

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.23.002

维吾尔族宫颈病变中 VEGF-C 与 HPV 相关性研究*

王新玲¹,李昭昭¹,古扎丽努尔·阿不力孜^{2△},夏 鸣³
(1.新疆医科大学附属肿瘤医院妇外四科,乌鲁木齐 830011;2.新疆医科大学附属肿瘤医院
妇外五科,乌鲁木齐 830011;3.重庆医科大学第一临床学院,重庆 400046)

[摘要] 目的 探讨血管内皮生长因子 C(VEGF-C)在维吾尔族宫颈病变[宫颈上皮内瘤变(CIN)Ⅰ~Ⅲ及早期宫颈癌]组织中的表达及其与人乳头瘤病毒(HPV)载量相关性。方法 采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法测定 140 例维吾尔族妇女(慢性宫颈炎 30 例,CIN Ⅰ、CIN Ⅱ、CIN Ⅲ 各 20 例,早期宫颈癌 50 例)宫颈石蜡切片组织中 VEGF-C 的水平;术前用第 2 代杂交捕获(HC-Ⅱ)方法测定同一患者术前宫颈 HPV 载量;比较 2 个指标同宫颈病变的关联。结果 CIN Ⅱ、CIN Ⅲ 及早期宫颈癌组织 VEGF-C 水平、宫颈病变程度及 HPV 载量均高于慢性宫颈炎组织($P<0.05$);组织中 VEGF-C 水平与 HPV 载量呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 新疆维吾尔族妇女宫颈组织中 VEGF-C 水平、HPV 载量均与宫颈病变严重程度相关,且二者存在协同作用。

[关键词] 宫颈肿瘤;宫颈疾病;血管内皮生长因子;人乳头瘤病毒
[中图分类号] R737.3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2016)23-3173-03

Correlation between the expression of VEGF-C and HPV load in cervical disease of Vighur population*

Wang Xinling¹,Li Zhaozhao¹,Guzalnur·Abuliz^{2△},Xia Ming³
(1.4th Department of Gynecologic Surgery,Xinjiang Medical Affiliated Tumor Hospital,Urumqi,the Xinjiang
Uygur Autonomous Region 830011,China;2.5th Department of Gynecologic Surgery,Xinjiang Medical
Affiliated Tumor Hospital,Urumqi,the Xinjiang Uygur Autonomous Region 830011,China;3.the First
Clinical College of Chongqing Medical University,Chongqing 400046,China)

[Abstract] Objective To study the relations between the expression of VEGF-C and HPV load in cervical disease in Uighur population of Xinjiang. Methods A total of 140 cases including 30 cases of normal cervical tissues,60 cases of CIN Ⅰ—Ⅲ and 50 cases of cervical cancer tissues were selected in this experiment. The expression of VEGF-C of all cases were detected by Real-time PCR assay;HPV load were detected by HC-Ⅱ before operation. And we compared the relationship between cervical lesions and these two index. Results VEGF-C and HPV load were both over-expressed in cervical cancer and CIN Ⅱ—Ⅲ tissues,compared with normal cervical tissues($P<0.05$). In cervical cancer samples and CIN samples,the expression level of VEGF-C and the degree of cervical diseases were positive associated with HPV load($P<0.05$). Conclusion The expression level of VEGF-C and HPV load are both related to the degree of cervical lesions.

[Key words] uterine cervical neoplasms;uterine cervical diseases;vascular endothelial growth factor;human pappilomavirus

