

宫颈癌发生与血浆 RelB 和 PSMD10 蛋白质表达调控的关系及临床意义

玛依拉·卡米力江 哈丽丹·热依木 阿丽叶古丽·艾皮热木 伊力努尔·沙比提 Abulizi Abudula

摘要 目的 在前期蛋白质组学研究中,明确了一系列候选血浆差异蛋白指标,包括 RelB、PSMD10 等含量上调可能是宫颈癌的候选血浆蛋白质指标。本研究对上述指标进行定量验证,探讨宫颈癌发生及进展与血浆蛋白质表达调控的关系及临床意义。**方法** 收集维吾尔族女性宫颈病变患者外周血标本共 70 例,其中宫颈炎(cervicitis, CV)20 例,宫颈内上皮瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)Ⅱ~Ⅲ 20 例及宫颈鳞癌(cervical squamous cell carcinoma, CESC)30 例,采用酶联免疫法对血浆 RelB、PSMD10 表达水平进行定量鉴定。**结果** 宫颈病变进展伴有血浆 RelB、PSMD10 蛋白质含量梯度性上调,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。通过不同血浆蛋白质含量变化的相关性分析,发现血浆 PSMD10 与 RelB 呈低度正相关($r < 0.4, P < 0.01$)。对不同蛋白质指标的检测对宫颈癌及癌前病变的预测能力分析,发现血浆 RelB 蛋白质检测的敏感度、特异性和准确度较高(依次为 90.0%、50.0% 和 75.7%),对宫颈癌诊断可能有较高的预测价值。**结论** 宫颈癌发生与血浆蛋白质表达调控存在密切关系,血浆 RelB、PSMD10 含量上调可能是宫颈癌发生的早期预警的血浆检测指标,对其检测对宫颈癌诊断具有较高的预测价值。

关键词 宫颈癌 酶联免疫吸附试验 血浆蛋白标志物

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.05.008

Association of Cervical Cancer Carcinogenesis with the Regulation of Plasma RelB and PSMD10 Protein Expression and Clinical Outcome.

Mayila · Kamilijiang, Halidan · Reyimu, Aliyeguli · Aipire, et al. People's Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Xinjiang 830011, China

Abstract Objective In previous proteomics studies, we identified a series of candidate plasma protein markers including RelB and PSMD10. The up regulation of those protein levels may have a causal relationship with the development of cervical cancer. In this study, we made quantitative detection of those two candidate plasma protein markers and discuss the association of cervical cancer carcinogenesis with the regulation of plasma protein expression and clinical outcome. **Methods** We collected plasma samples of seventy cases from Uyghur women with cervicitis (CV), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) Ⅱ - Ⅲ and cervical squamous cell carcinoma (CESC). The content of plasma proteins RelB and PSMD10 was quantitatively determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The development of cervical lesion was accompanied with the gradual increase in RelB and PSMD10 with significant differences ($P < 0.05$). Correlation analysis of cervical cancer - specific protein indicators showed that PSMD10 and RelB had a low positive correlation exists at the level of protein expression with significant ($r < 0.4, P < 0.01$). Analysis the different protein indicators' predictive ability for cervical cancer and precancerous lesions in the sensitivity, specificity, and accuracy of detection showed that RelB had higher sensitivity, specificity and accuracy (90.0%, 50.0%, 75.7%) than PSMD10. **Conclusion** Cervical cancer carcinogenesis has a close association with the regulation of plasma protein. The up - regulated plasma level of RelB, PSMD10 was closely associated with cervical carcinogenesis. These findings provide evidence for these proteins as plasma - based biomarkers for early detection of the cervical carcinoma.

