整合素α2β1和CD44V4与早期宫颈鳞癌淋巴结转移的关系

刘淑娟[1],金翠红[2]

(1.承德市妇幼保健院,河北 承德 067000;2.滦平县中医院,河北 滦平 068250)

摘　要:[目的]探讨整合素α2β1和CD44V4与早期宫颈鳞癌淋巴结转移的关系。[方法]收集我院宫颈鳞癌Ⅰb1期标本81份,正常宫颈组织20份和宫颈鳞状细胞原位癌组织20份。采用实时定量PCR和免疫组化法分别检测组织中整合素α2β1和CD44V4的表达,另外采用免疫组化法检测标记D2-40标记的淋巴管密度(LVD)。采用Pearson分析检验整合素α2β1、CD44V4和LVD相关性。[结果]宫颈癌组织中整合素α2β1和CD44V4 mRNA的相对表达量分别为1.1±0.2和1.3±0.1,均高于正常宫颈组织[(0.1±0.0)和(0.1±0.0)]和鳞状细胞原位癌组织[(0.3±0.1)和(0.3±0.1)](*P*<0.05)。宫颈癌组织中整合素α2β1和CD44V4蛋白的阳性表达率分别为87.7%和85.2%,均高于正常组织(5.0%和10.0%)和鳞状细胞原位癌组织(70.0%和40.0%)(*P*<0.05)。高中分化宫颈癌患者整合素α2β1和CD44V4阳性率均低于低分化患者,且有淋巴结转移患者高于无转移患者(*P*<0.05)。宫颈癌组织LVD均高于鳞状细胞原位癌组织和正常组织,高中分化和有淋巴结转移的宫颈癌组织LVD较高(*P*<0.05)。宫颈癌组织中整合素α2β1和CD44V4表达呈正相关(*r*=0.687,*P*<0.05),整合素α2β1表达与LVD呈正相关(*r*=0.559,*P*<0.05),CD44V4表达与LVD呈正相关(*r*=0.612,*P*<0.05)。[结论]整合素α2β1和CD44V4可促进早期宫颈鳞癌的发生、发展和淋巴结转移,两者可能发挥协同作用。

主题词:整合素α2β1;CD44V4;宫颈鳞癌;淋巴结转移

中图分类号:R737.33　　文献标识码:A　　文章编号:1671-170X(2019)11-0972-04

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2019.11.B009

Relationship Between Integrinα2β1 and CD44V4 and Lymph Node Metastasis in Early Cervical Squamous Cell Carcinoma

LIU Shu-juan[1],JIN Cui-hong[2]

(1.*Chengde Maternal and Child Health Hospital*, *Chengde* 067000,*China*; 2. *Luanping County Hospital of Traditional Chinese*, *Luanping* 068250,*China*)

Abstract:[Objective] To investigate the relationship between integrinα2β1 and CD44V4 and lymph node metastasis in early cervical squamous cell carcinoma. [Methods] A total of 81 samples of Ⅰb1 stage specimens of cervical squamous cell carcinoma,20 normal cervical tissues and 20 cervical squamous cell carcinoma in situ were selected in this study. The expression of integrin α2β1 and CD44V4 in the tissues was detected by real-time quantitative PCR and immunohistochemistry,and the lymphatic density(LVD) marked by D2-40 was detected by immunohistochemistry. Pearson analysis was used to examine the correlation between integrin alphaα2β1, CD44V4 and LVD. [Results] The expression of integrinα2β1 and CD44V4 mRNA in cervical cancer tissues (1.1±0.2 and 1.3±0.1) was higher than that in normal cervical tissue (0.1±0.0 and 0.1±0.0) and squamous cell carcinoma tissue (0.3±0.1 and 0.3±0.1)(*P*<0.05). The positive rate of integrinα2β1 and CD44V4 protein in cervical cancer tissues (87.7% and 85.2%) was higher than that in normal tissue(5.0% and 10.0%) and squamous cell carcinoma tissue(70.0% and 40.0%)(*P*<0.05). The positive rates of integrinα2β1 and CD44V4 in patients with differentiated cervical cancer were lower than those with low differentiation,and the patients with lymph node metastasis were higher than those without metastasis (*P*<0.05). The LVD of cervical cancer tissue was higher than the squamous cell carcinoma in situ and normal tissue. High differentiation and lymph node metastasis of cervical cancer with higher LVD (*P*<0.05). Pearson analysis showed that the expression of integrinα2β1 and CD44V4 in cervical cancer tissues was positively correlated(*r*=0.687,*P*<0.05),and the expression of integrinα2β1 was positively correlated with LVD (*r*=0.559,*P*<0.05), and the expression of CD44V4 was positively correlated with LVD(*r*=0.612,*P*<0.05). [Conclusion] Integrinα2β1 and CD44V4 can promote the occurrence,development and lymph node metastasis of early cervical squamous cell carcinoma. They may play a synergistic role and need further study.

