

宫颈尖锐湿疣中 hTERC 基因扩增和 CD105 表达的意义

冯雨苗¹, 孙 澜^{1*}, 刘 标², 杨 如³, 孙文洁⁴, 华 纲¹, 陈朝潮¹, 赵斌斌³, 施 辛⁵

(¹南京医科大学附属苏州医院皮肤科, ²病理科, ³妇产科, 江苏 苏州 215001; ⁴宜兴市人民医院皮肤科, 江苏 宜兴 214200; ⁵苏州大学附属第二医院皮肤科, 江苏 苏州 215004)

[摘要] 目的:探讨 hTERC 基因扩增和 CD105 在宫颈尖锐湿疣(candyloma acuminatum, CA)中的表达及其临床意义。方法:分别采用免疫荧光原位杂交(FISH)和免疫组化方法检测宫颈 CA 组织中 hTERC 基因扩增和 CD105 的表达。67 例宫颈 CA 中单纯性 CA 31 例, CA-CIN I 级 19 例, CA-CIN II 级 11 例, CA-CIN III 级 6 例; 宫颈癌 35 例; 正常宫颈黏膜 24 例作为对照。结果:宫颈正常黏膜、宫颈 CA 和宫颈癌中 hTERC 基因扩增率分别为 0.0%、25.4% 和 80.0%, 差异有统计学意义($P < 0.01$); CD105 标记的血管密度(MVD)亦存在明显差异($P < 0.01$)。宫颈 CA 中, hTERC 基因扩增率和 MVD 呈显著正相关($P < 0.05$), 均随 CIN 级别的升高而增加, 其中 CA-CIN I 级与 CA-CIN II 级之间差异有统计学意义($P < 0.01$); 两者表达在复发组均显著高于未复发组($P < 0.05$)。结论:hTERC 基因扩增和 CD105 表达在宫颈 CA 复发并向高级别 CIN 转化过程中扮演着重要角色, 对宫颈 CA 患者检测 hTERC 基因扩增和 CD105 表达有助于临床筛查高危 CA 患者。

[关键词] 宫颈尖锐湿疣; 宫颈上皮内瘤变; hTERC 基因; CD105

[中图分类号] R752.53

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-979-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160817

The expression and significance of hTERC and CD105 in cervical condyloma acuminatum

Feng Yumiao¹, Sun Lan^{1*}, Liu Biao², Yang Ru³, Sun Wenjie⁴, Hua Gang¹, Chen Zhaochao¹, Zhao Binbin³, Shi Xin⁵

(¹Department of Dermatology, ²Department of Pathology, ³Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Suzhou Hospital of NJMU, Suzhou 215001; ⁴Department of Dermatology, People's Hospital of Yixing City, Yixing 214200; ⁵Department of Dermatology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the significance of hTERC gene amplification and CD105 expression in cervical condyloma acuminatum (CA). **Methods:** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and immunohistochemical staining were used to detect the expression of hTERC gene and CD105 in 67 cases of cervical CA, including 31 cases without CIN, 19 CA-CIN grade I, 11 CA-CIN grade II, and 6 CA-CIN grade III; 35 cases of cervical cancer and 24 normal cervical mucosa were performed as controls. **Results:** The rates of hTERC gene amplification were 0%, 25.4% and 80% in normal cervical mucosa, cervical CA and cervical cancer, respectively ($P < 0.01$). Microvessel density (MVD) marked by CD105 antibody also had significant difference ($P < 0.01$). In cervical CA, hTERC gene amplification and MVD showed a positive correlation ($P < 0.05$) and increased with increasing CIN grade. There were significant differences between CA-CIN I and CA-CIN II ($P < 0.01$), as well as between the recurrence group and the non recurrence group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of hTERC gene and CD105 may play an important role in the recurrence of cervical CA, and in the process of conversion to the high grade CIN. The detection of hTERC gene and CD105 is helpful in the clinical screening of high-risk patients with cervical CA.

