

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000487

HIF-1 α 和 miR-210 在宫颈鳞癌中的表达及其相关性

楼 梦, 贾 英

(重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨宫颈癌组织中缺氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor-1 α)和 MicroRNA 210(miR-210)之间的关系,为宫颈癌的早期发现寻找参考指标。**方法:**采用免疫组化 En Vision 法和 real-time PCR 分别检测 52 例宫颈鳞癌及 20 例正常宫颈上皮组织中 HIF-1 α 和 miR-210 的表达情况,用 Spearman 秩相关检验分析癌组织中 HIF-1 α 和 miR-210 之间的相关性。**结果:**宫颈鳞癌组织细胞大部分胞核表达 HIF-1 α ,少部分胞核和胞浆同时表达,HIF-1 α 在宫颈鳞癌组织中的表达率为 73.1%(38/52),正常宫颈组织细胞中无表达。miR-210 在宫颈鳞癌组织中的表达水平较正常宫颈组织显著上调,正常宫颈组织 miR-210 的表达水平为 1.16 ± 0.76 ,宫颈鳞癌组织中其表达水平为 5.04 ± 1.28 ($P=0.000$);在 52 例宫颈鳞癌组织中,HIF-1 α 蛋白表达水平与 miR-210 表达呈正相关($r=0.43$, $P=0.001$)。HIF-1 α 蛋白在正常宫颈组织中均无阳性表达,与 miR-210 无相关性。在所有 72 例样本中进行相关性分析,发现两者的表达呈正相关($r=0.67$, $P=0.000$)。说明随着 HIF-1 α 蛋白表达的增加,miR-210 则随着增加。**结论:** HIF-1 α 和 miR-210 在宫颈鳞癌组织中均呈高表达,且两者有一定的相关性。推测 HIF-1 α 和 miR-210 与宫颈癌的发生发展相关,有助于进一步揭示宫颈癌的发病机制。

【关键词】宫颈癌;缺氧诱导因子-1 α ;microRNA210;免疫组化;real-time PCR

【中图分类号】R737.33

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-08-18

Expression of HIF-1 α and miR-210 in cervical squamous cell carcinoma and their relationship

Lou Meng, Jia Ying

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the correlation between hypoxia induced factor-1 α (HIF-1 α) and MicroRNA210(miR-210) in cervical cancer. **Methods:** The expression of HIF-1 α protein was detected by immunohistochemistry. Poly(A)-RT-qPCR was used to detect the expression of miR-210 in cervical cancer and normal cervical tissues. The correlation between the expression of miR-210 and HIF-1 α was analyzed in cervical cancer. **Results:** The expression of HIF-1 α in cervical cancer was 73.1% (38/52), but HIF-1 α was not detected in normal cervical tissues; the expression of miR-210 was significantly increased in cervical cancer tissues than in normal cervical tissues ($P=0.000$). The expression of miR-210 in normal cervical tissues and cervical cancer was 1.16 ± 0.76 and 5.04 ± 1.28 , respectively. The expression of HIF-1 α and miR-210 were positively correlated in 52 cases of cervical cancer ($r=0.43$, $P=0.001$). The expressions of HIF-1 α and miR-210 were not correlated in normal cervical tissues. The expressions of HIF-1 α and miR-210 were positively correlated in 72 cases ($r=0.67$, $P=0.000$). **Conclusion:** The expression of HIF-1 α and miR-210 are highly expressed in SCC tissues. HIF-1 α and miR-210 are positively correlated in cervical cancer. It is predicted that HIF-1 α and miR-210 are related with the occurrence and development of cervical cancers, which is conducive to revealing the pathogenesis of cervical cancer.

