

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.06.009

COTL-1 在宫颈癌的表达及与 MVD 的相关性分析

王晓丽 李锦行 张 萍[△]

(青岛大学附属青岛市立医院, 山东 青岛 266011)

摘要 **目的** 通过检测毛状样蛋白-1 (human coactosin-like protein-1, COTL-1) 和微血管密度 (MVD) 在子宫颈癌中的表达, 探讨两者在子宫颈癌的发生发展过程中的作用及意义。**方法** 应用免疫组化 (SP 法) 检测在 25 例正常宫颈上皮、13 例宫颈上皮内瘤样病变 I 级 (CIN I)、22 例宫颈上皮内瘤样病变 II-III 级 (CIN II-III) 及 37 例宫颈癌组织中 COTL-1 的表达及 MVD 值。**结果** COTL-1 在正常宫颈、CIN I、CIN II-III 及宫颈癌组织中, 病变的级别越高, 其染色强度越强, 各组间比较均具有统计学意义 ($\chi^2 = 12.43, P < 0.01$)。宫颈癌组织中, COTL-1 的表达在中-低分化、深肌层浸润和盆腔淋巴结转移阳性者高于高分化、浅肌层浸润、盆腔淋巴结转移阴性者 (χ^2 分别为 10.56、6.35、11.13, $P < 0.05$), 而与 FIGO 分期无关 ($\chi^2 = 0.84, P > 0.05$), COTL-1 表达与 MVD 呈正相关 ($r = 0.79, P < 0.05$)。**结论** COTL-1 有可能促进了肿瘤新生血管的形成, 为宫颈癌的生长、浸润和转移提供了条件, 有望可作为对宫颈癌患者病程的进展和预后进行预测的指标之一。

关键词 宫颈癌; CIN; COTL-1; 微血管密度; CD34

中图分类号: R737.33 **文献标识码**: B **文章编号**: 1000-9760(2015)12-412-03

子宫颈癌是发病率以及死亡率均较高的恶性肿瘤, 全球每年的发病人数超过 40 万^[1]。大量的研究发现, 微血管密度 (MVD) 作为最普遍指标, 其形态以及表达是宫颈癌可能出现转移、扩散的研究指标^[2]。

毛状样蛋白-1 (human coactosin-like protein-1, COTL-1) 作为肌动蛋白结合蛋白中的一种, 可以调控白细胞的趋化、吞噬等炎症反应, 并能够上调 5-脂氧合酶 (5-lipoxygenase, 5-LO) 同纤维状肌动蛋白 (fibrous actin, F-actin) 的表达^[3], 前者可能增加 5-LO 主要下游产物 5-经二十碳四烯酸 (5-HETE) 和白三烯 B₄ (LTB₄) 的表达, 进而促进了血管生成及扩张, 其对肿瘤的发生可能起了潜在的促进作用。本文通过检测 COTL-1 和 MVD (以 CD34 标记) 在正常宫颈上皮、CIN I、CIN II-III 以及宫颈癌中的表达, 探讨 COTL-1 在宫颈病变进展过程中的表达情况, 与 MVD 变化之间的关系, 为临床治疗提供新方向。

1 资料和方法

1.1 资料

本文选择 2012 年 1 月至 2013 年 6 月在千佛山医院接受治疗的门诊及住院患者活检标本及子宫颈病变手术标本共 97 例, 包括正常宫颈组 25 例, CIN I 组 13 例, CIN II-III 组 22 例及宫颈癌组

37 例。CIN 分级则依据妇产科学第八版的诊断标准。宫颈癌患者按照国际妇产科联盟 (FIGO) 2009 年所制定的临床分期法进行分期。所有患者术前均未行化疗、放疗或免疫抑制剂治疗, 无其他疾病, 均经病理检查证实诊断。其中高分化 13 例, 中-低分化 24 例。淋巴结转移阳性者 15 例, 阴性者 22 例。浅肌层浸润者 14 例, 深浸润者 23 例。