[Key words] cervical condyloma acuminatum; cervical intraepithelial neoplasia; hTERC gene; CD105

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 979-982]

[基金项目] 南京医科大学校基金(2012NJMU162)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: slszsy@126.com

随着宫颈尖锐湿疣 (condyloma acuminatum, CA) 的发病率不断升高, 其中伴有不同级别宫颈上皮内瘤样病变 (cervical intraepithelial neoplasm, CIN) 的宫颈 CA 患者检出率也逐渐增多。临床上大多数宫颈 CA 伴 CIN I 级患者可以自行康复, 但少数患者病情持续或发展成 CIN II/III 级, 甚至演变成浸润性癌。近年研究发现人类端粒酶 RNA (hTERC) 基因扩增在 CIN 由低级别向高级别演进中起重要作用^[1-2]; 此外 hTERC 还能促进微血管生成导致肿瘤的生长和侵袭^[3]。CD105 作为调控微血管生成的关键分子, 其标记的微血管密度 (microvessel density, MVD) 已经成为判断宫颈癌复发和预后的独立指标^[4]。本研究拟通过观察不同级别 CIN 的宫颈 CA 中 hTERC 基因扩增和 CD105 的表达, 探讨宫颈 CA 复发和宫颈 CA 引起的 CIN 由低级别向高级别演进的分子机制, 为临床筛查高危宫颈 CA 提供参考依据。

1 对象和方法

1.1 对象

收集临床资料完整的病理标本, 资料来源于南京医科大学附属苏州医院、苏州大学附属第二医院、宜兴市人民医院。宫颈 CA 67 例, 其中单纯性 CA 31 例, CA-CIN I 级 19 例, CA-CIN II 级 11 例, CA-CIN III 级 6 例; 宫颈癌 (鳞癌) 35 例; 因子宫肌瘤切除的正常宫颈黏膜 24 例作为正常对照。

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光原位杂交 (FISH) 检测 hTERC 基因扩增

hTERC/CSP3 DNA 双色荧光探针由中国北京金菩嘉医疗科技有限公司提供, 实验操作参考 FISH 试剂盒 (DAKO 公司, 丹麦) 说明书进行, 简述如下: 4 μm 厚切片常规脱蜡水化, 蛋白酶 K 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 梯度 (75%、95%、100%) 乙醇脱水后室温自然干燥。探针混合液 (7 μL 杂交缓冲液、1 μL 去离子水和 2 μL 探针) 置于 (75 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱变性 5 min, 切片置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 烤片机内预热片刻, 滴加 10 μL 探针液于杂交区域, 加盖盖玻片, 置 42 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中杂交过夜。切片滴加 15 μL DAPI 复染剂, 暗室内放置 10~20 min, 荧光显微镜下判断结果。

FISH 结果判断标准: hTERC DNA 探针杂交到 3 号染色体长臂 (3q26.3), 荧光信号为红色; CSP3 DNA 杂交到 3 号染色体着丝粒 (3p11.1~q11.1), 荧光信号为绿色。选择细胞核形态一致、边界完整、

DAPI 染色均一、无胞核重叠、红绿色信号清晰的切片区域, 每张切片随机计数 100 个细胞核中的双色信号。按观察到的信号数记录为: 细胞核中红色或绿色信号各 ≤ 2 个为正常细胞为二倍体, 红色或绿色信号 > 2 个定义为 hTERC 基因发生扩增。

1.2.2 免疫组化检测 CD105 标记的 MVD

10% 中性福尔马林固定石蜡包埋的标本按 4 μm 厚切片, 高压法修复抗原。实验按 Envision 法操作 (DAKO 公司, 丹麦), 小鼠抗人单克隆抗体 CD105 (P3D1, Santa Cruz 公司, 美国) 按 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释, MVD 评估按照“热点”法进行, 每张免疫组化切片先在低倍镜 ($\times 10$) 下扫描, 找出 MVD 最高的区域 (所谓“热点”), 然后高倍视野下 ($\times 40$) 计数 5 个“热点”区域的微血管数目, 取平均值记为 MVD。每个连续的血管腔以及与周围肿瘤细胞、纤维结缔组织、脂肪组织和包膜明确分开的阳性染色内皮细胞簇都视为一个新生血管。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 分析处理。计数资料采用卡方检验或 Fisher 确切概率法。计量资料中以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用独立样本 t 检验, 多组比较采用方差分析。相关分析采用 Spearman 等级相关分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hTERC 基因扩增

hTERC 基因在宫颈正常黏膜、CA 和宫颈癌中扩增率分别为 0.0%、25.4% 和 80.0%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 1)。宫颈 CA 中, hTERC 基因扩增率随着 CIN 级别的升高而增加, 其中 CA-CIN I 级与 CA-CIN II 级之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 2, 图 1)。hTERC 基因扩增在不同 CA 患者的年龄、病灶大小、数目和是否伴有阴道/外阴 CA 之间无明显差异 ($P > 0.05$), 复发组患者 hTERC 基因扩增率显著高于未复发组 ($P < 0.05$, 表 3)。

