

Mcl-1 在宫颈癌组织中的表达及临床意义

张 婷¹, 赵 纯², 项静英^{1*}

(¹南京医科大学附属无锡妇幼保健院检验科, 江苏 无锡 214002; ²南京医科大学附属南京妇幼保健院生殖中心, 江苏 南京 210004)

[摘要] 目的:探讨 Mcl-1 在宫颈癌的表达水平及其与临床病理特征的关系。方法:应用 qRT-PCR 技术检测 20 例宫颈癌组织及癌旁正常组织 Mcl-1mRNA 水平,同时应用免疫组织化学技术检测 45 例宫颈癌组织及正常宫颈组织 Mcl-1 表达水平,分析其表达与临床病理特征的关系。结果:宫颈癌组织 Mcl-1mRNA 表达水平明显高于正常宫颈组织($P < 0.05$),Mcl-1 在宫颈癌组织中的表达阳性率为 53.3%,明显高于正常宫颈组织的阳性率 11.1% ($P < 0.05$),其表达与病理分级、肿瘤大小及淋巴结转移有显著相关性($P < 0.05$)。结论:Mcl-1 的表达与宫颈癌的发生、发展有关,可作为宫颈癌诊断及临床监测的分子标志物。

[关键词] 宫颈癌;Mcl-1;肿瘤生物学特性

[中图分类号] R737.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-819-04

The expression and clinical significances of Mcl-1 in cervical cancer

ZHANG Ting¹, ZHAO Chun², XIANG Jing-ying^{1*}

(¹Clinic Test Laboratory, Wuxi Maternity and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214002; ²Center of Reproduction, Nanjing Maternity and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the expression profile of Mcl-1 in cervical cancer and its relationship with the clinical pathological characteristic, and to assess its clinical significance. **Methods:**Mcl-1mRNA expression both in cervical cancer and in corresponding normal tissue was detected by reverse transcription fluorescent quantitation polymerase chain reaction method. Mcl-1 protein expression was detected by immunohistochemistry method. The correlation of Mcl-1 expression and clinicopathological features of cervical cancer was analyzed. **Results:**Mcl-1mRNA was higher in cervical cancer tissue when compared with corresponding normal tissue. Mcl-1 was overexpressed in cervical cancer tissue (positive rate of 53.3%) when compared with corresponding normal tissue (positive rate of 11.1%). High expression of Mcl-1 was significantly correlated with histological grade, tumor size and lymph node involvement ($P < 0.05$). **Conclusion:**Our results suggest that Mcl-1 may play an important role in cervical cancer and have potential as biomarker and therapeutic target.

[Key words] cervical cancer; Mcl-1; oncobiology characteristic

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 819-822]

宫颈癌是女性最常见的生殖系统恶性肿瘤,严重危害女性健康和生命^[1]。最新统计结果显示:从 1980 年~2010 年,全球宫颈癌发病率平均每年以 0.6%的增幅递增,仅 2010 年,发展中国家因宫颈癌死亡的女性总数就达到 200 000 之多,死亡年龄也更趋于年轻化^[2]。

髓细胞白血病基因-1 (myeloid cell leukemia-

1, Mcl-1) 是 Bcl-2 家族成员之一,广泛表达于各种组织细胞^[3]。Mcl-1 基因位于人类染色体 1q21,该区域在肿瘤及其癌前病变中是一个易变区域, Mcl-1 基因的表达异常与肿瘤的发生发展及肿瘤细胞耐药关系密切, Mcl-1 也是肿瘤靶向治疗的关键点^[4-6]。迄今为止, Mcl-1 与宫颈癌的相关研究国内外报道较少,本研究应用 RT-PCR 方法及免疫组织化学方法检测宫颈癌组织 Mcl-1 的表达,并将不同临床分期和病理分级宫颈癌患者 Mcl-1 水平进行比较,探讨 Mcl-1 表达在宫颈癌发病中的作用。

[基金项目] 无锡市科技局科研项目(CSE00949);南京医科大学科技发展基金面上项目(08NMUM080)

