

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.16.003

宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中变异型分化抗原簇 44(17)的表达及意义*

殷新明,许文林,朱小兰,刘月琴[△]

(江苏大学第四附属医院/镇江市妇幼保健院妇科,江苏镇江 212001)

[摘要] **目的** 分析变异型分化抗原簇 44(17)(CD44v17)在宫颈上皮内瘤变(CIN)向宫颈癌发生、发展中的表达及意义,探讨其与 CIN 及宫颈癌之间的关系。**方法** 实时荧光定量 PCR 检测 CIN I、CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织中 CD44v17、基质金属蛋白酶 9(MMP9)和细胞核增殖相关抗原 Ki67 的表达;CD44v17 siRNA 干扰宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞 RNA 后,检测 CD44v17、MMP9 和 Ki67 的表达;以 CD44v17 基因慢病毒颗粒作用于荷瘤裸鼠,分析 CD44v17 siRNA 对裸鼠成瘤能力的影响。**结果** CD44v17 的表达水平在 CIN I、CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织中逐渐升高;以正常宫颈组织为对照,CD44v17、MMP9、Ki67 表达水平在 CIN I 级组织无明显上升($P>0.05$),在 CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织明显上升($P<0.05$);将 CD44v17 siRNA 转染宫颈癌细胞后,MMP9、Ki67 的表达明显降低($P<0.01$);CD44v17 基因慢病毒颗粒作用于荷瘤裸鼠后,肿瘤体积、质量均明显降低($P<0.01$),荷瘤裸鼠的成瘤能力降低。**结论** CD44v17 在 CIN 向宫颈癌发展的过程中可能有一定的促进作用,有望作为判定 CIN 是否具有恶变潜能的指标之一。

[关键词] 宫颈肿瘤;宫颈上皮内瘤变;变异型分化抗原簇 44(17);基质金属蛋白酶 9;Ki67

[中图法分类号] R711.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)16-2122-04

The expression and significance of CD44v17 in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia*

YIN Xinming, XU Wenlin, ZHU Xiaolan, LIU Yueqin[△]

(Department of Gynaecology, the Fourth Affiliated Hospital of Jiangsu University/Maternal and Child Care Service Centre of Zhenjiang, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[Abstract] **Objective** To analyse the expression and significance of CD44 variant (CD44v17) in the process of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) to cervical cancer, and to explore the relationship of CD44v17 with CIN and cervical cancer. **Methods** The expressions of CD44v17, matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and Ki67 in normal cervical tissue, CIN I, II, III and cervical carcinoma tissues were detected by real-time quantitative PCR. The expressions of CD44v17, MMP9 and Ki67 in human cervical cancer cell lines HeLa and SiHa after transfecting with CD44v17 siRNA were detected, as well. The tumor-bearing nude mice were treated with lentivirus particles of CD44v17, and the influence of CD44v17 siRNA on tumorigenicity in nude mice was analysed. **Results** The expression level of CD44v17 increased gradually from CIN I, II, III to cervical carcinoma tissues. Compared with normal cervical tissue, the expression levels of CD44v17, MMP9 and Ki67 were significantly increased in CIN II, III and cervical carcinoma tissues ($P<0.05$), while no significant difference was found between normal cervical tissue and CIN I tissue ($P>0.05$). The expression levels of MMP9 and Ki67 in human cervical cancer cell lines HeLa and SiHa were decreased significantly after transfecting with CD44v17 siRNA ($P<0.01$). The tumor volume and weight were decreased by treatment with CD44v17 siRNA transfection ($P<0.01$), and the tumorigenicity in nude mice was decreased. **Conclusion** CD44v17 may promote the development of CIN to cervical cancer. It is expected to be an indicator in predicting malignant potential of CIN.

[Key words] uterine cervical neoplasms; cervical intraepithelial neoplasia; CD44v17; matrix metalloproteinase 9; Ki67

宫颈癌是世界范围内的第三大女性常见癌症,伴有较高的病死率^[1]。宫颈上皮内瘤变(cervical intra-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81402165,81672913);江苏省自然科学基金项目(BK20141288);江苏省镇江市科技支撑计划-社会发展基金资助项目(SH2013088);江苏省镇江市科技支撑计划-社会发展基金资助项目(SH2016052);江苏省镇江市卫生计生科技重点专项项目(SHW2017011)。作者简介:殷新明(1973-),主任医师,硕士,主要从事妇科肿瘤、普通妇科临床工作。△ 通信作者,E-mail:liuyueqin2007@126.com。