1.2 方法

采用免疫组化 SP 法, 实验操作按试剂盒说明书进行, 用已知的阳性切片作为对照, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 检测宫颈不同病变组织中 COTL-1 的表达情况, 并用 CD34 染色, 计数 MVD。兔抗人 COTL-1 (1:200) 多克隆的抗体购自 Abcam 公司, 鼠抗人 CD34 (1:150) 单克隆的抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 结果判定

组织经染色制片后, COTL-1 阳性着色主要分布于胞浆, 呈棕黄色颗粒状或者片状。参照 Fromowitz 评分标准, 依据切片整张的染色情况, 在肿瘤区, 选取光镜下 ($\times 400$) 阳性表达最强的 5 个高倍视野, 计算阳性细胞数占肿瘤细胞数的比例, 0 分: 阳性细胞率 $\leq 25\%$, 1 分: $26\% \sim 50\%$, 2 分: $51\% \sim 75\%$, 3 分: $> 75\%$; 再按照多数阳性细胞呈现的染色强度予以记分, 0 分: 无显色, 1 分: 浅棕黄色, 2 分: 棕黄色, 3 分: 棕褐色。将上述两项的分数做和, 0 分: “-”, 1~2 分: “+”, 3~4 分: “++”, 5~6

[△] [通信作者] 张萍, E-mail: zpskx001@163.com

分：“卅”。MVD 检测标准则参照 veidner 等报道的方法^[4],用 CD34 染色计数 MVD,在高倍镜下对不重叠的 5 个视野的微血管计数,取其平均值,其中带有较厚肌层、管腔大于 6 个红细胞直径大小不计数,且各个标本取其平均值来做最后 MVD 计数结果。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 分析软件包进行统计数据处理。

2 结果

2.1 COTL-1、MVD 在正常宫颈、CIN、宫颈癌中的表达比较

COTL-1 蛋白染色呈棕黄色或者棕褐色颗粒,主要定位子宫颈病变中细胞胞浆,极少数可表达于细胞膜。经趋势卡方检验,COTL-1 的染色强度随着宫颈病变级别的升高逐渐增加,各组间进行比较有统计学意义。镜下 MVD 计数结果显示:MVD 计数在正常宫颈组、CIN 组以及宫颈癌组中,其表达呈逐渐降增高趋势,总体间有统计学意义($F=$

32.56, $P=0.00$),各组与对照组比较均有统计学差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 COTL-1、MVD 在正常宫颈、CIN 及宫颈癌组织中的表达比较

组别	COTL-1 表达			MVD 计数		
	n	阳性数	阳性率/%	χ^2	P	$\bar{x} \pm s$
正常宫颈组	25	1	4.00	12.43	0.00	12.55 $\pm$ 3.69
CIN I 组	13	3	23.07			21.46 $\pm$ 5.52 ^a
CIN II-III 组	22	10	45.45			36.11 $\pm$ 6.77 ^b
宫颈癌组	37	26	70.27			47.26 $\pm$ 10.38 ^b

注: a 和正常宫颈比较, $P<0.05$; b 和正常宫颈比较, $P<0.01$ 。

2.2 宫颈癌组织不同临床病理分类中 COTL-1 的表达及 MVD 计数的变化

COTL-1 表达与宫颈癌的组织分化程度、间质浸润深度和盆腔淋巴转移有关。而与临床分期无关。MVD 与宫颈癌的组织分化程度、盆腔淋巴转移有关,与宫颈癌组织不同浸润程度、临床分期无关。见表 2。