Key words Cervical carcinogenesis; Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA); Plasma biomarker

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,严重威胁

女性的身心健康。新疆南部地区维吾尔族女性宫颈癌发生率及病死率较高,因此被列为新疆少数民族高发肿瘤之一^[1~3]。早期发现是宫颈癌有效治疗的关键,而早期预警分子指标的筛选为肿瘤早期诊断提供依据。以往研究中,本研究团队通过维吾尔族女性宫颈癌血浆蛋白质学研究,发现多种可能与宫颈癌密切相关的候选血浆蛋白质指标^[4,5],其中包括 V - Rel

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360321)

作者单位:830011 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院(玛依拉·卡米力江、阿丽叶古丽·艾皮热木);新疆医科大学第二附属医院(哈丽丹·热依木);新疆医科大学附属肿瘤医院(伊力努尔·沙比提);新疆医科大学 2011 协同创新中心重点实验室(Abulizi Abudula)

通讯作者:Abulizi Abudula(德国籍),教授,博士生导师,电子邮箱:abulizi_a@126.com

网状内皮增生病毒癌基因同源物 B (V - Rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, RelB)、蛋白酶体 26S 亚基非 ATP 酶 10 (proteasome 26S subunit non - ATPase 10, PSMD10)。然而,宫颈癌及癌前病变与这些候选血浆蛋白质指标变化的定量关系尚待进一步验证。故本研究拟利用酶联免疫吸附法 (enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA),通过宫颈癌及癌前病变患者外周血标本的筛查分析,探讨宫颈病变进展与上述血浆蛋白质含量变化的定量关系,为建立宫颈癌早期预警指标体系提供客观依据。

材料与方法

1. 临床标本的采集:收集新疆医科大学第三附属肿瘤医院在 2012 年 1 月 ~ 2014 年 1 月期间,病理确诊的宫颈病变患者血浆标本共 70 例,其中有宫颈炎 (cervicitis) 20 例,宫颈内上皮瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) II ~ III 患者 20 例,宫颈鳞状细胞癌 (cervical squamous cell carcinoma, CSCC) 患者血浆标本 30 例。患者年龄 25 ~ 65 岁,平均年龄 53.00 ± 6.78 岁。所有子宫颈病变诊断均行细胞学、阴道镜或子宫颈活组织病理学检查确诊,且无子宫切除或骨盆放射治疗史以及无呼吸系统、心血管和代谢性疾病等其他严重疾病。采集治疗前 (肿瘤手术切除、放化疗等) 清晨空腹血液 2 ~ 3ml,经离心分离血浆 (3000r/min, 4℃, 10min),置于 - 80℃ 冰箱保存备用。标本采集经新疆医科大学伦理委员会通过,所有患者均签署知情同意书。

2. 主要试剂与仪器:人 RelB、PSMD10 特异的酶联免疫吸附试验检测试剂购自武汉优尔生科技股份有限公司,酶标仪 (Model 680) 为美国 Bio - Rad 公司产品。

3. 实验方法:采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法,遵照试剂盒说明书操作,首先稀释标准品,依次倍比稀释成 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 和 0.156ng/ml,标准品稀释液 (0ng/ml) 直接作为空白孔。设标准孔、待测样品孔、空白孔,之后将全血 (血浆) 分别加入 100μl,酶标板加上覆膜,37℃ 温育 2h。分别加入 A、B 液,重复洗版。最后加底物溶液 90μl,覆膜,37℃ 避光显色 10 ~ 15min。加终止溶液 50μl,终止反应。酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (A 值)。

4. 统计学方法:运用 SPSS 17.0 软件进行数据录入和统计分析,计量资料采用方差分析 (One - way

ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;两变量之间关系采用 Spearman 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $r < 0.4$ 为低度相关, $0.4 \sim 0.7$ 为中度相关, > 0.7 为高度相关。敏感度、特异性和准确度的计算公式为:敏感度 (%) = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) × 100% = $a / a + c \times 100\%$;特异性 (%) = 真阴性 / (真阴性 + 假阳性人数) × 100% = $d / b + d \times 100\%$;准确度 (%) = 真阳性 + 真阴性 / 总例数 × 100% = $a + d / N \times 100\%$ 。

结 果

1. 宫颈癌及癌前病变与患者体内血浆 RelB、PSMD10 含量变化存在密切关系:随着宫颈病变进展,血浆 RelB、PSMD10 含量逐渐上升 (表 1、图 1),以宫颈炎 (健康对照组) 作为对照组,与宫颈癌组比较,PSMD10 血浆含量差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。RelB 血浆含量变化在宫颈炎 (健康对照组) 宫颈癌与宫颈癌组之间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 宫颈病变患者血浆中 RelB、PSMD10 含量的 ELISA 法分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RelB (ng/ml)	PSMD10 (ng/ml)
宫颈炎组	20	0.685 ± 0.549	4.233 ± 1.802
CIN II ~ III 组	20	1.012 ± 0.582	5.252 ± 1.418
CSCC 组	30	1.142 ± 0.655 *	5.700 ± 2.026 **
F		3.470	3.995
P		0.037	0.023

