

· 论 著 ·

# 宫颈癌中激活蛋白 1 通路的活化及临床意义

朱皓峰<sup>1</sup>, 于晓红<sup>2</sup>, 杜丽英<sup>1</sup>, 熊敦勇<sup>1</sup>, 寇 辉<sup>1</sup>, 王芳胜<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨激活蛋白 1 (AP-1) 信号通路的重要组分 c-jun 和 c-fos 在宫颈癌中的表达及临床意义。**方法** 免疫组织化学 (SP) 法检测 c-jun 和 c-fos 在 70 例宫颈鳞状细胞癌、30 例宫颈上皮内瘤变及 20 例慢性宫颈炎中的表达情况, 同时分析其与宫颈癌临床病理特征和预后的关系。**结果** 70 例宫颈癌中 c-jun 和 c-fos 的阳性表达率分别为 57.1% (40/70)、60.0% (42/70), 在 30 例宫颈上皮内瘤变的表达阳性率分别为 53.3% (16/30)、63.3% (19/30), 而在 20 例慢性宫颈炎的表达阳性率均为 0; 宫颈癌组与宫颈炎组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 宫颈癌组与宫颈上皮瘤病变组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。c-jun 和 c-fos 表达与宫颈癌的临床分期、组织学分级、淋巴结转移等分组中差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但与患者年龄及肿瘤的大小等分组中的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。c-jun 和 c-fos 在宫颈癌的表达呈正相关 ( $r = 0.67, P < 0.05$ )。**结论** AP-1 信号通路活化可能与宫颈鳞状细胞癌发生发展相关, c-jun 和 c-fos 在致癌过程中可能起协同作用。

**[关键词]** 宫颈癌; 激活蛋白 1; 免疫组化; 病理学

**[中图分类号]** R737.33 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.02.005

## Clinical significance of AP-1 pathway alterations in cervical carcinoma

ZHU Hao-hao<sup>1</sup>, YU Xiao-hong<sup>2</sup>, DU Li-ying<sup>1</sup>, XIONG Dun-yong<sup>1</sup>, KOU Hui<sup>1</sup>, WANG Fang-sheng<sup>1</sup>. 1. Department of Pathology, 94 Hospital of PLA, Nanchang, Jiangxi 330002, China; 2. Department of Pathology, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression and clinical significance of activator protein-1 (AP-1), an important signaling pathway component of c-jun and c-fos, in cervical cancer. **Methods** Immunohistochemical (SP) method was used to detect the expression of c-jun and c-fos in 70 cases of cervical squamous cell carcinoma, 30 cases of cervical intraepithelial lesions and 20 cases of chronic cervicitis. The relationship between expressions and clinicopathologic characteristics and prognostic significance was analyzed. **Results** The positive expression rates of c-jun and c-fos were 57.1% (40/70) and 60% (42/70) in 70 cases of cervical squamous cell carcinoma. The positive expression rates were 53.3% (16/30) and 63.3% (19/30) in 30 cases of cervical intraepithelial neoplasia. The positive expression rate in the 20 cases of chronic cervicitis was 0. The expression rate in cervical cancer group and the chronic cervicitis group has a significant difference ( $P < 0.01$ ), in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia group has not statistically significant difference ( $P > 0.05$ ). The different expression of c-jun and c-fos protein in cervical carcinomas was statistically significant in the different groups of clinical stage, pathology grading and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ), but was not statistically significant in the different groups of tumor size and the patient age ( $P > 0.05$ ). Additionally, the expression of c-jun was positively correlated with that of c-fos ( $r = 0.67, P < 0.05$ ). **Conclusion** AP-1 pathway alterations may play a critical role in the development of cervical cancer, and c-jun and c-fos make synergistic action during the process of cervical cancer.

**[Key words]** cervical carcinoma; activator protein-1; immunohistochemistry; pathology

宫颈癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一, 近年来其发病率呈上升和年轻化趋势, 是严重威胁女性生命的一种恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。现有研究表明, 宫颈癌的发生与人乳头瘤病毒 (HPV) 感染尤其是高危型感染密切相关, 高危型人乳头瘤病毒持续感染是宫颈癌的重要发病诱因, 它是宫颈癌发生的必要生物学条件<sup>[2]</sup>。但研究同时发现并非所有感染 HPV 病毒的个体均进展为癌, 因此, HPV 感染和宫颈癌发

