

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.12.1317

· 论 著 ·

Bcl2 转录抑制因子 1、E-钙黏蛋白在宫颈鳞状细胞癌不同区域的表达及两者与 P16^{INK4a} 表达的关系

尚立娜¹, 周彰映¹, 张 城¹, 龚川友¹, 田世馨¹, 安利锋¹, 李晓琴², 赵 晋^{1*}

1. 西北民族大学医学院形态学教研室, 兰州 730030

2. 甘肃省肿瘤医院, 甘肃省医学科学研究院病理科, 兰州 730030

[摘要] **目的** 检测宫颈鳞状细胞癌肿瘤出芽区及肿瘤中央区失巢凋亡因子 Bcl2 转录抑制因子 1 (Bit1)、上皮-间质转化 (EMT) 标志物 E-钙黏蛋白及 P16^{INK4a} 的表达情况, 探讨 Bit1、E-钙黏蛋白在宫颈癌获得高侵袭力过程中的意义及二者与 P16^{INK4a} 表达的关系。**方法** 收集甘肃省肿瘤医院病理科 2014—2018 年宫颈鳞状细胞癌石蜡包埋标本 77 例。采用免疫组织化学法检测宫颈鳞状细胞癌肿瘤出芽区及中央区 Bit1、E-钙黏蛋白、P16^{INK4a} 的表达情况。以肿瘤中央区及出芽区各蛋白质表达评分的中位数作为分界点, 将标本分为高表达组和低表达组, 分析在不同 P16^{INK4a} 表达情况下 Bit1 及 E-钙黏蛋白的表达差异及二者与患者临床病理特征的关系, 并进一步分析在肿瘤中央区及出芽区 Bit1 与 E-钙黏蛋白的相关关系。统计学分析采用 χ^2 检验或连续校正 χ^2 检验和 Spearman 等级相关分析。**结果** 77 例宫颈鳞状细胞癌标本中, 肿瘤中央区 P16^{INK4a}、E-钙黏蛋白、Bit1 高表达率分别为 32.5% (25/77)、67.5% (52/77)、63.6% (49/77), 而在肿瘤出芽区分别为 67.5% (52/77)、33.8% (26/77)、37.7% (29/77), 差异有统计学意义 ($\chi^2=18.935$ 、17.561、10.391, P 均 <0.01)。无论在肿瘤出芽区还是中央区, P16^{INK4a} 高表达组与 P16^{INK4a} 低表达组 Bit1 及 E-钙黏蛋白的表达差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。肿瘤中央区 Bit1 低表达与脉管内癌栓及淋巴结转移有关 ($\chi^2=5.053$ 、4.400, P 均 <0.05), 肿瘤出芽区 E-钙黏蛋白和 Bit1 低表达均与淋巴结转移有关 ($\chi^2=5.580$ 、7.573, P 均 <0.05)。Spearman 等级相关分析显示, 在肿瘤中央区及肿瘤出芽区 E-钙黏蛋白与 Bit1 表达均呈正相关 ($r=0.287$, $P=0.011$; $r=0.236$, $P=0.039$)。**结论** 宫颈癌侵袭力的增高与 Bit1 及 E-钙黏蛋白表达降低及 P16^{INK4a} 表达增高有关, 宫颈癌细胞可能通过抑制 Bit1 获得失巢凋亡抗性并影响 EMT 的发生从而获得更高的侵袭能力, 但 P16^{INK4a} 并未参与此过程。

[关键词] 宫颈肿瘤; 鳞状细胞癌; 肿瘤出芽; 失巢凋亡; Bcl2 转录抑制因子 1; E-钙黏蛋白; 上皮-间质转化; P16^{INK4a}

[中图分类号] R 737.33

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2019)12-1317-08

Expression of Bcl2 inhibitor of transcription 1 and E-cadherin in different regions of cervical squamous cell carcinoma and their relationship with expression of P16^{INK4a}

SHANG Li-na¹, ZHOU Zhang-ying¹, ZHANG Cheng¹, GONG Chuan-you¹, TIAN Shi-xin¹, AN Li-feng¹, LI Xiao-qin², ZHAO Jin^{1*}

1. Department of Morphology, Medical College of Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2. Department of Pathology, Gansu Provincial Cancer Hospital, Gansu Provincial Academic Institute for Medical Research, Lanzhou 730030, Gansu, China

[Abstract] **Objective** To determine the expression of anoikis factor Bcl2 inhibitor of transcription 1 (Bit1), epithelial-mesenchymal transformation (EMT) marker E-cadherin and P16^{INK4a} in tumor budding and central tumor of cervical squamous cell carcinoma, and to explore the significance of Bit1 and E-cadherin expression in the process of obtaining high invasiveness of cervical cancer and their relationship with P16^{INK4a} expression. **Methods** A total of 77 paraffin-embedded specimens of cervical squamous cell carcinoma were collected from the Department of Pathology of Gansu Provincial Cancer Hospital between 2014 and 2018. The expression levels of Bit1, E-cadherin and P16^{INK4a} in tumor budding and central tumor of these specimens were detected by immunohistochemistry. Taking the median scores of protein expression in the central

[收稿日期] 2019-05-23 **[接受日期]** 2019-09-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81260442), 中央高校基本科研业务费专项资金(31920150044). Supported by National Natural Science Foundation of China (81260442) and Fundamental Science Research Fund for Central Universities (31920150044).