与宫颈炎组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. 宫颈病变过程中血浆 RelB、PSMD10 含量变化的相关性分析:对不同蛋白之间进行相关性分析,发现 PSMD10 和 RelB 呈显著低度正相关 ($r = 0.364, P = 0.020$),说明 PSMD10 含量增加与 RelB 蛋白含量有一定的同步变化趋势。

3. 宫颈癌特异性候选血浆蛋白质指标的敏感度、特异性和准确度分析:PSMD10 和 RelB 两种血浆蛋白指标在敏感度、特异性、准确度 (%) 方面的检测比较结果发现,RelB 蛋白的敏感度、特异性和准确度较高,分别为 90.0%、50.0%、75.7%,而 PSMD10 蛋白的敏感度、特异性和准确度较低,分别为 63.3%、65.0%、61.4% (图 2,表 2)。

讨 论

近年来,蛋白质组学技术以前所未有的速度进展,为人类肿瘤的早期预警和分子诊断提供了新的机遇,尤其是为肿瘤标志物的发现提供巨大前景^[6]。

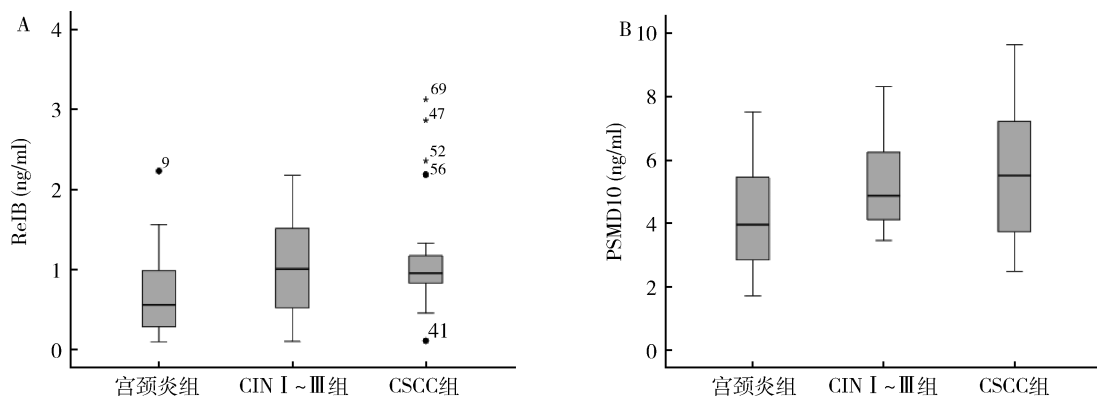


图1 不同宫颈病变组患者的 RelB、PSMD10 表达含量动态变化的箱式图分析

A. RelB; B. PSMD10

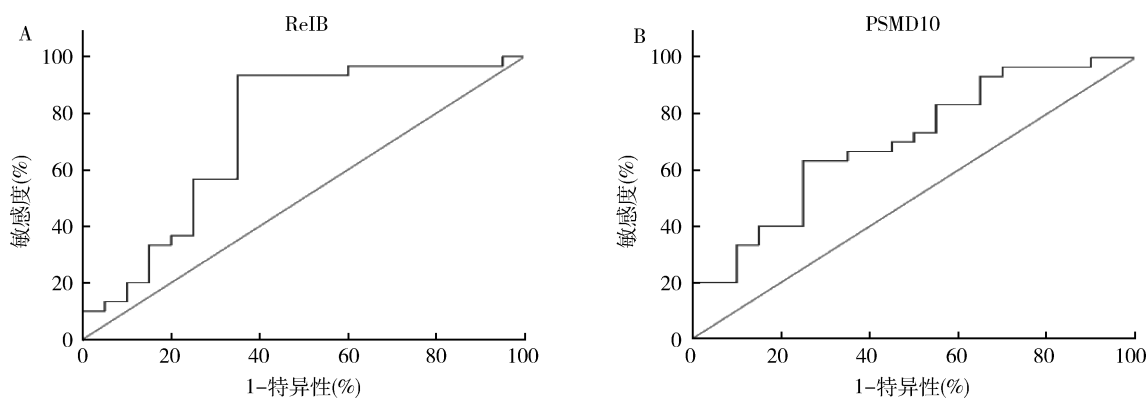


图2 RelB、PSMD10 候选血浆蛋白质指标的 ROC 曲线图

A. RelB; B. PSMD10

表2 两种血浆蛋白质含量检测对宫颈癌预警的
敏感度、特异性、准确度分析 (%)

