

宫颈癌组织中角质细胞生长因子受体的表达以及对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、迁移能力的影响

姜欢, 武明莉, 李怡梅, 杨小凤

郑州大学附属郑州中心医院妇产科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 探讨宫颈癌组织中角质细胞生长因子受体(KGFR)的表达以及对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、侵袭能力的影响。

方法 选取 2017 年 1 月-2018 年 4 月郑州中心医院保存的宫颈癌组织标本 52 例(宫颈癌组),同时选取正常宫颈组 40 例作为对照组,采用免疫组化染色法检测 KGFR 表达;选取宫颈癌 HeLa 细胞株,随机分为对照组、空白 shRNA 组和 KGFR-shRNA 组,其中空白 shRNA 组转染空白慢病毒载体,KGFR-shRNA 组转染沉默 KGFR 表达的慢病毒载体,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 HeLa 细胞 KGFR mRNA 和蛋白表达,CCK-8 检测 HeLa 细胞增殖情况,Transwell 细胞迁移实验检测 HeLa 细胞迁移能力。 **结果** 宫颈癌组 KGFR 阳性表达率为 76.92%,明显高于对照组($\chi^2 = 54.438, P < 0.05$);宫颈癌 TNM 分期Ⅲ期患者 KGFR 阳性表达率为 100.00%,明显高于Ⅰ~Ⅱ期患者($\chi^2_{校正} = 5.183, P < 0.05$);宫颈癌中低分化患者 KGFR 阳性表达率为 91.89%,明显高于高分化患者($\chi^2_{校正} = 13.399, P < 0.05$);KGFR-shRNA 组的 KGFR mRNA 和蛋白相对表达量分别为(0.354±0.065)和(0.603±0.122),明显低于对照组和空白 shRNA 组($P < 0.05$);KGFR-shRNA 组培养 24、48、72 h 细胞 OD 值明显低于对照组和空白 shRNA 组($P < 0.05$);KGFR-shRNA 组穿膜细胞数分别为(53.11±7.49)个,明显低于空白 shRNA 组和对照组($P < 0.05$)。 **结论** 宫颈癌组织中 KGFR 表达上调,与患者临床病理特征有一定关系;KGFR 表达沉默可抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖和迁移能力。

关键词: 宫颈癌;角质细胞生长因子受体;HeLa 细胞;增殖;迁移

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)06-0755-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.06.035

宫颈癌的发生风险明显上升,流行病学研究证实,我国 2010-2017 年每年宫颈癌的平均发病率可达 374~583/10 万人左右^[1]。临床上宫颈癌发生转移能够导致患者无进展生存期和无瘤生存期的缩短,影响患者的整体临床预后水平^[2]。

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(15A321139)

作者简介: 姜欢(1985-),女,硕士,主治医师,研究方向:妇产科学。

通信作者: 杨小凤, E-mail: yinjingping@163.com。

在影响宫颈癌发生发展的相关因素中,肿瘤相关生物学因子的改变,能够导致癌细胞的浸润、增殖、分化等病理特征的变化,促进了恶性肿瘤的发生过程。角质细胞生长因子受体(KGFR)是成纤维生长因子受体家族的重要成员,其能够通过对于受体络氨酸激酶的活化作用,进而促进患者癌细胞内信号通路的激活,导致癌细胞核转录活性的增强。KGFR 的表达能够通过提高癌细胞的迁移和变形能力,提高癌细胞浸润临近正常组织的风险,导致宫颈癌患者的临床病情的进

室内空气和实验室内不同物体表面、以及不易看到的污染死角的消毒,而且消毒彻底、消毒效果好,因此过氧化氢蒸汽可以作为微生物实验室彻底消毒的一种方法进行使用。由于过氧化氢蒸汽的消毒效果与 H_2O_2 剂量及消毒时间密切相关,因此在使用的过程中应该保持实验室的密封。

参考文献

- [1] 卫生法制与监督司. 消毒技术规范[Z]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2002;26-28.
- [2] 赵治英, 张露丹, 张鸿, 等. 2011-2015 年上海市浦东新区养老机构消毒消毒效果监测分析[J]. 实用预防医学, 2018, 25(3):305-307.
- [3] 郑吟秋, 王云川, 何媛, 等. 5 种化学消毒剂对高等级生物安全实验室消毒效果研究[J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(10):905-908.