epithelial neoplasia, CIN) 是宫颈癌的癌前病变, 从 CIN 发展到宫颈癌需经历一段较长的时间^[2], 在这个过程中如果进行规范的宫颈癌筛查, 及时早期作出诊断并实施规范的治疗, 发生宫颈浸润癌的概率会大大降低^[3]。因此, 重视 CIN 的早期诊治, 可以在 CIN 阶段阻断宫颈癌的发生。本文通过探讨各期 CIN (I、II、III 级) 及宫颈癌组织中变异型分化抗原簇 44 (CD44v17) 的表达变化及意义, 并进一步研究 CD44v17 与基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、细胞核增殖相关抗原 Ki67 的关系, 为 CIN 及宫颈癌的早期诊断、早期治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞株购自南京凯基生物科技有限公司。

1.1.2 实验动物 4~5 周龄雌性 BALB/c(nu/nu) 裸鼠 28 只, 体质量 14~17 g, 购自扬州大学医学实验中心, 在本院中心实验室饲养。饲养条件为 20~22 °C 的屏蔽系统, 室内相对湿度为 40%~60%, 无特定病原体。裸鼠以高压灭菌的水和标准饲料饲喂。

1.1.3 临床资料 选取 2014 年 1 月至 2016 年 12 月于本院妇科阴道镜室检查的患者 400 例, 将其分为 5 组: 正常宫颈、CIN I 级、CIN II 级、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌, 每组 80 例。所有 CIN II 级、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌均经后续的宫颈锥形切除或子宫切除证实相符。

1.1.4 实验试剂 TRIzol 试剂、RNA 酶抑制剂均购自美国 Invitrogen 公司。反转录、荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司 (RR716)。引物均由广州复能基因有限公司合成。CD44v17 siRNA 序列及 CD44v17 shRNA 慢病毒颗粒由上海吉凯生物技术有限公司合成构建。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 患者阴道镜下活检时同时取材, 取材后立即于 -80 °C 下冻存。正常宫颈组织取自子宫良性疾病行全子宫切除标本, 且术前人乳头瘤病毒 (HPV) 检查阴性、液基薄层细胞检测 (TCT) 未见异常、术后病理宫颈无异常。

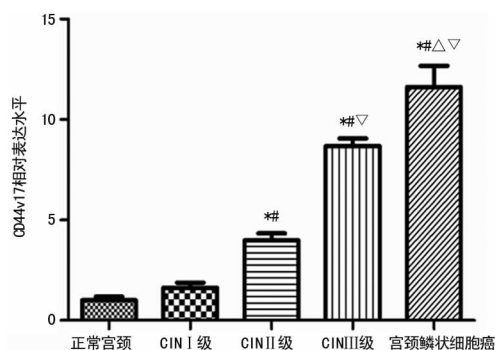
1.2.2 实验方法 人宫颈癌细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素), 选取对数生长期的细胞作为实验对象。目的基因的检测包括: (1) 细胞总 RNA 的提取。(2) 反转录反应。(3) 实时荧光定量 PCR 法检测目的基因相对表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因相对表达水平进行分析, 以内参基因三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 为标准, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的mRNA}} - Ct_{\text{GAPDH mRNA}}$ 。计算实验组相对于校准内参组目标基因增加或减少的倍数。(4) 选用前期体外实验验证有效的 CD44v17 siRNA 序列, 宫颈癌 HeLa 和宫颈癌 SiHa 细胞干扰 CD44v17 siRNA

后, 实时荧光定量 PCR 法检测 Ki67 和 MMP9 的表达。(5) 取 BALB/c 裸鼠 28 只, 背部皮下接种 1×10^6 个细胞/只。每隔 3 d 用测量裸鼠皮下肿瘤的长短径计算体积并绘制出肿瘤生长曲线 [肿瘤体积 (TV) = 长径 (mm) × 短径² (mm²) × 0.5]。待所有皮下瘤生长至最大直径大于或等于 5 mm 时, 随机分为两组: CD44v17 shRNA 慢病毒颗粒组、siRNA 阴性对照组, 每组 14 只, 继续饲养。各组瘤体内分别注射阴性对照病毒颗粒 (0.5×10^8 TU/mL)、含 CD44v17 基因慢病毒颗粒 (0.5×10^8 TU/mL) 相应药物 100 μL, 每 3 天 1 次, 共 6 次。慢病毒颗粒注射后第 20 天, 取肿瘤组织。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad prism 5.0 软件进行统计分析并制图, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

