2	3.91	0.02	3.39	0.04

Table 3 Relationship between *Bcl-2*、*Bcl-xl*、*c-IAP1* mRNA expression and the clinic pathological parameters

Factors	N	<i>Bcl-2</i>			<i>Bcl-xl</i>			<i>c-IAP1</i>		
		$2^{-\Delta\Delta C_t}$	F/ t	P	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	F/ t	P	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	F/ t	P
Clinic stage										
I	11	3.25			2.35			2.28		
II	17	3.14	8.26	<0.05	4.34	8.26	<0.05	2.80	17.28	<0.05
III	17	4.05	11.29		5.05	11.29		6.28	9.63	
Pathological differentiation										
Low-differentiated	16	0.34			0.68			4.93		
Moderately-differentiated	20	0.57	12.59	<0.05	0.55	12.59	<0.05	3.12	2.36	<0.05
High-differentiated	9	0.46	7.37		0.34	7.37		2.11	12.31	
Lymph node metastasis										
Yes	26	0.89	15.22	<0.05	0.94	15.22	<0.05	5.69	7.68	<0.05
No	19	0.37			0.42			2.58		
Tumor length(cm)										
≥4	24	0.85	7.35	<0.05	0.76	7.35	<0.05	4.23	5.39	<0.05
<4	21	0.38			0.41			3.14		
Muscular infiltration										
Deep muscularis	17	0.58	4.92	<0.05	0.50	4.92	<0.05	3.97	6.57	<0.05
Shallow muscularis	28	0.69			0.51			3.14		

Table 4 Bcl-2、Bcl-xl、c-IAP1 protein expression level in cervical cancer and normal cervix tissues

Groups	N	Bcl-2	Bcl-xl	c-IAP1
Cervical cancer	45	25 (55.6%)	27 (67.5%)	32 (71.1%)
Normal cervix	21	5 (23.8%)	3 (14.3%)	4 (19.0%)
χ^2		25.820	12.357	15.654
P		0.015	0.000	0.000

c-IAP1 蛋白表达进行检测,Bcl-2 在宫颈癌和宫颈非病变组织的阳性表达率分别为 55.6% (25/45)、23.8% (5/21),Bcl-xl 分别为 67.5% (27/45)、14.3% (3/21),c-IAP1 分别为 71.1% (32/45)、19.0% (4/21), 差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 4, Figure 2~4)。

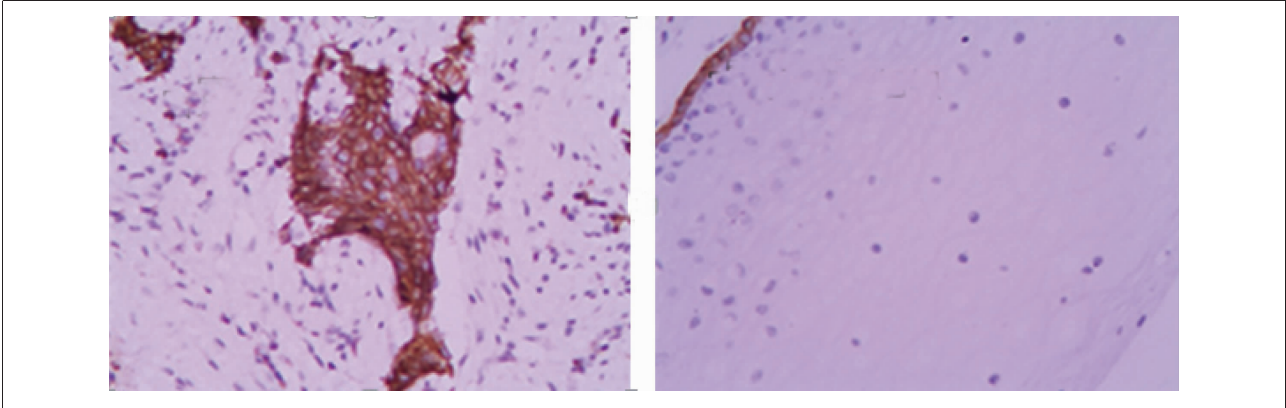


Figure 2 Bcl-2 expression in cervical cancer(left) and normal cervix(right) tissues (Immunohistochemical ×400)