- [4] 孔军伶, 邵长玲. 病原微生物实验室的消毒与灭菌[J]. 医学信息, 2016, 29(36):284-285.
- [5] 柳琴. 不同消毒方法在医学实验室消毒管理中应用的研究[J]. 中国保健营养, 2014, 2(中):498-499.
- [6] 杨华明, 易滨. 现代医院消毒学[M]. 北京:人民军医出版社, 2008:522-531.
- [7] 庞志钊, 马志辉. 石家庄市托幼机构物体表面消毒效果分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(2):219-220.
- [8] 李闽真, 林坚, 叶玲清. 微生物实验室空气紫外线消毒效果监测[J]. 海峡预防医学杂志, 2014, 20(1):57-58.
- [9] 龙显科, 汤丽霞. 医院微生物实验室空气细菌污染与消毒现状[J]. 右江民族医学院学报, 2009, 52(2):283-284.
- [10] 帖金凤, 王长德, 陈金龙, 等. 过氧化氢蒸汽对生物安全实验室灭菌效果观察[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(6):463-465.

收稿日期:2018-09-30

展^[3]。部分研究者报道了 KGFR 的表达与卵巢癌或者乳腺癌的关系^[4],认为 KGFR 表达的上升是促进卵巢癌患者临床分期进展、淋巴结转移的重要风险^[5],但对于 KGFR 的表达与宫颈癌的关系研究不足。为了为宫颈癌的临床诊疗提供理论基础,本次研究选取 2017 年 1 月-2018 年 4 月郑州中心医院保存的宫颈癌组织标本 52 例,探讨了 KGFR 的表达情况,并分析了 KGFR 的表达与宫颈癌细胞的生物学特征的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本 选取 2017 年 1 月-2018 年 4 月郑州中心医院保存的宫颈癌组织标本 52 例(宫颈癌组),同时选取正常宫颈组织 40 例(因子宫肌瘤或子宫腺肌症而切除)作为对照组,两组受试者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。纳入标准:(1)均经病理组织学确诊;(2)患者临床资料保存完整;(3)术前未行放化疗等治疗。排除标准:(1)合并有其他恶性肿瘤者;(2)临床资料不完整。

表 1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	产次(次)	孕次(次)
宫颈癌组	52	40.77±4.12	1.50±0.36	1.61±0.52
对照组	40	39.82±3.68	1.48±0.30	1.60±0.55
<i>t</i> 值		1.148	0.284	0.089
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	>0.05

1.2 细胞来源 宫颈癌 Hela 细胞购自中科院上海细胞研究所,37℃ 温水浴复苏,高糖 DMEM 培养基中培养,待细胞长满 80% 以上进行传代,取第 3 代对数生长细胞进行试验。

1.3 免疫组化染色法 所有组织标本经石蜡包埋后作连续切片,厚度约为 4 mm,采用免疫组化链霉卵白素-生物素复合体法(strep avidin-biotin complex, SABC 法)染色,二氨基联苯胺(diamionben zidene, DAB)显色。KGFR 蛋白通用型二抗以及 SP 试剂盒和 DAB 显色盒均购自北京中杉金桥生物技术开发公司。以阳性片及 PBS 代替一抗分别作为阳性及阴性对照,高倍显微镜下观察 KGFR 蛋白的表达情况,具体染色步骤严格按照 SP 试剂盒说明书进行操作。

1.4 细胞转染 采用无内毒素质粒提取试剂盒提取和纯化 KGFR 抑制剂质粒及空白质粒,测定浓度,将宫颈癌 Hela 细胞铺于六孔板上,隔日更换 DMEM 高糖培养基,在细胞融合度为 75%~80% 时加入脂质体和构建的质粒,并进行筛选,定期更换培养基清除死亡的细胞。

1.5 RT-PCR 检测 收集细胞进行裂解,收集细胞

裂解液,加入 0.2 ml 的氯仿,2℃~8℃ 冰冻离心机中离心(12 000 g/min, 15 min),反复一次洗涤 RNA,弃上清,在管底部可见一乳白色小沉淀物,加入 1 ml 75% 乙醇,0.1% DEPC 水溶解。加入角质细胞生长因子受体(KGFR)基因和 GAPDH 上下游引物、0.1% DEPC 使其终浓度均为 20 pmol/μl,制备反应体系,RT-PCR 扩增的条件与参数:48℃,45 min,94℃,2 min;94℃ 30 s,58℃ 60 s,68℃ 2 min 共 40 个循环;循环完毕后 68℃ 延伸 7 min。

