Bmi-1 在子宫颈癌中的表达及临床意义

龚宝兰,王任晓,陈永利,胡 平 (郧阳医学院附属人民医院妇产科,湖北 十堰 442000)

[摘 要] **目的** 探讨 Bmi-1 在子宫颈癌中的表达及临床意义。**方法** 应用 RT-PCR 方法检测子宫颈癌中 Bmi-1 mRNA 表达,采用免疫组织化学法检测子宫颈癌中 Bmi-1 蛋白的表达情况。**结果** 本组所有的子宫颈癌(100.0%)和绝大多数正常子宫颈组织(91.7%)都表达 Bmi-1 mRNA,定量分析其在子宫颈癌中的表达量明显高于正常子宫颈组织($P<0.05$),Bmi-1 蛋白仅在子宫颈癌中散在表达。**结论** Bmi-1 是干细胞基因,其在子宫颈癌中的表达提示子宫颈癌干细胞的存在,其可能为子宫颈癌治疗的一个潜在靶点。

[关键词] 子宫颈癌;Bmi-1;肿瘤病理学

[中图分类号] R737.33 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)04-0364-03

Expressions and clinical significances of Bmi-1 in human cervical carcinoma

GONG Bao-lan, WANG Ren-xiao, CHEN Yong-li, HU Ping (Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated People's Hospital of Yunyang Medical College, Shiyan Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions and clinical significances of Bmi-1 in human cervical carcinoma. **Methods** The expressions of Bmi-1 mRNA in cervical carcinoma tissues were evaluated by RT-PCR and the expressions of Bmi-1 protein in cervical carcinoma tissues were detected by immunohistochemical staining. **Results** Bmi-1 mRNA was expressed in all cervical carcinomas (100%) and most of normal cervixs (91.7%). The expressions of Bmi-1 mRNA were higher in cervical carcinomas than those in normal cervixes ($P<0.05$), but the sporadic expressions of Bmi-1 protein were only detected in cervical carcinoma. **Conclusion** Bmi-1 is a stem cell gene; its expressions indicate the existence of cervical cancer stem cell, which may be a potential target for cervical carcinoma therapy.

Keywords: cervical carcinoma; Bmi-1; tumor pathology

子宫颈癌是女性中仅次于乳腺癌的常见恶性肿瘤。研究发现人乳头瘤病毒感染是子宫颈癌的主要危险因素,但分子作用机制尚不清楚。Bmi-1 基因为多梳(polycomb group, PcG)基因家族成员之一,作为原癌基因与另一种癌基因 c-myc 协同作用,引起细胞转化及肿瘤形成。文献报道多种肿瘤的发生、发展过程均与 Bmi-1 表达增强与肿瘤预后有关。关于 Bmi-1 与子宫颈癌的研究国内外文献报道较少。本研究通过 RT-PCR、免疫组织化学方法检测 Bmi-1 mRNA 及其蛋白在子宫颈癌中的表达情况,探讨其与临床病理特征的关系及意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

41 例子宫颈癌标本为我院近年来经病理证实的手术切除标本。术前均按照子宫颈癌临床病理分级,子宫颈上皮内瘤变Ⅲ级(CIN-Ⅲ)13 例,子宫颈鳞癌Ⅰ期 15 例,Ⅱ期 10 例,Ⅲ期 3 例,正常子宫颈标本 5 例,均来自于子宫肌瘤,患者平均年龄为(41 ± 12)岁,术前未行治疗。

1.2 RT-PCR 半定量分析

引物均在上海生物公司合成。Bmi-1 基因上游:5'-AGGAGGACACGGGCACTTA-3', 下游: 5'-CTCTGTGGCGCTGTCATTCA-3',产物长度为 133 bp;β-actin 上游:5'-CCAGAGCAAGAGAGGCATCC-3', 下游: 5'-CCGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3',产物长度为 205 bp。组织总 RNA 提取按照 Trizol (Qiagen, USA)试剂盒说明书的操作步骤,按 5 mg 组织 1 mL Trizol 的比例提取组织总 RNA;按照逆转录试剂盒(MBI, USA)说明书在 20 μl 的反应体系中合成细胞总 cDNA;PCR 体系为 50 μl,内含模板 2 μl,Taq 酶 5 U(TAKARA, Japan),目的引物各 1 μl,补足为 50 μl。反应条件除退火温度外均为预变性 94 ℃ 4 min,变性 94 ℃ 30 s,退火 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,25 个循环数。Bmi-1 退火温度为 59.5 ℃,β-actin 为 57.5 ℃。1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,经凝胶电泳分析系统数码成像并半定量分析 Bmi-1 mRNA 的表达情况。