宫颈癌在女性恶性肿瘤中发病率排第 4 位^[1],是维吾尔族妇女高发的恶性肿瘤,总生存率排第 7 位^[2-3]。据报道,宫颈癌发病人数约有 50 万/年,死亡人数将近 3 万/年。在中国,新疆是宫颈癌高发的地区。目前已经确定人乳头瘤病毒(human pappilomavirus,HPV)的持续感染是宫颈癌前病变发生及进展为宫颈癌的病因,但并不是全部 HPV 持续感染的女性都会罹患宫颈癌,这表明在宫颈癌发病过程中尚存其他协同因素^[4-5]。本研究通过采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)和 HPV DNA 第 2 代杂交捕获(hybrid capture Ⅱ,HC-Ⅱ)法分别检测 140 例维吾尔族宫颈病变患者组织中血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor C,VEGF-C)的 RNA 表达水平及 HPV 病毒载量,以明确 VEGF-C 在新疆维吾尔族妇女宫颈病变发生、发展中的作用,及 VEGF-C 的 RNA 表达水平与 HPV 载量的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 12 月到 2015 年 6 月符合纳入

标准的新疆医科大学附属肿瘤医院住院患者的病理标本。石蜡标本:慢性宫颈炎 30 例(作为正常对照组)、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia CIN)Ⅰ 20 例、CIN Ⅱ 20 例、CIN Ⅲ 20 例、早期宫颈癌 50 例并取同一患者治疗前的宫颈 HPV(定量)标本。标本纳入标准:(1)所有患者均为维吾尔族妇女;(2)慢性宫颈炎标本均为子宫肌瘤行全子宫切除术后标本,均未合并任何宫颈疾病或其他影响试验结果的疾病;(3)CIN Ⅰ、CIN Ⅱ、CIN Ⅲ 均为初治锥切大体标本;(4)早期宫颈癌 FIGO 2009 分期ⅠB1~ⅡA1 期均为鳞癌术后大体标本,术前未经过辅助放化疗。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 RNAprep Pure FFPE Kit(DP439,天根,北京);FastQuant RT Kit(KR106-02,天根,北京);SYBR Select Master Mix(4472920,ABI,USA);梯度 PCR 仪(MyCycler Thermal Cycler,Bio-Rad,USA);Real-time PCR 仪器(7500,ABI,USA)。

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2013211A071)。 作者简介:王新玲(1966—),主任医师,硕士,主要从事妇科肿瘤方面研究。
△ 通讯作者,Email:gzlhr@qq.com。

表 1 宫颈病变与 HPV 载量相关性分析[n(%)]

宫颈病变程度	HPV 载量(RLU/CO)					合计
	<1	1~<10	10~<100	100~1 000	>1 000	
慢性宫颈炎	27(19.29)	3(2.14)	0(0)	0(0)	0(0)	30(21.43)
CIN I	4(2.86)	2(1.43)	4(2.86)	3(2.14)	7(5.00)	20(14.29)
CIN II	3(2.14)	4(2.86)	4(2.86)	3(2.14)	6(4.29)	20(14.29)
CIN III	1(0.71)	0(0)	2(1.43)	9(6.43)	8(5.71)	20(14.28)
早期宫颈癌	0(0)	2(1.42)	11(7.86)	20(14.29)	17(12.14)	50(35.71)
合计	35(25.00)	11(7.86)	21(15.00)	35(25.00)	38(27.14)	140(100.00)

1.2.2 总 RNA 抽提和 cDNA 合成 石蜡样品切成 5~10 μm 厚的片状,取出 2~8 张切片放置于 1.5 mL RNase-Free 离心管中,向离心管中加入 1.0 mL 二甲苯剧烈涡旋 10 s,室温 15~25 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 2 min。加入 1.0 mL 无水乙醇涡旋混匀,室温 15~25 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 2 min。37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min。加入 200 μL 裂解液 RF,10 μL Proteinase K 彻底涡旋混匀 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,室温 15~25 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 5 min。加入 220 μL 的缓冲液 RB,660 μL 的无水乙醇,12 000 r/min 离心 1 min。加入 80 μL 的 DNase I 工作液,室温 15 min。加入 500 μL 去蛋白液 RW1,室温 15~25 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 30~60 s。加入 500 μL 漂洗液 RW,室温静置 2 min,12 000 r/min 离心 30~60 s;室温 15~25 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 2 min。悬空滴加 30~100 μL RNase-Free 双蒸水(ddH₂O),室温 12 000 r/min 离心 2 min,得到 RNA 溶液。核酸蛋白定量仪检测 RNA 浓度、A₂₆₀/A₂₈₀,电泳检测 RNA 完整性。RNA 样本按照 5 $\times$ g DNA Buffer 2 μL 、Total RNA、RNase-Free ddH₂O 补足到 10 μL 配置好体系简离心(42 $^{\circ}\text{C}$,孵育 3 min)。将反转录反应中的 Mix(10 $\times$ Frist-Strand Buffer 2 μL ,RT Primer Mix 1 μL ,FQ-RT Primer Mix 2 μL ,RNase-Free ddH₂O 补足到 10 μL)加入反应液混匀(42 $^{\circ}\text{C}$,15 min;95 $^{\circ}\text{C}$,孵育 3 min),得到的 cDNA。