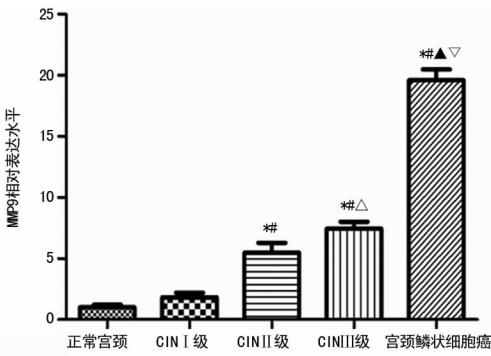
2.1 组织中 CD44v17 的表达 正常宫颈组织、CIN 组织、宫颈鳞状细胞癌组织的 CD44v17 表达阳性率逐渐升高, 呈递增趋势。以正常宫颈组织作为对照, CIN I 级组织 CD44v17 表达水平上升, 但差异无统计学意义 ($P = 0.056 0$); CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织 CD44v17 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。CIN I、CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织 CD44v17 表达水平两两比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。



*: $P < 0.01$, 与正常宫颈组织比较; #: $P < 0.01$, 与 CIN I 级组织比较; △: $P < 0.01$, 与 CIN II 级组织比较; ▽: $P < 0.01$, 与 CIN III 级组织比较

图 1 CD44v17 在各级 CIN 和宫颈癌中的表达

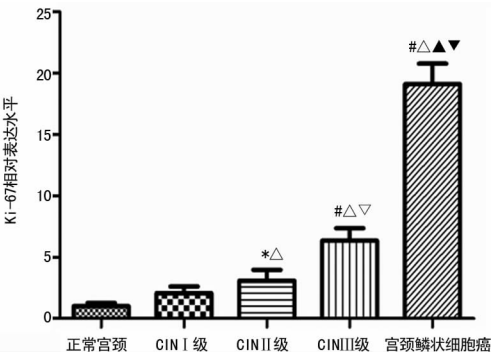
2.2 组织中 MMP9 的表达 在 CIN 向宫颈癌演变进展过程中, 组织中 MMP9 的表达呈逐渐升高的趋势, 在 CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织间 MMP9 的增幅更加明显。以正常宫颈组织作为对照, CIN I 级组织 MMP9 表达水平上升, 但差异无统计学意义 ($P = 0.061 2$); CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织 MMP9 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。CIN I、CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织间 MMP9 表达水平两两比较, 差异均有统计学意义 (其中 CIN II 级和 CIN III 级组织间 $P < 0.05$, 其余 $P < 0.01$), 见图 2。



*: $P < 0.01$, 与正常宫颈组织比较; #: $P < 0.01$, 与 CIN I 级组织比较; Δ : $P < 0.05$, \blacktriangle : $P < 0.01$, 与 CIN II 级组织比较; ∇ : $P < 0.01$, 与 CIN III 级组织比较

图 2 宫颈上皮内瘤变和宫颈癌组织中 MMP9 的表达

2.3 组织中 Ki67 的表达 在 CIN 向宫颈癌演变过程中, 组织中 Ki67 的表达呈逐渐升高的趋势, 且病变级别越高, Ki67 的增幅越明显。以正常宫颈癌组织作为对照, CIN I 级组织 Ki67 的表达水平上升, 但差异无统计学意义 ($P = 0.0790$); CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织 Ki67 的表达水平上升, 差异有统计学意义 (正常宫颈与 CIN II 级组织间 $P < 0.05$, 其余 $P < 0.01$)。CIN I、CIN II、CIN III 级和宫颈鳞状细胞癌组织 Ki67 的表达水平两两比较, CIN I 级和 CIN II 级间差异无统计学意义 ($P = 0.1195$), 其余差异有统计学意义 (其中 CIN II 级和 CIN III 级间 $P < 0.05$, 其余 $P < 0.01$), 见图 3。

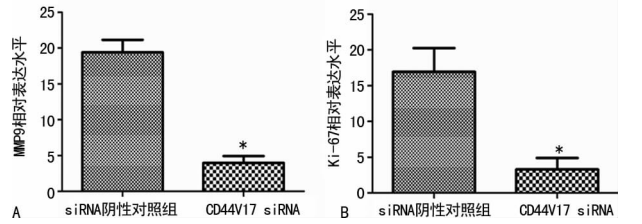


*: $P < 0.05$, #: $P < 0.01$, 与正常宫颈组织比较; Δ : $P < 0.01$, 与 CIN I 级组织比较; ∇ : $P < 0.05$, \blacktriangle : $P < 0.01$, 与 CIN II 级组织比较; \blacktriangledown : $P < 0.01$, 与 CIN III 级组织比较

