

• 论 著 •

PI3K 表达与宫颈鳞状细胞癌局部血管生成和浸润转移及预后的关系*

刘兆董¹, 江忠清^{2△}, 戴丽玉¹

(福建医科大学: 1. 教学医院/福建省妇幼保健院妇科, 福建福州 350001;

2. 福建医科大学附属第一医院妇科, 福建福州 350005)

摘 要:目的 探讨 PI3K 在宫颈鳞状细胞癌(SCC)组织的表达及其临床意义。方法 采用免疫组化 SP 法检测 PI3K 在 28 例宫颈正常上皮(NCE)、36 例宫颈上皮内瘤变(CIN)和 68 例 SCC 组织的表达,并检测其中 Ki-67 标记的增殖指数(PI)和 CD34 标记的微血管密度(MVD)。结果 PI3K 在 NCE、CIN 及 SCC 组的阳性表达率分别为 25.00%、55.56% 及 85.29%。PI3K 在 SCC 组的阳性表达率分别显著高于 CIN 和 NCE 组($P<0.05$)。PI3K 在 SCC 组表达分别与 PI 及 MVD 显著正相关。PI3K 在 SCC 组表达分别与 FIGO 分期、组织学分级及有否盆腔淋巴结转移有关($P<0.05$),而与患者年龄、有否脉管浸润、间质浸润深度及生存率无关($P>0.05$)。宫颈鳞癌 FIGO 分期为 II 期、组织学分级为 III 级及有盆腔淋巴结转移者,其 PI3K 阳性表达率分别显著高于 FIGO 分期为 I 期、组织学分级在 II 级以内及无盆腔淋巴结转移者($P<0.05$)。结论 PI3K 过度表达可能上调宫颈鳞癌细胞增殖及间质血管新生,可能促进宫颈鳞癌转移、从而促进其病程进展。

关键词:宫颈鳞癌; PI3K; 增殖指数; 微血管密度; 肿瘤转移; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)14-1977-03

Relationship between the expressions of PI3K and regional angiogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in cervical squamous cell carcinoma*

Liu Zhaodong¹, Jiang Zhongqing^{2△}, Dai Liyu¹

(Department of Gynecology, Fujian Medical University Teaching Hospital, Fujian Provincial Maternal and Children's Health Hospital, Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Objective** The expressions of PI3K in invasive squamous cell carcinoma of cervix and their clinical significance were investigated. **Methods** The expressions of PI3K, Ki-67 and CD34 protein in 28 cases of normal cervical epithelium (NCE), 36 cases of cervical intraepithelial neoplasm (CIN) and 68 cases of squamous cell carcinoma of cervix (SCC) were detected by immunohistochemistry SP method. **Results** The positive expression rates of PI3K in NCE, CIN and SCC were 25.00%, 55.56% and 85.29%, respectively. The positive expression rates of PI3K increased remarkably from NCE and CIN to SCC ($P<0.05$). The expression of PI3K in SCC was significantly positive correlated with PI and MVD. The expression of PI3K in SCC was related with FIGO staging, histological grading and pelvic lymph node metastasis ($P<0.05$), but was not related with age, depth of stroma infiltration and intravascular infiltration ($P>0.05$). In the cases with FIGO staging II, poorly differentiated tissue and pelvic lymph node metastasis, The positive expression rate of PI3K significantly higher than those in the cases without them ($P<0.05$). **Conclusion** The over-expression of PI3K may lead to up regulation of tumor angiogenesis and cancer cell proliferation in SCC, and may promote tumor Metastasis and progress of SCC.

Key words: Cervical Squamous Cell Carcinoma; PI3K; proliferation index; microvessel density; tumor metastasis; immunohistochemistry

磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)是一类可特异性磷酸化磷脂酰肌醇三位羟基的激酶,具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、参与细胞胞吐与分泌颗粒、促进细胞间黏附及促进骨架蛋白重排等功能。研究发现,PI3K 参与组成多种信号通路,在许多恶性肿瘤的发生发展中起着重要作用,并与肿瘤新生血管形成、侵袭转移关系密切^[1-4]。因此可能影响患者的预后,近年来受到研究者的密切关注。本研究采用免疫组化 SP 法检测 PI3K 在宫颈鳞状细胞癌(SCC)组织中的表达情况,并检测 Ki-67 标记的增殖指数(PI)和 CD34 标记的微血管密度(MVD),探讨 SCC PI3K 表达与局部肿瘤血管生成、癌细胞增殖、浸润转移及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 选择 1998 年 03 月至 2005 年 06 月在福建医科大学附属第一医院手术治疗的 36 例宫颈上皮内瘤变(CIN)和 68

