

Topo II α 在宫颈癌前病变中的表达及其与高危型人乳头瘤病毒感染的关系

屈王蕾 高宝辉 董剑达 吕杰强

摘要 **目的** 探讨 Topo II α 蛋白在宫颈癌前病变组织中的表达及其在宫颈癌发生中的作用,并探讨高危型人乳头瘤病毒感染与 Topo II α 表达的关系。**方法** 选取 2006 年 1~12 月在温州医学院附属第二医院行宫颈病变诊治的患者,其中包括各级宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈鳞癌(SCC)的患者。随机选取同期就诊的慢性宫颈炎患者作为对照。运用第 2 代杂交捕获法(HC2)检测高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)的表达。活体提取组织,运用免疫组织化学法(SP 法)检测宫颈组织中 Topo II α 蛋白表达。**结果** Topo II α 在正常宫颈上皮组织、CIN I、CIN II、CIN III、SCC 中的表达率分别 20.0% (6/30)、15.8% (6/38)、46.9% (15/32)、85.7% (30/35) 和 90.0% (27/30),表达率逐渐增加,有统计学意义。在 HR-HPV 阳性患者的宫颈病灶组织中 Topo II α 蛋白阳性表达率高于 HR-HPV 阴性患者,有统计学意义。**结论** Topo II α 蛋白表达随着宫颈癌前病变的严重程度而上调,可能参与宫颈上皮的异常增殖和恶性转变。其表达的上调与 HR-HPV 感染有关,可能是 HR-HPV 感染后导致细胞恶性转化的中间行为。

关键词 Topo II α 宫颈癌 人乳头瘤病毒

Expression of Topo II α in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Its Relation to High-risk Human Papillomavirus Infection. Qu Wanglei, Gao Baohui, Dong Jianda, Lü Jieqiang. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract **Objective** To investigate the expression of topoisomerase II α in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and invasive squamous cell carcinoma (SCC) and the function of cervical carcinogenesis; and study the influence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection on it. **Methods** Totally 135 patients with CIN or SCC were rolled in the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College from January to December in 2006. Another 30 patients during the same period with chronic cervicitis were selected as control group. Hybrid capture II assay (HC2) was used to detect the expression of HR-HPV of all the patients. All tissues were diagnosed and grouped through HE after operation. Immunohistochemical staining (SP) was used to detect the topoisomerase II α in these tissues. **Results** The positive rate of expression of Topo II α in NCE, CIN I, CIN II, CIN III and SCC was 20.0% (6/30), 15.8% (6/38), 46.9% (15/32), 85.7% (30/35) and 90.0% (27/30), respectively. A progressive increase was along with the grade of the lesion ($P < 0.05$). The positive rate of expression of Topo II α was increased in HR-HPV-positive lesions than that of HR-HPV-negative (64.2% vs 13.3%, $P < 0.05$). The increased Topo II α expression was associated with HR-HPV ($r_s = 0.454$, $P < 0.05$). **Conclusion** Topo II α expression was up-regulated with the increasing grade of cervical lesion. Topo II α could be involved in abnormal proliferation and cancerization of cervix epithelium. The up-regulation of Topo II α was related to HR-HPV infection and could be a stage of cancerization after HR-HPV infection.

Key words Topoisomerase II α ; Cervical cancer; Human papillomavirus

DNA 拓扑异构酶 II (topoisomerase II, Topo II) 是生物体内广泛存在的一类核蛋白,是控制核酸生理功能的关键酶。在 DNA 的重组、修复、转录及复制过

程中起重要作用,在许多人类恶性肿瘤中,包括宫颈癌中表现为上调^[1~3]。本研究通过检测 Topo II α 在宫颈癌前病变和宫颈癌组织中的表达及其与高危型人乳头瘤病毒感染的关系,探讨 Topo II α 表达与宫颈癌变的关系及其在宫颈癌前病变筛查方面的临床意义。

对象与方法

1. 研究对象:2006 年 1~12 月在笔者医院门诊因宫颈病变进行宫颈活检的患者 150 例,其中病理诊断为 CIN I 40 例,

基金项目:英国威廉信托基金会资助项目(071845/Z/03/Z);浙江省计划生育委员会资助项目(200930)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院妇产科(屈王蕾、吕杰强);病理科(高宝辉);肿瘤外科(董剑达)