生的内在机制尚不明确。本文采用免疫组织化学 (SP) 法对 70 例宫颈鳞状细胞癌、30 例宫颈上皮内瘤变及 20 例慢性宫颈炎组织的激活蛋白 1 (AP-1) 信号通路中的重要分子 c-jun 和 c-fos 的表达进行研究, 并结合临床病理资料进行比较分析, 以了解 c-jun 和 c-fos 的表达与宫颈癌临床分期、分化程度及淋巴结转移的关系, 深入探讨 AP-1 信号通路的活化与宫颈癌的发生发展的相关及意义。

基金项目: 南京军区医学科技创新课题 (12MB022)

作者单位: 1. 330002 江西南昌, 解放军 94 医院病理科; 2. 330006 江西南昌, 江西省妇幼保健院病理科

## 1 材料与方法

1.1 临床资料 收集 2005 - 2011 年解放军 94 医院

病理科确诊为宫颈鳞状细胞癌的存档蜡块共 70 例, 根据其组织学分化程度分为 3 级: 其中 1 级高分化癌 22 例, 2 级中分化癌 30 例, 3 级低分化癌 18 例。年龄 28 ~ 76 岁, 平均 46.3 岁。按临床病理分期分为: 宫颈癌临床分期 I 期 + II 期 42 例, III 期 + IV 期 28 例; 伴盆腔淋巴结转移 27 例, 无淋巴结转移者 43 例。选宫颈上皮内瘤变 30 例, 其中宫颈轻度不典型增生 10 例, 宫颈中度不典型增生 10 例, 宫颈重度不典型增生及原位癌 10 例。另选慢性宫颈炎 20 例作为对照组。所有患者术前均未行放疗、化疗或激素治疗, 均有完整的临床资料及随访资料。所有标本采用 10% 的中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4  $\mu$ m 厚连续切片。HE 染色石蜡切片, 由 2 名副高级以上病理医师复阅诊断。

**1.2 试剂与方法** 鼠抗人 c-jun 和 c-fos 单克隆抗体和二抗试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。抗原采用柠檬酸盐缓冲液 (pH: 6.0) 高压修复。采用 SP 法, 具体实验步骤按试剂盒说明书进行, 以 PBS 代替一抗做阴性对照, 已知阳性结果做阳性对照。

**1.3 免疫组化结果判断标准** c-jun 和 c-fos 蛋白 SP 法结果判定以细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性标准。由两个观察者对切片进行盲式阅片, 每张切片随机选取 10 个高倍视野 ( $\times 400$ ), 根据染色细胞百分率和染色程度进行综合评分。阳性细胞所占百分比分为 5 级, 无阳性着色细胞: 0; 阳性着色细胞 1% ~ 25% : 1; 阳性着色细胞 26% ~ 50% : 2; 阳性着色细胞 51% ~ 75% : 3; 阳性着色细胞 76% ~ 100% : 4。根据细胞染色强度分为 4 级, 无阳性着色: 0; 浅黄色: 1; 棕黄色: 2; 棕褐色: 3。阳性细胞百分比和染色强度乘积为免疫反应得分 (immunoreactivescore, IRS) [3]。按照 0 ~ 2 分为 ( - ), 3 ~ 5 分为 ( + ), 6 ~ 8 分为 ( + + ), 9 ~ 12 分为 ( + + + ) 划分为 4 个等级。其中 0 ~ 2 分视为阴性, 等级为 +、+ + 或 + + + 的视为阳性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计处理。计数资料以百分率 (%) 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验 (或 Fisher 确切概率法), 相关分析采用 Spearman 等级相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 c-jun、c-fos 在宫颈鳞状细胞癌中的表达及与临床病理特征之间的关系** 高倍视野下显示 c-jun、c-fos 的表达差异显著 (图 1 ~ 图 5), c-jun、c-fos 在宫颈鳞状细胞癌中的阳性表达率分别为 57.1% (40/

70)、60% (42/70), 在宫颈上皮内瘤变阳性表达率分别为 53.3% (16/30)、63.3% (19/30), 在慢性宫颈炎中的阳性表达率均为 0 (0/20); c-jun、c-fos 的表达在宫颈癌组与宫颈炎组间比较有显著差异 (P < 0.01), 但宫颈癌组与宫颈上皮内瘤变组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。c-jun、c-fos 在 70 例宫颈癌组织中 40 例均呈 ( + + ) ~ ( + + + ) 表达, c-jun 和 c-fos 表达与宫颈癌的临床分期、组织学分级、淋巴结转移等分组中比较差异具有统计学意义 (P < 0.05), 但与患者年龄及肿瘤的大小等分组中的表达差异无统计学意义 (P > 0.05, 表 1)。