1.6 Western blot 检测 将所收集的蛋白与上样缓冲液以 5:1 的浓度相互混合,80℃~100℃ 煮沸 5 min。根据不同的蛋白分子量水平,配制并灌注相应的 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,按 15 g/孔蛋白量进行组织蛋白的上样,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后根据条带进行切胶,半湿法转移至硝酸纤维素膜,BSA 蛋白封闭 2 h,加入含 10% BSA 一抗及二抗(1:1 000),磷酸盐缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,进行曝光及胶片弧度的读取。

1.7 细胞增殖毒性(CCK)检测 在 96 孔板中接种细胞悬液(100 μl/孔),向每孔加入 10 μl CCK8 溶液,将培养板在培养箱内孵育 1~4 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,若暂时不测定 OD 值,可以向每孔中加入 10 μl 0.1 M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液,24 h 内测定,吸光度不会发生变化。

1.8 Transwell 细胞迁移实验 采用细胞刮将上室内细胞轻轻刮去,采用磷酸盐缓冲液洗两次,每次 3 min,行多聚甲醛固定液固定,结晶紫染色后显微镜下观察,随机选 3 个视野,计数穿膜细胞,根据每个区域的细胞数量计算细胞侵袭能力。

1.9 免疫组化结果判断 随机选取 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,胞质出现棕黄色为 KGFR 表达阳性,阳性细胞占细胞总数的比例≥30% 为阳性表达,否则为阴性表达。

1.10 统计学处理 统计分析采用 SPSS 19.0 软件,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较使用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料比较使用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组中 KGFR 阳性表达情况比较 宫颈癌组 KGFR 阳性表达率明显高于对照组($P<0.05$),见表 2 和图 1。

表 2 两组中 KGFR 阳性表达情况比较

组别	例数	KGFR 阳性表达 (%)	χ^2 值	P 值
宫颈癌组	52	40(76.92)	54.438	<0.05
对照组	40	0(0.00)		

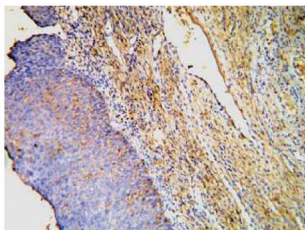


图 1 宫颈癌组 KGFR 阳性表达图(免疫组化染,×100)

2.2 KGFR 表达与宫颈癌临床病理特征关系 KGFR 阳性表达与宫颈癌 TNM 分期、分化程度有关($P<0.05$),见表 3。

表 3 KGFR、TFPI-2 表达与宫颈癌临床病理特征关系

临床病理特征	例数	KGFR 阳性表达 (%)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				
≤35	23	16(69.57)	1.258	>0.05
>35	29	24(82.76)		
组织类型				
鳞癌	30	23(76.67)	0.003	>0.05
腺癌	22	17(77.27)		
TNM 分期				
I~Ⅱ期	36	24(66.67)	5.183 *	<0.05
Ⅲ期	16	16(100.00)		
分化程度				
高分化	15	6(40.00)	13.399 *	<0.05
中低分化	37	34(91.89)		
淋巴结转移				
有	17	13(76.47)	0.088 *	>0.05
无	35	27(77.14)		

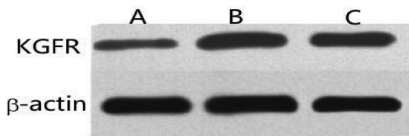
注: * 为校正卡方值。

2.3 各组 Hela 细胞 KGFR mRNA 及蛋白表达比较 KGFR-shRNA 组 KGFR mRNA 和蛋白相对表达量明显低于对照组和空白 shRNA 组,比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4 和图 2。

表 4 各组细胞 KGFR mRNA 及蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	KGFR mRNA 相对表达量	KGFR 蛋白相对表达量
对照组	0.948±0.102	1.022±0.202
空白 shRNA 组	0.950±0.109	1.004±0.182
KGFR-shRNA 组	0.354±0.065 ^{ab}	0.603±0.122 ^{ab}
F 值	7.933	8.201
P 值	<0.05	<0.05

注: a 与对照组比较, $P<0.05$; b 与空白 shRNA 组比较, $P<0.05$ 。



注: A: KGFR-shRNA 组; B: 空白 shRNA 组; C: 对照组。

图 2 Western blot 检测图

2.4 各组 Hela 细胞增殖情况比较 KGFR-shRNA 组培养 24、48、72 h 细胞 OD 值明显低于对照组和空白 shRNA 组($P<0.05$),见表 5。

表 5 各组 Hela 细胞增殖情况 OD 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.092±0.013	0.224±0.039	0.560±0.094	0.658±0.101
空白 shRNA 组	0.101±0.014	0.215±0.042	0.564±0.086	0.660±0.105
KGFR-shRNA 组	0.097±0.012	0.151±0.037 ^{ab}	0.376±0.097 ^{ab}	0.508±0.099 ^{ab}
F 值	1.221	6.922	8.201	9.033
P 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