*通讯作者, E-mail: wxxyj89@163.com

1 对象和方法

1.1 对象

宫颈癌组织取自2004年~2008年南京医科大学附属无锡妇幼保健院妇科初诊初治的宫颈癌患者45例,年龄27~58岁。所有患者均经病理检查确诊且不合并其他炎症性疾病及免疫相关性疾病。病理分级:G1 18例、G2 11例、G3 16例;临床分期按国际妇产科联盟(FIGO)标准:I~II期22例,III~IV期23例;另取45例正常宫颈上皮组织作为正常对照,年龄32~57岁,正常对照为同期因子宫肌瘤行全子宫切除术,术后宫颈组织病理检查报告为正常宫颈上皮者,且无其他疾病。用于RT-PCR检测Mcl-1mRNA的20例宫颈癌组织及癌旁正常组织取自2007~2008年初诊初治的宫颈癌患者,年龄28~55岁,其中G1 9例、G2 5例、G3 6例,临床分期为I~II期12例,III~IV期8例,收集并记录所有患者的临床和病理资料。

1.2 方法

1.2.1 标本收集

取宫颈癌患者手术切除或放疗前活检标本,避开坏死和炎症区域,分别进行液氮冻存及石蜡包埋固定,所有标本均经病理检查确诊。

1.2.2 RT-PCR检测Mcl-1mRNA表达

①总RNA提取及质量鉴定:取液氮保存的宫颈癌组织及正常宫颈组织标本,超声匀浆后,采用Trizol试剂(Applied Invitrogen公司,美国)提取组织RNA,DEPC水溶解,应用Bio-Rad检测RNA浓度及纯度, $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 为1.8~2.0,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳5S、18S、28S条带清晰可见者用于后续实验;②Mcl-1检测:应用SYBR Premix Ex Taq试剂盒(Applied Takara Bio公司,大连)进行Mcl-1mRNA检测, β -actin作为内参基因。Mcl-1引物序列如下:5'-TCAGCGACGGCGTAACAAACT-3'(上游),5'-CAAACCCATCCCAGCCTCTT-3'(下游); β -actin引物序列如下:5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'(上游),5'-TCCTTCTGCATCCTGTCCGCA-3'(下游)。反应条件:95℃,2 min,95℃ 10 s,56℃ 20 s,72℃ 20 s,共40个循环;③Mcl-1表达水平的计算方法:在目的基因与内参照基因扩增效率相同的情况下,测定循环阈值(Ct值),计算 Δ Ct值,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示Mcl-1的相对表达水平。

1.2.3 免疫组化检测Mcl-1的表达

Mcl-1单克隆抗体(ab32087,Abcam公司,美

国),免疫组化具体操作步骤如下:①脱蜡入水;②pH6.0柠檬酸缓冲液煮沸10 min行抗原修复;③正常羊血清封闭1h;④1:50一抗4℃过夜(以PBS取代一抗作为阴性对照);⑤滴加二抗:滴加即用型非生物素免疫组化Elivision™ plus检测试剂A 1滴,37℃孵育20 min,滴加试剂B 1滴,37℃孵育30 min;⑥DAB染色;⑦苏木素复染,脱水透明封片。阳性结果判定:在排除非特异性染色的情况下,Mcl-1阳性反应产物为棕黄色,分布于胞浆和(或)胞核,以10个高倍视野下阳性细胞数>30%为阳性表达^[7]。

1.3 统计学方法

应用SPSS16.0统计软件进行数据处理,癌组织与正常宫颈组织Mcl-1mRNA表达水平以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较应用 t 检验,Mcl-1表达水平与临床病理特征的分析采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌组织Mcl-1mRNA的表达

应用RT-PCR方法检测了20例宫颈癌患者及癌旁正常宫颈组织中Mcl-1mRNA的表达,结果显示与癌旁正常宫颈组织(1.15 ± 0.32)比较,宫颈癌组织Mcl-1mRNA表达水平明显增高(2.36 ± 1.14),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 宫颈癌组织Mcl-1的表达

免疫组化结果显示Mcl-1的阳性染色部位主要位于细胞浆和(或)核,与正常宫颈组织比较,宫颈癌组织Mcl-1表达明显增高,组间比较差异均具有统计学意义($P < 0.01$,图1,表1)。

2.3 宫颈癌患者Mcl-1表达水平与临床病理特征的关系

为了进一步探讨Mcl-1表达的临床意义,进行Mcl-1表达水平与宫颈癌临床病理特征相关分析。经统计学分析,Mcl-1表达水平与肿瘤病理分级、肿瘤大小及淋巴结转移有相关性,差异均具有统计学意义($P < 0.05$,表2)。

3 讨论

细胞凋亡也称为“程序性细胞死亡”,是由一系列生物化学事件引起的多种细胞形态的改变,包括细胞膜对称性的改变、细胞皱缩、核碎裂以及染色质浓缩^[8]。凋亡的发生和调控是多种蛋白和分子之间相互作用的结果。Bcl-2蛋白家族是凋亡程序的主要调控者,它包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,二者