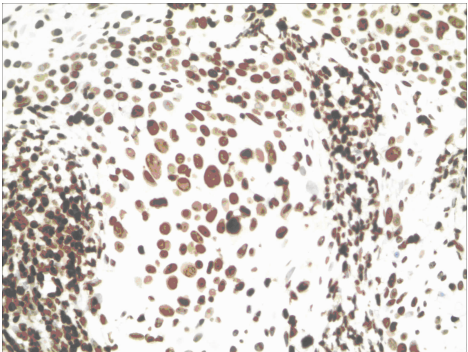


图 1 c-jun 在宫颈癌中阳性表达 (DAB  $\times 400$ )

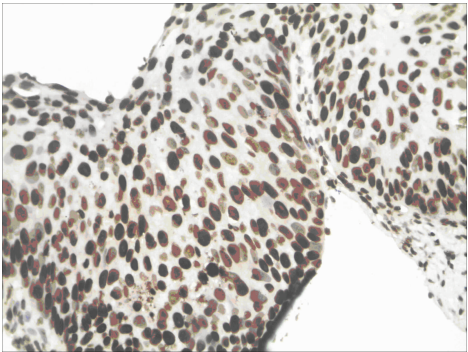


图 2 c-jun 在宫颈上皮内瘤变 (高等级) 中的阳性表达 (DAB  $\times 400$ )

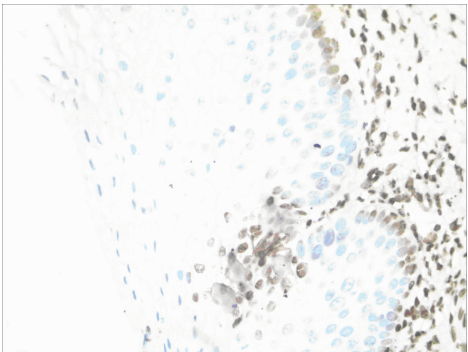


图 3 c-jun 在慢性宫颈炎中阴性表达 (DAB  $\times 400$ )

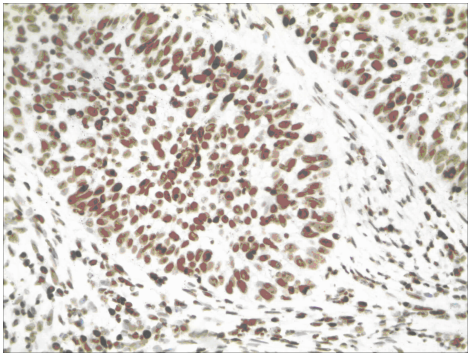


图 4 c-fos 在宫颈癌中阳性表达 (DAB ×400)

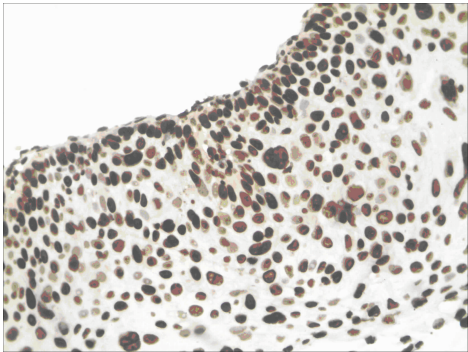


图 5 c-fos 在宫颈上皮内瘤变 (高等级) 中阳性表达 (DAB ×400)

表 1 c-jun、c-fos 与宫颈癌临床病理特征的关系 [n(%) ]

临床病理指标	n	c-jun 阳性率	c-fos 阳性率
临床分期			
I ~ II	42	19(45.2)	21(50.0)
III ~ IV	28	21(75.0) *	21(75.0) *
组织学分级			
1	22	8(36.4)	9(40.9)
2 ~ 3	48	32(66.7) *	33(68.8) *
肿瘤大小 (cm)			
≥4	31	16(51.6)	16(56.1)
<4	39	24(61.5)	26(66.7)
患者年龄 (岁)			
>50	39	25(64.1)	20(51.3)
≤50	31	15(48.4)	22(71.0)
盆腔淋巴结转移			
有	27	20(74.1)	21(77.8)
无	43	20(46.5) *	21(48.8) *