Subject words:integrinα2β1;CD44V4;cervical squamous cell carcinoma;lymph node metastasis

基金项目:承德市科学技术研究与发展计划项目(201804A002)

通信作者:金翠红,副主任医师,本科;滦平县中医院妇产科,河北省承德市滦平县新建路保健道578号(068250),E-mail:1229105545@qq.com

收稿日期:2019-03-12;修回日期:2019-05-22

既往研究发现早期宫颈癌患者会出现淋巴结转移，大部分患者死于癌症转移和(或)复发[1-2]。淋巴结转移是早期宫颈癌转移的主要途径，是影响患者预后的独立危险因素[3]。早期宫颈癌淋巴结转移是一个复杂的过程，其中细胞黏附分子的改变发挥重要作用。整合素α2β1是α2亚基和β1亚基构成的二聚体，具有细胞粘附作用和信号转导作用，其在肝癌、乳腺癌、胃癌等组织中高表达[4]。CD44V4是CD44家族中的一员，可以介导细胞-细胞、细胞-EMC的相互作用，在肿瘤细胞粘附、转移中发挥重要作用[5]。本研究旨在探讨整合素α2β1和CD44V4与早期宫颈鳞癌淋巴结转移的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2016年6月至2017年11月在我院行宫颈癌根治术患者81例作为研究对象(宫颈浸润性鳞状细胞癌组)，FIGO分期均为Ⅰb1期，病理类型均为鳞癌。患者术前均未行放疗或化疗。患者年龄31~68岁，平均年龄(50.3±6.8)岁；淋巴结转移36例，无转移45例；高中分化52例，低分化29例。此外，选择20例正常宫颈组织(正常宫颈组)和20例宫颈鳞状细胞原位癌作为对照(原位鳞状细胞癌组)。本研究经医院伦理委员会批准，患者均知情同意。

1.2 方 法

1.2.1 整合素α2β1和CD44V4 mRNA表达检测

采用实时定量PCR法检测mRNA的表达，首先将RNA逆转录为cDNA，然后进行定量检测。反转录体系包括：RNA模板2μl、dNTP 2μl、$MgCL_2$ 2μl、EDPC补充至总体积为25μl。反应参数为：95℃预变性4min→95℃变性40s→58℃退火30s→72℃延伸30s，循环共40次。采用-ΔΔCT法计算mRNA的相对表达水平($2^{-\Delta\Delta CT}$)，ΔΔCT=ΔCT(样本)-ΔCT(对照)，ΔCT=CT(目的基因)-ΔCT(内参)[6]。实验中的引物均由北京嘉美生物公司设计并提供。

1.2.2 整合素α2β1、CD44V4和D2-40表达检测

采用免疫组化法检测蛋白表达水平，癌组织标本采用石蜡包埋，连续切片(厚度3~5μm)，用二甲苯进行脱蜡，85%酒精脱水，3%过氧化氢孵育10min后用PBS冲洗，抗原修复，使用山羊抗血清封闭1h，一抗4℃孵育过夜，二抗室温孵育，最后加DAB显色，ddH_2O冲洗、复染、脱水、透明和封片。

整合素α2β1和CD44V4蛋白阳性表达主要定位于细胞膜上，呈棕褐色或者棕黄色。每张切片在高倍镜下选择10个视野进行分析，染色细胞<10%为阴性(-)，≥10%为阳性(+)[7]。D2-40用来标记淋巴管密度(lymphatic vessel density，LVD)，D2-40阳性细胞主要位于淋巴内皮细胞，呈棕黄色，标记的淋巴管多为闭塞状态，呈孤立状、条状。400倍镜下对LVD进行观察和计算。LVD在宫颈癌组织中为瘤中心组织实质内LVD，正常宫颈组织中为基底膜下2mm间质内LVD[8]。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0进行统计学分析，计量资料采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD检验；两组独立样本比较采用t检验；计数资料组间比较采用卡方检验；相关性检验采用Pearson分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

