

缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 和血管生成拟态在宫颈癌中表达的变化及其意义

陈国斌, 李卫红, 梁文倩, 刘植华

(深圳市妇幼保健院妇科, 广东 深圳 518028)

**【摘要】** 目的 探讨缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )和血管生成拟态(VM)在宫颈癌中的表达及其临床意义。方法 收集 2016 年 1~12 月深圳市妇幼保健院收治的宫颈癌患者,其中宫颈上皮内瘤变(CIN) 20 例,宫颈鳞癌 I 期 20 例(I 期组),宫颈鳞癌 II 期 15 例(II 期组),正常宫颈组织 16 例作为对照组,免疫组化法检测各组宫颈组织中 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 的表达,分析 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 在不同期别和临床病理特征宫颈癌中的表达。结果 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 在对照组、CIN 组、I 期组和 II 期组宫颈组织中表达阳性率逐渐升高,分别为 0、5.0%、30.0%、73.3%和 0、15.0%、45.0%、80.0%,组间比较差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );癌栓阳性和肿瘤直径 $>4$  cm 患者的 HIF-1 $\alpha$ 阳性率分别 69.20%和 76.9%,明显高于癌栓阴性和肿瘤直径 $<4$  cm 患者(分别为 27.3%和 31.8%),差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );癌栓阳性和肿瘤直径 $>4$  cm 患者 VM 的阳性率分别 83.3%和 53.8%,明显高于癌栓阴性和肿瘤直径 $<4$  cm 患者(分别为 24.1%和 18.2%),差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );淋巴结阳性和癌细胞中低分化患者的 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 表达均高于淋巴结阴性和癌细胞高分化患者,但其差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 表达随宫颈癌分期逐渐升高,并与癌栓阳性和肿瘤直径 $>4$  cm 相关,检测 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 对提高宫颈癌的诊治具有重要的临床意义。

**【关键词】** 宫颈癌;缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ;血管生成拟态;临床意义

**【中图分类号】** R737.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)07-0955-03

**Expression of hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  and vasculogenic mimicry in cervical cancer and its clinical significance.** CHEN Guo-bin, LI Wei-hong, LIANG Wen-qian, LIU Zhi-hua. Department of Gynecology, Shenzhen Maternal and Child Healthcare Hospital, Shenzhen 518028, Guangdong, CHINA

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vasculogenic mimicry (VM) in the tumorigenesis of cervical cancer and its clinical significance. **Methods** The expression levels of HIF-1 $\alpha$  and VM were examined by immunohistochemistry in different degree of cervical cancer and its precursor from January 2016 to December 2016 in Shenzhen Maternal and Child Healthcare Hospital, including 20 cervical intraepithelial neoplasia (CIN), 20 cervical cancer phase I, 15 cervical cancer phase II, and 16 normal cervical tissues as control. Then its relationship with different grade and clinicopathologic features of cervical cancer was analyzed. **Results** The positive expression rate of HIF-1 $\alpha$  and VM were increased along with the degree of cervical cancer, which were 0, 5.0%, 30.0%, 73.3% and 0, 15.0%, 45.0%, 80.0%, respectively, and the differences had statistical significance ( $P<0.05$ ). The positive expression rate of HIF-1 $\alpha$  in patients with vascular cancer embolus and tumor diameter $>4$  cm were 69.20% and 76.9%, which were higher than the corresponding 27.3% and 31.8% in the patients without cancer embolus and with tumor diameter $<4$  cm ( $P<0.05$ ). The positive expression rate of VM in patients with vascular cancer embolus and tumor diameter $>4$  cm were 83.3% and 53.8%, which were also significantly higher than the corresponding 24.1% and 18.2% in the patients without cancer embolus and with tumor diameter $<4$  cm ( $P<0.05$ ). The expressions of HIF-1 $\alpha$  and VM in patients with lymphatic metastasis and moderate or poor differentiation were higher than those in the patients without lymphatic metastasis and with high differentiation, but the difference had no significance ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The expression of HIF-1 $\alpha$  and VM increase with the degree of cancer and had relation with the clinicopathologic features of cervical cancer such as cancer embolus and tumor diameter $>4$  cm, which had significance for the diagnosis and treatment of cervical cancer.