注:与同组不同分组比较, \*  $P < 0.05$

2.2 c-jun、c-fos 在宫颈鳞状细胞癌中表达的相关性 Spearman 等级相关分析显示,宫颈鳞状细胞癌组织中 c-jun 和 c-fos 的表达呈显著正相关 ( $r = 0.67, P < 0.05$ )。

3 讨 论

原癌基因 c-jun 和 c-fos 属于 myc 基因家族,其

蛋白表达产物 jun 和 fos 定位于细胞核,具有结合特异性 DNA 序列和激活基因转录的活性,属于核转录因子。jun 和 fos 在细胞中常以亮氨酸拉链结构域的异源二聚体 AP-1 的形式存在。这两者均可因结构改变而被激活为癌基因,通过 MAPKS 家族的磷酸化来调节激活前和新合成的 AP-1 活性,其产物可以结合到多种基因增强子上,导致靶基因的表达而引起致癌作用<sup>[4]</sup>。AP-1 信号通路是细胞中重要的信号转导通路,其活性增高与恶性肿瘤的形成、浸润、转移均关系密切,是近年来的研究热点。有研究表明<sup>[5]</sup>,AP-1 信号通路活化与肿瘤的发生、发展密切相关,许多参与肿瘤发生和进展的基因序列上,都存在 AP-1 的结合位点。在细胞受到各种刺激后,AP-1 蛋白水平短暂而迅速升高,并转变为以 c-jun 和 c-fos 异源二聚体为主要存在形式<sup>[6]</sup>。fos 和 jun 蛋白水平的增高,对于这些依赖 AP-1 转录激活的基因来说是必须的,且活化的 AP-1 能通过调控下游靶基因促进转移瘤新生血管的形成、肿瘤细胞运动增强、黏附分子的异常表达等环节来促进肿瘤侵袭转移。Juneja 等<sup>[7]</sup>通过 RNA 干扰的方法发现在敲除 AP-1 转录因子的结肠癌中,能通过减少 MACC1 的表达使结肠癌转移率降低,并证实人类结肠癌中,c-jun 水平与结肠癌进展及异时转移率显著相关。Lee 等<sup>[8]</sup>通过研究膀胱癌 5673 和 T-24 细胞株发现,炎症细胞因子 IL-5 及其受体 IL-5Rα 能通过激活转录因子 AP-1 的表达提高膀胱癌细胞肌层浸润及转移的能力。Ding 等<sup>[9]</sup>的研究则显示在小鼠的鳞状细胞癌模型中,通过组蛋白去甲基赖氨酸特异性脱甲基 4A(KDM4A)诱导 AP-1 转录因子的基因编码,能促进鳞状细胞癌的浸润性生长及转移能力;而敲除 KDM4A 则能降低生长因子介导的信使 RNA 的表达,并能使包括 jun 和 fos 蛋白的 AP-1 家族的蛋白水平表达下降,抑制淋巴结转移。同样,在人类鳞状细胞癌组织中,也观察到丰富的 KDM4A 与 jun 和 fos 蛋白水平高度相关,且高水平的 KDM4A 以及 jun 和 fos 蛋白水平均能增加淋巴结癌转移,其机制可能与 KDM4A 诱导 AP-1 活性的正反馈循环有关。这一发现为肿瘤治疗提供了新思路,通过抑制 AP-1 通路的活化似乎可抑制侵袭性鳞状细胞癌的生长和转移。

本研究显示,AP-1 信号通路的重要组分 c-jun 和 c-fos 在慢性宫颈炎中均呈阴性表达,而在宫颈上皮内瘤变及宫颈鳞状细胞癌中出现过表达,且在宫颈鳞癌中的表达随肿瘤组织分化程度的降低及临床分期升高而阳性率逐渐增高,结果与现有研究报道

相符。Prusty 等<sup>[10]</sup>研究发现 c-jun 和 c-fos 表达强度随宫颈上皮内瘤变级别增高其强度亦逐步增强,在宫颈浸润性癌中均呈强表达,由于宫颈上皮内瘤变及子宫颈鳞状细胞癌均为 HPV 感染相关性疾病,而女性宫颈癌被认为与高危型 HPV 尤其是 16/18 型感染相关,在这瘤变进程中 AP-1 转录因子起着重要的调控作用,提示 c-jun 和 c-fos 在宫颈鳞状细胞癌的形成及发展过程中可能起到了一定的促进作用,并有望通过下调 c-jun 和 c-fos 水平来逆转 AP-1 活性治疗宫颈癌并及早用于临床。