蛋白	敏感度	特异性	准确度
RelB	93.3	65.0	82.0
PSMD10	63.3	75.0	68.0

前期研究中,我们以宫颈癌、癌前病变(CIN II/III)患者为研究对象,通过基于二维液相色谱及质谱技术的血浆蛋白质组学研究,发现宫颈癌特异血浆蛋白质103种,CIN特异性蛋白质31种。以此为基础,经生物信息学分析,明确14种宫颈癌特异差异表达的候选血浆蛋白质指标,而仅有2种候选血浆蛋白质指标与CIN II/III相关^[4,5,7-9]。本研究选择宫颈癌特异的候选血浆蛋白质指标 RelB、PSMD10,利用70例维吾尔族宫颈病变患者血浆标本,对上述指标的表达水平进行了ELISA方法定量验证,发现宫颈病变进展伴有血浆 RelB 和 PSMD10 两种含量逐渐增高,且在慢性宫颈炎组与宫颈癌组中的总体变化趋势具有统计学意义。

转录因子 RelB 是 NF- κ B 家族中的一个重要成员,参与多种生物学过程,如炎症反应、免疫应答、细胞生存和肿瘤发生^[8]。近期研究发现一种 IKK α 介导的 NF- κ B 激活通路,该通路信号转导主要控制 RelB 活性^[9]。据现有研究,前列腺癌和非小细胞肺癌组织内 RelB 表达增强,而抑制 RelB 表达增加肿瘤对放疗的敏感度^[10-12]。前期笔者对宫颈癌患者与健康对照组织进行转录组学研究,明确肿瘤组织中 RelB 基因的表达水平上调,与正常对照组比较差异有统计学意义^[13],对于宫颈癌预测预警和早期诊断有重要意义。但是,宫颈病变进展与血浆中 RelB 表达含量的关系尚未见研究报道。

本研究中伴随着宫颈病变进展的加重,候选血浆蛋白 RelB 表达含量逐渐升高。以慢性宫颈炎组作为对照,分别与 CIN II~III 组、宫颈癌组进行比较,慢性宫颈炎与宫颈癌组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),结合本研究结果和以往研究报道,可以推测宫颈癌发生与体内血浆 RelB 水平上升及肿瘤组织内表

达水平上调存在密切关系,此为建立双重检测肿瘤组织和血浆指标的宫颈癌早期诊断提供客观依据。

PSMD10 是在肝癌中发现的一个新的基因,定位于人类 Xq22.3^[14]。有研究报道,PSMD10 在正常消化系统器官组织中呈阴性或者弱阳性表达,而在原发性肝细胞癌、食管鳞状细胞癌、胃癌、结直肠癌中呈高表达,说明其可能参与了肿瘤的发生、发展过程^[15~17]。但是 PSMD10 与宫颈病变进展的关系研究尚未见报道。在本研究中候选蛋白 PSMD10 在宫颈癌患者血浆表达含量明显上升,结合以往研究报道 PSMD10 在原发性肝细胞癌、食管鳞状细胞癌、胃癌、结直肠癌中呈高表达,可以推测其可能也参与了宫颈癌的发生过程,并对宫颈癌肿瘤细胞的分化、转移具有一定的促进作用。

进一步通过对在正常对照组、CIN 组和宫颈鳞癌组间蛋白表达含量存在差异的候选血浆标志蛋白 RelB、PSMD10 在敏感度、特异性、准确度方面的检测比较发现,RelB 蛋白检测敏感度、特异性、准确度较高,分别为 93.3%、65.0%、82.0%,对宫颈癌诊断和鉴别有较大的临床意义和价值。对上述两种不同血浆蛋白质指标的相关性分析,发现 PSMD10 与 RelB 蛋白呈显著低度正相关($r < 0.4$, $P < 0.01$),提示 PSMD10 含量增加可能与 RelB 蛋白含量的增加有关。