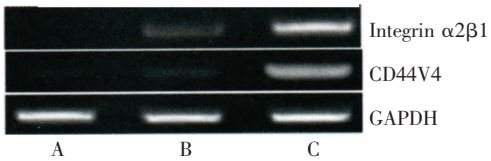
2.1 宫颈组织中整合素α2β1和CD44V4 mRNA表达

宫颈癌组织中整合素α2β1和CD44V4 mRNA表达均高于正常宫颈组织($t=12.494$；$t=67.728$)和鳞状细胞原位癌组织($t=23.872$；$t=32.222$)($P<0.05$)(Table 1，Figure 1)。

Table 1 Expression of integrin α2β1 and CD44V4($\bar{x}\pm s$)

Group	N	Integrin α2β1	CD44V4
Normal cervical	20	0.1±0.0	0.1±0.0
Squamous cell carcinoma in situ	20	0.3±0.1*	0.3±0.1*
Invasive squamous cell carcinoma of cervix	81	1.1±0.2*#	1.3±0.1*#

Compared with normal cervical group，*$P<0.05$；compared with in situ squamous cell carcinoma group，#$P<0.05$



A：Normal cervical；B：Squamous cell carcinoma in situ；C：Invasive squamous cell carcinoma of cervix

Figure 1 Expression of integrin α2β1 and CD44V4 mRNA

2.2 整合素 α2β1 和 CD44V4 蛋白阳性表达率

宫颈癌组织中整合素 α2β1 和 CD44V4 蛋白的阳性表达率均高于正常组织(χ^2=53.535;χ^2=43.423)和鳞状细胞原位癌组织(χ^2=3.750;χ^2=18.077),差异均有统计学意义(P<0.05)(Table 2,Figure 2,3)。

2.3 整合素 α2β1 和 CD44V4 与宫颈癌病理参数的关系

高中分化宫颈癌患者整合素 α2β1 和 CD44V4 阳性率均低于低分化患者(χ^2=2.719;χ^2=2.486),且有淋巴结转移患者高于无转移患者(χ^2=8.471;χ^2=9.859),差异均有统计学意义(P<0.05)(Table 3)。

2.4 淋巴管密度与病理参数的关系

宫颈癌组织 LVD 均高于鳞状细胞原位癌组织和正常组织(F=38.261),高中分化和有淋巴结转移的宫颈癌组织 LVD 较高(t=18.339;t=19.644),差异均有统计学意义(P<0.05)(Table 4)。

2.5 整合素 α2β1 和 CD44V4 与 LVD 相关性

Pearson 分析发现,宫颈癌组织中整合素 α2β1 和 CD44V4 的表达呈正相关(r=0.687,P<0.05),整合素 α2β1 表达与 LVD 呈正相关(r=0.559,P<0.05),CD44V4 表达与 LVD 呈正相关(r=0.612,P<0.05)。

Table 2 Positive expression of integrin α2β1 and CD44V4 protein [*n*(%)]

Group	N	Integrin α2β1	CD44V4
Normal cervical	20	1(5.0)	2(10.0)
Squamous cell carcinoma in situ	20	14(70.0)	8(40.0)
Invasive squamous cell carcinoma of cervix	81	71(87.7)	69(85.2)

Table 3 Relationship between integrinα2β1,CD44V4 and pathological parameters[n(%)]

Pathological parameters	N	Integrinα2β1(+)	CD44V4(+)
Pathological typing			
High and medium differentiation	52	43(82.7)	40(76.9)
Poorly differentiated	29	27(93.1)*	26(89.7)*
Lymph node metastasis			
Yes	36	35(97.2)	31(86.1)
No	45	33(73.3)#	24(53.3)#

Compared with the high school differentiation group,*P<0.05;compared with the lymph node metastasis group,#P<0.05