【Key words】 cervical cancer; hypoxia induced factor-1 α ; microRNA210; immunohistochemistry; real-time PCR

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤,约占女性恶性肿瘤的 15%。宫颈癌的发生总是伴随高危型人乳

头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的感染,然而,仅有 HPV 的感染是不够的,宫颈癌的发生发展还需要其他遗传事件的参与。microRNA 是一类内源性的非编码 RNA,可以调控细胞生命活动诸多过程,也影响肿瘤的发生和发展,人类大约 30%的基因受到 microRNA 的调控^[1]。肿瘤细胞微环境缺氧是实体肿瘤的共同特征。在缺氧微环境下,肿瘤细胞高表

作者介绍:楼 梦, Email: lemmosan@163.com,

研究方向:妇科肿瘤学。

通信作者:贾 英, Email: jiaying284@tom.com。

基金项目:重庆市卫生局科研项目(编号:2013-2-011)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2212.013.html>

(2015-03-08)

达缺氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor, HIF-1 α)。研究发现, microRNA210(miR-210)受 HIF-1 α 调控, HIF-1 α 在接近 miR-210 启动子处直接与转录起始位点上游大约 40 bp 的 HRE 结合, 启动靶基因的转录, 使机体对缺氧产生一系列适应性反应。关于二者在宫颈癌中表达的相关性研究, 尚未见报道。本研究利用免疫组化方法和 real-time PCR 分别检测 HIF-1 α 和 miR-210 在正常宫颈组织和宫颈鳞癌组织中的表达情况, 探索两者的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本

收集重庆医科大学附属第一医院门诊经过病理组织学确诊的原发性宫颈鳞状上皮细胞癌的组织标本共 52 例, 患者年龄 30~74 岁, 平均年龄 47.7 岁。正常宫颈组织 20 例, 年龄 28~59 岁, 平均年龄 46 岁。宫颈癌组织标本获取前患者均未进行任何治疗, 包括化疗和放疗。正常宫颈组织标本来自因其它良性肿瘤行子宫切除的新鲜标本。取组织标本离体后将其分为 2 份, 1 份于 5 min 内置于液氮罐内迅速冷冻后置 -80 °C 保存; 另 1 份放入 4% 甲醛固定。

1.2 试剂与方法

1.2.1 主要试剂 鼠抗人 HIF-1 α 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 免疫组化检测试剂盒 (En Vision 法) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒, 逆转录试剂盒及 Real Time 扩增试剂盒均购自 Takara Biotechnology 公司; miR-210 和内参引物 U6 均购自广州复能基因有限公司。

1.2.2 免疫组化方法 采用免疫组化 En Vision 法, 宫颈组织常规切片, 烘干、脱蜡、水化, 柠檬酸缓冲液高压修复抗原, 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶; 滴加一抗 4 °C 过夜, 试剂一 37 °C 孵育 30 min, 试剂二 37 °C 孵育 30 min, 常规 DAB 显色, 苏木精复染, PBS 返蓝, 中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照, 用同一条件下染色的阳性组织切片作阳性对照。

1.2.3 Real-time PCR 检测 采用多聚腺苷酸加尾实时荧光定量反转录聚合酶链反应[poly(A)-RT-qPCR]检测各样品的目的 miRNA 和内参(U6), 按试剂盒说明操作。本研究以 U6 做内参进行数据的归一化后, 用 miR-210 的 CT 值与 U6 的 CT 值的比值进行相对定量计算, 检测得到 miR-210 的表达结果。

1.3 结果判定

1.3.1 免疫组化结果 阳性为细胞出现棕黄色颗粒, 阴性为无显色。HIF-1 α 的阳性信号位于肿瘤细胞的胞浆和(或)细胞核被染成棕黄色颗粒, 根据其染色程度及细胞数量进行染色评分判读。阳性细胞评分法: 阳性细胞比例 < 25% 为 1 分,

阳性细胞比例 25%~50% 为 2 分, 阳性细胞比例 51%~75% 为 3 分, 阳性细胞比例 > 75% 为 4 分。细胞染色程度评分法: 肿瘤细胞不着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。上述 2 项之和即为肿瘤细胞的染色评分, 总分 0 分为阴性(-), 1~2 分为(+), 3~6 分为(++), 7~12 分为(+++)。