2.2 CD105 标记的 MVD

CD105 主要表达于病变区域的新生血管内皮细胞, 病变旁和正常组黏膜偶见 CD105 标记的新生微血管, CA 和宫颈癌组织内可见活跃的 CD105 阳性微血管增生, 与正常宫颈黏膜相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 1)。宫颈 CA 中, CD105 标记的 MVD 随着 CIN 级别的升高而增加, 其中 CA-CIN I 级与 CA-CIN II 级之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 2, 图 2)。MVD 在不同 CA 病变大小之间差异有统计

学意义($P < 0.05$), 复发组 MVD 显著高于未复发组($P < 0.05$), 在不同患者年龄、病损数目以及是否伴有阴道/外阴 CA 之间无明显差异($P > 0.05$, 表 3)。

表 1 宫颈正常黏膜、CA 和宫颈癌中 hTERT 基因扩增和 MVD-CD105

Table 1 hTERT and MVD-CD105 in the normal cervical mucosa, CA and cervical cancer

组别	n	hTERT[n(%)]	MVD($\bar{x} \pm s$)
正常黏膜	24	0(0.0)	6.0 ± 3.1
CA	67	17(25.4)	16.2 ± 5.8
宫颈癌	35	29(80.0)	25.9 ± 9.0
P 值		<0.01	<0.01

表 2 宫颈 CA 中 hTERT 基因扩增和 MVD-CD105

Table 2 hTERT gene amplification and MVD-CD105 in cervical CA

组别	n	hTERT[n(%)]	MVD($\bar{x} \pm s$)
单纯性 CA	31	2(6.5)	13.6 ± 4.2
CA-CIN I	19	3(15.7)	14.5 ± 4.6
CA-CIN II	11	7(63.6)*	20.9 ± 5.1*
CA-CIN III	6	5(83.3)	23.7 ± 4.2

与 CIN I 级比较, * $P < 0.01$ 。

2.3 hTERT 基因扩增与 MVD 的关系

经相关性分析, 宫颈 CA 中 hTERT 基因扩增与

表 3 宫颈 CA 中 hTERT 基因扩增、MVD-CD105 与临床病理参数的关系

Table 3 Relationship between hTERT/MVD-CD105 and clinicopathological parameters in cervical CA

组别	n	hTERT[n(%)]	MVD($\bar{x} \pm s$)
年龄(岁)			
≥26	39	12(30.7)	15.9 ± 5.7
<26	28	5(19.9)	16.5 ± 5.9
病变大小(cm)			
≥0.7	25	7(28.0)	17.3 ± 6.0
<0.7	42	10(23.8)	13.9 ± 4.4*
病变数目(个)			
≥3	20	7(35.0)	18.1 ± 5.8
<3	47	10(21.3)	15.0 ± 5.5
伴阴道/外阴 CA			
是	17	4(23.5)	15.8 ± 6.2
否	50	13(26.0)	16.3 ± 5.5
复发			
是	21	9(42.9)	17.1 ± 5.9
否	46	8(17.4)*	13.8 ± 4.7*

组内比较, * $P < 0.05$ 。

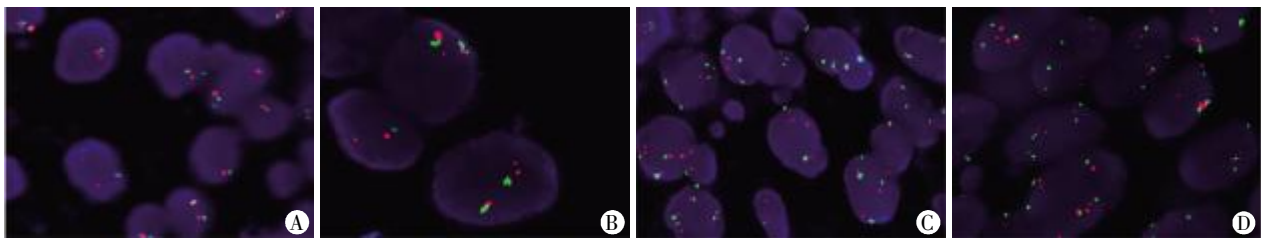


图 1 FISH 检测 hTERT 基因扩增(×100)
A: 宫颈正常上皮细胞 hTERT 基因扩增阴性; B: 宫颈 CA-CIN I 级 hTERT 基因扩增阳性; C: 宫颈 CA-CIN II 级大量细胞显示 hTERT 基因扩增阳性; D: 宫颈 CA-CIN III 级大量细胞显示多个红绿色信号, hTERT 基因显著扩增。