表 2 COTL-1、MVD 与宫颈癌临床病理参数的关系

病理分类	组别	COTL-1 表达				MVD 计数			
		n	阳性数	阳性率/%	χ^2	P	$\bar{x} \pm s$	t	P
FIGO 分期	I 期	21	15	71.42	0.84	0.57	47.84 $\pm$ 10.61	1.28	0.75
	IIa 期	16	11	68.75			44.45 $\pm$ 4.18		
组织分化程度	中、低分化	24	19	87.10	10.56	0.01	51.89 $\pm$ 9.87	4.53	0.02
	高分化	13	6	46.15			37.24 $\pm$ 3.79		
间质浸润深度	浅肌层	14	6	42.85	6.35	0.03	48.45 $\pm$ 10.31	0.69	0.26
	深肌层	23	19	82.61			47.26 $\pm$ 10.49		
盆腔淋巴结转移	有	15	14	93.33	11.13	0.00	56.11 $\pm$ 7.52	6.57	0.00
	无	22	12	54.54			37.56 $\pm$ 4.73		

2.3 COTL-1 和 MVD 在宫颈癌中的表达相关性分析

结果显示:COTL-1 蛋白表达与 MVD 之间存在正相关($r=0.79, P<0.05$)。见下表 3。

表 3 COTL-1 与 MVD 在宫颈癌组织中表达的相关性分析

MVD 值	COTL-1		r	P
	—	+ ~卅		
≤ 40	8	7	0.79	0.00
40~50	3	10		
≥ 50	0	9		
合计	11	26		

3 讨论

肿瘤的发病率和死亡率在现代社会中有逐年升高的趋势,对人类的身体健康和精神压力方面产生严重的影响^[5]。侵袭、转移和局部的复发性是宫颈癌患者共同的生物学行为特征,在宫颈癌的治疗过程中,也是至今影响其疗效以及患者预后的主要因素。Hye-Cheol 等^[6]通过蛋白组学的方法研究发现在小细胞肺癌中 COTL-1 的高表达,基因定位于 17p11.2,线性化程度较高。由 142 个氨基酸残基所组成的。可通过结构的重构来改变细胞凋

亡和侵袭等表型,在肿瘤发生中可能起促进作用。

本文结果显示:COTL-1 在正常宫颈、CIN 和宫颈癌组织中的表达阳性率依次升高,差异有统计学意义,提示 COTL-1 在宫颈癌的发生及演进发展中起着重要的作用。宫颈癌患者中,中-低分化组 COTL-1 表达比高分化组明显增高;间质浸润程度深者比间质浸润程度浅者高;有淋巴结转移者比无淋巴结转移者高。说明了肿瘤的组织分化的程度越差,间质浸润的越深,向远处转移的概率越高,而 COTL-1 的表达就越高。另外,本文 MVD 的计数结果显示,在正常宫颈、CIN 以及宫颈癌组织中逐渐升高,说明在宫颈癌发生过程中微血管生成起着重要的作用。

COTL-1 的致癌原因可能与以下因素有关:1)其空间结构主要由 6 条混合的 β -折叠链和 2 个疏水核心构成,可以通过它不同的结合位点而上调 F-actin 和 5-LO 的表达,进而调控白细胞的趋化、黏附和吞噬作用。2)能够诱使白细胞发生限制性肿瘤反应性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte,CTL),进而参与肿瘤细胞的特异性免疫反应^[7]。3)COTL-1 上调 5-LO 的表达后,有可能引起其主要下游产物 5-HETE 及 LTB₄ 的表达增多,同时促进了血管生成,血管扩张,引起了肿瘤的发展。COTL-1 可能是宫颈癌和宫颈高级别上皮内瘤变多种病理过程的关键蛋白,通过某种机制促使宫颈病灶中新生血管的增加,进而使 CD34 在宫颈癌组织中呈现高表达。对于肿瘤的转移来说,血管的生成是必需的步骤,但是新生血管上基膜的高通透性、不完整性以及血管生成的同时肿瘤周围毛细淋巴管的生成,可能是加速转移的主要因素。