1.3.2 Real-time PCR 结果 记录每个反应管中标本的 CT 值, 采用定量 PCR 中的相对定量法进行分析, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示肿瘤组织 miR-210 表达量相对于正常宫颈组表达量的变化倍数, 其中 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{实验组}} - \Delta CT_{\text{对照组}}$ 。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理, 所有资料数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, HIF-1 α 与 miR-210 在正常组与宫颈癌组的比较用独立样本的 t 检验; 率的分析采用 Fisher 确切概率法; HIF-1 α 与 miR-210 的相关性应用 Spearman 秩和相关性分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HIF-1 α 在正常宫颈组织与宫颈鳞癌组织中的表达

所有检测的正常宫颈组织弱表达或不表达 HIF-1 α (图 1)。宫颈鳞癌组织大部分胞核表达 HIF-1 α (图 2), 少部分胞核和胞浆同时表达。HIF-1 α 在宫颈鳞癌组织中的表达率为 73.1% (38/52) (表 1)。

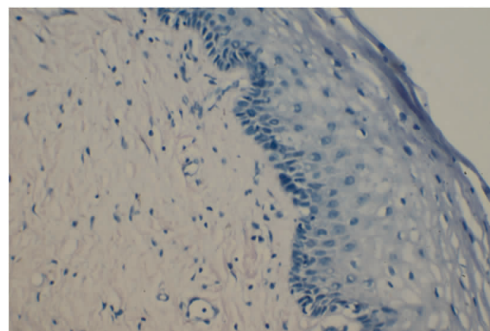


图 1 HIF-1 α 在正常宫颈组织中阴性表达 (200 ×)

Fig.1 Expression of HIF-1 α in normal cervical tissues (200 ×)

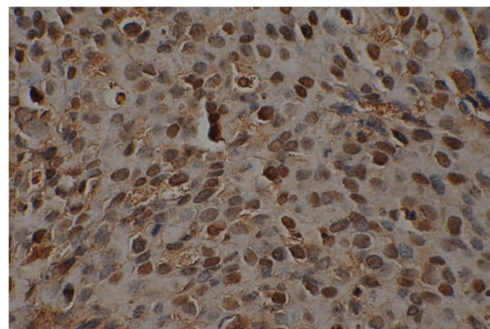


图 2 宫颈鳞癌组织中 HIF-1 α 在高倍镜下的表达 (400 ×)

Fig.2 Expression of HIF-1 α in cervical cancer tissues (400 ×)

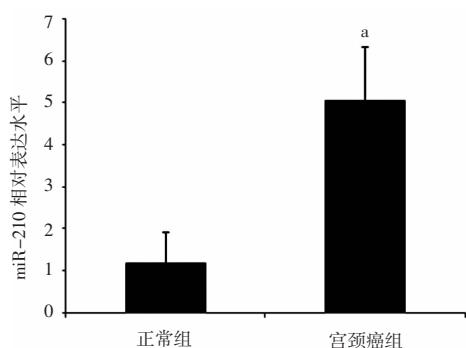
表 1 HIF-1 α 在正常宫颈组织及宫颈鳞癌中的表达
Tab.1 Expression of HIF-1 α in cervical squamous cell carcinoma and normal cervical tissues

分组	例数	HIF-1 α				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
正常宫颈组	20	20	0	0	0	0.0
宫颈鳞癌组	52	14	4	22	12	73.1 ^a

注:a, 宫颈鳞癌与正常宫颈组表达阳性率相比较, $P=0.000$

2.2 miR-210 在正常宫颈组织与宫颈癌组织中的表达差异

miR-210 在宫颈癌组织中的表达水平较正常宫颈组织显著上调(图 3)。正常宫颈组织 miR-210 的表达水平为 1.16 ± 0.76 ; 宫颈鳞癌组织中其表达水平为 5.04 ± 1.28 ($P<0.01$)。该结果显示, 宫颈鳞癌组织中 miR-210 维持一个较高水平。



图中每柱表示 ($\bar{x} \pm s$), a 表示与正常宫颈组织比较有统计学意义 ($P<0.01$)