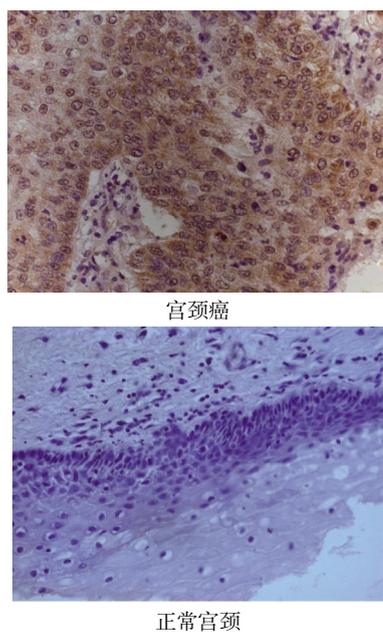


图 1 宫颈癌组织及正常宫颈组织 Mcl-1 表达($\times 400$)

Figure 1 The expression of Mcl-1 in cervical cancer tissue and normal cervical tissue($\times 400$)

表 1 宫颈癌组织与正常宫颈组织 Mcl-1 蛋白表达情况比较
Table 1 The expression of Mcl-1 protein in cervical cancer tissue and normal cervical tissue

组别	n	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
宫颈癌组	45	24	21	53.3*
正常对照组	45	5	40	11.1

* $P < 0.01$ 。

表 2 Mcl-1 与宫颈癌临床病理特征特征的相关分析

Table 2 Correlation of Mcl-1 expression and clinicopathological parameters in 45 cervical cancer specimens

临床病理特征	n	Mcl-1[n(%)]		P 值
		+	-	
年龄(岁)				0.936
<40	19	10 (52.63)	9 (47.37)	
≥ 40	26	14 (53.85)	12 (46.15)	
病理分级				0.016
G1	18	5 (27.78)	13 (72.22)	
G2	11	7 (63.64)	4 (36.36)	
G3	16	12 (75.00)	4 (25.00)	
肿瘤直径				0.027
<2.5 cm	20	7 (35.00)	13 (65.00)	
≥ 2.5 cm	25	17 (68.00)	8 (32.00)	
FIGO 分期				0.661
I~II	22	11 (50.00)	11 (50.00)	
III~IV	23	13 (56.52)	10 (43.48)	
淋巴结转移				0.004
阴性	24	8 (33.33)	16 (66.67)	
阳性	21	16 (76.19)	5 (23.81)	

之间的平衡是细胞存活与否的关键。凋亡失衡与多种疾病尤其是肿瘤的发生密切相关。

Mcl-1 是 Bcl-2 家族成员之一, Mcl-1 作为关键的抗凋亡蛋白定位于细胞线粒体外膜, 在内源性凋亡途径(线粒体途径)的调控中发挥重要作用。Mcl-1 对细胞凋亡的调控异常与肿瘤发生密切相关^[9-10], 文献报道 Mcl-1 在淋巴细胞白血病患者过表达, 且其过表达与肿瘤细胞对新型抗癌因子 ABT-737 抵抗有关^[11]。Mcl-1 表达下调可能增强 BH3 模拟物诱导的缺氧肺癌细胞凋亡^[12]。过表达 Mcl-1 的转基因鼠淋巴瘤的发病率明显增高^[13]。因此, Mcl-1 成为肿瘤研究的新靶点。

Mcl-1 在宫颈癌发生发展及临床预后中的作用尚不清楚。本研究结果表明宫颈癌患者 Mcl-1 mRNA 及蛋白表达明显高于正常对照, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 提示宫颈癌患者的凋亡平衡受到异常调控, Mcl-1 过表达导致细胞凋亡异常可能参与了宫颈癌的发病机制。肿瘤临床病理特征分析结果显示 Mcl-1 表达水平与肿瘤的临床病理分级、肿瘤大小及淋巴结转移密切相关, 提示癌细胞高表达 Mcl-1 可能是肿瘤细胞抗凋亡的重要因素, 与宫颈癌的发生和发展有关。