图 1 FISH 检测 hTERT 基因扩增(×100)

Figure 1 hTERT gene amplification by FISH(×100)

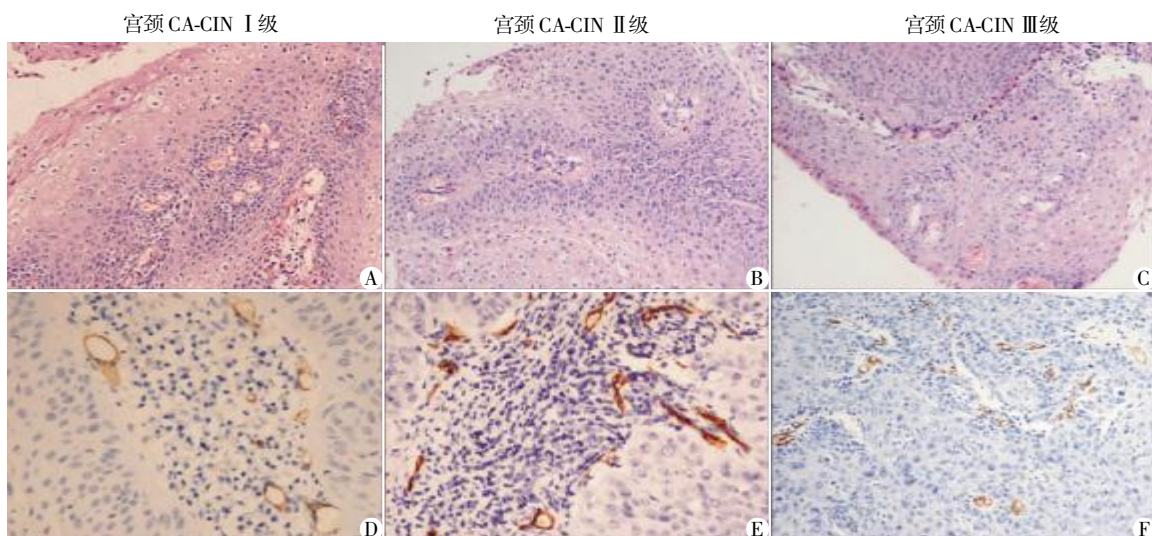


图 2 宫颈 CA HE 染色(A、B、C, ×20)和 CD105 免疫组化染色(D、E, ×40; F, ×20)

Figure 2 HE staining(A、B、C, ×20) and immunohistochemical staining of CD105 (D、E, ×40; F, ×20) in cervical CA

MVD 呈显著正相关($r=0.725, P < 0.05$)。

3 讨论

大量研究发现宫颈癌的发病具有两个重要环节,一是高危 HPV 持续感染,另一个是 hTERC 基因扩增^[5-6]。研究证实宫颈癌和宫颈癌前病变中均存在 hTERC 基因扩增,hTERC 基因扩增可能是宫颈癌发病过程中的早期事件,是 CIN 由低级别向高级别演进并向宫颈癌转化的关键步骤^[7-8]。

本研究发现,宫颈 CA 存在不同程度的 CIN 和 hTERC 基因拷贝数异常。其中宫颈 CA 复发组 hTERC 基因扩增率显著高于未复发组,这些复发组病例形态学上均伴有不同级别的 CIN,对部分患者复发病灶重新活检或细胞学检测显示 HPV 和 CIN 往往持续存在,提示 HPV 感染和端粒酶激活可能是 CIN 持续存在的重要因素之一。进一步分析发现,31 例单纯性 CA 病例中仅有 2 例存在 hTERC 基因扩增,而在 CA-CIN I、II 和 III 级病例中 hTERC 基因扩增率分别为 15.7%、63.6% 和 88.3%,而且随着 CIN 级别的增加,出现高核倍体以及成簇扩增信号的细胞数量也显著增加。上述结果提示 hTERC 基因扩增可能是宫颈 CA 患者的 CIN 向高级别进展的重要分子学事件,FISH 检测 hTERC 基因扩增对于宫颈 CA 伴 CIN 具有预警判断价值,有助于筛查宫颈 CA 伴低级别 CIN(CIN I)向高级别 CIN(CIN II/III)的转化。