综上所述,本研究结果提示,RelB 和 PSMD10 在宫颈病变发生、发展中起重要作用,其可能是宫颈病变进展中的重要预警蛋白,有助于宫颈病变早期候选生物标志物的发现,为建立宫颈癌特异性血浆诊断指标打下基础。

参考文献

- 1 刘开江,刘继文,李晓荣,等.新疆维汉妇女宫颈癌发病危险因素的流行病学研究[J].新疆医科大学学报,2008,31(10):1335-1338
- 2 拉莱·苏祖克,彭玉华,周康,等.新疆不同民族宫颈癌发病趋势分析[J].新疆医科大学学报,2006,29(7):569-571
- 3 张国庆,刘开江,赖小军,等.新医大附属肿瘤医院 1989~2002 年住院病人恶性肿瘤分布[J].新疆医科大学学报,2003,26(4):393-395
- 4 Guo X, Abliz G, Reyimu H, *et al.* The association of a distinct plasma proteomic profile with the cervical high-grade squamous intraepithelial lesion of Uyghur women: a 2D liquid-phase chromatography/

- mass spectrometry study [J]. *Biomarkers*, 2012, 17(4):352-361
- 5 Guo X, Hao Y, Kamilijiang M, *et al.* Potential predictive plasma biomarkers for cervical cancer by 2-dige proteomics and ingenuity pathway analysis [J]. *Tumor Biol*, 2015,36(3):1711-1720
- 6 Aiello D, Casadonte F, Terracciano R, *et al.* Targeted proteomic approach in prostatic tissue: a panel of potential biomarkers for cancer detection[J]. *Oncoscience*, 2016, 3(7-8):220-241
- 7 哈丽丹·热依木,郭霞,刘开江,等. apoA I 和 apoE 水平在维吾尔族妇女子宫颈病变进展中的变化及其意义[J].实用肿瘤杂志,2013,28(2):143-146
- 8 Vogel CF, Li W, Wu D, *et al.* Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF- κ B subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 over expression [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 12(1):78-86
- 9 Cildir G, Low KC, Tergaonkar V. Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease[J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(5):414-429
- 10 Xu Y, Jossan S, Fang F, *et al.* RelB enhances prostate cancer growth: implications for the role of the nuclear factor- κ B alternative pathway in tumorigenicity[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8):3267-3271
- 11 Giopanou I, Lilis I, Papaleonidopoulos V, *et al.* Comprehensive evaluation of nuclear factor- κ B expression patterns in non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One*,2015,10(7):1-20
- 12 Zhu HC, Qiu T, Dan C, *et al.* Blockage of RelB expression by gene silencing enhances the radio sensitivity of androgen independent prostate cancer cells[J]. *Mol Med Rep*,2015, 11(2):1167-1173
- 13 迪拉热·力迪甫,努尔满古力·肉孜,热孜亚·肉孜阿洪,等.宫颈癌发生与 ApoE、CLU 和 RelB 表达调控的关系及意义[J].医学分子生物学杂志,2016,13(3):143-148
- 14 Hori T, Kato S, Sseki M, DeMartino GN, *et al.* CDNA cloning and functional analysis of p28 (Nas6p) and p40.5 (Nas7p), two novel regulatory subunits of the 26S proteasome [J]. *Gene*, 1998, 216:113-122
- 15 Dawson S, Higashitsuji H, Wilkinson AJ, *et al.* Gankyrin: a new oncoprotein and regulator of pRb and p53[J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16:229-233
- 16 Liu Y, Xu J, Jiang M, *et al.* Association between functional PSMD10 Rs111638916 variant regulated by MiR-505 and gastric cancer risk in a Chinese population [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015,37(3):1010-1017
- 17 Luo T, Fu J, Xu A, *et al.* PSMD10/gankyrin induces autophagy to promote tumor progression through cytoplasmic interaction with ATG7 and nuclear transactivation of ATG7 expression [J]. *Autophagy*, 2016, 12(8):1355-1371

(收稿日期:2016-10-12)

(修回日期:2016-10-18)