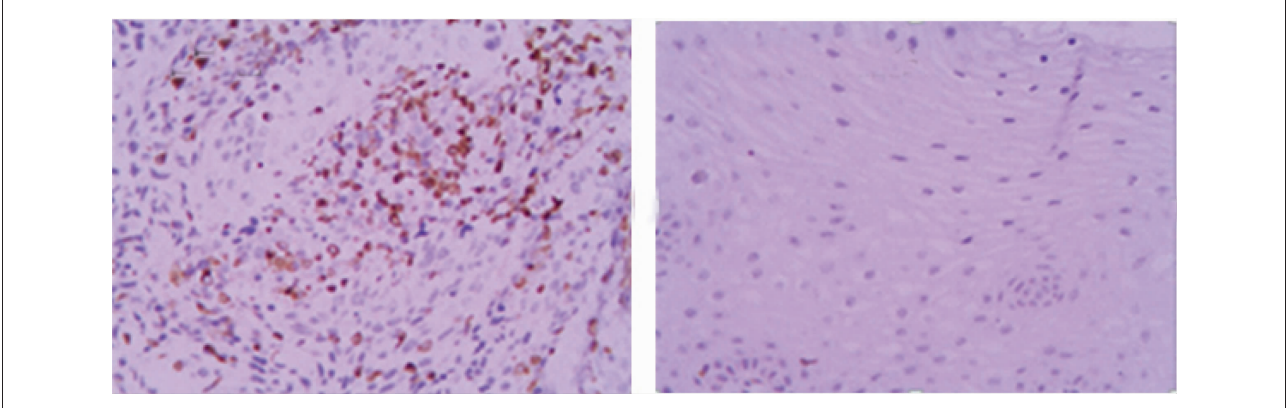


Figure 3 Bcl-xl expression in cervical cancer (left) and normal cervix(right) tissues (Immunohistochemical ×400)

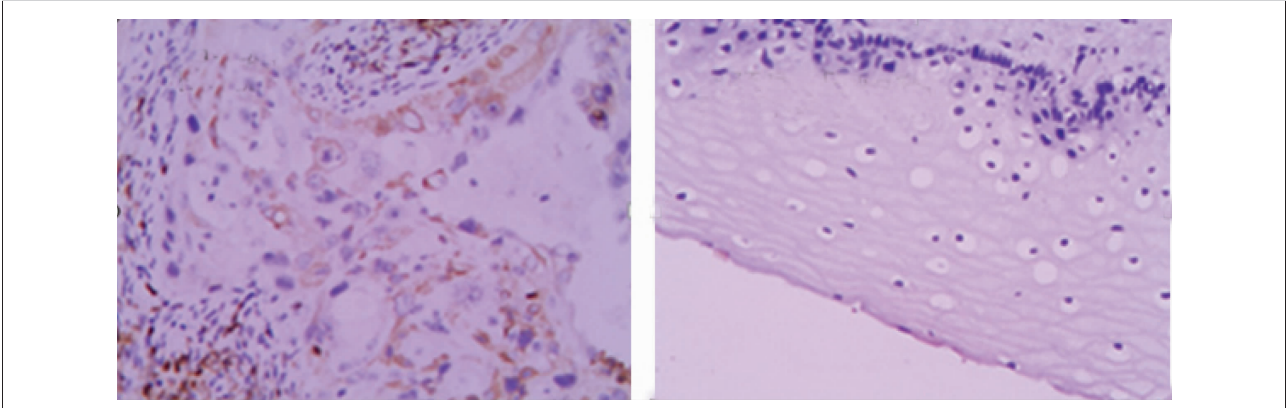


Figure 4 c-IAP1 expression in cervical cancer(left) and normal cervix(right) tissues (Immunohistochemical ×400)

Table 5 Relationship between clinical features of cervical cancer and Bcl-2,Bcl-xl,c-IAP1 protein expression