1.2.3 Real-time PCR 检测 引物由欧易生物公司设计合成,反应体系:Forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$)0.4 μL ,Reverse primer(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ,SYBRR Select Master Mix (2X) 10.0 μL ,cDNA template 1.0 μL ,RNase-Free water 加至 20.0 μL 。上游引物:5'-GGC TGG CAA CAT AAC AGA GAA-3',引物长度 21 bp,下游引物:5'-CCC CAC ATC TAT ACA CAC CTC C-3',引物长度 22 bp。每个样品重复 3 次实验,通过观察样品扩增曲线和溶解曲线,了解实验情况。同时进行内参基因 β -Actin 检测。将标准品进行 10 倍梯度稀释拷贝 5 个梯度后,进行 Real-time PCR,将阳性梯度的模板浓度和对应的 CT 值进行标准曲线的计算,相对表达量=2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 。

1.2.4 高危型 HPV 的检测 手术前采用 HC-II 法检测患者宫颈 HPV 载量。用专用 HPV 取样器,插入宫颈外口,顺/逆时针(同方向)转动 5~8 圈,取出后放入含有保存液的配套试管中,随后送至该院检验科进行检测。HPV 试剂购于上海凯杰企业管理有限公司(Qiagen Gaithersburg, MD20878, Inc)。HC-II 检测样本中 HPV-DNA 水平。具体操作步骤由检验科的检验专业医师操作,按试剂盒说明的详细步骤进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spersman 等级相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 VEGF-C 的表达 各组组织中 VEGF-C 基因的相对表达量不同,其中 CIN II [(1.158 $\pm$ 0.144) pg/mL]、CIN III [(2.161 $\pm$ 0.288) pg/mL] 及早期宫颈癌 [(2.929 $\pm$ 0.600) pg/mL]组织中 VEGF-C 水平比慢性宫颈炎[(1.009 $\pm$ 0.135) pg/mL]组织明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);CIN III 及早期宫颈癌组织中 VEGF-C 水平比 CIN I [(1.071 $\pm$ 0.124) pg/mL]、CIN II 均明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);早期宫颈癌组织中 VEGF-C 水平比慢性宫颈炎、CIN I~III 组织均明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 HPV 的感染情况 HPV 在慢性宫颈炎、CIN I~III 和早期宫颈癌中的感染情况(HPV 载量大于 1 为感染)分别为 3/30(10%)、16/20(80%)、17/20(85%)、19/20(95%)和 50/50(100%),病变程度越高,HPV 感染率亦明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1;HPV 载量同宫颈病变程度有相关性,呈中度正相关($r=0.59,P<0.01$)。