[作者简介] 尚立娜, 硕士, 讲师. E-mail: shln572@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0931-2938152, E-mail: yxzj@xbmu.edu.cn

tumor and tumor budding as dividing points, the specimens were divided into high expression group and low expression group. The differences of Bit1 and E-cadherin expression under different p16^{INK4a} expression and their relationship with the clinicopathological characteristics of the patients were analyzed. The correlation between Bit1 and E-cadherin expression in central tumor and tumor budding was explored. The χ^2 test, continuous correction χ^2 test and Spearman rank correlation analysis were used for statistical analysis. **Results** In 77 cases of paraffin-embedded specimens of cervical squamous cell carcinoma, the high expression rates of P16^{INK4a}, E-cadherin and Bit1 in central tumor and tumor budding were 32.5% (25/77), 67.5% (52/77) and 63.6% (49/77), and 67.5% (52/77), 33.8% (26/77) and 37.7% (29/77), respectively, and the differences were significant ($\chi^2=18.935, 17.561$ and 10.391 , all $P<0.01$). Both in central tumor and in tumor budding, there were no significant differences in Bit1 or E-cadherin expression between high and low P16^{INK4a} expression regions (all $P>0.05$). In central tumor, the low expression of Bit-1 was related to lymphovascular invasion and lymph node metastasis ($\chi^2=5.053$ and 4.400 , both $P<0.05$). In tumor budding, the low expression levels of E-cadherin and Bit-1 were both associated with lymph node metastasis ($\chi^2=5.580$ and 7.573 , both $P<0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that there was positive correlation between E-cadherin and Bit1 expression in central tumor and tumor budding ($r=0.287, P=0.011; r=0.236, P=0.039$). **Conclusion** The increased invasiveness of cervical cancer may be related to the decreased expression of Bit1 and E-cadherin and the increased expression of P16^{INK4a}. Cervical cancer cells may acquire high invasiveness by inhibiting Bit1 to obtain anoikis resistance and affecting the EMT, but P16^{INK4a} is not involved in this process.

[Key words] uterine cervical neoplasms; squamous cell carcinoma; tumor budding; anoikis; Bcl2 inhibitor of transcription 1; E-cadherin; epithelial-mesenchymal transformation; P16^{INK4a}

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(12): 1317-1324]

失巢凋亡是细胞与细胞外基质及其他细胞失去接触而发生的一种不依赖半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 途径的特殊细胞凋亡形式。癌细胞具有的脱离细胞外基质而不发生凋亡的能力被称为失巢凋亡抗性^[1], 这种特性是肿瘤侵袭和转移的关键因素。Bcl2 转录抑制因子 1 (Bcl2 inhibitor of transcription 1, Bit1) 是失巢凋亡的诱导因子, 癌细胞可能通过绕过 Bit1 途径获得失巢凋亡抗性, 从而获得锚定独立性和恶性转化^[2]。除了在细胞凋亡中的作用外, Bit1 还对肿瘤细胞的上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 发挥抑制作用, Bit1 表达增高可以促进间质表型的恶性肿瘤细胞向上皮细胞转变, 并上调 E-钙黏蛋白表达^[3]。但是 Bit1 在宫颈癌中的表达及其与 EMT 的关系鲜见报道。目前认为, 几乎所有宫颈癌都与人类乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染有关, 而 P16^{INK4a} 的表达被认为是 HPV 感染的标志^[4-7], 那么在不同的 P16^{INK4a} 表达情况下, Bit1 及 EMT 标志蛋白 E-钙黏蛋白的表达是否不同呢? 目前还不清楚。

肿瘤出芽是肿瘤侵袭过程的组织病理学标志, 存在于肿瘤浸润前沿或癌巢周围, 其反映了具有浸润和转移潜力的肿瘤细胞亚群侵袭的动态过程^[8]。本研究选取宫颈鳞状细胞癌标本为研究对象, 采用

免疫组织化学法检测肿瘤出芽区 Bit1、E-钙黏蛋白及 P16^{INK4a} 的表达情况, 并以肿瘤中央区为对照探讨宫颈鳞状细胞癌在浸润和转移过程中获得高侵袭能力的可能机制。

