论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1502-03

聚焦超声对外阴白色病变组织细胞周期的影响

吴艺佳[1],胡丽娜[2],袁小莉[1],罗小东[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010;2. 四川大学华西第二医院妇产科,成都 610041)

【摘 要】目的:探讨聚焦超声治疗外阴白色病变后细胞周期素蛋白 D1(CyclinD1)和细胞周期素依赖性激酶(CCDK4)的表达,揭示聚焦超声对细胞周期的影响。方法:选择外阴白色病变组织 30 例及 10 例正常组织,应用免疫组化方法检测正常皮肤及聚焦超声治疗外阴白色病变前后组织中 CyclinD1、CDK4 蛋白的表达。结果:与正常皮肤比较,外阴白色病变组织中,CyclinD1 及 CDK4 蛋白阳性表达异常增高,差异均有统计学意义($P<0.05$);聚焦超声治疗外阴白色病变后,CyclinD1 及 CDK4 蛋白表达降低,与治疗前比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:聚焦超声治疗后,CyclinD1 表达降低,CDK4 水平降低,逆转了细胞周期的紊乱,有效的抑制了外阴白色病变的进展。

【关键词】聚焦超声;外阴白色病变;细胞周期

【中图图书分类法分类号】R711.72 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-10

Focused ultrasound therapy for white lesion of the vulvae: the changes of cell cycles

WU yi-jia, et al

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the changes of cell cycles in white lesion of the vulvar after focused ultrasound treatment. *Methods*: 30 patients were treated with focused ultrasound therapy from 2005 to 2007. Cyclin D1 and Cyclin Dependent Kinase (CDK4)were examined by strepavidin peroxidase immunohistochemistry. Statistical analysis was performed using SPSS. *Results*: The positive cell staining intensity of Cyclin D1 and CDK4 were significantly higher in white lesion of the vulvar than those of normal vulvar skin($P<0.05$). After the ultrasound treatment, the positive expression of CyclinD1 and CDK4 were decreased, significantly at the treated region($P<0.05$). No major complications occurred. *Conclusion*: White lesion of the vulvar could be effectively treated with focused ultrasound. The balance of CyclinD1 and CDK4 is reversed to normal, indicating focused ultrasound could regulate the cell cycles and effectively inhibit the progression in white lesion of the vulvar.

【Key words】 Focused ultrasound; White lesion of the vulvar; Cell cycle

外阴白色病变是指女性外阴皮肤和粘膜营养障碍而致的组织变性及色素改变的一类常见慢性病,国外统计其发病率为 1/300 ~ 1/1 000,2% ~ 3%的患者可发生癌变[1],随着分子生物学研究的不断深入,从细胞周期调控机制的变化来探讨其发病机理,已成为外阴白色病变研究的新的切入点。近年来聚焦超声治疗外阴白色病变取得了良好的效果,通过其热效应、机械效应、化学效应和空化效应而使生物组织、细胞、分子产生一系列变化。本实验通过高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound, HIFU)对外阴白色病变的疗效着手,研究超声治疗前后外阴皮肤中细胞周期素蛋白 D1(CyclinD1)和细胞周期素依赖性激酶(CDK4)的变化,探讨聚焦超声对外阴白色病变的细胞周期的影响,有望探求出外阴白色病变的发病机理,为临床治疗和疗效观察提供理论依据。

作者介绍:吴艺佳(1969-),女,主治医师,研究方向:外阴疾病及女性不孕。

1 资料和方法

1.1 研究对象

研究对象为 2005 年 6 月至 2007 年 10 月在重庆医科大学附属第二医院就诊的 30 例外阴白色病变的病人,患者年

龄 18~61 岁，平均年龄（40.16 ± 4.13）岁，所有患者治疗前均取组织活检证实为外阴白色病变。每例病人治疗前及治疗后（平均约3 个月）病变部位各取材 1 次。月经期、妊娠期、哺乳期妇女、外阴癌或癌前病变以及有急性外阴或阴道感染、全身性疾病及糖尿病的妇女均排除在本研究之外。所有患者在治疗前均签署知情同意书。同时取 10 例外阴正常皮肤对照，为子宫脱垂患者行阴道前后壁修补术中获得，患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 设备 海极星妇科超声治疗仪（重庆海扶技术有限公司研制）。