例 SCC 患者作为研究对象。所有研究对象均为初治病例,术前均未行放疗、化疗及免疫治疗等其他治疗,并均经病理确诊。同期选取因子宫肌瘤行子宫切除的 28 例宫颈正常上皮(NCE)作为对照。CIN 分级和 SCC 组织学分级及 FIGO 分期参照文献^[5]。从手术当日到 2006 年 12 月 31 日止,对所选择的 68 例 SCC 患者进行随访,共随访到 53 例,随访率 77.94%,随访时间 5~93 月,平均 54.8 月。在随访到的 53 例中死亡 14 例,5 年生存率 67.44%(29/43,随访时间不够 5 年者剔除)。

1.2 仪器与试剂 浓缩型兔抗人 PI3K 多克隆抗体(克隆号 BA1352,工作浓度为 1:50),购自武汉博士德生物工程有限公司。SP 免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。即用型鼠抗人 Ki-67(克隆号 MIB1)及 CD34(克隆号 QBEnd/10)单克隆抗体(美国 Maxim 公司产品)购自福州迈新生物技术有限公司。

* 福建医科大学学科带头人培养专项基金(JXK200715);福建省教育厅科研基金资助项目(JA03104、JA04210)。 作者简介:刘兆董,男,主治医师,主要从事妇科肿瘤研究。

1.3 方法 所有新鲜标本均经 4% 甲醛溶液固定, 48 h 内取材, 石蜡包埋, 连续 3~5 μm 厚度切片。采用免疫组化 SP 法检测, 步骤按说明书操作。PI3K、Ki-67 和 CD34 均采用枸橼酸缓冲液高压热力修复抗原, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染。用已知阳性片作为阳性对照, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判断 PI3K 染色判断标准参照文献[6]: PI3K 染色定位于细胞质, 阳性反应物质为棕黄色颗粒, 细胞中出现明显棕黄色颗粒者为阳性细胞。Ki-67 标记的 PI: Ki-67 在细胞核表达, 阳性染色者细胞核呈棕黄色, PI 计数判断标准参照文献[7]。CD34 标记的 MVD: CD34 阳性染色定位于血管内皮细胞质, 呈棕黄色。MVD 计数判断标准参照文献[8]。

1.5 统计学处理 所有数据采用 SPSS13.0 统计软件包进行分析, 计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法检验, 定量资料比较采用 *t* 检验, 变量间的关系采用 Pearson 相关分析, 生存情况采用 Kaplan-Meier 曲线表示, Log rank 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PI3K 在 NCE、CIN 及 SCC 组的表达 PI3K 在 NCE、CIN 及 SCC 组的阳性表达率分别为 25.00%、55.56% 及 85.29%。从 NCE 到 CIN 再到 SCC, PI3K 阳性表达率明显升高。CINⅢ中的阳性表达率高于 CINⅠ和 CINⅡ(均 $P < 0.05$)。

2.2 PI3K 在 NCE、CIN 及 SCC 组表达分别与 PI 的关系 从 NCE 到 CIN 再到 SCC 组, PI 明显升高($P < 0.05$)。在 NCE、CIN 及 SCC 各组中, PI3K 阳性表达者 PI 比阴性表达者明显升高($P < 0.05$)。相关分析显示, PI3K 在 NCE、CIN 和 SCC 中的表达分别和 PI 有显著正相关(均 $P < 0.05$)。

2.3 PI3K 在 NCE、CIN 及 SCC 组表达分别与 MVD 的关系 从 NCE 到 CIN 再到 SCC 组, CD34 标记的 MVD 明显升高($P < 0.05$)。在 SCC 中, MVD 随 PI3K 表达增强而明显升高, 当 PI3K 呈强阳性表达时 MVD 明显升高(PI3K+++ vs -; $t = 3.656, P = 0.002$)。相关分析显示, PI3K 在 NCE 及 CIN 组中表达均分别与 MVD 无显著相关性($P > 0.05$), 而在 SCC 组中表达与 MVD 显著正相关($r = 0.402, P = 0.001$)。