2.3 VEGF-C 和 HPV 载量的关系 经 Spersman 等级相关分析,VEGF-C 在宫颈病变的表达水平与 HPV 载量有相关性,呈正相关($r=0.179,P=0.035$)。

3 讨 论

3.1 VEGF-C 与宫颈病变的关系 VEGF 在目前已知的各种淋巴管内皮生长刺激因子中特异性最高,其中 VEGF-C 最为显著。VEGF-C 是目前公认的淋巴管生成因子,可以导致淋巴管内皮细胞增殖、分化、迁移,在诱导肿瘤细胞的增殖及转移过程中起重要作用。有研究表明,VEGF-C 在正常宫颈组织中不表达,在 CIN II~III 及宫颈鳞癌组织中表达均增高^[6]。Inamine 等^[7]研究证明,VEGF-C 是宫颈癌变的早期标志物,并与 CIN 级别呈正相关。也有研究证明,VEGF-C 可促进肿瘤直径增大、原发肿瘤进展,从而导致局部浸润、淋巴结远处转移,最终可在一定程度上影响肿瘤预后^[8-10]。本研究结果显示,高级别宫颈病变(CIN II~III 及宫颈癌)组织中 VEGF-C 水平比慢性宫颈炎组织明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);在慢性宫颈炎、CIN I~III 和宫颈癌发展过程中水平逐渐增高,在宫颈癌中最高,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 VEGF-C 与维吾尔族宫颈癌发生、发展密切相关,可能在 CIN 发展为宫颈癌并继续进展转移过程中发挥一定作用,本研究与其他研究结果相符。

3.2 HPV 载量与宫颈病变的关系 HPV 主要侵犯皮肤和黏膜的上皮细胞。HPV E 基因编码的蛋白具有多种调控功能,E6、E7 是最重要的调控蛋白,可促使肿瘤发生、发展。研究已经确定,高危型 HPV 病毒的持续感染可以导致宫颈癌前病发生并最终发展为宫颈癌。吕倩灵等^[11]认为宫颈癌及其癌前病变的发生、发展与高危型 HPV 的感染及其病毒载量高低密

切相关。高玉华等^[12]针对各级别宫颈病变中 HPV 病毒载量的分布研究发现,HPV 病毒载量与宫颈病变的严重程度具有密切相关性,HPV 病毒较高载量的持续感染预示着宫颈高级别病变发生率增高。本研究的结果表明,维吾尔族各级别宫颈病变与慢性宫颈炎组织相比,HPV 感染率明显升高,且宫颈 HPV 感染率与宫颈上皮细胞损伤严重程度呈正比,差异有统计学意义($r=0.59, P<0.01$)。

3.3 VEGF-C 和 HPV 的关系 HPV 致癌机制尚不完全明确,目前关于 HPV 载量和 VEGF-C 相关性的研究尚不多见。Huang 等^[13]通过 PCR 的方法将 HPV-16 E6 阳性的细胞同 HPV-16 E6 阴性的比较,发现 HPV 的原癌基因可能通过直接作用于 VEGF-C 的基因启动子区促进肿瘤血管生成,提示 VEGF-C 的表达与 HPV 密切相关。还有研究进一步发现 HPV-16 E6 原癌蛋白可以激活缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α),增强了 VEGF-C 的释放,同时,HPV-16 E5 的原癌蛋白还通过激活多条信号通路上调了 VEGF-C 的表达^[14-16]。目前试验结果表明,HPV、VEGF-C 在细胞周期调控之间可能存在着极其复杂的网络化的相互联系,二者在宫颈癌前病变及宫颈癌的发生、发展及肿瘤血管生成过程中发挥协同作用,因此认为 HPV 的免疫表达同 VEGF-C 的密度显著相关,HPV 感染可能刺激了宫颈癌中肿瘤血管生成,这是 HPV 引发宫颈癌的重要机制之一。本研究结果显示,维吾尔族妇女各级别宫颈病变组织中 VEGF-C 表达水平和高危 HPV 载量呈正相关($r=0.18, P<0.01$),提示二者之间存在一定的内在联系,但相关性较弱。考虑可能为本研究样本量较小,需前瞻性大样本试验进一步证实维吾尔族患者 HPV 是否通过提高 VEGF-C 水平而导致恶性肿瘤发生、发展及播散。还有研究进一步发现 HPV-16 E6 原癌蛋白可以激活 HIF-1 α ,增强了 VEGF-C 的释放,同时,HPV-16 E5 的原癌蛋白还通过激活多条信号通路上调了 VEGF-C 的表达^[12-14]。因此有理由认为 HPV 的免疫表达同 VEGF-C 的水平显著相关,HPV 感染可能刺激了宫颈癌中肿瘤血管生成,这是 HPV 引发宫颈癌的重要机制之一。目前试验结果表明,HPV、VEGF-C 在细胞周期调控之间可能存在着极其复杂的网络化的相互联系,二者在宫颈癌前病变及宫颈癌的发生、发展及肿瘤血管生成过程中发挥协同作用。