Factors	N	Bcl-2			Bcl-xl			c-IAP1		
		n(%)	χ^2	P	n(%)	χ^2	P	n(%)	χ^2	P
Lymph node metastasis										
Yes	26	12(46.2)	7.348	0.008	20(76.9)	6.128	0.008	23(88.5)	9.024	0.004
No	19	8(42.1)			7(36.8)			9(47.3)		
Tumor length(cm)										
≥4	24	8(38.1)	10.243	0.002	8(33.3)	10.243	0.002	13(54.2)	5.620	0.019
<4	21	12(50.0)			19(79.2)			19(90.5)		
Pathological differentiation										
High-differentiated	16	5(55.6)	6.173	0.017	4(25.0)	8.916	0.003	6(43.8)	11.025	0.001
Moderately-differentiated	20	6(30.0)			15(75.0)			18(90.0)		
Low-differentiated	9	9(56.2)			8(88.9)			8(88.9)		
Clinic stage										
I	11	2(18.2)	5.812	0.020	3(27.3)	4.504	0.040	5(45.4)	8.762	0.001
II	17	11(64.7)			10(58.8)			14(82.4)		
III	17	12(70.6)			15(88.2)			16(94.1)		
Muscular infiltration										
Deep muscularis	17	5(29.4)	4.600	0.032	6(35.3)	6.949	0.010	9(52.9)	4.391	0.001
Shallow muscularis	28	15(53.6)			21(75.0)			23(82.1)		

2.5 Bcl-2、Bcl-xl 和 c-IAP1 在维吾尔族宫颈癌组织中各临床参数分组中的表达

Bcl-2、Bcl-xl、c-IAP1 蛋白在维吾尔族宫颈癌组织不同临床分期、有无淋巴结转移、肿瘤直径、临床分期、肌层浸润及病理分级中的表达均有差异 ($P<0.05$)。随着临床分期的升高,Bcl-2、Bcl-xl、c-IAP1 蛋白阳性表达率也升高。有淋巴结转移、肿瘤直径大于4cm 及深肌层浸润的 Bcl-2、Bcl-xl、c-IAP1 蛋白阳性表达率较高,不同病理分化程度的维吾尔族宫颈癌组织中 Bcl-2、Bcl-xl、c-IAP1 的阳性表达率也不同 (Table 5)。

3 讨论

基因表达谱分析为高通量的分析肿瘤变化基因提供了全新的手段,可以为研究肿瘤的发生、发展、检测以及预后提供大量的数据。维吾尔族宫颈癌的发生过程都是与原癌基因的表达、细胞增殖、分化、细胞凋亡等密切相关。本研究采用 Affymetrics 寡核苷酸芯片,检测维吾尔族宫颈癌与宫颈非病变组织的差异表达谱,结果显示,与凋亡相关的基因 *c-IAP1* (*BIRC2*)、*Bcl-xl* (*BCL2L1*)、*Bcl-2* 表达均上调。凋亡调控分子(包括 IAP 家族和 Bcl-2 家族)的表达在宫颈癌组织中发生了明显改变;IAP 家族成员

c-IAP1 和 Bcl-2 家族抗凋亡成员 *Bcl-xl*、*Bcl-2* 等在宫颈癌组织中表达升高;本研究在宫颈癌组织中中高表达,用层次聚类分析对差异表达基因进行分析,左侧 5 列聚为一类,均为宫颈癌组织标本,右侧 5 列聚到一类,均为宫颈非病变组织标本,两者的基因呈完全相反的表达趋势;从纵向来看基因的聚类,功能相似的基因被聚类在一起,上调、下调差异基因表达存在着明显的聚类性质不同。相关基因被聚类在一起,根据红、绿色彩的差异可看出 A 组(癌)与 B 组(非癌)之间基因表达明显的差异。提示维吾尔族宫颈癌与宫颈非病变组织基因表达存在着明显的聚类性质不同。