1 资料和方法

1.1 标本来源 收集甘肃省肿瘤医院病理科 2014—2018 年宫颈鳞状细胞癌石蜡包埋标本 77 例, 其中角化型鳞状细胞癌 40 例, 非角化型鳞状细胞癌 37 例。患者年龄为 25~67 岁, 中位年龄为 48 岁; 国际妇产科协会 (Federation International of Gynecology and Obstetrics, FIGO) 分期 I 期 38 例, II~III 期 39 例。标本收集时排除宫颈癌根治性手术前后接受过放射治疗与化学治疗等非手术治疗的患者, 以及肿瘤浸润前沿及癌巢周围不存在肿瘤出芽的患者, 所有标本的 H-E 染色切片由 2 位经验丰富的病理科医师判断并达成一致诊断意见。本研究通过甘肃省肿瘤医院伦理委员会审批。

1.2 试剂及方法 所有标本经 10% 甲醛溶液常规固定, 石蜡包埋, 制成 4 μm 厚切片, 常规行 H-E 染色及免疫组织化学染色 (MaxVisionTM 法)。鼠抗人单克隆抗体 E-钙黏蛋白 (货号 MAB-0589, 稀释比例 1:100)、鼠抗人单克隆抗体 P16^{INK4a} (MAB-0673, 1:200) 及免疫组织化学

MaxVision™ 试剂盒 (KIT-5920) 均购自福州迈新生物技术开发有限公司, Bit1 浓缩型兔抗人 Bit1 单克隆抗体 (ab62554, 1 : 100) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 结果判定 免疫组织化学染色结果由 2 位经验丰富的病理科医师采用双盲法独立阅片后做出判断。P16^{INK4a} 表达以细胞质及细胞核、Bit1 表达以细胞质、E-钙黏蛋白表达以细胞膜呈黄色或黄褐色颗粒为阳性细胞。判读标准: (1) 根据显色细胞的比例评分。0 分为显色细胞占比为 0, 1 分为显色细胞占比 ≤ 10%, 2 分为显色细胞占 11%~25%, 3 分为显色细胞占 26%~50%, 4 分为显色细胞占 51%~75%, 5 分为显色细胞占比 ≥ 76%。(2) 根据细胞染色强度评分。0 分为癌细胞无显色, 1 分为浅黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为黄褐色。2 种记分方法得分相乘结果为最终免疫组织化学评分结果, 评分 < 1 分定义为阴性, ≥ 1 分但 < 5 分为+, ≥ 5 分但 < 10 分为++, ≥ 10 分为+++。参考 Rodrigues 等^[9]的判定方法, 将每个肿瘤灶分为 2 个区域: 肿瘤中央区和肿瘤出芽区。肿瘤中央区, 定义为最大的扩展肿瘤区域, 随机选择 3 个区域进行评估, 每个区域计数 100 个细胞, 计算其中阳性细胞数所占的百分比, 取 3 个区域的算术平均值为显色细胞的比例评分, 与染色强度评分相乘后得出最终评分结果。肿瘤出芽区, 即肿瘤侵袭边缘出现的单个肿瘤细胞或不超过 5 个肿瘤细胞的瘤巢, 其广泛地渗入邻近的基质。结合宫颈癌出芽的具体情况, 在 Rodrigues 等^[9]方法基础上适当改进肿瘤出芽区的确定及评判方法: 所有包括宫颈癌成分的切片置于 100 倍镜下整体扫描, 选取出芽最丰富的 5 个区域; 切换至 400 倍下对每个肿瘤芽中的细胞进行评估, 计算阳性细胞占总细胞数的百分比, 如果存在肿瘤芽的区域少于 5 个, 则对每个存在肿瘤芽的区域进行评估, 最终评分方法同肿瘤中央区。以肿

瘤中央区及出芽区各蛋白质表达评分的中位数作为分界点将标本分为高表达组和低表达组: P16^{INK4a} 表达评分值 ≥ 9.2 为 P16^{INK4a} 高表达, < 9.2 为低表达; E-钙黏蛋白表达评分值 ≥ 4.2 为 E-钙黏蛋白高表达, < 4.2 为低表达; Bit1 表达评分值 ≥ 4.6 为 Bit1 高表达, < 4.6 为低表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验或连续校正 χ^2 检验, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 P16^{INK4a} 在宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区和出芽区的表达情况 见表 1、图 1, 77 例宫颈鳞状细胞癌标本中, 肿瘤中央区 P16^{INK4a} 高表达者占 32.5% (25/77)、低表达者占 67.5% (52/77), 肿瘤出芽区高表达者占 67.5% (52/77)、低表达者占 32.5% (25/77), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 18.935$, $P < 0.01$)。