**【Key words】** Cervical cancer; Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; Vasculogenic mimicry; Clinical significance

宫颈癌是常见的妇科恶性生殖道肿瘤,严重威胁女性的健康,是女性因癌致死的主要原因之一;其发病率在全世界女性恶性肿瘤中居第 3 位,全世界每年约有 530 000 新发病例和 27 500 例因宫颈癌而死亡,其中 80% 以上的新发病例和死亡病例均发生在发展中国家<sup>[1]</sup>。肿瘤转移引起的大出血、侵犯重要器官、全身多脏器损害、恶病质等是宫颈癌的严重并发症,给患者带来无法估计的身心损害以及巨大的家庭、社会负担。宫颈癌的转移机制尚不十分清楚,因此明确宫颈癌的转移机制对于宫颈癌的防治具有重大的意

义。本研究拟将在宫颈癌及其癌前病变中检测缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)的表达,探讨 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 在宫颈癌发生发展及侵袭转移中的作用,为宫颈癌的防治提供新的分子靶点。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1~12 月深圳市妇幼保健院收治的拟行手术治疗的宫颈鳞癌患者,其中宫颈鳞癌 I 期 20 例(I 期组);宫颈鳞癌 II 期 15 例(II 期组);宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia,

CIN) 20 例(CIN 组), 其中 CIN II 和 CIN III 各 10 例; 正常宫颈组织 16 例为对照组, 取自因良性肿瘤而行全子宫切除患者。排除标准: 合并其他生殖道恶性肿瘤、既往有其他系统恶性肿瘤病史、合并其他系统恶性肿瘤患者, 宫颈癌需排除术前已行放化疗患者, 以及不能手术治疗的宫颈癌患者。

## 1.2 主要试剂及检测方法

1.2.1 HIF-1 $\alpha$  的检测 采用免疫组化法检测, 主要试剂为小鼠缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 免疫组化试剂盒(雅吉, 上海), 严格按照说明书操作, 一抗阴性对照使用 PBS 替代, 组织经切片、脱蜡、水化、抗原修复、封闭后加入兔抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体孵育, 然后洗涤、封闭, 加入生物素化羊抗兔二抗, 最后洗涤、封片, 显微镜下观察细胞染色情况。

1.2.2 VM 的检测 采用免疫组化 CD34/PAS 双重染色, 主要试剂为兔 CD34 免疫组化试剂盒(江莱, 北京)和过碘酸-雪夫(AB-PAS)染色试剂盒(索莱宝, 北京)。步骤严格按试剂说明进行。首先行 CD34 染色, CD34 阳性颗粒可见于血管内皮细胞的细胞质或细胞膜。然后冲洗三遍后再行 PAS 染色, PAS 阳性表达见于血管或类血管腔壁的基膜, 呈樱桃红色或紫红色。由 CD34 阴性的肿瘤细胞(HE 染色后光镜下确认)围绕形成的血管样结构, 管内有一层 PAS 阳性不规则的物质, 其内或可见红细胞, 管道周围无炎症细胞、出血及坏死组织等, 即判定为 VM。其中 CD34 和 PAS 均阳性表达且规则的圆环形管道结构, 作为正常内皮血管而排除。