图 3 宫颈上皮内瘤变和宫颈癌组织中 Ki67 的表达

2.4 CD44v17 对 MMP9、Ki67 表达的影响 人宫颈癌 Hela 和 Siha 细胞干扰 CD44v17 siRNA 后, MMP9、Ki67 的表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Hela 和 Siha 细胞的表达相似, 图为 Hela 细胞表达, 见图 4。

2.5 CD44v17 对荷瘤裸鼠成瘤的影响 CD44v17 shRNA 慢病毒颗粒组的肿瘤体积明显小于 siRNA 阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 肿瘤质量也明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 5~7。



A: MMP9 的表达; B: Ki67 的表达; *: $P < 0.0001$, 与 siRNA 阴性对照比较

图 4 干扰 CD44v17 siRNA 后宫颈癌细胞 MMP9 与 Ki67 的表达

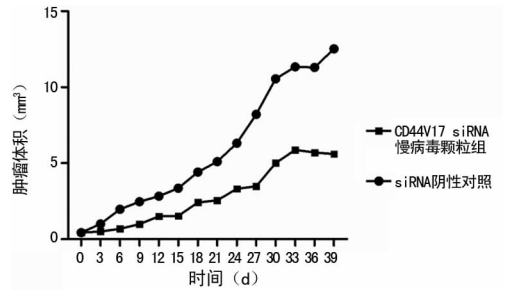
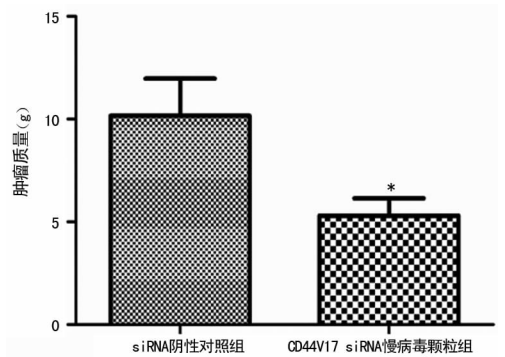


图 5 两组荷瘤裸鼠肿瘤体积比较



*: $P < 0.0001$, 与 shRNA 阴性对照组比较

图 6 两组荷瘤裸鼠肿瘤质量比较



A: shRNA 阴性对照组; B: CD44v17 siRNA 慢病毒颗粒组

图 7 两组荷瘤裸鼠

3 讨 论

CD44 基因蛋白与透明质酸等基质中的分子结合, 可以促进恶性肿瘤细胞的增殖和侵袭。BOURGNIGNON 等^[4]认为, CD44 通过与透明质酸结合, 可以激活酪氨酸激酶, 从而下调肿瘤抑制蛋白, 重塑细胞骨架, 使癌细胞的侵袭性增强。研究表明, 某些 CD44 分子表达异常可显著提高恶性肿瘤细胞的转移能力^[5-6], 并且与肿瘤恶性程度密切相关^[7]。CD44 剪接变异体 (CD44v) 与多种恶性肿瘤的发生、发展有着密切关系, 是肿瘤发生转移的重要因素, 可以作为一个较好的预测肿瘤转移扩散能力和预后情况的

指标^[8]。

细胞外基质(ECM)是恶性肿瘤细胞发生浸润和转移的主要障碍,在肿瘤的侵袭与转移过程中必须水解 ECM^[9],这一过程需要多种蛋白水解酶,其中常见的水解酶有基质金属蛋白酶类(MMPs)。这一家族中 MMP9 是Ⅳ型胶原降解的主要作用酶之一,在其作用下 ECM 中的Ⅳ型胶原降解,破坏 ECM 并促进肿瘤血管形成,推动了恶性肿瘤细胞浸润和转移的进程。肿瘤分期、恶性程度、转移能力与 MMP9 的表达水平呈正相关^[10-11]。Ki67 是一种与 DNA 结合的核内蛋白,仅表达于细胞增殖期,能够较好地判断肿瘤的生长增殖特性,与肿瘤的侵袭性呈正相关,因此 Ki67 可作为判断肿瘤侵袭性的指标之一^[12-13]。肿瘤组织 Ki67 阳性率升高,说明肿瘤组织中处于增殖周期的细胞比例越高,即 Ki67 阳性率越高,肿瘤生长越快、分化越差。

目前普遍认为宫颈癌是人类唯一一种可以阻断的癌症。CIN 为绝大多数浸润性宫颈癌浸润发生之前的一个必经时期,在这个过程中如果进行规范的宫颈癌筛查,及时作出正确诊断并实施规范有效的治疗,完全可以在该阶段阻断宫颈癌的发生,发生宫颈浸润癌的概率会大大降低^[3],从这一角度显示出早期诊断治疗 CIN 的重要性。