2.2 E-钙黏蛋白在肿瘤中央区和出芽区的表达情况及与临床病理特征之间的关系 见表 1、图 2, 77 例宫颈鳞状细胞癌标本中, 肿瘤中央区 E-钙黏蛋白高表达及低表达率分别为 67.5% (52/77)、32.5% (25/77), 肿瘤出芽区分别为 33.8% (26/77)、66.2% (51/77), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 17.561$, $P < 0.01$)。见表 2, 进一步分析发现, 无论是在肿瘤中央区还是出芽区, P16^{INK4a} 高表达组与 P16^{INK4a} 低表达组 E-钙黏蛋白的表达差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见表 3, 分析 E-钙黏蛋白表达水平与临床病理特征之间的关系, 结果显示肿瘤出芽区 E-钙黏蛋白的表达与淋巴结转移有关 ($\chi^2 = 5.580$, $P = 0.018$)。

表 1 P16^{INK4a}、E-钙黏蛋白及 Bit1 在宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区与出芽区的表达

Tab 1 Expression of P16^{INK4a}, E-cadherin and Bit1 in central tumor and tumor budding of cervical squamous cell carcinoma

$N = 77, n$

Region	P16 ^{INK4a}		χ^2 value	P value	E-cadherin		χ^2 value	P value	Bit1		χ^2 value	P value
	High	Low			High	Low			High	Low		
Central tumor	25	52	18.935	<0.01	52	25	17.561	<0.01	49	28	10.391	<0.01
Tumor budding	52	25			26	51			29	48		

Bit1: Bcl2 inhibitor of transcription 1

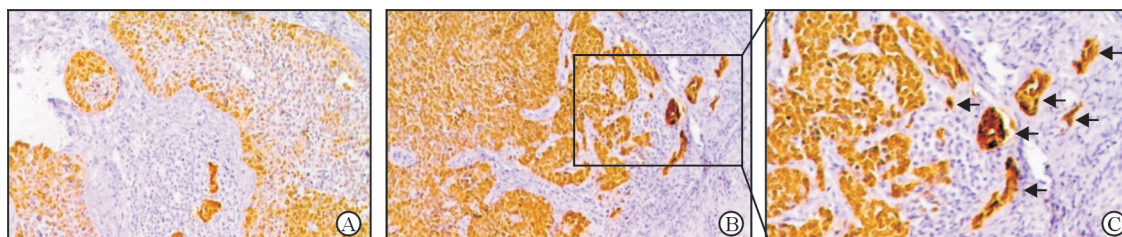


图1 P16^{INK4a}在宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区及出芽区的表达

Fig 1 Expression of P16^{INK4a} in central tumor and tumor budding of cervical squamous cell carcinoma

Positive immunostaining for P16^{INK4a} in central tumor (A) and tumor budding (B, C). Arrows indicate tumor buds. MaxVision staining. Original magnification: ×100 (A, B), ×400 (C)

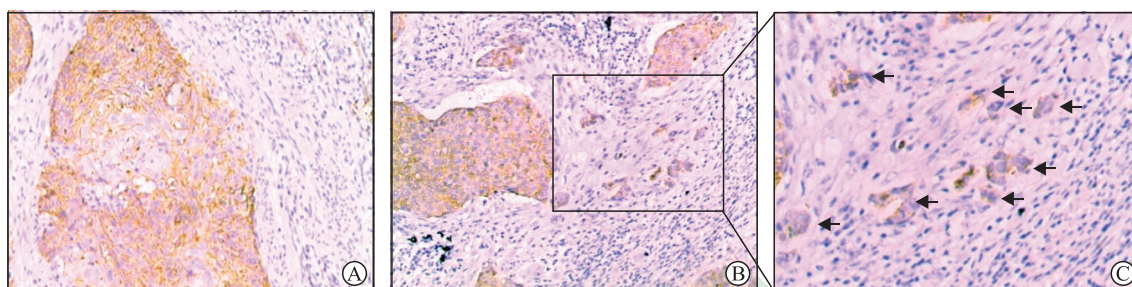


图2 E-钙黏蛋白在宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区及出芽区的表达

Fig 2 Expression of E-cadherin in central tumor and tumor budding of cervical squamous cell carcinoma

Positive immunostaining for E-cadherin at central tumor (A) and tumor budding (B, C). Arrows indicate tumor buds. MaxVision staining. Original magnification: ×100 (A, B), ×400 (C)

表2 宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区 and 出芽区不同 P16^{INK4a} 表达情况下 E-钙黏蛋白及 Bit1 表达的差异

Tab 2 Difference of E-cadherin and Bit1 expression under different expression of P16^{INK4a} in central tumor and tumor budding of cervical squamous cell carcinoma