基因芯片的研究方法可提供大量的基因组信息,对这些变化基因信息进行分析,有助于对宫颈癌发生发展的分子机制、信号转导通路进行进一步的认识,并可能为肿瘤的早期诊断、基因分型、基因治疗提供新的方向。

3.1 c-IAP1、Bcl-2、Bcl-xl 在维吾尔族宫颈癌及宫颈非病变组织中表达的差异

本文通过扩大样本对与凋亡相关基因 *c-IAP1*、*Bcl-2*、*Bcl-xl* 基因进行实时荧光定量及免疫组化进一步验证,结果提示,与宫颈非病变组织相比,宫颈癌组织中 *c-IAP1*、*Bcl-xl*、*Bcl-2* 高表达,与全基因组表达谱结果一致。*Bcl-xl* 与 *Bcl-2* 有着高度的序列

同源性并且在许多肿瘤中共同表达,但有着不同的生物学作用。尽管 Bcl-2 和 Bcl-xl 都发挥了抗凋亡作用,但其途径不同。Bcl-xl 对凋亡的抑制作用强于 Bcl-2,因为 Bcl-xl 的过度表达可以抑制凋亡通路。Bcl-2 在肿瘤形成的过程中,不是通过促进肿瘤细胞的增殖,而是通过阻止肿瘤细胞凋亡而促进肿瘤发生、发展。c-IAP1 在宫颈癌组织中的表达及其意义,目前报道较少。本课题前期使用全基因组检测宫颈癌组织及宫颈非病变组织,发现宫颈癌中 c-IAP1 表达较宫颈非病变组织高 2.91 倍。实时荧光定量分析结果显示,宫颈癌组织中 c-IAP1 表达较宫颈非病变组织中表达高 2.39 倍,与全基因组结果一致性较高。

凋亡抑制蛋白 c-IAP1 广泛存在于各种肿瘤中,在白血病、淋巴瘤、肺癌、卵巢癌、肾细胞癌、黏膜和色素瘤、腺样囊性癌等恶性肿瘤组织中表达升高^[2]。Vázquez-Franco 等^[3]检测急性白血病患者及健康献血者 c-IAP1 的表达,发现急性白血病患者血液中 c-IAP1 呈现高表达。在宫颈癌中表达的报道尚比较少见,早在 2000 年有国外一项报道提示 c-IAP1 在宫颈癌中表达与宫颈非病变组织比较没有统计学差异。本文全基因组、实时荧光定量、免疫组化检测维吾尔族宫颈癌组织及宫颈非病变组织,发现维吾尔族宫颈癌中 c-IAP1 表达较宫颈非病变组织高,说明 c-IAP1 与宫颈鳞状上皮细胞癌(CSCC)的发生、发展有关,与宫颈非病变组织的鳞状细胞相比,早期鳞状细胞癌中 c-IAP1 扩增明显,晚期宫颈鳞状细胞癌更高。

细胞凋亡调控的失调是导致肿瘤发生发展的重要方面,Bcl-xl、Bcl-2 主要通过线粒体途径参与凋亡调控,当细胞受到死亡信号刺激,与 Bcl-2 相结合的 bax 就会被置换出来,线粒体膜通透性增加,释放出一系列物质,最终导致细胞死亡。实时荧光定量和免疫组化验证宫颈癌组织中 Bcl-xl、Bcl-2 呈高表达,与基因芯片结果一致。有研究者证实 Bcl-xl 的抑凋亡作用比 Bcl-2 强^[4]。所以,我们还认为在治疗中应该设计针对 Bcl-xl 而非 Bcl-2 靶点的药物。Bcl-2 在调控细胞程序死亡中具有非常重要的作用,Liu 等^[5]研究显示,与宫颈非病变组织相比,宫颈癌组织中 Bcl-2 的表达水平增加。Hagemann 等^[6]在宫颈癌中检测到 Bcl-2 和 bax 表达下调,认为 Bcl-2 在宫颈癌复发转移中可作为新的分子治疗策略的潜在目标。