在本实验中 CD44v17 的表达在正常宫颈组织、逐级升高的 CIN 组织和宫颈癌组织中逐渐升高,说明 CD44v17 介入了宫颈癌肿瘤的进展过程。本研究结果显示,CD44v17 的表达发生改变从 CIN II 级后开始,在 CIN III 级与宫颈癌组织间的差异尤为明显。CIN I 级有可能向正常组织转变,临床倾向于观察,CIN II、CIN III 级患者需进一步治疗。本研究 CIN 组织中 CD44v17、MMP9、Ki67 的表达逐渐升高,在 CIN I 级组织中表达升高不明显,与临床处置相吻合,病变继续升级后 CD44v17、MMP9、Ki67 的增幅明显增加。CD44v17 能抑制宫颈癌细胞凋亡,促进宫颈癌细胞的生长,增强宫颈癌细胞的增殖迁移能力,从而促进宫颈癌肿瘤生长^[14]。本研究在宫颈癌细胞株中干扰宫颈癌细胞 CD44v17 siRNA 后 MMP9、Ki67 的表达明显降低,说明 CD44v17、MMP9 和 Ki67 在宫颈癌肿瘤细胞增殖和组织浸润过程中共同起到了重要作用。荷瘤裸鼠体内成瘤情况显示,干扰 CD44v17 siRNA 后荷瘤裸鼠成瘤的体积和质量均明显降低,成瘤能力明显降低,说明在体内 CD44v17 有促进宫颈癌肿瘤组织生长的作用。

综上所述,CD44v17 可促进宫颈癌肿瘤细胞增殖、组织浸润,在 CIN 向宫颈癌发生、发展的过程中可能起到一定的促进作用,其机制将是今后研究工作的重点。CD44v17 有望作为判定 CIN 是否具有恶变潜能及预后的重要指标之一,在临床工作中,可以通过检测 CD44v17、MMP9 和 Ki67,评价 CIN 及宫颈癌患

者的筛查、诊断,并有可能成为宫颈癌治疗的新靶点。

参考文献

- [1] LI D, CHEN L, WANG H, et al. Clinical application of a rapid cervical cancer screening method: folate receptor-mediated staining of cervical neoplastic epithelia[J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2017, 13(1): 44-52.
- [2] TSIKOURAS P, ZERVOUDIS S, MANAV B, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging[J]. *J BUON*, 2016, 21(2): 320-325.
- [3] WRIGHT T C, MASSAD L S, DUNTON C J, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ[J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2007, 11(4): 223-239.
- [4] BOURGNIGNON L Y, WONG G, EARLE C, et al. Hyaluronan-CD44 interaction promotes microRNA signaling and Rho GTPase activation leading to tumor progression[J]. *Small GTPase*, 2012, 3(1): 53-59.
- [5] SHERIDAN C, KISHIMOTO V, FUCHS R K, et al. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties, an early step necessary for metastasis[J]. *Breast Cancer Res*, 2006, 8(5): R59.
- [6] SLVEN M, KNLPINSKI J, GAFFNEY J, et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways[J]. *Matrix Biol*, 2006, 26(1): 58-68.
- [7] 刘晖, 周赞峰, 曾四元, 等. 黏附分子 CD44v6, ICAM-1 与早期宫颈鳞癌淋巴结转移的关系[J]. *重庆医学*, 2017, 46(22): 605-608.
- [8] 冯凡, 曹卫平, 陈琦, 等. CD44 剪接变异体(CD44v)在肿瘤中的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(1): 75-79.
- [9] MARTINO J C, YOULE R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101.
- [10] 薛清华. Rsf-1、MMP-9、TTF-1 在肺癌及肺部良性病变中的检验结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(6): 885-887.
- [11] 彭海员, 马杰, 朱慧芳, 等. MMP-9 与肺癌临床病理特征及预后的关系[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(4): 322-325.
- [12] YILMAZ M, VURAL E, KOC K, et al. Cavernous sinus invasion and effect of immunohistochemical features on remission ingrowth hormone secreting pituitary adenomas[J]. *Turk Neurosurgery*, 2015, 25(3): 380-388.
- [13] 何璐, 郭亮, 胡春洪, 等. 垂体腺瘤 MRI Knosp 分级与 Ki67、p53、MMP-9 的相关性分析[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2016, 15(5): 410-413.
- [14] 殷新明, 刘月琴, 温坚, 等. 变异型分化抗原簇 44(17)对宫颈癌 Hela 细胞, Sila 细胞系增殖的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(20): 3486-3490.