

CISD2 在早期宫颈腺癌中的表达和临床意义

刘璐欣, 何 勉*, 刘军秀, 夏 梦, 王 晶
(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】: 探讨 CISD2 在早期宫颈腺癌组织中的表达及其与临床特征的关系。【方法】采用免疫组织化学染色法分析 CISD2 在 56 例 FIGO 分期为 IB-IIA 期的早期宫颈腺癌组织中的表达, 并以 3 例正常宫颈组织作为阴性对照。运用统计学分析 CISD2 表达水平与早期宫颈腺癌的临床病理特点与预后的关系。【结果】CISD2 在 FIGO 分期为 IB-IIA 期的早期宫颈腺癌患者组织中 44.6% 为高表达, 55.4% 为低表达, 在正常宫颈组织中不表达。CISD2 的表达水平与早期宫颈腺癌患者深肌层浸润 ($P = 0.023$), 淋巴结转移 ($P = 0.003$) 和卵巢转移 ($P = 0.014$) 有明显相关。高表达 CISD2 的早期宫颈腺癌患者 5 年生存率明显低于 CISD2 低表达患者 ($P = 0.002$)。多因素分析提示 CISD2 的表达水平是早期宫颈腺癌患者总体生存期的独立预测指标 ($P = 0.027$)。【结论】在早期宫颈腺癌患者中 CISD2 的表达与临床特征和预后有关, 它可能是一种新的预测早期宫颈腺癌患者预后的分子标志物。

关键词: CISD2; 早期宫颈腺癌; 预后标志物

中图分类号: R737.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2015)05-0728-06

Expression of CISD2 in Early-stage Cervical Adenocarcinoma and Its Clinical Significance

LIU Lu-xin, HE Mian*, LIU Jun-xiu, XIA Meng, WANG Jing

(Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: HE Mian; E-mail: drhemian@hotmail.com

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the expression of CISD2 in early-stage cervical adenocarcinoma tissues and its association with the clinical features. 【Methods】 CISD2 expression was examined by immunohistochemical method in 56 cases of early-stage (FIGO stage IB-IIA) cervical adenocarcinoma tissues, and 3 cases of normal cervical tissues were used as negative control. Statistical analyses were performed to evaluate the association between CISD2 expression and the clinicopathological characteristics and prognosis of early-stage cervical adenocarcinoma. 【Results】 CISD2 expression was positive in early-stage (FIGO stage IB-IIA) cervical adenocarcinoma tissues; CISD2 high expression accounted for 44.6% and CISD2 low expression was 55.4%, but negative in normal cervical tissues. The level of CISD2 expression was significantly correlated with deep myometrium invasion ($P = 0.023$), lymph node metastasis ($P = 0.003$) and ovarian metastasis ($P = 0.014$). Patients with high CISD2 expression had a lower 5-year survival rate than patients with low CISD2 expression ($P = 0.002$). Multivariate analysis suggested that CISD2 expression was an independent prognostic marker for survival in patients with early-stage cervical adenocarcinoma ($P = 0.027$). 【Conclusion】 CISD2 expression was closely associated with clinical features and prognosis, and it might be a novel biomarker for the prediction of prognosis of early-stage cervical adenocarcinoma.

Key words: CISD2; early-stage cervical adenocarcinoma; prognostic marker

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(5):728-733]

而宫颈腺癌的发病率占有所有宫颈癌的 10% ~ 20%^[1-2], 近年来呈上升趋势, 并且这种上升趋势在

常规接受细胞学涂片筛查年龄小于 40 岁的年轻妇女中表现得尤为突出^[3-4]。因此, 我们有必要进

收稿日期: 2015-04-05

基金项目: 广东省自然科学基金(S2013010015552)

作者简介: 刘璐欣, 硕士研究生, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: liuluxin19900320@163.com; * 通信作者: 何勉, 教授, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: drhemian@hotmail.com