2.4 PI3K 在 SCC 中的表达与临床病理参数的关系 PI3K 在 SCC 组表达分别与 FIGO 分期、组织学分级及盆腔淋巴结转移有关($P < 0.05$), 而与患者年龄、间质浸润深度及脉管浸润无关($P > 0.05$)。

2.5 PI3K 在 SCC 中表达与预后的关系 将 PI3K 在 SCC 组表达分为阴性和阳性两组。PI3K 阳性表达患者平均生存时间为(72.02 $\pm$ 5.01)月, 5 年生存率为 71.74%。PI3K 阴性表达患者平均生存时间为(79.00 $\pm$ 7.41)月, 5 年生存率为 85.71%。PI3K 阳性表达患者的生存率低于阴性表达者, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), Log rank 检验, $P = 0.4187$ 。

3 讨论

3.1 PI3K 表达与宫颈鳞癌的发生发展 PI3K 是由一个相对分子质量为 85×10^3 的调节亚基 P85 和一个相对分子质量为 110×10^3 的催化亚基 P110 组成的异二聚体。PI3K 的 P110 亚基和蛋白激酶具有同源性, 本身既具有 Ser/Thr 激酶的活性, 也具有磷脂酰肌醇激酶的活性[9]。正常情况下, 活化的 PI3K 产生的脂类物质可作为第二信使, 结合并激活多种细胞内的靶蛋白, 形成一个信号级联复合物, 参与调节细胞的增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等功能, 并且与细胞外基质的降解、肿瘤细胞的迁移、黏附、肿瘤血管生成以及侵袭转移等密切相关。已有研究表明, PI3K 在乳腺癌、卵巢癌、头颈部鳞癌等多种人体恶性肿瘤中表达增强, 与肿瘤进展关系密切[2,10-11]。信号转

导的异常和肿瘤的发生有着密切的联系, PI3K 介导的多种信号转导系统与细胞代谢、生长、凋亡和恶变等关系密切, 且与 G 蛋白、PKB 和 Ras 等有着复杂的相互作用。人乳头瘤病毒(HPV)感染后可能引起某些信号转导途径异常而促使宫颈癌的发生。近年来研究证实, 编码 P110 催化亚基的 PI3KP110 基因 PIK3CA(定位于染色体 3q26.3), 是卵巢和宫颈肿瘤的癌基因[3-4]。Harri 等[12]利用探针技术研究发现, PIK3CA 通过基因扩增协助 HPV 诱发宫颈肿瘤。可见, PI3K 过度表达可能促进宫颈上皮细胞恶性转化, PI3K 表达增强可能参与宫颈鳞癌的发生、发展过程。

3.2 PI3K 表达与宫颈鳞癌细胞增殖的关系 PI3K 介导多种的信号转导通路如 PI3K/Akt、PI3K/Akt/mTOR 广泛存在于细胞中, 参与细胞生长、增殖、分化的调节。在对乳腺癌等多种恶性肿瘤的研究发现, PI3K/Akt 信号通路活化能够抵抗化疗、放疗引发的细胞凋亡[13]。选择性抑制 PI3K 活性, 将会使细胞对化疗、放疗所致凋亡的敏感性增加。Rincon-Arango 等[14]发现, 宫颈癌细胞株经 R-Ras87L 诱导后升高的增殖、散播和迁移能力可以被 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 抑制。可见, PI3K 在宫颈癌的发生和癌细胞增殖方面发挥着重要作用。本研究结果显示, 在 NCE、CIN 及 SCC 各组中, PI3K 阳性表达者 PI 比阴性表达者明显升高。相关分析显示, PI3K 在 NCE、CIN 和 SCC 组中的表达分别和 PI 有显著正相关。可见, PI3K 可能主要通过促进肿瘤细胞增殖和抑制肿瘤细胞凋亡起作用, PI3K 表达升高可能加速宫颈鳞癌进展。