1.3 免疫荧光组织化学检测

每组每个样本随机取三个组织块,每个组织块随机切片 5 张。组织切片后经二甲苯脱蜡,梯度酒精再水化后,0.01 mol/L 枸橼酸钠(pH 6.0)温度 100 ℃行抗原修复 10 min,PBS 冲洗 3 次,10% BSA 封闭非特异性位点 10 min,一抗(大鼠抗人 Bmi-1, 1∶100)4 ℃孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,加入羊抗大鼠绿色荧光二

[作者简介] 龚宝兰(1973 -),女,湖北省十堰市人,主治医师,本科,主要从事妇科肿瘤方面的研究。电话:(0719)8637682, E-mail: gongbaolan@163.com

[收稿日期] 2011-03-14 [修回日期] 2011-04-15

抗(1∶100)室温下孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次。DAPI 标记细胞核。PBS 冲洗 3 次。荧光显微镜下观察,Bmi-1 阳性主要表现为细胞核内呈现绿色荧光,DAPI 标记的细胞核为蓝色,叠加后呈土绿色。计数切片阳性率 = Bmi-1 阳性切片数/总切片数。Bmi-1 阳性切片经 Image J(NIH)图像处理软件分析其绿色荧光值。以上结果由两位病理科医师在双盲情况下观察所得。

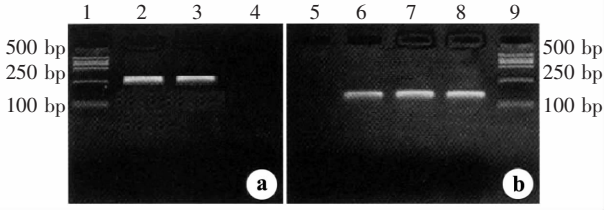
1.4 统计学处理

计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,$P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 Bmi-1 mRNA 在子宫颈癌中的表达

本组所有的子宫颈癌(100%)和绝大多数正常宫颈组织(91.7%)都表达 Bmi-1 mRNA,为相对分子量质量 36×10^3 的特异性蛋白条带(图 1)。半定量分析发现,41 例子宫颈癌中表达水平(6.51 ± 1.38)明显高于 5 例慢性宫颈炎(4.33 ± 1.64),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

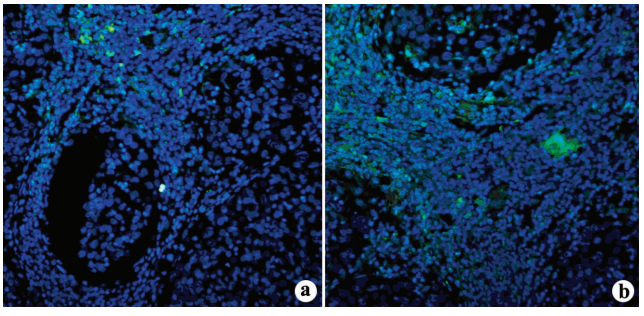


a:β-actin 产物 205 bp;b:Bmi-1 产物 133 bp;1、9:DNA Marker DL2000;2、3:β-actin 产物;4、5:阴性对照组(灭菌蒸馏水作为模板);6:慢性宫颈炎 Bmi-1 产物;7:子宫颈癌 Bmi-1 产物;8:K562 中 Bmi-1 产物

图 1 Bmi-1 mRNA 在子宫颈癌中表达的 RT-PCR 分析

2.2 Bmi-1 蛋白在子宫颈癌中的表达

免疫荧光组织化学染色显示,正常子宫颈未见有 Bmi-1 蛋白表达,在子宫颈癌的癌细胞中散在表达,部分成灶状表达。在 CIN-Ⅲ、子宫颈癌Ⅰ期、Ⅱ期及Ⅲ期组织切片 Bmi-1 阳性切片率分别为 10%、38%、45% 和 68.3%,主要表现为细胞核内呈现土绿色荧光(蓝色荧光与绿色荧光叠加),少量胞浆内呈绿色荧光,其阳性荧光值各组之间有显著性差异,见图 2,表 1。



a:子宫颈癌细胞核中 Bmi-1 阳性表达;b:子宫颈癌细胞浆中 Bmi-1 阳性表达

图 2 Bmi-1 蛋白在子宫颈癌中表达的免疫荧光化学分析

表 1 Bmi-1 蛋白在子宫颈癌中表达的荧光值分析($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	Bmi-1 表达荧光值
CIN-Ⅲ	13	4.78 ± 1.70
子宫颈癌Ⅰ期	15	6.72 ± 1.09
子宫颈癌Ⅱ期	10	8.31 ± 1.10
子宫颈癌Ⅲ期	3	9.80 ± 0.50