一步了解宫颈腺癌的病因,同时寻找更有效的宫颈腺癌患者预后的肿瘤标志物,以指导临床治疗及预后判断^[5]。CISD2(CDGS iron sulfur domain 2)是包含 CDGS 铁硫簇结合结构域的基因家族成员之一,位于第四号染色体长臂上^[6]。有研究发现 CISD2 参与了哺乳动物寿命的调控,其机制可能与 CISD2 蛋白能维持线粒体外膜稳定性有关^[6-9]。CISD2 的缺失可导致线粒体外膜的分解和功能的破坏,引发细胞自噬死亡反应,最终表现为一系列早衰的症状^[8-9]。近来 Sohn 等^[10]进一步发现 CISD2 在乳腺癌细胞系中表达升高,而且它通过维持线粒体结构和功能的稳定来促进乳腺癌细胞增殖和肿瘤的生长^[8],因此在肿瘤的治疗中有潜在线粒体靶向蛋白的作用。不过目前还没有 CISD2 在宫颈癌患者中临床及预后意义的研究,而且也未见其在宫颈腺癌中作用的相关报道。因此,本研究通过观察 CISD2 在早期宫颈腺癌中的表达,分析其与早期宫颈腺癌患者临床特征及其预后的关系,进而探索 CISD2 在早期宫颈腺癌中的作用,为寻找新的宫颈腺癌预后标志物提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

我院 2005 年至 2009 年间 FIGO 分期为 IB-IIA 期的早期宫颈腺癌患者,IB 期 47 例,IIA 期 9 例,年龄 31~63 岁,中位年龄 44 岁,均采用根治性子宫切除+盆腔淋巴结清扫术,术前均未行放疗。收集患者术后石蜡包埋宫颈腺癌组织标本,对其进行为期 5 年以上的随访。将 3 例正常宫颈组织作为 CISD2 表达阴性对照,这 3 例正常宫颈组织均取自因子宫肌瘤行单纯子宫切除的患者。以上标本应用均获患者及其家属知情同意,具体临床资料见表 1。

1.2 研究方法

1.2.1 免疫组化法 免疫组化的试剂分别为 CISD2 兔抗人多克隆抗体(1:100,Proteintech,13318-1-AP),SP 及 DAB 显色试剂盒(北京康为世纪生物公司)。56 例早期宫颈腺癌组织石蜡切片采用 SP 法染色,严格按照试剂盒说明书进行操作,每个染色流程均设有对照以作为染色质量控制标准。步骤如下:石蜡切片厚约 4 μm ,65 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 0.5 h,常规二甲苯脱蜡、梯度酒精水化,微波炉硝

尿酸盐缓冲液抗原修复(pH 6.0),3% H_2O_2 孵育 30 min 以去除内源性过氧化物酶,1%山羊血清封闭非特异性结合位点,一抗孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。室温孵育二抗 1 h,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木素复染后脱水、透明、封片,显微镜下观察。

1.2.2 免疫组化染色结果判断 免疫组化染色评分标准按参考文献方法进行^[11],由 2 位病理科医师进行双盲评分。具体评分标准如下:细胞染色强度评分:0 分(无染色),1 分(浅黄色),2 分(棕黄色),3 分(棕色或黑色);染色阳性细胞分布评分:0 分(无阳性染色细胞),1 分(<10%染色阳性细胞),2 分(10%~50%染色阳性细胞),3 分(>50%染色阳性细胞)。评分=染色强度 \times 染色阳性细胞分布,分别评分为 0、1、2、3、4、6 和 9 分。CISD2 表达高低的截断值参考总体生存的 Log-rank 检验值,本研究中以 ≥ 4 分为 CISD2 高表达,<4 分为 CISD2 低表达。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,卡方检验,Fisher 确切概率法及 Spearman 秩相关用于分析 CISD2 与临床病理特点的关系,Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验分析 CISD2 蛋白表达高低与患者 5 年生存率的关系。Cox 比例风险回归模型单因素和多因素分析各临床病理因素和 CISD2 的表达与早期宫颈腺癌患者预后的关系,所有统计学分析以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