本文结果显示:COTL-1 的表达与 MVD 呈现正相关,COTL-1 表达阴性的部位 MVD 值低,COTL-1 表达阳性的部位 MVD 值高,COTL-1 可能通过某种途径作用于血管,促进血管增生,另一方面也可能是高转移性的肿瘤细胞周围高表达肿瘤血管,同时促进了细胞-细胞之间的运动,引起了 COTL-1 的增高。从 CIN 到浸润型癌是一缓慢而又渐进的过程,其中在宫颈癌的发展过程中,血管的形成是关键步骤,持续的血液供应是肿瘤生长、浸润、转移的基础,如果没有新生血管,肿瘤组织因为缺血缺氧而生长缓慢或不再继续生长^[8]。CD34 标记的 MVD 是表征微血管密度的重要指标,其高表达是微血管密度增多,组织需氧、需血液的重要体现^[9]。对于肿瘤组织中微血管数量和肿

瘤发生转移之间关系的研究表明,血管的生成与肿瘤的生长、转移、复发等密切相关^[10]。张金标等^[11]研究显示,COTL-1 表达的程度同肺癌患者的性别、临床分期、年龄、组织类别和淋巴的转移等均无相关性,而与肺癌的分化程度有着相关性。

通过对宫颈癌临床病理特征的分析,我们可以推断,COTL-1 的高表达可能是使宫颈癌具有高转移、高侵袭能力的分子基础,可能通过促进肿瘤形成新生血管,进而促进宫颈癌的生长、浸润以及转移。检测 COTL-1 的表达对于了解肿瘤的侵袭性、发展程度及预测复发有重要作用,为肿瘤的生物治疗提供了新的思路和途径。

参考文献:

- [1] Bellaminutti S, Seraceni S, De Seta F, et al. HPV and Chlamydia trachomatis co-detection in young asymptomatic women from high incidence area for cervical cancer[J]. Med Virol, 2014, 86(11):1920-1925.
- [2] Bodnar M, Szyllberg L, Kazmierczak W, et al. Evaluation of microvessel density (MVD) in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Przegl Lek, 2012, 69(10):726-730.
- [3] Lee J A, Sung H N, Jeon C H, et al. AIP1, a carbohydrate fraction from artemisia iwayomogi, modulates the functional differentiation of bone marrow-derived dendritic cells[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(4):534-541.
- [4] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147(11):9-19.
- [5] Kottarathil V D, Antony M A, Nair I R, et al. Recent advances in granulosa cell tumor ovary: a review[J]. Indian J Surg Oncol, 2012, 4(1):37-47.
- [6] Jeong H C, Kim G I, Cho S H, et al. Proteomic analysis of human small cell lung cancer tissues: up-regulation of coactosin-like protein-1[J]. Proteome Res, 2011, 10(1):269-276.
- [7] Oh J E, Karlmark R K, Shin J H, et al. Cytoskeleton changes following differentiation of N1E-115 neuroblastoma cell line[J]. Amino Acids, 2006, 31(3):289-298.
- [8] Danielle S, Ross H, Barbara W, et al. Chronic neck pain: making the connection between capsular ligament laxity and cervical instability[J]. Open Orthop, 2014, 8:326-345.
- [9] Gluhovschi C, Potencz E, Lazar E, et al. CD34 + fibroblast-like cells in the interstitial infiltrates in glomerulonephritis-an immunohistochemical observation[J]. Pol J Pathol, 2012, 63(4):267-271.
- [10] Mills A M, Karamchandani J R, Vogel H, et al. Endocervical fibroblastic malignant peripheral nerve sheath tumor (neurofibrosarcoma): report of a novel entity possibly related to endocervical CD34 fibrocytes[J]. Am J Surg Pathol, 2011, 35(3):404-412.
- [11] 张金标. MMP-9、CD147、COTL-1 在肺癌组织的表达及临床意义[D]. 南方医科大学, 2011.

(收稿日期 2015-08-28)