3 讨论

子宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤,随着分子生物学发展及临床研究深入,发现 CIN 并非单向的病理生理学发展过程,而是具有两种不同的生物学行为:自然消退或进一步发展为浸润癌[1]。国内外通过流行病学调查发现子宫颈癌的发生可能是多因素综合作用,但各因素间有无协同及对抗作用尚待进一步研究。原癌基因的激活,抑癌基因的失活,突变、凋亡基因的失调及转移相关基因的作用均可使细胞增殖失控而导致恶性转化,导致肿瘤的发生。Bmi-1 基因是一种属于 polycomb 家族成员的致癌基因,它直接参与细胞生长、增殖的调节,在许多成体干细胞和肿瘤干细胞中高表达,在干细胞的自我更新过程中发挥重要作用[2-3]。过度表达 Bmi-1 基因可上调人端粒酶逆转录酶(hTERT)的转录,端粒酶活性增高,阻止细胞的衰老,导致永生化,在细胞恶性转化中起重要作用。目前研究发现淋巴瘤、白血病、成纤维细胞瘤、口腔上皮细胞癌、早期肝癌、鼻咽癌、肾脏透明细胞癌、胃癌中均能检测到Bmi-1的过度表达[4-5],提示该基因在肿瘤形成中发挥了重要作用。有学者发现 Bmi-1 的表达水平与肿瘤的大小和淋巴结转移有高度的相关性,Bmi-1 表达阳性患者与表达阴性的患者比较,其生存率很低[6-7]。以上研究均提示 Bmi-1 的过度表达可能与肿瘤恶性程度、侵袭性及预后有关。

本研究中 Bmi-1 在正常子宫颈未见表达,子宫颈重度上皮内瘤变、子宫颈癌Ⅰ期、Ⅱ期和Ⅲ期中阳性表达率分别为 10%、38%、45% 和 68.3%,Bmi-1 明显表达于过度增生细胞,在正常细胞中低表达或不表达,可见子宫颈癌 DNA 表达失控,导致细胞恶性增生与 Bmi-1有相关性,提示 Bmi-1 阳性表达可能是子宫颈癌的普遍现象,其过渡表达可作为诊断子宫颈癌的预测及诊断指标之一。Bmi-1 在子宫颈癌的临床分期中的阳性表达率有显著统计学差异($P < 0.05$),说明 Bmi-1 蛋白的表达程度可提示癌细胞浸润及转移情况。

癌干细胞,也称肿瘤干细胞,是癌组织中“存在的”为数不多的具有自我更新能力、分化潜能的细胞。Setoguchi 等[8]发现很多肿瘤细胞系中持续存在癌干

细胞,Patrawala 等[9]也证实人多种肿瘤细胞系中存在干细胞样细胞。在治疗过程中因为这类细胞大多数处于静止期,这类细胞才是癌症复发与转移的原因;正常干细胞的自我更新具有反馈调节,增殖和分化处于平衡状态,而对于肿瘤干细胞而言,这一反馈调节机制并不存在,增殖和分化是无序的、失控的[10]。对肿瘤干细胞特异性标志物及相关信号转导通路将会被发现、揭示,这对于肿瘤预防、早期诊断、高效药物治疗、转移复发预防及预后判断等将具有重要实际意义。目前子宫颈癌干细胞方面的报道较少,子宫颈癌干细胞的存在,对下一步寻找特异性子宫颈癌表面标记分子分选,进而对其生物学特性研究提供了坚实的基础,这也可能成为子宫颈癌治疗的一个靶点。

[参考文献]

[1] 乐 杰. 妇产科学[M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社,2005:285.

[2] Reinisch C, Kandutsch S, Uthman A, et al. BMI-1: a protein expressed in stem cells, specialized cells and tumors of the gastrointestinal tract [J]. Histol Histopathol, 2006, 21(11): 1143 - 1149.

[3] Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters[J]. Cancer Res, 2006, 66(9): 4553 - 4557.

[4] Cui H, Hu B, Li T, et al. Bmi-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells[J]. Am J Pathol, 2007, 170(4): 1370 - 1378.

[5] Kim RH, Kang MK, Shin KH, et al. Bmi-1 cooperates with human papillomavirus type 16 E6 to immortalize normal human oral keratinocytes [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(3): 462 - 472.

[6] 冯 艳. 宋立兵,郭宝红,等. Bmi-1 在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 癌症, 2007, 26(2): 154 - 157.