1.2.2 治疗方法 术前准备：按外科手术准备原则，常规检测心电图、血糖、血常规、凝血相，外阴部皮肤备皮。病人排空膀胱后，取截石位，常规消毒。局部浸润麻醉后，对患者的外阴病变区域进行超声治疗，治疗头以 3~5 mm/s 的速度进行连续直线扫描，辐照时间为 15~40 min，治疗后 24 h 外阴间断冷敷。

1.3 免疫组织化学测定

1.3.1 主要试剂 兔抗人 CyclinD1、CDK4 多克隆抗体由 Sigma 公司提供，山羊抗兔 IgG 购于北京中山生物技术有限公司。SP 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色剂购买于北京中山生物技术有限公司。

1.3.2 CyclinD1 和 CDK4 的表达检测 采用免疫组化 SP 法。

1.3.3 结果分析 以出现黄色 / 棕黄色颗粒着色为 cyclin D1、CDK4 蛋白表达阳性。采用北航生物医学图像分析系统对切片上的染色信号进行光密度分析。每张切片随机选取 3 个 100 × 视野，测定平均光密度值，光密度值代表信号表达强度。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 11.0 件进行数据分析，光密度值比较采用 F 检验。

2 结 果

2.1 聚焦超声治疗外阴白色病变组织前后中 cyclin D1 蛋白的表达

Cyclin D1 蛋白阳性表达产物主要位于临近外阴白色病变基底层的细胞核内，呈棕褐色，平均光密度值结果显示，外阴白色病变组织中，Cyclin D1 蛋白表达异常增高，与正常皮肤比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；聚焦超声治疗外阴白色病变后，Cyclin D1表达较治疗前降低，与对照组比较其差异也有显著性（表 1）。

表 1 CyclinD1 及 CDK4 在正常皮肤及聚焦超声治疗外阴白色病变中的表达[光密度值（$\bar{x}\pm s$）]

组别	例数	CyclinD1	CDK4
正常皮肤	10	0.163 ± 0.037	0.220 ± 0.061
外阴白色病变疗前	30	0.249 ± 0.054	0.443 ± 0.035
外阴白色病变疗后	30	0.112 ± 0.068	0.159 ± 0.026
P 值		0.011* 0.035** 0.015***	0.013* 0.042** 0.019***

注：* 为正常皮肤组与治疗前比较结果，** 为正常皮肤组与治疗后比较，*** 为治疗前后比较结果

2.2 聚焦超声治疗外阴白色病变组织前后中 CDK4 蛋白的表达

CDK4 蛋白阳性表达产物主要表达于外阴白色病变基底层的细胞核及细胞质内，呈棕褐色，平均光密度值结果显示，外阴白色病变中 CDK4 蛋白表达与正常外阴皮肤组织比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；聚焦超声治疗外阴白色病变后，CDK4 表达降低，与治疗前比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），与对照组比较差异也有显著性（表 1）。

3 讨 论

外阴白色病变迄今病因和发病机理未明，其治疗效果较差。随着分子生物学研究的不断深入，从细胞周期调控机制的变化来探讨其发病机理，已成为外阴白色病变研究的新的切入点。细胞周期调控因子参与多种发育途径，不仅调节细胞周期，还影响细胞增殖、分化、凋亡、粘附和癌变。Cyclin 和 CDKs 是细胞周期内源性调控的核心因子，一旦失控，细胞就可能发生异常增殖[2]。CyclinD（主要是 D1、D2、D3）以及 CDK4、CDK6 在细胞周期由 G 期进入 S 期的调控中起至关重要的作用。Cyclin 通过与 CDK 形成复合物发挥调控细胞周期或转录的功能[3]。其中，Cyclin 的周期性积累与降解对细胞周期的进程起着关键性的作用。在许多肿瘤与细胞周期蛋白的相关研究中，均发现有细胞周期蛋白的异常表达，且在外阴白色病变的相关研究中，也发现了 CyclinD1 的异常表达[4]。本实验结果发现：与正常皮肤比较，外

阴白色病变组织中,CyclinD1 及 CDK4 蛋白阳性表达异常增高,两者比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);此结果与以往[5]的研究结果基本相符。外阴白色病变组织 CyclinD1 蛋白及 CDK4 蛋白的高表达,是否同肿瘤一样,是由于其基因的局部扩增或易位至强启动子下游所致,有待于更深入地研究。本研究结果显示,CyclinD1 蛋白及 CDK4 蛋白的高表达致细胞周期的平衡状态被打破,可能是外阴白色病变发病的原因之一。