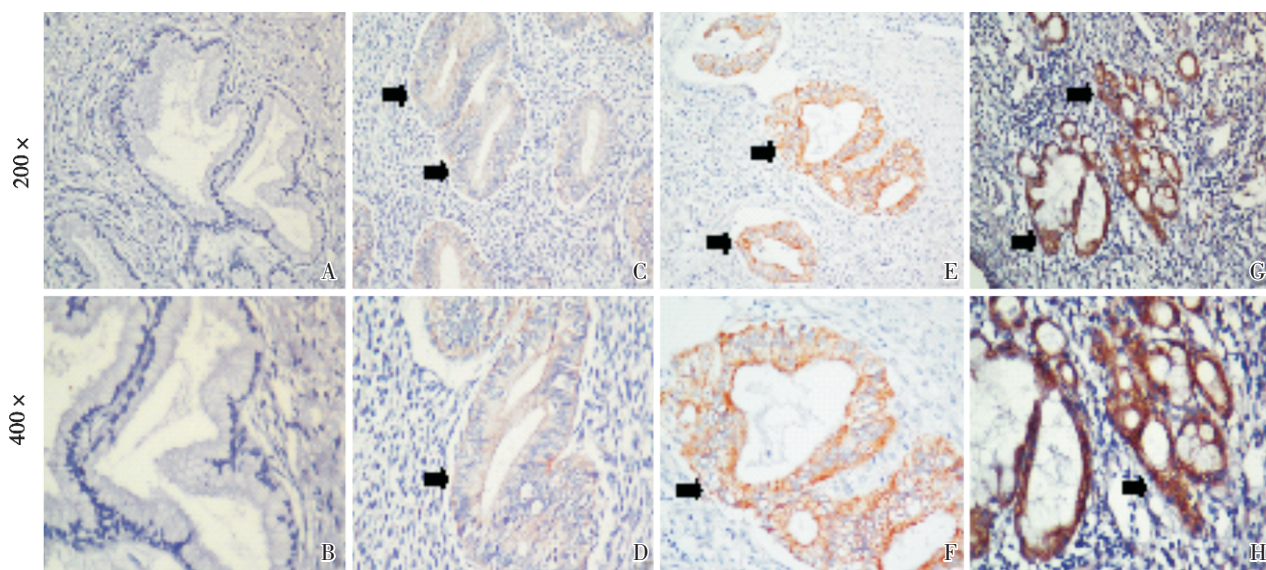
2 结果

2.1 CISD2 在正常宫颈组织和宫颈腺癌组织中的表达

CISD2 在正常宫颈组织中不表达(图 1A,B),而在宫颈腺癌组织中表达阳性,且主要定位于宫颈腺癌细胞的胞浆,其染色强度(图 1)分为弱、中、强。其中 CISD2 高表达患者 25 例,占 44.6%,低表达患者 31 例,占 55.4%(表 1)。

2.2 早期宫颈腺癌中 CISD2 的表达与临床病理的关系

对 56 例早期宫颈腺癌患者组织石蜡切片的免疫组化结果与临床病理特点之间相关性采用卡方检验和 Fisher 确切概率法分析如表 2 所示:CISD2 的表达水平与患者的年龄,肿瘤生长类型,



A.B: CISD2 expression was negative in normal cervical tissues; C.D: representative images of weak CISD2 staining in cervical adenocarcinoma tissues; E.F: representative images of moderate CISD2 staining in cervical adenocarcinoma tissues; G.H: representative images of strong CISD2 staining in cervical adenocarcinoma tissues; black arrows: CISD2 expression was positive in the cytoplasm of cervical adenocarcinoma cells.

图 1 免疫组化法检测 CISD2 在正常宫颈组织和早期宫颈腺癌组织中的表达

Fig.1 Immunohistochemical detection of CISD2 protein expression in normal cervical tissues and early-stage cervical cancer tissues

组织学类型, 病灶大小, 病理分级和切缘浸润无关, 但与深肌层浸润($P = 0.023$), 淋巴结转移($P = 0.001$)和卵巢转移($P = 0.009$)有关。进一步采用 Spearman 秩相关分析发现, CISD2 的表达与深肌层浸润的相关系数 r 为 0.305 ($P = 0.022$), 与淋巴结转移的相关系数 r 为 0.425 ($P = 0.001$), 与卵巢转移的相关系数 r 为 0.349 ($P = 0.008$)。这些结果说明, 在早期宫颈腺癌中 CISD2 高表达的患者更容易发生深肌层浸润、淋巴结转移和卵巢转移。