3.3 PI3K 表达与宫颈鳞癌血管生成、浸润转移的关系 肿瘤血管生成是肿瘤发生转移的必要条件。文献报道, 正常血管的生成需要 PI3K/Akt 信号途径[9]。肿瘤细胞通过分泌多种血管活性物质, 促进肿瘤血管的生成, 其中以 VEGF 的作用最强, 特异性最高, 在食管鳞癌、宫颈癌等多种人体肿瘤中都有较高水平的表达。PI3K 可以通过与 E-Cadherin、 β -Catenin 和 VEGFR-2 形成复合物经由 PI3K/Akt 通路的活化参与调节 VEGF 的转录和表达, 促进肿瘤血管的生成[2]。PI3K/Akt 信号转导途径还能促进肿瘤坏死因子(TNF)诱导的内皮细胞迁移, 形成新生血管, 增加肿瘤细胞的血供。基质金属蛋白酶(MMPs)和环氧化酶-2(cox-2)均能影响肿瘤血管生成。在肿瘤的侵袭和转移中, 血小板衍生生长因子(PDGF)可以经由 PI3K 介导的通路诱导 MMP3 的表达, 而 COX-2 刺激内皮细胞迁移和血管生成也依赖 PI3K 介导的信号通路的激活。本研究结果显示, 在 SCC 组中, MVD 随 PI3K 表达增强而逐渐升高, PI3K 在 SCC 组表达与 MVD 显著正相关。可见, PI3K 在促进恶性肿瘤新生血管生成中起重要作用, 可能参与了宫颈鳞癌局部肿瘤新生血管的正性调节。肿瘤细胞的黏附和迁移在肿瘤侵袭转移中起着重要作用。PI3K 介导的信号通路参与了黏附因子所介导的细胞黏附、运动和侵袭作用。PI3K 能传递整合素所介导的侵袭信号, 如 PI3K 可以介导前列腺癌中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 驱动的侵袭特性。其次, 细胞外基质的降解是肿瘤侵袭和转移的必要步骤。PI3K 信号通路与基质金属蛋白酶(MMP)的表达有关, 可以上调 MMP-2 mRNA 和蛋白质的表达, 加速细胞外基质的降解而促进肿瘤转移。本研究结果显示, PI3K 在 SCC 组表达分别与 FIGO 分期、组织学分级及有否盆腔淋巴结转移有关。故笔者认为, PI3K 在 SCC 中过度表达可能加速细胞外基质降解和肿瘤新生血管形成, 同时可能传递整合素所介导的肿瘤细胞和细胞外基质黏附信号, 最终向淋巴管和血管浸润, 进而发生远处转移。

3.4 PI3K 表达与宫颈鳞癌预后的关系 PI3K 在多种恶性肿瘤中都有异常表达, 可能影响患者的预后。(下转第 1981 页)

以获得更好的临床妊娠率,是目前亟待解决的问题。本研究结果显示,优选精子前根据精子浓度分为 3 组: $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ 组(I 组)、 $(\geq 10, < 15) \times 10^6/\text{mL}$ 组(II 组)、 $< 10 \times 10^6/\text{mL}$ 组(III 组),临床妊娠率分别为 17.13%、16.05%、4.26%,III 组均明显低于 I 组、II 组($P < 0.05$);根据 PR 精子百分比分为 3 组: $\geq 32\%$ 组(A 组)、 $(\geq 10, < 32)\%$ 组(B 组)、 $< 10\%$ 组(C 组),临床妊娠率分别为 17.53%、16.55%、4.65%,C 组均明显低于 A 组、B 组($P < 0.05$)。因此,笔者认为,AIH 周期优选精子前精子浓度 $\geq 10 \times 10^6/\text{mL}$ 、PR 精子 $\geq 10\%$,可获得较理想的临床妊娠率,遵循首先考虑相对简单、风险较小的技术的 ART 治疗方案选择原则,从男方因素方面考虑,以上情况可优先考虑 AIH 方案。本研究在精子正常形态率方面缺乏完整数据,有待进一步探讨分析。

多项研究表明,AIH 周期精子优选后 PR 精子总数可作为重要参数应用于预测 AIH 临床妊娠率,处理后 PR 精子总数 $\geq 10 \times 10^6$ 可获得较高的临床妊娠率^[7-8]。本研究优选精子后根据 PR 精子总数分为 2 组: $\geq 10 \times 10^6$ 组、 $< 10 \times 10^6$ 组,临床妊娠率分别为 17.33%、10.22%,两组之间差异具有统计学意义($P < 0.05$),结果与以上研究相符^[9-10]。因此,笔者认为,AIH 周期优选精子后 PR 精子总数 $\geq 10 \times 10^6$,可获得较理想的临床妊娠率。