CD105 是调控微血管生成的关键分子,是一种增殖相关的缺氧诱导蛋白,表达定位于血管内皮细胞,诱导血管内皮细胞增殖和微血管生成。CD105 标记的 MVD 已经成为判断多种肿瘤复发和预后的独立指标,宫颈癌中 CD105 的表达预示着淋巴结转移和预后不良^[9-10]。本研究发现宫颈 CA 和宫颈癌中均存在活跃的微血管增生,CD105 标记的 MVD 在正常宫颈黏膜、宫颈 CA 和宫颈癌中存在明显差异;宫颈 CA 复发组和未复发组之间,MVD 也存在差异,MVD 增高可能预示着宫颈 CA 易于复发。对复发 CA 进行形态学观察发现往往伴有不同级别的 CIN,随着 CIN 由低级别向高级别演进,MVD 也呈显著增加。MVD 在 CIN I 级和 CIN II 级之间的明显差异提示其有助于筛查伴高级别 CIN 的宫颈 CA。

总之,宫颈 CA 因发病隐匿、容易漏诊、易于复发和发展成 CIN,一直是 CA 临床筛查和治疗中的难题。本研究发现部分宫颈 CA 病例伴有较高频率的 hTERC 基因扩增以及 CD105 的表达,这类 CA 患者往往复发并发展成 CIN,而随着 CIN 级别的升

高 hTERC 基因扩增率和 CD105 标记的 MVD 也显著增加,提示 hTERC 基因扩增和 CD105 表达在宫颈 CA 复发并向高级别 CIN 转化过程中扮演着重要角色。其机制可能是 hTERC 基因扩增通过诱导端粒酶活性进一步促进细胞增殖和微血管生成。对宫颈 CA 患者检测 hTERC 基因扩增和 CD105 表达有助于临床筛查高危 CA 患者,而对于伴有 hTERC 基因扩增和高 MVD 的宫颈 CA 患者临床应给予积极治疗和密切随访,避免发展为高级别 CIN 乃至宫颈癌。

[参考文献]

- [1] Jiang J, Wei LH, Li YL, et al. Detection of TERC amplification in cervical epithelial cells for the diagnosis of high-grade cervical lesions and invasive cancer: a multi-center study in China [J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12 (6): 808-817
- [2] 杨萍,董瑞卿,杨安强,等. 荧光原位杂交法检测人端粒酶 RNA 基因在子宫颈病变筛查中的意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(18): 2939-2942
- [3] 王艳芬,王东林,施公胜,等. 端粒酶逆转录酶、缺氧诱导因子-1 α 和 CD105 在脑胶质瘤中的表达意义 [J]. *中华病理学杂志*, 2006, 35(11): 681-682
- [4] Randall LM, Monk BJ, Darcy KM, et al. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: a gynecologic oncology group study [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112 (3): 583-589
- [5] Theelen W, Speel EJ, Herfs M, et al. Increase in viral load, viral integration, and gain of telomerase genes during uterine cervical carcinogenesis can be simultaneously assessed by the HPV 16/18 MLPA-assay [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(4): 2022-2033
- [6] 杨莹莹,潘景,孙春意,等. hTERC 基因表达及其和 HPV 感染在宫颈病变中的关系 [J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(16): 2654-2656
- [7] Sui W, Ou M, Dai Y, et al. Gain of the human telomerase RNA gene TERC at 3q26 is strongly associated with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, 19(8): 1303-1306
- [8] 孙佳星,王莹,肖琳,等. hTERC 基因在预测宫颈上皮内瘤变 I 进展和转归中的价值 [J]. *实用妇产科杂志*, 2015, 31(09): 680-683
- [9] Stepan D, Simionescu C, Stepan A, et al. VEGF and CD105 immunoreactivity in squamous cervical carcinomas and associated precancerous lesions [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2012, 53(3): 585-589
- [10] 曲长萍,许宗兰,王渠源,等. 宫颈癌血清 CD105 的水平及临床意义 [J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(13): 188-189

[收稿日期] 2015-06-17