Group	N	E-cadherin		χ^2 value	P value	Bit1		χ^2 value	P value	n
		High	Low			High	Low			
Central tumor				0.004	0.952			0.212	0.646	
P16 ^{INK4a} -high	25	17	8			15	10			
P16 ^{INK4a} -low	52	35	17			34	18			
Tumor budding				1.579	0.209			0.044	0.835	
P16 ^{INK4a} -high	52	20	32			20	32			
P16 ^{INK4a} -low	25	6	19			9	16			

Bit1: Bcl2 inhibitor of transcription 1

2.3 Bit1 在肿瘤中央区 and 出芽区的表达情况及与临床病理特征之间的关系 见表1、图3, 77例宫颈鳞状细胞癌标本中, 肿瘤中央区 Bit1 高表达及低表达率分别为 63.6% (49/77)、36.4% (28/77), 肿瘤出芽区分别为 37.7% (29/77)、62.3% (48/77), 差异有统计学意义 ($\chi^2=10.391, P<0.01$)。见表2, 进一步分析发现, 无论是在肿瘤中央区还是出芽区, P16^{INK4a} 高表达组与 P16^{INK4a} 低表达组 Bit1 的表达差异均无统计学意义 (P 均>0.05)。见表

4, 分析 Bit1 表达水平与患者临床病理特征之间的关系, 结果显示肿瘤中央区 Bit1 的表达水平与脉管内癌栓及淋巴结转移有关 ($\chi^2=5.053、4.400, P=0.025、0.036$), 肿瘤和出芽区其表达水平与淋巴结转移有关 ($\chi^2=7.573, P=0.006$)。

2.4 肿瘤中央区 and 出芽区 E-钙黏蛋白与 Bit1 表达的相关性分析 见表5, 无论在肿瘤中央区还是在肿瘤出芽区, E-钙黏蛋白与 Bit1 表达均呈正相关 ($r=0.287, P=0.011; r=0.236, P=0.039$)。

表 3 宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区及出芽区 E-钙黏蛋白表达与患者临床病理特征的关系

Tab 3 Relationship between E-cadherin expression in central tumor and tumor budding and clinicopathological characteristics of cervical squamous cell carcinoma patients

Characteristic	N	Central tumor		χ^2 value	P value	Tumor budding		χ^2 value	P value
		High	Low			High	Low		
Age (year)				1.680	0.195			0.779	0.377
< 50	38	23	15			11	27		
\geq 50	39	29	10			15	24		
Pathological type				0.000	0.995			0.528	0.467
Keratin type	40	27	13			12	28		
Non-keratinizing	37	25	12			14	23		
Infiltration depth				1.733	0.188			2.380	0.123
\leq 1/2 muscular layer	16	13	3			8	8		
$>$ 1/2 muscular layer	61	39	22			18	43		
FIGO stage				0.027	0.869			0.160	0.689
I	38	26	12			12	26		
II - III	39	26	13			14	25		
Tumor differentiation				0.006	0.936			0.324	0.569
Well and medium	62	42	20			20	42		
Poor	15	10	5			6	9		
Lymphovascular invasion				0.009	0.924			0.107	0.744
Yes	19	13	6			7	12		
No	58	39	19			19	39		
Perineural invasion				0.000	1.000			0.120	0.729
Yes	9	6	3			4	5		
No	68	46	22			22	46		
Lymph node metastasis				2.369	0.124			5.580	0.018
Yes	22	12	10			3	19		
No	55	40	15			23	32		
Pausimonia				0.550	0.458			0.013	0.910
Yes	26	19	7			9	17		
No	51	33	18			17	34		

FIGO: Federation International of Gynecology and Obstetrics

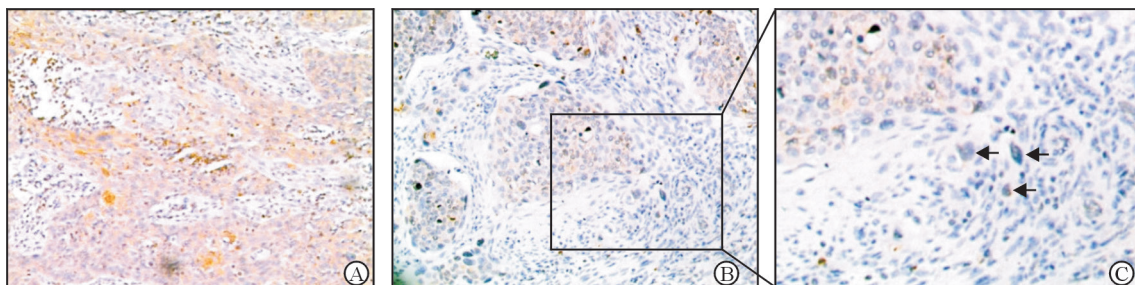


图 3 Bit1 在宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区及出芽区的表达

Fig 3 Expression of Bit1 at central tumor and tumor budding of cervical squamous cell carcinoma