[7] 黄开红,刘建化,李学先,等. Bmi-1 基因过盘表达与胃癌分化、转移及预后的关系[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(7): 973 - 979.

[8] Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines[J]. Cell Cycle, 2004, 3(4): 414 - 415.

[9] Patrawala L, Calhoun T, Schneider Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2$^+$ and ABCG2$^-$ cancer cells are similarly tumorigenic[J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6207 - 6219.

[10] 于清蕊. 干细胞与肿瘤干细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(15): 2948 - 2951.

(编辑:余汇洋)

(上接第 363 页)

实性质中,呈鱼肉状,均质,伴囊性变,符合淋巴结血管滤泡性淋巴组织增生(Castleman 病)。滤泡间区局灶淋巴组织增生伴异型性(图 2),免疫组化:B 淋巴细胞 CD20(+)、CD79α(+);T 淋巴细胞 CD3(+)、CD45RO(+)、CD5(+);滤泡中心细胞 CD10(+)、CD23(+);滤泡树突细胞 CD21(+)、CD35(+)、ALK(-)、CD15(-)、CD30(-)、CD1α(-)、Bcl-2 滤泡间区淋巴细胞部分(+);CD31 血管内皮细胞(+);Ki67 约 10%(+)。

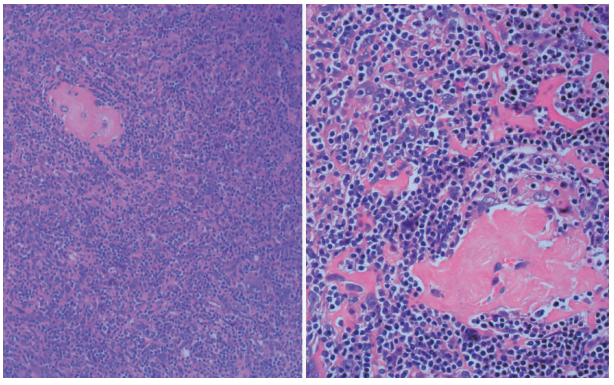


图 2 肿块病理切片

2 讨论

Castleman 病不同于淋巴瘤,为非肿瘤性免疫增生性疾病,可能与病毒感染如 HHV-8、细胞因子调节异常如 IL-6 表达增加及血管增生等有关[1]。Castleman 病可发生于淋巴结存在的任何部位,60% ~70% 发生在胸部纵隔,10% ~14% 发生在颈部,5% ~10% 发生于腹部,2% ~4% 发生于腋部,而腹部以腹膜后最常见[2]。Castleman 病术前诊断困难,多以肿块为首发症状,确诊有赖于病理检验结果 Castleman 病的治疗应根据临床和病理类型选择适当的方案,即:①单中心型(UCD)首选手术治疗,复发的概率微乎其微,绝大多数病人可长期生存;②无法切除或不能完全切除的 UCD,联合应用放疗及化疗,如 CHOP 方案(环磷酰胺 400 mg、长春新碱 2 mg、泼尼松 60 mg);③对多系统侵犯的多中心型(MCD)争取局部切除,术后辅以放疗、化疗和类固醇激素治疗;④对已转化为恶性淋巴瘤的病例,参照恶性淋巴瘤的化疗方案进行全身化疗;⑤对无明确包块病例采用内科药物治疗,如应用类固醇激素、免疫抑制剂或干扰素治疗[3]。

本例患者腹部 CT 除发现腹膜后巨大肿块外,肝脏及脾脏还发现有病灶,考虑为肿瘤转移或多发,因此临床分型为 MCD。术中发现肿块表面血管粗大、丰富,术后剖开肿块发现肿块中心呈多发囊性变,病理报告提示血管内皮细胞增生,病理分型应为透明血管型(HVV)。因此,本例患者为多中心透明血管型(M-HVV)。治疗上,我们采取了先手术切除腹膜后局部病灶,然后辅以化疗的方法。该病例术前的 CT 影像及术中探查发现肿块血供丰富,且与髂血管关系密切,因此术中出现大量出血。患者目前给予 CHOP 方案化疗,患者情况良好,预后较好。

[参考文献]

[1] 韩 潇,周道斌. Castleman 病的发病机制和治疗进展[J]. 中国医学科学院学报, 2009, 31(5): 639 - 642.

[2] 陈祖华,杨光钊. 局限性 Castleman 病的 CT 和 MRI 表现[J]. 影像诊断与介入放射学, 2008, 17(2): 78 - 80.

[3] 韩少良,张培趁,黄颖鹏,等. 腹部 Castleman 病的临床特点与外科治疗[J]. 外科理论与实践, 2009, 14(1): 76 - 78.

(编辑:雷 艳)