图 3 宫颈正常组织与宫颈鳞癌组织 miR-210 的表达变化

Fig.3 Differences between the cervical cancer tissues and the normal tissues

2.3 宫颈癌组织和正常宫颈组织中 HIF-1 α 表达与 miR-210 表达的关系

对 52 例宫颈癌组织中的 HIF-1 α 蛋白及 miR-210 进行 spearman 等级相关分析, 发现两者的表达呈正相关 (spearman 相关系数为 $r=0.43$, $P=0.001$)。HIF-1 α 蛋白在正常宫颈组织中均无阳性表达, 与 miR-210 无相关性。在所有 72 例样本中进行相关性分析, 发现两者的表达呈正相关 ($r=0.67$, $P=0.000$)。说明随着 HIF-1 α 蛋白表达的增加, miR-210 则随着增加。

3 讨论

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在女性恶性肿瘤中居第二, 仅次于乳腺癌。高危型 HPV 的感染被认为是宫颈癌的病因, 尽管高达 95% 的宫颈癌前病变伴随有 HPV 感染, 然而最终只有极少一部分进展到宫颈癌。因此虽然高危型 HPV 感染是宫颈病变进展的必要条件, 但是并不足以促进

宫颈癌的发生, 还需其他遗传事件的参与。

越来越多的研究表明, miRNA 的表达失调与肿瘤的发生发展, 肿瘤的转移侵袭等都有重要的关系。因此 miRNA 被认为是肿瘤发生发展的一种新的标志物。近些年来有研究者发现 miRNA 可以受到外源环境的调节, 这使得人们对 miRNA 的功能又有了新的认识。缺氧是肿瘤微环境的重要组成部分, 也是临床肿瘤治疗过程中失败的充分证据。通过检测发现在肿瘤组织内存在低氧区, 这些区域的产生与肿瘤生长迅速及肿瘤血管结构异常等原因有关; 而低氧又改变了肿瘤的生物学特性, 导致肿瘤细胞的遗传不稳定和对放、化疗的耐受以及侵袭力的增加^[2]。缺氧诱导因子 (hypoxia induced factor, HIF) 作为一种对氧气敏感的转录因子超家族, 主要负责众多的低氧诱导基因的表达调控。活化的 HIF 是由 HIF α 和 HIF β 亚基构成的异二聚体。其中, HIF-1 α 是决定恶性肿瘤预后的重要因子^[3]。已发表的研究一致认为 miR-210 是在缺氧的正常或肿瘤细胞中表达变化最显著的 miRNA, 在生理状态下及恶性肿瘤环境中对缺氧细胞的增殖、凋亡、血管生成、DNA 损伤修复和能量代谢起重要作用。miR-210 是缺氧诱导因子明确的目标, HIF-1 α 蛋白通过 miR-210 途径参与调控细胞代谢过程及其基因的表达^[4]。也有研究报道, 在肺癌组织中 miR-210 积极调控 HIF-1 α ^[5] 参与调控肿瘤的进展。目前, 已经在各种低氧的疾病, 包括大多数实体肿瘤检测到其过表达^[6]。miR-210 在肿瘤中的表达状态可能会影响其治疗效果。在软组织的肉瘤, 儿童骨肉瘤, 乳腺癌, 头颈部癌及胰腺癌中发现高表达 miR-210 提示其预后不良^[7-11]; 同时也提示这些肿瘤的发生发展与 miR-210 调节途径有关。

宫颈组织与其他实体肿瘤组织相比有一个显著的特点, 就是即使在正常组织中也可能存在慢性缺氧。为了证实 miR-210 是否影响宫颈鳞癌的发生发展, 本研究中采用 qRT-PCR 方法检测了 52 例宫颈鳞癌患者的组织标本和 20 例正常宫颈组织标本, 结果发现宫颈鳞癌组织中其表达水平较正常宫颈组织组明显升高。这个结果提示 miR-210 可能与宫颈癌的发生发展密切相关。为进一步了解 HIF-1 α 蛋白与 miR-210 在宫颈鳞癌组织中的关系, 采用 Spearman 秩和相关性分析发现, 这 2 个因子在宫颈鳞癌组织中表现为正相关性, 这也与以前的研究相符合^[12]。但研究结果尚不清楚 miR-210 在宫颈鳞癌组织中的升高是 HIF-1 α 蛋白表达增加的原因还是