Positive immunostaining for Bit1 in central tumor (A) and tumor budding (B, C). Arrows indicate tumor buds. Bit1: Bcl2 inhibitor of transcription 1. MaxVision staining. Original magnification: $\times 100$ (A, B), $\times 400$ (C)

表4 宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区及出芽区 Bit1 表达与临床病理特征的关系

Tab 4 Relationship between Bit1 expression in central tumor and tumor budding and clinicopathological characteristics of cervical squamous cell carcinoma patients

Characteristic	N	Central tumor		χ^2 value	P value	Tumor budding		χ^2 value	P value
		High	Low			High	Low		
Age (year)				0.314	0.575			0.381	0.537
< 50	38	23	15			13	25		
≥ 50	39	26	13			16	23		
Pathological type				1.355	0.244			0.945	0.331
Keratin type	40	23	17			13	27		
Non-keratinizing	37	26	11			16	21		
Infiltration depth				0.476	0.490			1.309	0.252
≤ 1/2 muscular layer	16	9	7			8	8		
> 1/2 muscular layer	61	40	21			21	40		
FIGO stage				1.783	0.182			0.021	0.883
I	38	27	11			14	24		
II - III	39	22	17			15	24		
Tumor differentiation				0.757	0.384			1.949	0.163
Well and medium	62	38	24			21	41		
Poor	15	11	4			8	7		
Lymphovascular invasion				5.053	0.025			0.398	0.528
Yes	19	8	11			6	13		
No	58	41	17			23	35		
Perineural invasion				0.325	0.569			0.007	0.936
Yes	9	7	2			4	5		
No	68	42	26			25	43		
Lymph node metastasis				4.400	0.036			7.573	0.006
Yes	22	10	12			3	19		
No	55	39	16			26	29		
Pausimonia				0.531	0.466			1.206	0.272
Yes	26	18	8			12	14		
No	51	31	20			17	34		

Bit1: Bcl2 inhibitor of transcription 1; FIGO: Federation International of Gynecology and Obstetrics

表5 宫颈鳞状细胞癌肿瘤中央区及出芽区 E-钙黏蛋白与 Bit1 表达的 Spearman 等级相关分析

Tab 5 Spearman rank correlation analysis between E-cadherin and Bit1 expression in central tumor and tumor budding of cervical squamous cell carcinoma

Region	Protein					r value	P value
		-	+	++	+++		
Central tumor	E-cadherin	1	28	41	7	0.287	0.011
	Bit1	4	29	40	4		
Tumor budding	E-cadherin	22	33	22	0	0.236	0.039
	Bit1	13	38	22	4		

Bit1: Bcl2 inhibitor of transcription 1

3 讨论

研究显示在大肠癌肿瘤出芽区中 E-钙黏蛋白表达下调,同时伴随着 β-连环蛋白 (β-catenin) 的

核移位、细胞极性丧失及表现为成纤维细胞的形态特征^[10]。Kohler 等^[11]将 E-钙黏蛋白表达缺失作为 EMT 的生物学标志,发现 E-钙黏蛋白在胰腺导管腺癌的肿瘤出芽区表达降低,在大肠癌中目前已知

的 EMT 诱导因子如转录因子锌指 E 盒结合同源盒蛋白 (zinc-finger E-box binding homeobox protein, ZEB) 1 和 ZEB2 的表达也有所上调^[12]。最近 Meyer 等^[13]研究发现大肠癌的肿瘤芽存在既表达上皮表型又表达间质表型的现象, 并提出肿瘤芽代表着发生部分 EMT 的细胞亚群。Grigore 等^[14]也提出肿瘤出芽是 EMT 的形态学表现的观点。本研究结果显示, 与肿瘤中央区相比, 肿瘤出芽区 E-钙黏蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 说明宫颈鳞状细胞癌肿瘤出芽区细胞同样具有向间质细胞转化的特征, 提示宫颈癌的侵袭能力增加可能与 EMT 有关。进一步分析 E-钙黏蛋白表达与患者临床病理特征的关系, 肿瘤出芽区 E-钙黏蛋白的表达与淋巴结转移有关, 而在肿瘤中央区则无此相关性, 提示肿瘤出芽区 E-钙黏蛋白表达降低的患者预后更差, 肿瘤出芽区 E-钙黏蛋白的表达情况可能是预测宫颈癌预后的一项较好的指标。