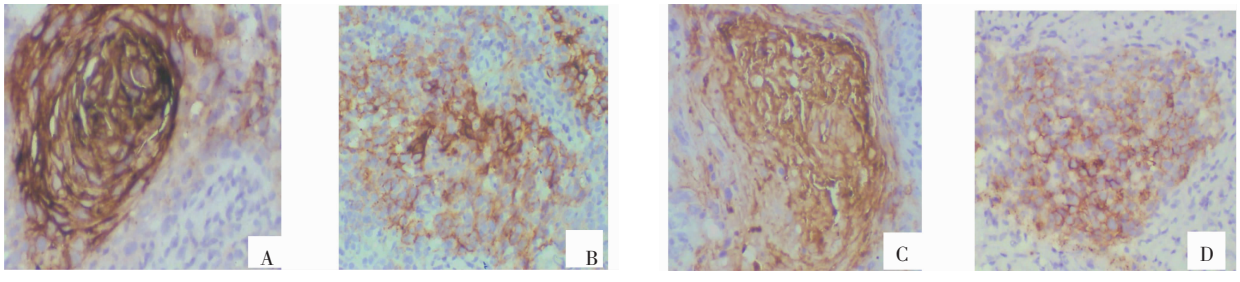
Table 4 Relationship between LVD and pathological parameters

Pathological parameters		N	LVD
Disease types	Normal cervix	20	1.4±0.1*
	Squamous cell carcinoma in situ	20	6.3±0.5*
	Invasive squamous cell carcinoma of cervix	81	12.8±2.5
Pathological typing	High and medium differentiation	52	7.6±1.7#
	Poorly differentiated	29	16.0±2.3
Lymph node metastasis	Yes	36	27.0±3.4@
	No	45	15.5±2.0

Compared with invasive squamous cell carcinoma of cervix,*P<0.05,compared with poorly differentiated group,#P<0.05,compared with non-lymph node metastasis group,@P<0.05.

3 讨 论

淋巴结转移是早期宫颈癌转移的主要途径,是影响患者预后的独立危险因素[3]。LVD 是评价淋巴管血管生成的重要指标[8]。D2-40 抗体是唾液酸糖



A:Cervical squamous cell carcinoma (keratosis)

B:Cervical squamous cell carcinoma (non-keratosis)

C:Cervical squamous cell carcinoma (keratosis)

D:Cervical squamous cell carcinoma(non-keratosis)

Figure 2 Integrin α2β1 protein expression in normal cervical mucosa and cervical squamous cell carcinoma (keratinized and non-keratinized) (DAB,×200)

Figure 3 The expression of CD44V3 protein in normal cervical mucosa and cervical squamous cell carcinoma (keratinized and non-keratinized)(DAB,×200)

蛋白，可以结合肿瘤淋巴管内表皮表面的抗原，可以用来标记乳腺癌、宫颈癌和肺癌等淋巴管[8-9]。本研究发现，D2–40 标记的 LVD 在宫颈癌组最高，且在低分化和伴有淋巴结转移的宫颈癌组织中较高。

整合素 α2β1 是 α2 亚基和 β1 亚基构成的二聚体，具有细胞粘附作用和信号转导作用，其在肝癌、乳腺癌、胃癌等组织中高表达[4]。整合素 α2β1 在宫颈癌淋巴结转移中的研究较少。本研究发现，宫颈癌组织中整合素 α2β1 蛋白的阳性表达率均高于正常组织和鳞状细胞原位癌组织，且在低分化和有淋巴结转移的癌组织中表达水平较高。既往有研究发现，整合素 α2β1 在宫颈癌细胞株中高表达，并且整合素的表达可以激活基质金属蛋白酶–2 活化，进而促进肿瘤的侵袭和生长[10]。CD44V4 是 CD44 家族中的一员，可以介导细胞–细胞、细胞–EMC 的相互作用，在肿瘤细胞粘附、转移中发挥重要作用[11]。既往研究发现，CD44V4 高表达与食管癌、直肠癌、胆道癌和胃癌等淋巴结转移有关[12–14]。有学者发现，宫颈癌组织中 CD44V6 高表达与淋巴结转移有关，并且患者的预后更差[15]。本研究发现，CD44V4 在正常组织、原位癌和宫颈癌组织中的表达水平逐渐升高，且低分化和有淋巴结转移者表达水平较高，结果说明 CD44V6 在宫颈癌的发生发展和转移中发挥重要作用。