1.3 免疫组化染色蛋白表达的判定 采用双盲法判读, 染色结果由我院两名资深病理学医师在临床数据及其他免疫结果不知情的情况下独立盲审, 如遇结果不一致时则由两位医师再次共同阅片商量达成一致。根据细胞染色强度和染色细胞百分率进行综合评分: 不着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 着色细胞数占计数细胞总数的百分比 < 5% 为 0 分, 5%~24% 为 1 分, 25%~49% 为 2 分, 50%~74% 为 3 分, 75%~100% 为 4 分。每张切片的总评分由平均着色强度得分剩于平均着色细胞百分率得分而得, 结果: 0 分为阴性(-); 1~4 分为弱阳性(+); 5~8 分为中度阳性(++); 9~12 分为强阳性(+++)。最终 0 和 + 归为阴性表达, ++ 和 +++ 归为阳性表达。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据录入及统计学分析, 计数资料采用两独立样本的非参数检验或者  $\chi^2$  检验, 相关性检验采用 Spearman 相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HIF-1 $\alpha$  和 VM 在四组宫颈组织中的表达 HIF-1 $\alpha$  的表达(如图 1)随宫颈病变病理升级逐渐增加, 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CIN 组与 I 期组、I 期组和 II 期组之间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 1。但对对照组与 CIN 组间两两比较差

异无统计学意义( $P > 0.05$ )。VM 的表达(如图 2)也随宫颈病变程度升高而增加, Spearman 相关分析结果显示; HIF-1 $\alpha$  表达和 VM 表达呈正相关( $r = 0.88, P < 0.05$ )。

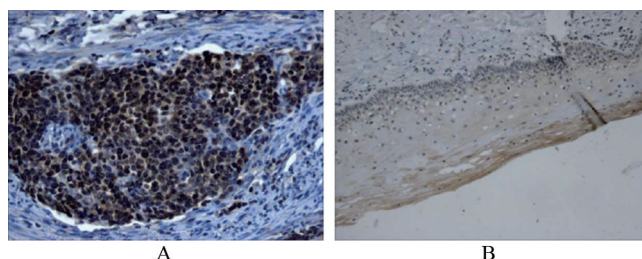


图 1 HIF-1 $\alpha$  在宫颈癌组中的表达

注: A, 宫颈癌组织, HIF-1 $\alpha$  表达阳性( $\times 200$ ); B, 正常宫颈组织, HIF-1 $\alpha$  表达阴性( $\times 100$ )。

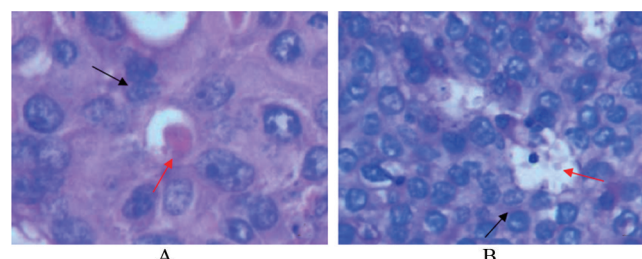


图 2 VM 在宫颈癌组织中的表达( $\times 100$ )

注: A, HE 染色; B, CD34/PAS 双重染色。

表 1 HIF-1 $\alpha$  和 VM 在不同期别宫颈癌中的表达[例(%)]

组别	例数	HIF-1 $\alpha$ (+)	$\chi^2$ 值	P 值	VM (+)	$\chi^2$ 值	P 值
对照组	16	0 (0)	-	-	0 (0)	-	-
CIN 组	20	1 (5.0)	0.82	0.36	3 (15.0)	2.61	0.11
I 期组	20	6 (30.0)	4.33	0.03	9 (45.0)	4.28	0.03
II 期组	15	11 (73.3)	6.44	0.01	12 (80.0)	4.37	0.04

2.2 HIF-1 $\alpha$  和 VM 在不同临床病理特征宫颈癌中的表达 HIF-1 $\alpha$  和 VM 的表达与宫颈癌的临床病理特征相关, 见表 2。癌栓阳性及肿瘤直径 > 4 cm 患者 HIF-1 $\alpha$  和 VM 表达均明显高于癌栓阴性和肿瘤直径 < 4 cm 患者, 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。HIF-1 $\alpha$  和 VM 在淋巴结阳性和癌细胞中低分化组表达均高于淋巴结阴性和癌细胞高分化患者, 但其差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 HIF-1 $\alpha$  和 VM 表达与宫颈癌临床病理特征的关系[例(%)]