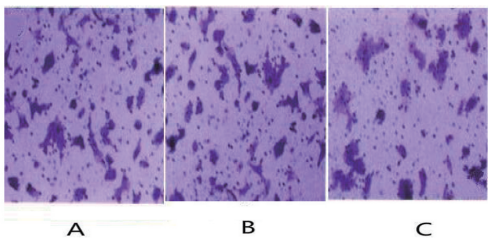
注: a 与对照组比较, $P<0.05$; b 与空白 shRNA 组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组 Hela 细胞迁移能力比较 KGFR-shRNA 组穿膜细胞数分别为(53.11±7.49)个,明显低于空白 shRNA 组和对照组($P<0.05$)。见表 6 和图 3。

表 6 各组 Hela 细胞迁移能力比较($\bar{x}\pm s$)

组别	穿膜细胞数(个)	F 值	P 值
对照组	98.82±10.02	65.592	<0.05
空白 shRNA 组	97.01±9.84		
KGFR-shRNA 组	53.11±7.49 ^{ab}		

注: a 与对照组比较, $P<0.05$; b 与空白 shRNA 组比较, $P<0.05$ 。



注: HE 染色, ×400; A 为对照组; B 为空白 shRNA 组; C 为 KGFR-shRNA 组。

图 3 Transwell 细胞迁移实验

3 讨论

遗传易感性因素或者高危型 HPV 病毒感染导致的持续性宫颈上皮细胞的病变,均可能增加宫颈癌的发生风险,导致患者生存预后水平的恶化^[6]。特别是在合并有 HPV16、HPV18 等亚型病毒感染的患者中,宫颈上皮细胞异常核分裂的风险可进一步的上升^[7-8]。现阶段临床上宫颈癌患者手术联合术后放化疗治疗的效果有限,综合性措施治疗后的宫颈癌患者的无进展生存期仍然较短^[9]。其中宫颈癌患者术后的复发或者转移,是影响到宫颈癌远期生存预后转归的最为重要的因素^[10]。对于宫颈癌患者肿瘤转移或者复发的基础机制的研究,能够为临床上宫颈癌患者预后的改善提供理论方面的参考。

KGFR 在恶性肿瘤的发生过程中发挥重要的作用,其能够影响癌细胞的增生调控、癌细胞分化成熟等病理过程中。KGFR 能够通过激活细胞内的络氨酸酶,导致癌细胞内的蛋白激酶 B(AKT)信号通路的激

活,从而导致癌细胞中 G1/S 期细胞比例的上升。KGFR 能够通过对于癌细胞变形或者粘附能力的影响而提高癌细胞的转移风险。基础方面的研究还认为, KGFR 对于上皮-间质转化过程的调控,能够促进癌细胞周边间质成分的分解,从而为肿瘤的转移或者复发提供前提^[11]。部分研究者报道了 KGFR 的表达与宫颈癌的关系,认为 KGFR 蛋白表达阳性率的上升与宫颈癌患者的早期发生过程密切相关,并认为 KGFR 的上升能够导致宫颈癌临床病理分期的显著进展^[12],但关于 KGFR 在宫颈癌细胞水平的相关理论研究不足。

本次研究免疫组化的结果分析可见,在宫颈癌病灶组织中,KGFR 蛋白的表达阳性率明显的上升,高于正常对照宫颈组织,差异较为明显,提示了 KGFR 蛋白的表达可能影响到了宫颈癌的发生发展过程,通过汇集不同的相关文献,笔者认为这主要考虑与 KGFR 蛋白的下列几个方面的作用有关^[13-14]:(1) KGFR 蛋白的上升能够导致癌细胞膜内第二信使的激活,提高了三磷酸腺苷或者络氨酸酶的活性,导致癌细胞核周边转录因子的显著激活;(2) KGFR 蛋白的表达上升能够导致癌细胞对于临近正常宫旁组织浸润能力的增强,提高了早期宫颈癌发生风险。王永良等^[15]研究者也通过探讨了宫颈癌病灶组织中的 KGFR 蛋白表达情况,发现 KGFR 蛋白的表达阳性率可平均上升 45% 以上,特别是在合并有宫旁组织浸润的宫颈癌患者中, KGFR 蛋白的表达阳性率可进一步的上升。对于 KGFR 与宫颈癌患者临床病理特征的关系研究可见,在发生了癌细胞分化程度较差或者临床分期较晚的患者中, KGFR 蛋白的表达阳性率可进一步的上升,这主要由于 KGFR 蛋白的表达能够提高癌细胞对于临近正常组织的浸润能力,促进了临床分期的进展,同时还能够导致宫颈柱状上皮细胞分化诱导成熟障碍。通过沉默 KGFR 基因后,宫颈癌细胞的生物学特征发生了显著的改变,沉默 KGFR 蛋白表达组宫颈癌细胞的增殖活性明显的下降,提示了 KGFR 蛋白的表达对于宫颈增殖状态的影响,这主要由于 KGFR 的表达能够影响到癌细胞的 DNA 增殖速度,提高癌细胞上游转录调控因子的活性,进而促进了癌细胞的增殖。而沉默表达 KGFR 的宫颈癌细胞,其迁移或者侵袭能力明显的下降,提示了 KGFR 的表达还能够显著影响到宫颈癌的侵袭能力。