通讯作者:吕杰强,电子信箱:jieqianglu@126.com

CIN II 40 例, CIN III 40 例, 宫颈鳞癌 (SCC) 30 例。并随机选取同期病理诊断为慢性宫颈炎 30 例患者作为对照组。

2. 标本来源: 所有进入研究的患者, 均于笔者医院行手术治疗, 包括宫颈锥切 (冷刀或 LEEP 术) 和子宫全切或宫颈瘤的根治术。术后活体切取组织, 在 10% 中性甲醛溶液固定, 常规脱水、透明、石蜡包埋。

3. 实验分组: 将石蜡切块制成切片经 HE 染色, 由两位病理科医师分别读片, 再次进行病理学诊断。剔除病理诊断不一致的病例, 根据病理结果重新调整分组, 将实验对象分为 5 组。分别为: A 组, 慢性宫颈炎; B 组, CIN I; C 组, CIN II; D 组, CIN III; E 组, 浸润性鳞癌。各组实际病例数为: A 组 30 例; B 组 38 例; C 组 32 例; D 组 35 例; E 组 30 例。CIN 组患者年龄 21 ~ 62 岁, 平均年龄 36.20 ± 5.76 岁; 宫颈癌组患者年龄 28 ~ 68 岁, 平均年龄 51.00 ± 6.52 岁; 慢性宫颈炎组患者年龄 22 ~ 67 岁, 平均年龄 37.00 ± 5.33 岁。

4. 实验方法及结果判定: (1) HR-HPV 检测: 所有进入研究的患者手术前行美国 Digene 公司的第二代杂交捕获试验 (hybrid capture, HC2) 检测。相对光单位 (RLU) / 终值的比率 ≥ 1.0 时, 表示 13 种高危型 HPV 有一种或多种型别为阳性。(2) 免疫组化检查方法: 采用免疫组化微波修复 S-P 法检测。鼠抗人 Topo II α 抗体及免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。设阳性和阴性对照, DAB 显色。(3) 免疫组化结果判定: 对每张切片在低倍镜 ($\times 100$) 下观察并确定有代表性的染色阳性视野, 选择 5 个视野, 在高倍镜 ($\times 400$) 下计数每 100 个细胞中的阳性细胞数, 每例至少计数 1000 个细胞, 取其平均数, 即为标记指数 (labeling index, LI)。根据表达的 LI, 将结果分为: 阴性 (-): $LI \leq 5\%$; 弱阳性 (+): $6\% < LI \leq 25\%$; 中度阳性 (++) : $25\% < LI \leq 50\%$; 强阳性 (+++): $LI > 50\%$ 。

5. 统计学方法: 所有统计数据均采用 SPSS 13.0 统计软件计算分析。计数资料结果比较用 Person χ^2 检验或四格表精确概率法检验; 免疫组化表达强度的分析用秩和检验; 两变量间的关系用 Spearman 等级相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

结 果

1. HR-HPV 感染情况: HR-HPV 在慢性宫颈炎、CIN I、CIN II、CIN III 及 SCC 中的阳性率分别为 20.0%、63.2%、87.5%、94.3% 和 96.7%, 随着宫颈病变的加重, HR-HPV 感染率显著升高, 有统计学意义 ($\chi^2 = 64.194, P < 0.05$)。慢性宫颈炎组的阳性率低于 CIN 各组 and SCC 组 ($P < 0.05$)。CIN I 组的阳性率低于 CIN II、CIN III 和 SCC 组 ($P < 0.05$)。CIN II、CIN III 和 SCC 组之间两两比较, 差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2. Topo II α 蛋白的表达情况: (1) Topo II α 在正常宫颈鳞状上皮不表达或低表达。可以在正常鳞状上皮基膜附近见到散在的阳性细胞。染色浅局限于胞核 (图 1A)。在宫颈上皮内瘤变组织中表达于异型细胞的胞核 (图 1B、图 1C)。在宫颈浸润性鳞癌组织中表达于癌细胞的胞核, 偶尔可见胞质轻微染色 (图 1D)。(2) Topo II α 在正常宫颈上皮、CIN 和 SCC 中表达率的比较: 从表 1 可见, Topo II α 在正常宫颈上皮组织、CIN I、CIN II、CIN III、SCC 中的表达率分别 20.0% (6/30)、15.8% (6/38)、46.9% (15/32)、85.7% (30/35) 和 90% (27/30)。Topo II α 的表达与宫颈病变的严重程度呈正相关 (Spearman 秩相关系数 $r_s = 0.673, P < 0.05$)。正常宫颈上皮组织与 CIN I 之间比较差别无统计学意义, CIN II、CIN III、SCC 中 Topo II α 的表达均高于正常上皮和 CIN I; CIN III、SCC 中 Topo II α 的表达高于 CIN II, 差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。CIN III、SCC 之间 Topo II α 的表达的差别无统计学意义。