临床病理特征	例数	HIF-1 $\alpha$ (+)	$\chi^2$ 值	P 值	VM (+)	$\chi^2$ 值	P 值
淋巴结			0.94	0.33		7.73	0.05
有	6	4 (66.7)			5 (83.3)		
无	29	13 (44.8)			7 (24.1)		
癌栓			4.60	0.03		8.66	0.003
有	13	9 (69.2)			8 (61.5)		
无	22	6 (27.3)			4 (18.2)		
肿瘤直径(cm)			6.65	0.01		4.44	0.03
< 4	22	7 (31.8)			4 (18.2)		
> 4	13	10 (76.9)			7 (53.8)		
分化程度			1.58	0.20		0.95	0.32
中低	9	6 (66.7)			4 (44.4)		
高	26	11 (42.3)			7 (26.9)		

### 3 讨论

我国每年宫颈癌新发病例约在 13 万以上,约占全世界新发病例的 1/4<sup>[2]</sup>。宫颈癌的死因多是肿瘤转移引起的大出血、侵犯重要器官、恶病质等,宫颈癌转移造成的并发症给患者带来无法估计的身心伤害以及巨大的家庭、社会经济负担。但是癌细胞是通过何种机制侵袭转移目前尚不清楚。因此明确宫颈癌的侵袭转移机制对宫颈癌的防治具有重大的意义,尤其对于宫颈癌分期的判断具有重要的指导意义。目前宫颈癌的分期以临床分期为主,由两名具有高级职称的专家共同判断,因此可能存在较大的主观性。宫颈癌的治疗方案选择依赖于准确的肿瘤分期,如分期错误则会给患者带来巨大的灾难。因此,提高宫颈癌分期的准确性对宫颈癌的治疗具有重要的指导意义。HIF-1 $\alpha$ 和 VM 是近年来研究与恶性肿瘤转移密切相关的因子,已在多种转移肿瘤中被报道<sup>[3-5]</sup>。

VM 是指管道壁由肿瘤细胞排列衬覆,管道内可见血细胞的一种类似传统血管的肿瘤血管,该血管与传统血管不同的是管壁没有内皮细胞围绕。目前研究认为恶性肿瘤生长迅速需要宿主提供足够的血供以维持肿瘤细胞的快速生长,但仅依靠传统的血管不能满足其生长需求,而 VM 不但能为肿瘤生长提供足够的血供,同时 VM 由于无内皮细胞衬覆,使得 VM 有利于肿瘤细胞穿透基底膜与血液循环直接接触,促进肿瘤的侵袭转移。因此,VM 更有利于肿瘤生长、侵袭和转移<sup>[3-4]</sup>。

近年来不断在肝癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、恶性黑色素瘤、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中证实 VM 的存在,VM 的形成与肿瘤的恶性程度及预后密切相关,在肿瘤的发生发展中 VM 具有重大意义<sup>[5-7]</sup>。本研究显示 VM 表达随宫颈病变病理升级逐渐增加,尤其是宫颈鳞癌 II 期,明显高于 CIN 和宫颈鳞癌 I 期,这与其他学者报道结果相似<sup>[8]</sup>。本研究亦显示 VM 表达与宫颈癌的临床病理特征相关,癌栓阳性及肿瘤直径 >4 cm 的患者其癌组织中 VM 表达明显增加,这可能与 VM 能够促进肿瘤增殖、侵袭和转移有关。本研究亦显示淋巴结阳性和癌细胞中低分化者的 VM 表达高于淋巴结阴性和癌细胞高分化者,但差异无统计学意义。而国内学者张一真等<sup>[9]</sup>在一项 60 例的宫颈鳞癌研究发现 VM 在中低分化组的阳性率(47.9%)显著高于高分化组(8.3%),与 FIGO 分期、淋巴结转移有关;本研究 VM 在淋巴结阳性和癌细胞中低分化患者中表达与淋巴结阴性组和癌细胞高分化者比较差异无统计学意义,这可能与样本量少有关,应进一步扩大样本量检查。