本研究发现，宫颈癌组织中整合素 α2β1 和 CD44V4 表达呈正相关，整合素 α2β1 表达与 LVD 呈正相关，CD44V4 表达与 LVD 呈正相关。这与李键淇等[16]在胃癌中的研究结果一致。本研究的局限性在于：①为单中心研究，且样本相对较小；②缺乏随访；③由于样本量较小，未对年龄等因素进行分层分析；④本研究对象为宫颈鳞癌，未对腺癌进行分析。

综上，肿瘤组织中整合素 α2β1 和 CD44V4 的表达水平增高，宫颈鳞癌恶性程度增加，并且与肿瘤分化程度和淋巴结转移有关，两者在宫颈癌的发生、发展和淋巴结转移中可能发挥协同作用，需要进一步研究。

参考文献：

[1] Nanthamongkolkul K，Hanprasertpong J. Predictive factors of pelvic lymph node metastasis in early-stage cervical cancer[J]. Oncol Res Treat，2018，41(4)：194–198.

[2] Wu SG，Sun JY. Early-stage node negative cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma show similar survival outcomes after hysterectomy：a population-based study[J]. J Gynecol Oncol，2017，28(6)：e81.

[3] Yamada T，Nakanishi Y，Okamura K，et al. Impact of serum CA199 level on prognosis and prediction of lymph node metastasis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol，2018，10(1)：132–138.

[4] Wong KF，Liu AM，Hong W，et al. Integrin α2β1 inhibits MST1 kinase phosphorylation and activates yes-associated protein oncogenic signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget，2016，7(47)：77683–77695.

[5] Kawahara R，Niwa Y，Simizu S. Integrin β1 is an essential factor on vasculogenic mimicry in human cancer cells[J]. Cancer Sci，2018，109(8)：2490–2496.

[6] Zheng W，Zhao Z，Yi X，et al. Down-regulation of IFITM1 and its growth inhibitory role in cervical squamous cell carcinoma[J]. Cancer Cell Int，2017，17(1)：88–94.

[7] Wang HR，Liu GD，Chen W，et al. Clinical value of p16/Ki-67 immunocytochemical dual staining in cervical cancer screening[J]. Chin J Oncol，2017，39(8)：636–640.[王海瑞，廖光东，陈汶，等. p16/Ki-67 免疫细胞化学双染在宫颈癌筛查中的应用价值[J]. 中华肿瘤杂志，2017，39(8)：636–640.]

[8] He KW，Sun JJ，Liu ZB，et al. Prognostic significance of lymphatic vessel invasion diagnosed by D2–40 in Chinese invasive breast cancers[J]. Medicine，2017，96(44)：e8490.

[9] Ero ğ lu A，Ersöz C，Karasoy D，et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF)-C，VEGF-D，VEGFR-3 and D2–40 expressions in primary breast cancer：association with lymph node metastasis[J]. Adv Clin Exp Med，2017，26(2)：245–249.

[10] Zhu H，Chen A，Li S，et al. Predictive role of galectin-1 and integrin α5β1 in cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy of bulky squamous cervical cancer[J]. Biosci Rep，2017，37(5)：1–7.

[11] Joosten SPJ，Zeilstra J，van Andel H，et al. MET signaling mediates intestinal crypt-villus development，regeneration，and adenoma formation and is promoted by stem cell CD44 isoforms[J]. Gastroenterology，2017，153(4)：1040–1053.

[12] Wang L，Zuo X，Xie K，et al. The role of CD44 and cancer stem cells[J]. Methods Mol Biol，2018，1692(1)：31–42.

[13] Liu M，Di J. Comparison of EpCAM(high)CD44(+) cancer stem cells with EpCAM(high)CD44(–) tumor cells in colon cancer by single-cell sequencing[J]. Cancer Biol Then，2018，19(10)：939–947.

[14] Chen C，Zhao S，Karnad A，et al. The biology and role of CD44 in cancer progression：therapeutic implications[J]. J Hematol Oncol，2018，11(1)：64–71.

[15] Valenti G，Vitale SG，Tropea A，et al. Tumor markers of uterine cervical cancer：a new scenario to guide surgical practice?[J]. Updates Surg，2017，69(4)：441–449.

[16] Li JQ，Qi JM. Expression and significance of integrin alpha 2 beta 1 and CD44v4 in gastric cancer[J]. Chin J Geront，2017，37(4)：910–912.[李键淇，齐洁敏. 整合素 α2β1 及 CD44v4 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 中国老年学杂志，2017，37(4)：910–912.]