获得抗失巢凋亡能力是肿瘤侵袭和转移的关键因素。研究发现 Bit1 可以通过抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭促进失巢凋亡^[15], 因此恶性肿瘤细胞可能通过下调 Bit1 实现抗失巢凋亡, 如在非小细胞肺癌^[2]和乳腺癌^[16]的晚期阶段 Bit1 均被选择性下调, 而 Bit1 表达下调后非小细胞肺癌细胞的失巢凋亡抗性和不依赖贴壁的生长能力增强^[2]。在卵巢癌中雌激素也可通过减少 Bit1 释放影响卵巢癌细胞系 Caov-3 的失巢凋亡^[17]。本研究结果显示, 宫颈癌肿瘤出芽区 Bit1 的表达低于肿瘤中央区 ($P < 0.01$), 提示宫颈癌肿瘤出芽区细胞亚群的高侵袭性可能与 Bit1 的表达降低有关, 推测宫颈癌细胞可能通过抑制 Bit1 的表达获得失巢凋亡抗性从而具有了更高的侵袭能力。进一步分析 Bit1 表达与患者临床病理特征的关系发现, 肿瘤中央区 Bit1 低表达与脉管内癌栓有关 ($P < 0.05$), 并且无论是肿瘤中央区还是肿瘤出芽区 Bit1 低表达均与患者的淋巴结转移有关, 说明 Bit1 表达降低的患者更容易发生局部侵犯和转移, 这一结果也与前述抑制 Bit1 表达增强宫颈癌侵袭能力的推测相吻合。

研究发现, Bit1 除了在细胞凋亡中发挥作用外, 还对非小细胞肺癌中的 EMT 发挥抑制作用^[3]。抑制内源性 Bit1 表达可以诱导细胞间充质表型, 包括增强的成纤维细胞样形态和迁移潜能, 伴随上皮标志物 E-钙黏蛋白表达的抑制。增加外源性 Bit1

表达可促进肿瘤向上皮细胞转变, 异位 Bit1 被证明可有效阻断体内非小细胞肺癌细胞的转移潜能, Bit1 诱导的 E-钙黏蛋白表达是 Bit1 依赖的失巢凋亡和 EMT 抑制的必要分子事件^[3,18]。在胰腺癌中, EMT 也被证明可能参与 Bit1 依赖的失巢凋亡的整个调节过程^[15]。那么在宫颈癌中 Bit1 的表达是否与 EMT 标志物 E-钙黏蛋白的表达有关呢? 本研究结果显示, 在肿瘤中央区和肿瘤出芽区 E-钙黏蛋白与 Bit1 表达均呈正相关 ($r = 0.287, P = 0.011$; $r = 0.236, P = 0.039$), 提示 Bit1 表达的抑制与宫颈癌细胞同质性黏附能力降低并向间质特征转化有关, 宫颈癌细胞可能通过抑制 Bit1 表达获得失巢凋亡抗性并通过影响 EMT 提高其侵袭能力, 从而发生浸润和转移, 这一结果与 Yao 等^[3]的研究结果相吻合。

宫颈癌的发生与 HPV 感染密切相关, 但是 HPV 须持续存在并最终整合到宿主基因组中才会导致宫颈上皮细胞发生肿瘤转化, 而 P16^{INK4a} 的免疫组织化学表达被建议作为 HPV 诱导的肿瘤转化的替代指标^[4-7]。为了探讨宫颈癌细胞的侵袭性是否与 P16^{INK4a} 表达有关, 本研究检测了 P16^{INK4a} 在肿瘤中央区及肿瘤出芽区的表达, 结果显示肿瘤出芽区 P16^{INK4a} 的表达高于中央区, 提示 P16^{INK4a} 表达增高与宫颈的侵袭能力增强有关, 这与 Kanthiya 等^[19]及 Zhang 等^[20]的研究结果相符。那么, P16^{INK4a} 高表达是否与宫颈癌获得失巢凋亡抗性 & EMT 的发生有关呢? 在本研究中, 分别将肿瘤中央区及肿瘤出芽区分为 P16^{INK4a} 高表达组与 P16^{INK4a} 低表达组, 分析不同 P16^{INK4a} 表达情况下 Bit1 及 E-钙黏蛋白表达的变化情况, 结果显示无论是在中央肿瘤区还是出芽区二者在 P16^{INK4a} 高表达组与 P16^{INK4a} 低表达组的表达差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05), 提示 P16^{INK4a} 的表达可能与宫颈癌是否获得失巢凋亡抗性 & EMT 过程中同质性黏附能力降低无关, 推测 P16^{INK4a} 可能未参与失巢凋亡抗性 & EMT 的过程。