高危型 HPV 的感染可促进 VEGF-C 表达增加,进一步引起宫颈癌组织的血管生成,是宫颈癌发生、侵袭及转移的重要机制之一。但目前高危型 HPV 感染如何促进血管内皮生长因子 C 在肿瘤血管及淋巴管形成中的作用和具体机制尚不完全明确,需要进一步的研究,若明确其作用,则可以通过阻断该途径,从而防止 CIN 向宫颈癌发展。

参考文献

- [1] Park JY, Sheung Ngan HY, Park W, et al. Asian Society of Gynecologic Oncology International Workshop 2014 [J]. J Gynecol Oncol, 2014, 26(1): 68-74.
- [2] Rebecca S, Jiemin M, Zou ZH, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA, 2014, 64(1): 9-29.
- [3] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): 359-386.
- [4] Snijders PJ, Verhoef VM, Arbyn M, et al. High-risk HPV

testing on self-sampled versus clinician-collected specimens; a review on the clinical accuracy and impact on population attendance in cervical cancer screening[J]. Int J Cancer, 2013, 132(10): 2223-2236.

- [5] Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, et al. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening[J]. J Clin Virol, 2015, 14(2): 107-109.
- [6] 王惠芬, 毛熙光. 肿瘤增殖相关分子(TSPAN-1)和血管内皮生长因子 C(VEGF-C)在宫颈鳞癌中的表达及意义[J]. 当代医学, 2016, 15(6): 1-4.
- [7] Inamine M, Nagai Y, Mitsunashi A, et al. Cigarette smoke stimulates VEGF-C expression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1 and 2 lesions[J]. Int J Clin Oncol, 2012, 17(5): 498-504.
- [8] Duan L, Ye L, Zhao G, et al. Serum spleen tyrosine kinase and vascular endothelial growth factor-C levels predict lymph node metastasis of oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2013, 43(3): 58-63.
- [9] Wakisaka N, Hirota K, Kondo S, et al. Induction of lymphangiogenesis through vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor receptor 3 axis and its correlation with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oral Oncol, 2012, 48(8): 703-708.
- [10] Acs G, Paragh G, Rakosy Z, et al. The extent of retraction clefts correlates with lymphatic vessel density and VEGF-C expression and predicts nodal metastasis and poor prognosis in early-stage breast carcinoma [J]. Mod Pathol, 2012, 25(2): 163-177.
- [11] 吕倩灵, 张玲, 林伟平, 等. 高危型人乳头状瘤病毒及病毒载量对宫颈癌癌前病变的相关性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(4): 804-805.
- [12] 高玉华, 高岩, 汤巍巍, 等. 高危型 HPV DNA 检测在宫颈病变诊治中意义的研究[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(11): 1548-1550.
- [13] Huang Q, Qu QX, Xie F, et al. CD40 is overexpressed by HPV16/18-E6 positive cervical carcinoma and correlated with clinical parameters and vascular density[J]. Cancer Epidemiol, 2011, 35(4): 388-392.
- [14] Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. Expression of human skin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors[J]. Oncogene, 2004, 23(17): 2988-2995.
- [15] Chen L, Wu YY, Liu P, et al. Down-regulation of HPV18 E6, E7 or VEGF expression attenuates malignant biological behavior of human cervical cancer cells[J]. Med Oncol, 2011, 28(1): 528-539.
- [16] Zappacosta R, Lattanzio G, Viola P, et al. A very rare case of HPV-53-related cervical cancer, in a 79-year-old woman with a previous history of negative pap cytology [J]. Clin Interv Aging, 2014, 9(2): 683-688.