超声治疗是利用超声传播在组织内有良好的能量穿透性和沉积性等特征,能量透过表层,将超声波的能量沉积到发生病变的真皮内,通过超声的机械效应、热效应及空化效应而使生物组织、细胞、分子产生一系列变化,改善其微血管和神经末梢的营养状况,改变局部组织生长的微环境,使组织修复和再生,从而达到使病变的外阴皮肤得以康复的目的[6~8]。已有研究发现超声治疗不仅能够根除外阴顽固性瘙痒等症状, 还可恢复外阴的颜色与弹性[9]。可使上皮细胞及真皮组织的超微结构和色素代谢趋于正常[10]。本实验结果同时发现,聚焦超声治疗后,CyclinD1 和 CDK4 表达降低, 与治疗前比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),证实了高强度超声对外阴白色病变的细胞周期过程的改善。研究还发现 HIFU 治疗后 CyclinD1、CDK4 水平低于对照组水平,考虑与 HIFU 治疗后观察时限有关系:聚焦超声治疗后 3 个月,外阴组织的形态可以恢复正常,但微循环障碍可能还未完全消除, 同时推测由于 HIFU 的热效应和空化效应可能对组织细胞的功能有暂时的抑制,从而使细胞周期调控未完全恢复,导致 CDK4、CyclinD1 的表达较对照组稍低; 临床长期随访资料证实,聚焦超声治疗后并未出现外阴的萎缩和坏死,说明这种短时间内对细胞周期的抑制是可逆性的,这种可逆性过程中各种活性蛋白的表达情况需要进一步研究证实。细胞周期调控的信号转导途径及其反馈环路上的一系列调节基因组成复杂的网络精确地调控细胞周期,决定细胞是否继续增殖、暂不增殖或者永不增殖,以及何时分裂和分化[11,12]。一旦这种正负调控的平衡被打破,细胞就可能发生异常增殖。而聚焦超声治疗后,其比例向良性转归,外阴白色病变的细胞周期调控趋于正常。提示聚焦超声对病变组织的细胞周期有良性调控作用。因此我们认为,聚焦超声对细胞周期的调控作用可能是其治疗外阴白色病变的机制之一。

参 考 文 献

[1] Umekita Y,Ohi Y,Sag ara Y,et al. Overexpression of cyclin D1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients[J]. Int J Cancer,2002,98(3):415-418.

[2] 李成志,王智彪,卞度宏,等.超声治疗外阴白色病变的临床和病理评价[J]. 实用妇产科杂志,2003,19(1):17-18.

[3] Hostein I,Pelmus M,Aurias A,et al. Evaluation of MDM2 and CDK4 amplification by real-time PCR on paraffin wag-·embedded materiala potential tool for diagnosis of atypical lipo matous tumours/well-diferentiated liposarcomas[J]. J Pathol,2004,202(1):95-102.

[4] Chytil A,Waltner Law M,West R,et al. Construction of a cyclin D1-edk2 fusion protein to model the biological functions of cyclinD1-edk2 complexes[J]. J Biol Chem,2004,279(46):47688-47698.

[5] 李广太,曹京红,付玉静.细胞周期调控因子 Cyclin D1、p16 蛋白表达异常与外阴白色病变发病的关系[J]. 中华妇产科杂志,2006,41(5):322-325.

[6] 王智彪.外阴白色病变的超声治疗[J]. 实用妇产科杂志,2003,19(1):6-7.

[7] 王智彪.高强度聚焦超声治疗技术在妇产科的应用[J]. 中华妇产科杂志,2003,38(8):510-512.

[8] 李成志,王智彪,陈文直.聚焦超声治疗外阴白色病变的研究[J]. 中华妇产科杂志,2004,39(6):373-377.

[9] 焦鲁霞,宋 磊,李冬平.聚焦超声治疗外阴白色病变临床研究[J]. 解放军医学杂志,2004,29(12):1086-1087.

[10] 廖晓岗,李成志,汪克建,等.超声治疗前后外阴白色病变的超微形态比较研究[J]. 电子显微学报,2004,23(6):653-657.

[11] Pommier Y,Kohn K W.Cell cycle and checkpoints in oncology:*new therapeutic targets*[J]. Med Sci,2003,19(2):173-186.

[12] Aynati M M,Radulovich N,Tsao M S.Overexpression of Gl-S cyclins and cyclin dependent kinases during multistage humarl pancreatic duct cell carcinogenesis[J]. Clin Cancer Res,2004,10(19):6598-6605.

(责任编辑:关蕴良)