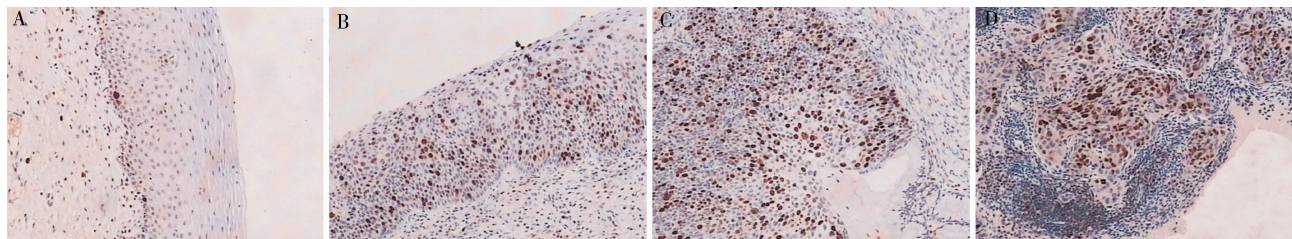


图 1 Topo II α 在正常鳞状上皮、CIN、SCC 中表达 (SP, $\times 100$)

A. 正常鳞状上皮基膜附近见散在阳性细胞; B. CIN II; C. CIN III; D. SCC; CIN: 宫颈上皮内瘤变; SCC: 宫颈鳞癌

3. HR-HPV 感染和 Topo II α 表达的相关性: 由表 2 可见, HR-HPV 阳性的患者的宫颈病灶组织中 Topo II α 阳性表达率为 63.3% (76/120), HR-HPV 阴性患者的宫颈病灶组织中 Topo II α 的阳性表达率

为 17.8% (8/45), 两者差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。Topo II α 表达强度与 HR-HPV 的感染正相关 ($r_s = 0.424, P < 0.05$)。

表 1 Topo II α 在正常上皮组织、CIN 和 SCC 中的表达

病变程度	n	Topo II α 表达				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
正常上皮组织	30	24	6	0	0	20.0
CIN I	38	32	4	1	1	15.8 [△]
CIN II	32	17	9	5	1	46.9 ^{△*}
CIN III	35	5	5	7	18	85.7 ^{△**}
SCC	30	3	4	6	17	90.0 ^{△**▲}

[△]与正常上皮组织相比较;CIN I 组 $\chi^2 = 0.077, P > 0.05$;CIN II 组 $\chi^2 = 7.159, P < 0.05$;CIN III 组 $\chi^2 = 35.017, P < 0.05$;SCC 组 $\chi^2 = 37.267, P < 0.05$; * 与 CIN I 组比较;CIN II 组 $\chi^2 = 5.898, P < 0.05$;CIN III 组 $\chi^2 = 37.402, P < 0.05$;SCC 组 $\chi^2 = 39.601, P < 0.05$; * 与 CIN II 组比较; $\chi^2 = 23.144, P < 0.05$;▲ 与 CIN III 组比较, $\chi^2 = 0.303, P > 0.05$;CIN. 宫颈上皮内瘤变;SCC. 宫颈鳞癌

表 2 HR-HPV 感染与 Topo II α 表达强度的相关性

HR-HPV 表达	n	Topo II α 表达				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
+	120	44	22	18	36	63.30
-	45	37	6	1	1	17.80
合计	165	81	28	19	37	27.40

Person $\chi^2 = 30.219, P < 0.05$;Spearman $r_s = 0.424, P < 0.05$

讨 论

1. Topo II α 在宫颈癌和癌前病变中表达:Topo II 是生物体内广泛存在的一类核蛋白,通过调节核酸结构动态变化,在 DNA 复制、修复、转录、重组以及染色体分离等生命活动中发挥重要作用。Topo II 有 α 与 β 两种同工酶。Topo II β 几乎全部存在于核仁内,是构成核仁所必需的成分与核糖体 RNA 转录有关。Topo II α 主要位于核基质中,参与 DNA 复制过程。Topo II α 的表达依赖于细胞周期,在正常细胞中主要见于 S 期、G 期和 M 期,在 G₂/M 期达到峰值。其高表达可导致 DNA 复制与细胞分裂增加,是细胞增殖的一个特异性指标。在肿瘤细胞中,Topo II α 在 G₀、G₁ 期亦可表达,使其在恶性增殖细胞中表达比良性增生细胞更高^[4,5]。Nakopoulou 等^[6]在乳腺癌组织中研究显示,Topo II α 含量高的细胞分化程度低。在口腔扁平苔藓中,Topo II α 表达与细胞的异型性,基底细胞增生等密切相关^[7]。在口腔上皮鳞癌、外阴鳞癌中 Topo II α 表达与肿瘤细胞分级正相关,且有增殖依赖性^[8]。由此可见,Topo II α 不仅能作为判断增生的定性指标,还可以用来区分病变的良、恶性^[9]。