此外,本研究还显示 c-jun 和 c-fos 在宫颈鳞状细胞癌中的表达呈正相关,这也与多数研究结果<sup>[11-12]</sup>吻合。作为 AP-1 家族共同成员,c-jun 和 c-fos 两种核蛋白的共同表达可能是细胞不断增殖的触发点,它们之间能通过协同作用影响其他癌基因表达,从而使细胞在基因水平发生失控性生长并最终导致癌变。c-jun 和 c-fos 都可以诱导转录因子 AP-1 在肿瘤转移中发挥重要的作用。c-jun 能抑制人类多种肿瘤细胞的侵袭性生长,c-fos 在哺乳动物的上皮细胞中异常表达可以引起上皮细胞极性消失、上皮细胞和类成纤维细胞互相转化,以及细胞向胶原中侵入以利于肿瘤细胞的浸润转移,c-jun 和 c-fos 还能调节一些血管生成因子的表达,如在纤维肉瘤中通过激活血管生成因子 proliferin 促进肿瘤新生血管形成<sup>[13]</sup>。c-jun 和 c-fos 在宫颈鳞状细胞癌的强表达不仅提示肿瘤细胞增殖异常活跃而且与组织学分级差及肿瘤病理分期晚显著相关,因此似可用作临床医生对于宫颈鳞状细胞癌预后判断的参考指标之一。

综上所述,AP-1 通路活化在宫颈鳞状细胞癌的发生和发展中可能发挥着重要作用,HPV 感染与 AP-1 通路活化在宫颈鳞状细胞癌发生、发展中的相关性及其机制有待于进一步的研究证实。

# 【参考文献】

[1] Kokawa K,Takekida S,Kamiura S,et al. The incidence,treatment and prognosis of cervical carcionma in young women;a retrospec-

tive analysis of 4,975 cases in Japan[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2010,31(1):37-43.

[2] Poljak M,Ostrbenk A. The abbot real time high risk HPV test is a clinically validated human papillomavirus assay for triage in the referral population and use in primary cervical cancer screening in women 30 years and older;a review of validation studies[J]. Acta Dermatovenrol Alp Panonica Adriat,2013,22(2):43-47.

[3] Nur S,Chuang L,Ramaswamy G. Immunohistochemical characterization of cancer antigen in uterine cancers[J]. Int J Gynecol Cancer,2006,16(5):1903-1910.

[4] de Wilde J,De-Castro Arce J,Snijders PJ,et al. Alterations in AP-1 and AP-1 regulatory genes during HPV-induced carcinogenesis[J]. Cell Oncol,2008,30(1):77-87.

[5] 朱 宁,原继荣,王德莹. c-fos 和 c-jun 与癌症关系的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,20(2):6-7.

[6] Maritz MF,van der Watt PJ,Holderness N,et al. Inhibition of AP-1 suppresses cervical cancer cell proliferation and is associated with p21 expression[J]. Biol Chem,2011,392(5):439-448.

[7] Juneja M,Ilm K,Schlag PM,et al. Promoter identification and transcriptional regulation of the metastasis gene MACC1 in colorectal cancer[J]. Mol Oncol,2013,7(5):929-943.

[8] Lee EJ, Lee SJ, Kim S, et al. Interleukin-5 enhances the migration and invasion of bladder cancer cells via ERK1/2-mediated MMP-9/NF-κB/AP-1 pathway:involvement of the p21WAF1 expression[J]. Cell Signal,2013,25(10):2025-2038.

[9] Ding X,Pan H,Li J,et al. Epigenetic activation of API promotes squamous cell carcinoma metastasis[J]. Sci Signal,2013,6(273):1-13.

[10] Prusty BK, Das BC. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin[J]. Int J Cancer,2005,113(6):951-960.

[11] 熊 晶,刘凤英,陶光实. c-fos 和 c-jun 在宫颈癌、CIN 及宫颈炎中的表达及意义[J]. 现代生物医学进展,2009,9(4):687-689.

[12] 晋红中,王家璧. c-jun c-fos 在尖锐湿疣和宫颈鳞状细胞癌发病中的作用[J]. 中国皮肤性病杂志,2001,15(3):159-162.

[13] Toft DJ,Rosenberg SB,Bergers G,et al. Reactivation of proliferin gene expression is associated with increased angiogenesis in a cell culture model of fibrosarcoma tumor progression[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98(23):13055-13059.

(收稿日期:2013-09-02;修回日期:2014-01-04)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)