综上所述, 本研究结果提示宫颈癌侵袭性的增高可能与 Bit1、E-钙黏蛋白表达降低及 P16^{INK4a} 表达增加有关, 宫颈癌细胞可能通过抑制 Bit1 获得失巢凋亡抗性并影响 EMT 的发生而获得更高的侵袭能力, 但 P16^{INK4a} 并未参与此过程。Bit1 与 E-钙黏蛋白之间作用的具体机制仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] KAKAVANDI E, SHAHBAHRAMI R, GOUDARZI H, ESLAMI G, FAGHIHLOO E. Anoikis resistance and oncoviruses[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 2484-2491.
- [2] YAO X, JENNINGS S, IRELAND S K, PHAM T, TEMPLE B, DAVIS M, et al. The anoikis effector Bit1 displays tumor suppressive function in lung cancer cells[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9: e101564. doi: 10.1371/journal.pone.0101564.
- [3] YAO X, PHAM T, TEMPLE B, GRAY S, CANNON C, CHEN R, et al. The anoikis effector Bit1 inhibits EMT through attenuation of TLE1-mediated repression of E-cadherin in lung cancer cells[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11: e0163228. doi: 10.1371/journal.pone.0163228.
- [4] SARWATH H, BANSAL D, HUSAIN N E, MOHAMED M, SULTAN A A, BEDRI S. Introduction of P16^{INK4a} as a surrogate biomarker for HPV in women with invasive cervical cancer in Sudan[J/OL]. *Infect Agent Cancer*, 2017, 12: 50. doi: 10.1186/s13027-017-0159-0.
- [5] VON KNEBEL DOEBERITZ M, REUSCHENBACH M, SCHMIDT D, BERGERON C. Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16^{INK4a} to highlight transforming HPV infections[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2012, 9: 149-163.
- [6] CHEAH P L, LOOI L M, TEOH K H, MUN K S, NAZARINA A R. p16^{INK4a} is a useful marker of human papillomavirus integration allowing risk stratification for cervical malignancies[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13: 469-472.
- [7] HALEC G, SCHMITT M, DONDOG B, SHARKHUU E, WENTZENSEN N, GHEIT T, et al. Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132: 63-71.
- [8] ZLOBEC I, LUGLI A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget[J]. *Oncotarget*, 2010, 1: 651-661.
- [9] RODRIGUES I S, LAVORATO-ROCHA A M, DE M MAIA B, STIEPCICH M M, DE CARVALHO F M, BAIOCCHI G, et al. Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109: 184-194.
- [10] BRABLETZ T, JUNG A, REU S, PORZNER M, HLUBEK F, KUNZ-SCHUGHART L A, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10356-10361.
- [11] KOHLER I, BRONSERT P, TIMME S, WERNER M, BRABLETZ T, HOPT U T, et al. Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 30(Suppl 1): 78-84.
- [12] DE SMEDT L, PALMANS S, ANDEL D, GOVAERE O, BOECKX B, SMEETS D, et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116: 58-65.
- [13] MEYER SN, GALVÁN J A, ZAHND S, SOKOL L, DAWSON H, LUGLI A, et al. Co-expression of cytokeratin and vimentin in colorectal cancer highlights a subset of tumor buds and an atypical cancer-associated stroma[J]. *Hum Pathol*, 2019, 87: 18-27.
- [14] GRIGORE A D, JOLLY M K, JIA D, FARACH-CARSON M C, LEVINE H. Tumor budding: the name is EMT. Partial EMT[J/OL]. *J Clin Med*, 2016, 5: E51. doi: 10.3390/jcm5050051.
- [15] 黄帅,袁达,郭俊超,张太平,赵玉沛. Bit1 蛋白对胰腺癌细胞恶性生物学行为的影响及其临床指标的相关性分析[J]. *中华外科杂志*, 2017, 55: 857-862.
- [16] KARMALI P P, BRUNQUELL C, TRAM H, IRELAND S K, RUOSLAHTI E, BILIRAN H. Metastasis of tumor cells is enhanced by downregulation of Bit1[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6: e23840. doi: 10.1371/journal.pone.0023840.
- [17] ZHENG J, ZHOU J, XIE X, XIE B, LIN J, XU Z, et al. Estrogen decreases anoikis of ovarian cancer cell line Caov-3 through reducing release of Bit1[J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33: 847-853.
- [18] YAO X, PHAM T, TEMPLE B, GRAY S, CANNON C, HARDY C, et al. TLE1 inhibits anoikis and promotes tumorigenicity in human lung cancer cells through ZEB1-mediated E-cadherin repression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 72235-72249.
- [19] KANTHIYA K, KHUNNARONG J, TANGJITGAMOL S, PURIPAT N, TANVANICH S. Expression of the p16 and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions and cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17: 3201-3206.
- [20] ZHANG C Y, BAO W, WANG L H. Downregulation of p16^{ink4a} inhibits cell proliferation and induces G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33: 1577-1585.

[本文编辑] 杨亚红