肿瘤细胞无限增殖会导致肿瘤周围微环境的缺氧,HIF-1 $\alpha$ 直接受氧分压调节,是组织缺氧的内在标志。HIF-1 $\alpha$ 存在于多种肿瘤细胞中,可调控多种靶基因的转录,使癌细胞在低氧的环境下得以生存,与肿瘤

增殖、侵袭、转移等密切相关<sup>[10]</sup>。宋毓平等<sup>[11]</sup>通过抑制 HIF-1 肿表达发现其能够对宫颈癌 Hela 细胞的恶性生物学行为产生影响,包括抗凋亡、促增殖、侵袭转移等。本研究显示 HIF-1 $\alpha$ 在癌栓阳性及肿瘤直径 >4 cm 的患者表达明显高于癌栓阴性和肿瘤直径 <4 cm 患者,这与 HIF-1 $\alpha$ 促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移相关。而研究中 HIF-1 $\alpha$ 在淋巴结阳性和癌细胞中低分化患者中表达高于淋巴结阴性和癌细胞高分化患者,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),这与吴春风等<sup>[12]</sup>研究不一致,该研究认为 HIF-1,在淋巴结阳性组与淋巴结阴性组表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),这可能与本研究样本量少引起的误差有关,需进一步扩大临床样本量检查验证。

本研究结果显示,HIF-1 $\alpha$ 和 VM 表达与宫颈癌分期和临床病理特性相关,因此,通过检测 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 可以预测宫颈癌的分期,有助于制定正确的临床策略,对于提高宫颈癌的诊治具有重大的意义。目前宫颈癌的分期主要由临床医生通过临床检查而判断,存在很大的主观性,如能通过肿瘤相关标志物的检测协助提高分期判断将有助于宫颈癌的初始治疗,提高宫颈癌的治疗效果。本研究的不足是样本量少,且未深入探讨 HIF-1 $\alpha$ 和 VM 的作用机制,这将在后续的研究进一步探讨。

### 参考文献

- [1] Ahmedin Jemal DVM, Freddie B, Melissa M, et al. Global cancer statistics [J]. CA CANCER J CLIN, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Arbyn M, Castellsague X, de Sanjose S, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008 [J]. Ann Oncol, 2011, 22(12): 2675-2686.
- [3] Brahimi-Hom MC, Pouyssegur J. Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(3): 450-457.
- [4] Du J, Sun B, Zhao X, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 2014, 133(3): 575-583.
- [5] Vartanian AA, Stepanova EV, Gutorov SI, et al. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in clear cell renal cell carcinoma [J]. Can J Urol, 2009, 16(4): 4726-4732.
- [6] Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis [J]. Am J Pathol, 2000, 156(2): 361-381.
- [7] 梁军, 苗蕊, 邢慧敏. 血管生成拟态在子宫内膜癌组织中的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(23): 1124-1127.
- [8] 黄小环, 向丽, 龚莉, 等. 宫颈鳞癌组织中血管生成拟态及 HIF-1 $\alpha$  的表达[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(5): 645-647.
- [9] 张一真, 俞薇薇, 宋恩霖. 宫颈鳞状细胞癌组织中血管生成拟态和 EphA2 的表达及意义[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(5): 742-744.
- [10] Fu Z, Chen D, Cheng H, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protects cervical carcinoma cells from apoptosis induced by radiation via modulation of vascular endothelial growth factor and p53 under Hypoxia [J]. Med Sci Monit, 2015, 21(42): 318-325.
- [11] 宋毓平, 张庆华, 黄磊, 等. 抑制缺氧诱导因子 1 制对人宫颈癌细胞生长和侵袭的影响研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31(10): 965-967.
- [12] 吴春风, 张丹丹, 何志娟. HIF-1 $\alpha$  在宫颈癌和宫颈上皮内瘤变中的表达及意义[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2009, 43(5): 464-468.

(收稿日期: 2017-07-25)