在本研究中我们发现 Topo II α 在正常宫颈鳞状上皮中不表达或轻度表达,表达的强度随着 CIN 的级别的升高而增加,阳性颗粒在上皮细胞层的表达水

平也随着病情的进展及恶变的程度逐渐从下蔓延至全层。这与 Saha 和 Smrkoli 等^[10,11]研究结果相似,显示 Topo II α 表达的上调与宫颈鳞状上皮的异常增殖相关。邹倩等^[12]检测了 Topo II 在宫颈癌前病变和宫颈癌中的表达,显示了相似的规律,但其研究显示,Topo II 在正常宫颈和 CIN I 中表达均有 50% 以上,而本研究中 Topo II α 的表达明显较低。这是由于 Topo II 的两种同工酶中只有 Topo II α 参与 DNA 复制过程,其表达依赖于细胞周期,是提示增殖的更为特异的指标。本研究中,Topo II α 在正常鳞状上皮和 CIN I 中无表达或低表达,而在 CIN III 级时表达明显上调,在 CIN III 级和早期浸润癌中表达无明显差异,这一规律显示 Topo II α 的激活和高表达可能是宫颈癌变过程中的一个晚期事件。Topo II α 在 CIN II/III 级时过度表达,促进细胞增殖,抑制凋亡,使存在基因缺陷的细胞越过 G₂/M 检查点,异常增生繁殖,从而促使细胞恶性转化,最终导致宫颈癌的发生。

2. Topo II α 与 HR-HPV 感染的相关性:本研究显示,Topo II α 在 CIN 和 SCC 中的表达与 HR-HPV 感染有明显的相关性。这种相关性在国内外文献中均鲜有提及。但 Gupta 在对另一种由 HPV 病毒引起的病——复发性呼吸道乳头状瘤的研究中也发现相似的规律。Topo II α 作为一种核酶,其活性受体内多种因素的调节,如各种细胞周期依赖的蛋白激酶、蛋白激酶抑制因子和转录调节因子。其中包括细胞周期依赖的蛋白激酶的抑制因子:Rb 和 P53 蛋白以及 p21 和 p16,均可与 Topo II α 基因的启动子结合,下调其活性,减少 Topo II α 的表达。其中以 Rb 和 P53 研究得比较透彻。野生型的 Rb 蛋白和 p53 除了能下调 Topo II α 基因的启动子活性,减少其表达外,还能直接抑制 Topo II α 的生物活性。变异和突变的 RB 和 p53 则没有这一作用。Rb 和 p53 对 Topo II α 的调节作用对细胞正常活动至关重要,其关系失衡可能是肿瘤发生的内在因素之一。

HR-HPV 感染时,病毒 DNA 整合入宿主细胞后,使病毒 E6 和 E7 的 mRNA 稳定性增加、表达增强。E6 能特异性的结合肿瘤抑制蛋白 P53,使其快速降解。E7 能与 Rb 蛋白结合。我们推测,HR-HPV 感染可导致野生的 Rb 和 p53 基因的失活或突变,从而失去对 Topo II α 的抑制作用,使 Topo II α 基因过度表达,最终导致细胞增殖恶变。Satterwhite 曾做过一个体外实验,以制剂抑制 Topo II α 的活性,可使 Rb 蛋白表达上调,细胞周期停止,然后以 HPV

病毒的 E7 灭活 Rb, 细胞周期又得以继续。这一实验结果支持我们的推测, 提示 HR - HPV 与 Topo II α 的表达有密切关系。HR - HPV 与 Topo II α 的这种联系可能暗示了 Topo II α 上调是 HR - HPV 触发细胞增殖进而导致细胞恶变的一个靶点。