综上所述,Pureception™ 密度梯度离心法是一种较好的精子优选方法,应用于 AIH 可获得较满意的临床妊娠率。优选精子前精子浓度 $\geq 10 \times 10^6/\text{mL}$ 、PR 精子 $\geq 10\%$,及优选精子后 PR 精子总数 $\geq 10 \times 10^6$,可获得较理想的临床妊娠率。

参考文献

[1] 中华医学会编著. 辅助生殖技术与精子库分册: 临床诊疗指南

(上接第 1978 页)

McIntyre 等^[5]研究发现,基因 PIK3CA 外显子 9 和 20 的多点突变与宫颈癌的总生存率紧密相关。PI3K 在 SCC 组的表达与患者预后关系的研究,国内少见报道。本研究结果显示,PI3K 阳性表达患者的生存率低于阴性表达患者,但未达统计学差异。PI3K 表达与宫颈鳞癌患者预后的关系,有待于更广泛深入的研究探讨。

参考文献

[1] Shukla S, MacLennan GT, Hartman DJ, et al. Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion[J]. Int J Cancer, 2007, 121(14): 1424-1432.

[2] Zhang L, Yang N, Katsaros D, et al. The oncogene phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(40): 4225-4231.

[3] Ma YY, Wei SJ, Lin YC, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer[J]. Oncogene, 2000, 19(23): 2739-2744.

[4] Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer[J]. Nat Genet, 1999, 21(1): 99-102.

[5] 乐杰. 妇产科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 261-268.

[6] 杨大志, 姬长友. PI3K、p-Akt 蛋白在喉鳞癌中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 935-937.

[7] 江忠清, 连成瑛, 林岷, 等. 宫颈鳞癌组织埃兹蛋白表达与局部浸润转移及预后的关系[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2007, 6(3): 308-312.

[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 60-63.

[2] 庄广伦主编. 现代辅助生育技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 132-147.

[3] 世界卫生组织著; 谷翊群, 陈振文, 卢文红等译. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第 5 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 135-141.

[4] Allamaneni SS, Agarwal A, Rama S, et al. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa[J]. Asian Androl, 2005, 7(1): 86-92.

[5] 柴铭铭, 凌国灿, 周建萍. 促排卵联合 Pureception™ 密度梯度法优选精子在 AIH 中的应用[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2013, 10(2): 38-41.

[6] 黄娟华, 刘炜培, 张四友, 等. Pureception™ 密度梯度离心法优选精子在 IVF、ICSI 中的应用[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(20): 3183-3185.

[7] 滕晓明, 韩毅冰, 黄文强, 等. 男性不育的辅助生殖技术治疗[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2012, 31(5): 378-380.

[8] Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination[J]. Fertil Steril, 2009, 91(3): 777-781.

[9] 苏宁, 王维, 何燕, 等. 精液参数对宫腔内人工授精妊娠率的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(23): 3154-3157.

[10] 张科, 范立青, 刘薇, 等. 活动精子总数、精子形态与宫腔内人工授精妊娠率的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(19): 2254-2257.

(收稿日期: 2015-02-28)

[8] 林岷, 江忠清, 朱凤川, 等. 宫颈癌 CD44v6 表达与局部肿瘤血管生成、癌细胞增殖及浸润转移的关系[J]. 福建医科大学学报, 2005, 39(1): 41-44.

[9] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 7(2): 489-501.

[10] Park YH, Jung HH, Ahn JS, et al. Statin induces inhibition of triple negative breast cancer (TNBC) cells via PI3K pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(2): 275-279.

[11] Yarbrough WG, Whigham A, Brown B, et al. Phosphoinositide kinase-3 status associated with presence or absence of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 69(2): 98-101.

[12] Harris CP, Lu XY, Narayan G, et al. Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cancer cell lines[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2003, 36(3): 233-241.

[13] Knuefermann C, Lu Y, Liu B, et al. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells[J]. Oncogene, 2003, 22(21): 3205-3212.

[14] Rincon-Arango H, Rosales R, Mora N, et al. R-Ras promotes tumor growth of cervical epithelial cells[J]. Cancer, 2003, 97(3): 575-585.

[15] McIntyre JB, Wu JS, Craighead PS, et al. PIK3CA mutational status and overall survival in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy[J]. Gynecol Oncol, 2013, 128(3): 409-414.

(收稿日期: 2015-03-15)