Dimitrakakis 等^[7]研究发现在宫颈癌患者中 Bcl-2 表达阳性者,预后反而较好,生存期延长。本文前期使用全基因组检测宫颈癌组织及宫颈非病变组织,发现宫颈癌组织中 Bcl-2 较宫颈非病变组织表达升高,实时荧光定量和免疫组化验证宫颈癌组织中 Bcl-2 也呈高表达,与基因芯片结果一致。

3.2 c-IAP1、Bcl-2、Bcl-xl 与宫颈癌组织各临床参数的关系

本研究中,c-IAP1、Bcl-2、Bcl-xl 的 mRNA 及蛋白的表达与临床分期有关,随着临床分期的进展,宫颈癌组织 c-IAP1、Bcl-2、Bcl-xl 的表达逐渐增高,提示 c-IAP1、Bcl-2、Bcl-xl 在维吾尔族宫颈癌的发病进展中起着一定的作用,推测可能由于 c-IAP1、Bcl-2、Bcl-xl 表达增高扰乱了信号传导的调节和正常基因表达的调节,从而使细胞的增殖与分化调节异常,导致恶性肿瘤的发生。目前尚未见报道 c-IAP1 在宫颈癌前各级病变中的表达情况,尚需进一步研究和探讨。Tjalma 等^[8]报道随宫颈癌临床分期的降低,Bcl-2 蛋白的表达也逐渐降低。Sinicrope 等^[9]发现大肠腺瘤中 Bcl-2 的表达高于恶性肠癌,这进一步证实 Bcl-2 在肿瘤早期发生着重要作用。临床上患者的预后与患者癌组织的病理分化程度是相关的,在宫颈癌中肿瘤的分期及病理分级被认为是决定预后的重要因素,本研究中与宫颈非病变组织相比,维吾尔族宫颈癌组织中 Bcl-2、Bcl-xl 和 c-IAP1 mRNA 及蛋白在病理分化程度上有显著差异,病理分化为低分化的组织,其 Bcl-2、Bcl-xl 和 c-IAP1 的表达阳性率较高,有淋巴结转移组的 mRNA 及蛋白均高表达于无淋巴结转移组,且与肌层浸润深度有明显的一致性,肌层浸润深的癌组织中 Bcl-2、Bcl-xl 和 c-IAP1 的表达也较高,与临床分期也有较高的一致性。Bcl-2、Bcl-xl 和 c-IAP1 mRNA 及蛋白的表达与患者肿瘤直径有显著相关性,肿瘤直径较大的组织中 Bcl-2、Bcl-xl 和 c-IAP1 的表达也较高,可能与肿瘤直径较大的患者,其临床期别较晚有关。

3.3 Bcl-2、c-IAP1、Bcl-xl 表达和肿瘤的机制探讨

我们采用实时荧光定量及免疫组化的方法对 c-IAP1、Bcl-2、Bcl-xl 在宫颈癌中的表达进行了定性及定量研究。结果表明,c-IAP1、Bcl-2、Bcl-xl mRNA 及蛋白的高表达与宫颈癌的发病密切相关,c-IAP1 过度表达可能与 Bcl-xl 参与的细胞增殖和凋亡失衡