3. Topo II α 表达在 CIN 中表达的临床意义: 目前, 液基细胞学 (TCT) 和医生取材 HC2 检测 HR - HPV 相组合, 被推荐为最佳宫颈癌筛查方案, 已在世界范围内广泛应用。但 TCT 敏感性和阴性预测值低, HC2 检测 HR - HPV 假阳性率高。组织学检查虽然是诊断的金标准, 但在实际应用时, 常会面临活检的组织过小、破碎或炎细胞浸润过多影响观察等情况, 使诊断难以标准化、精确化。而且诊断标准中存在一定的主观因素, 常常出现不同的病理医生会对同一病例给出不同级别的 CIN 诊断, 造成过诊断或诊断不足。本研究中, Topo II α 的上调是 HR - HPV 持续感染宿主细胞产生的异常基因产物, 比单纯的 HC2 的阳性更能反应 HR - HPV 的感染状态, 是 CIN 和 SCC 的更为客观和特异的检测指标。而且 Topo II α 在 CIN II 以上表达明显上调, 提示可能是宫颈癌变过程中的晚期事件。Topo II α 表达的明显上调, 可能预示细胞恶性转变的不可逆转, 可作为临床上提示我们及时进行干预的一个预警指标。

参考文献

- 1 Brustmann H, Naude S. Expression of topoisomerase II α , Ki - 67, proliferating cell nuclear antigen, p53, and argyrophilic nucleolar organizer regions in vulvar squamous lesions [J]. Gynecol Oncol, 2002, 86(2): 192 - 199
- 2 Lynch BJ, Guinee DG Jr, Holden JA. Human DNA topoisomerase II - α : a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer [J]. Hum Pathol, 1997, 28 (10): 1180 - 1188
- 3 Stathopoulos GP, Kapranos N, Manolopoulos L, et al. Topoisomerase

- II α expression in squamous cell carcinomas of the head and neck [J]. Anticancer Res, 2000, 20(1A): 177 - 182
- 4 Villman K, Stahl E, Liljgren G, et al. Topoisomerase II - α expression in diferent celcycle phases in fresh human breast carcinomas [J]. Mod Pathol, 2002, 15(5): 486 - 491
- 5 Kimura F, Kawamura J, Kamoshida s, et al. Significance of cell proliferation markers (minichromosome maintenance protein 7, topoisomerase II α and Ki - 67) in cavital fluid cytology: can we differentiate reactive mesothelial cells from malignant cells? [J]. Diagn Cytopathol, 2010, 38(3): 161 - 167
- 6 Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, et al. Expression of the vascularendothelial growth factor receptor - 2/Flk - 1 in breast carcinomas: correlation with proliferation [J]. Hum Pathol, 2002, 33(9): 863 - 870
- 7 Mattila R, Alaneb K, Syrjanen S. Immunohistochemical study on topoisomerase II α , Ki - 67 and cytokeratin - 19 in oral lichen planus lesions [J]. Arch Dermatol Res, 2007, 298(8): 381 - 388
- 8 Hafian H, Venteo L, Sukhanova A, et al. Immunohistochemical study of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II α , p53, and Ki - 67 in oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinomas [J]. Hum Patol, 2004, 35(6): 745 - 751
- 9 Brustman H, Naude S. Expression of topoisomerase II α , Ki - 67, proliferating cell nuclear antigen, p53, and argyrophilic nucleolar organizer regions in vulvar squamous lesions [J]. Gynecol Oncol, 2002, 86(2): 192 - 199
- 10 Saha B, Chaiwun B, Tsao - wei DD, et al. Telomerase and markers of cellular proliferation are associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions [J]. Int J Gynecol Pathol, 2007, 26(3): 214 - 222
- 11 Smrkoli S, Erzen M, Raker S. Prognostic significance of topoisomerase II α and collagen IV immunoexpression in cervical cancer [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2010, 31(4): 380 - 385
- 12 邹倩, 石王伟, 黄利鸣, 等. 拓扑异构酶 II 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 肿瘤防治研究, 2003, 30(3): 196 - 197

(收稿: 2011 - 05 - 28)

(修回: 2011 - 06 - 13)

吡啶靛绿清除试验及终末期肝病模型对 肝衰竭患者早期预后的评估价值

谭 俊 叶俊茂 周 密 胡爱荣 阮 冰

摘 要 目的 探讨 ICG(吡啶靛绿)清除试验 (ICGR₁₅值) 与终末期肝病模型 (MELD 评分) 在肝衰竭患者预后评估中的相

基金项目: 吴阶平医学基金会肝病医学部肝功能评价方法研究基金资助项目 (LDWMF - PJ - 2011A003)

作者单位: 315016 宁波市第二医院/宁波市传染病医院

通讯作者: 胡爱荣, 电子信箱: har1224@126.com