Mcl-1 可以抑制细胞色素 C 从线粒体膜释放, 对抗 Bcl-2 家族促凋亡蛋白的作用, 维持细胞存活。同时近年有学者提出 Mcl-1 调控细胞凋亡除了参与经典的线粒体途径外, 在不同组织细胞中可能也会有外源性凋亡途径(死亡受体途径)的参与^[6]。Chetoui 等^[14]报道黑色素瘤中 Mcl-1 作为重要的细胞生存信号在对抗 Fas 介导的细胞凋亡中有重要作用, 应用 RNAi 技术下调黑色素瘤细胞中 Mcl-1 可以增强 Fas 介导的凋亡和 caspase9 激活。这些研究结果均提示 Mcl-1 过表达在肿瘤发生中具有重要作用。因此, 检测宫颈癌患者 Mcl-1 的表达水平, 可以为宫颈癌患者的治疗和临床监测提供依据, 并可作为肿瘤治疗和研究的新靶点。

[参考文献]

[1] Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr, et al. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4):1441-1448

[2] Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010; a systematic analysis [J]. *Lancet*, 2011, 378(9801):1461-1484

[3] Akgul C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multi-

ple types of cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*,2009,66(8): 1326-1336

[4] Clohessy JG,Zhuang J,de Boer J,et al. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis[J]. *J Biol Chem*,2006,281(9):5750-5759

[5] Adams JM,Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy [J]. *Oncogene*,2007,26(9): 1324-1337

[6] Kang MH,Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors;targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*,2009,15(4):1126-1132

[7] 张婷,许飞,张晨辉,等. CD58/CD2 表达与宫颈癌肿瘤生物学的关系及意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2010,30(8):1097-1099

[8] 林旭滨,姜文奇,钟雪云,等. 凋亡调控基因 Mcl-1 在 T 细胞性淋巴瘤中的表达及临床意义[J]. *癌症*,2007,26(4):435-439

[9] Allen TD,Zhu CQ,Jones KD,et al. Interaction between MYC and MCL1 in the genesis and outcome of non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Res*,2011,71(6): 2212-2221

[10] Schulze-Bergkamen H,Ehrenberg R,Hickmann L,et al. Bclx (L) and Myeloid cell leukaemia-1 contribute to apoptosis resistance of colorectal cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*,2008,14(24):3829-3840

[11] Tromp JM,Geest CR,Breij EC,et al. Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*,2012,18(2):487-498

[12] Harrison LR,Micha D,Brandenburg M,et al. Hypoxic human cancer cells are sensitized to BH-3 mimetic-induced apoptosis via downregulation of the Bcl-2 protein Mcl-1[J]. *J Clin Invest*,2011,121(3):1075-1087

[13] Zhou P,Levy NB,Xie H,et al. MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes[J]. *Blood*,2001,97(12):3902-3909

[14] Chetoui N,Sylla K,Gagnon-Houde JV,et al. Down-regulation of mcl-1 by small interfering RNA sensitizes resistant melanoma cells to fas-mediated apoptosis[J]. *Mol Cancer Res*,2008,6(1):42-52

[收稿日期] 2011-12-23

(上接第 818 页)

patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*,2007,25(17):4757-4764

[6] Krambeck AE,Thompson RH,Dong H,et al. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature; associations with cancer progression and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2006,103(14):10391-10396

[7] Zang X,Loke P,Kim J,et al. B7x;a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100(11):10388-10392

[8] Choi IH,Zhu G,Sica GL,et al. Genomic organization and expression analysis of B7-H4,an immune inhibitory molecule of the B7 family [J]. *J Immunol*,2003,171(19):4650-4654

[9] Tringler B,Liu W,Corral L,et al. B7-H4 overexpression in ovarian tumors[J]. *Gynecol Oncol*,2006,100(7):44-52

[10] Salceda S,Tang T,Kmet M,et al. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation [J]. *Exp Cell Res*,2005,306(10):128-141

[11] Sica GL,Choi IH,Zhu G,et al. B7-H4,a molecule of the B7 family,negatively regulates T cell immunity[J]. *Immunity*,2003,18(3):849-861

[12] Miyatake T,Tringler B,Liu W,et al. B7-H4 (DD-O110) is overexpressed in high risk uterine endometrioid adenocarcinomas and inversely correlated with tumor T-cell infiltration[J]. *Gynecol Oncol*,2007,106(1):119-127

[13] Crispen PL,Boorjian SA,Lohse CM,et al. Predicting disease progression after nephrectomy for localized renal cell carcinoma;the utility of prognostic models and molecular biomarkers[J]. *Cancer*,2008,113(3):450-460

[14] Lam JS,Pantuck AJ,Belldegrun AS,et al. Protein expression profiles in renal cell carcinoma;staging,prognosis,and patient selection for clinical trials [J]. *Clin Cancer Res*,2007,13(4):703-708

[收稿日期] 2011-11-03