有关,在宫颈癌的发展过程中,两种蛋白表达有协同效应。Wong 等^[10]在小细胞肺癌中研究了 c-IAP1、Bcl-xl 的蛋白表达,发现这两种基因在肺癌中高表达,一氧化氮(NO)/环鸟苷(cGMP)/蛋白激酶 G 型 I α (PKG-I α)信号通路在正常细胞(骨髓基质细胞和血管平滑肌细胞)与某些癌细胞(卵巢癌细胞)中促进细胞增殖,防止自发的细胞凋亡中起着重要的作用,如果可以抑制 PKG I α 激酶活化的作用,可使化疗药顺铂在肿瘤细胞中的促凋亡作用增强,并表明 c-IAP1 的过表达,激活了 PKG I α 激酶的活化磷酸化水平,避免了肿瘤细胞自发性凋亡,并促进非小细胞肺癌细胞集落形成,从而降低了化疗药物顺铂在肿瘤治疗中的疗效。提示 c-IAP1 受到 Bcl-xl 的正性调节作用可能是主要因素,也并非惟一因素。王艳等^[11]检测急性白血病患者血液中 c-IAP1、Bcl-2 的表达,发现在首次医治的患者中这两个基因表达较高。Bcl-xl 蛋白不仅在前列腺癌和膀胱肿瘤等多种 Bcl-2 蛋白高表达的肿瘤中呈高表达,而且在部分 Bcl-2 低表达的肿瘤,比如恶性胶质瘤和血液系统肿瘤中也呈高表达^[12,13]。本研究中 Bcl-xl 和 c-IAP1 在宫颈癌中呈一致性增高,与 Wong 等^[10]在肺癌中的研究结果类似。环氧合酶 2 被证实可以增加 Bcl-2 的表达,环氧合酶 2 增加,可以抑制细胞凋亡,延长肿瘤细胞的存活,环氧合酶 2 还能降低 Bcl-xl 的表达,各基因之间在肿瘤发展的早期或晚期互相作用。肿瘤的发生及进展到各阶段,绝不是个别基因在起作用,而是多种突变或异常激活使得基因分别上调或下调,发挥正性或负性调节作用,动态协调,平衡细胞增殖与凋亡的关系,共同促进了细胞的癌变,其复杂的机制及调控通路尚未完全被揭示。

参考文献:

- [1] Vicil P, Mariani F, Pizzutil L, et al. Emerging biological treatments for uterine cervical carcinoma[J]. J Cancer, 2014, 5(2): 86-97.
- [2] Grzybowska-Izydorczyk O, Cebula B, Robak T, et al. Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(4): 800-810.
- [3] Vázquez-Franco JE, Reyes-Maldonado E, Vela-Oieda J, et al. Src, Akt, NF- κ B, BCL-2 and c-IAP1 may be involved in an anti-apoptotic effect in patients with BCR-ABL positive and BCR-ABL negative acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Res, 2012, 36(7): 862-866.
- [4] Maurer CA, Friess H, Bühler SS, et al. Apoptosis inhibiting factor Bcl-xl might be the crucial member of the Bcl-2 gene family in colorectal cancer[J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(12): 2641-2648.
- [5] Liu L, Yu X, Guo X, et al. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(3): 753-760.
- [6] Hagemann T, Bozanovic T, Hooper S, et al. Molecular profiling of cervical cancer progression [J]. Br J Cancer, 2007, 96(2): 321-328.
- [7] Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions[J]. Gynecol Oncol, 2000, 77(1): 129-136.
- [8] Tjalma W, De Cuyper E, Weyler J, et al. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix[J]. Am J Obstet Gynecol, 1998, 178(1Pt 1): 113-117.
- [9] Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KK, et al. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis[J]. Cancer Res, 1995, 55(3): 237-241.
- [10] Wong JC, Bathina M, Fissus RR. Cyclic GMP/protein kinase G type- I α (PKG- I α) signaling pathway promotes CREB phosphorylation and maintains higher c-IAP1, livin, survivin, and Mcl-1 expression and the inhibition of PKG-I α kinase activity synergizes with cisplatin in non-small cell lung cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(11): 3587-3598.
- [11] Wang Y, Ren JH, Lin FR, et al. Expressions of c-IAP1 and bcl-2 gene in acute leukemia and their clinical significance [J]. Clinical Focus, 2005, 20(23): 1362-1364. [王艳, 任金海, 林凤茹, 等. c-IAP1 与 bcl-2 基因在急性白血病中的表达及临床意义 [J]. 临床荟萃, 2005, 20(23): 1362-1364.]
- [12] Giorgini S, Trisciuglio D, Gabellini C, et al. Modulation of Bcl-xL in tumor cells regulates angiogenesis through CX-CL8 expression[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(8): 761-771.
- [13] Swanson PJ, Kuslak SL, Fang W, et al. Fatal acute lymphoblastic leukemia in mice transgenic for B cell-restricted Bcl-xL and c-myc[J]. J Immunol, 2004, 172(11): 6684-6691.