本次研究的创新性在于探讨了 KGFR 的表达对于宫颈癌细胞迁移或者增殖活性的改变。综上所述, KGFR 在宫颈癌病灶组织中的表达显著的增强, KGFR 的表达能够显著影响宫颈癌患者的细胞分化和临床分

期,同时 KGFR 还能够提高宫颈癌细胞的迁移和增殖能力。

参考文献

- [1] 梁聪,李维丽,陈春林,等. 基于中国大陆部分医院宫颈癌诊疗大数据的嗜神经浸润与临床病理参数相关性分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2018,34(1):72-77.
- [2] Yao J, Zhou G, Wang Y, et al. Prognostic values of the integrated model incorporating the volume of metastatic regional cervical lymph node and pretreatment serum Epstein - Barr virus DNA copy number in predicting distant metastasis in patients with N1 nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin J Cancer,2017,36(1):34-36.
- [3] 王振国,李争,陈瑜. 宫颈癌组织中 KGF、KGFR 及 MMP-9 的表达变化[J]. 山东医药,2016,56(1):50-52.
- [4] 罗安琪,韩瑞,吴芳,等. 不同分子亚型乳腺癌骨转移患者的临床特征和预后分析[J]. 西安交通大学学报(医学版),2017,38(5):740-743.
- [5] 张雨滢,李力. 分子进化理论在卵巢癌发生及多药耐药的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24(5):553-557.
- [6] Takekuma M, Shimokawa M, Nishio S, et al. Phase II study of adjuvant chemotherapy with paclitaxel and nedaplatin for uterine cervical cancer with lymph node metastasis[J]. Cancer Sci,2018,32(7):56-58.
- [7] 钱莉莉,徐菲,宋伟国,等. 局部晚期子宫颈癌新辅助化疗疗效分析[J]. 癌症进展,2017,15(5):501-504.
- [8] Abbasian Ardakani A, Reiazi R, Mohammadi A. A clinical decision support system using ultrasound textures and radiologic features to distinguish metastasis from tumor-free cervical lymph nodes in patients with papillary thyroid carcinoma[J]. J Ultrasound Med,2018,26(5):345-347.
- [9] Nanthamongkolkul K, Hanprasertpong J. Predictive factors of pelvic lymph node metastasis in early-stage cervical cancer[J]. Oncol Res Treat,2017,41(4):194-198.
- [10] Samouelian V, Mechtouf N, Leblanc E, et al. Sensitive molecular detection of small nodal metastasis in uterine cervical cancer using HPV16-E6/CK19/MUC1 cancer biomarkers[J]. Oncotarget,2018,9(31):34-36.
- [11] 张珊,官海涟,丁锦红,等. 宫颈癌及其癌前病变的分子标志物临床应用进展[J]. 实用妇产科杂志,2016,32(7):503-506.
- [12] 叶庆华,邵凌云,童晓文. 上皮间质转化的分子机制及在妇科肿瘤转移中的研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志,2015,16(5):471-473.
- [13] 郑爱文,陈雅卿,方静,等. 早期子宫颈癌术后肺转移的临床病理特征及危险因素分析[J]. 中华妇产科杂志,2015,50(3):204-209.
- [14] 吴乾凤,高国兰,孔为民. I~IIA2 期宫颈癌淋巴结转移高危因素及对预后的影响[J]. 中国妇产科临床杂志,2016,17(5):407-409.
- [15] 王永良,陈美才. 惠州龙门地区妇女宫颈病变中 p16INK4a 蛋白与 KGFR 的表达及意义[J]. 检验医学与临床,2015,12(6):825-826.