2.3 生存分析

通过 Kaplan-Meier 分析和 Log-rank 检验分析表明, 早期宫颈腺癌患者 5 年生存率在 CISD2 高表达和低表达中明显不同 ($P = 0.002$)。CISD2 低表达患者的 5 年累积生存率为 87.1%, 而 CISD2 高表达患者的 5 年累积生存率仅为 48.0%, 明显低于 CISD2 低表达患者。与 CISD2 低表达患者相比, CISD2 高表达的患者生存时间更短(图 2)。Cox 单因素回归分析结果表明, CISD2 高表达 ($P = 0.006$)、宫颈腺癌深肌层浸润($P = 0.048$)、淋巴结转移($P = 0.042$)是患者预后差的影响因素。多因素 Cox 回归分析结果表明只有 CISD2 表达水平的高低是影响患者预后的独立危险因素(relative

risk: 4.010, 95% CI: 1.168-13.768, $P = 0.027$; 表 3)。

3 讨论

目前发现宫颈癌的发病与人乳头状病毒(HPV)持续性感染有关, 其中 HPV16 和 18 亚型的感染约占 70%。随着宫颈脱落细胞检查、宫颈癌筛查策略的建立和实施, 宫颈癌的发病率呈进行性下降, 主要表现为鳞癌的发病率降低^[3,12]。而宫颈腺癌由于发病部位多在宫颈管内膜, 且大部分呈内生性生长, 细胞学筛查宫颈异常性腺细胞的有效性远远不及异常性鳞状细胞。常规的巴氏涂片对宫颈腺癌诊断的假阴性率超过 50%, 液基细胞学对于宫颈腺癌诊断敏感性是 65.6%^[5]。因此, 近年来研究人员一直在寻找其他特异性更强且更能准确反映宫颈腺癌预后的肿瘤分子标记物。李华等^[12]研究提示治疗前血 CA125 水平与宫颈癌的预后相关, 而且联合检测血清 CA125 和 CA199 对评估宫颈腺癌临床分期、指导治疗和预后评估有一定价值。不过也有研究报道虽然血 CA125 水平升高者其 5 年生存率低于 CA125 正常者, 但两者的

表 1 56 例早期宫颈腺癌患者的临床病理特征

Table 1 Clinicopathological characteristics of patient samples and expression of CISD2 in early-stage cervical adenocarcinoma

Characteristics	Number of cases (%)
Age (years)	
≤44	30(53.6)
> 44	26(46.4)
Types	
Exogenous	17(44.6)
Endogenous	25(30.4)
Ulcerative	14(15)
Histological types	
MUCUS adenocarcinoma	54(96.4)
Adenosquamous carcinoma	2(3.6)
Carcinoma diameter	
≤4 cm	45(80.4)
> 4 cm	11(19.6)
FIGO staging system	
Stage Ib	47(83.9)
Stage IIa	9(16.1)
Pathological grading	
Highly differentiated	11(19.6)
Moderately	29(51.8)
Poorly	10(17.9)
Unclassified	6(10.7)
Myometrium invasion	
< 1/2	38(67.9)
≥1/2	18(32.1)
Property of surgical margin	
Negative	54(96.4)
Positive	2(3.6)
Infiltration of parauterine organ	
No	56(100.0)
Yes	0(0.0)
Vascular invasion	
No	55(98.2)
Yes	1(1.8)
Lymph node metastases	
No	46(82.1)
Yes	10(17.9)
Ovarian metastases	
No	51(91.1)
Yes	5(8.9)
Vital status (at follow-up)	
Alive	39(69.6)
Dead	17(30.4)
Expression of CISD2	
Low expression	31(55.4)
High expression	25(44.6)

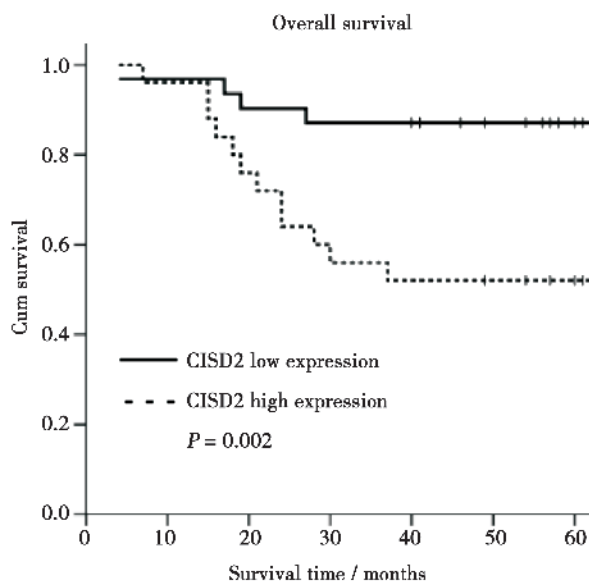


图 2 Kaplan-Meier 分析 CISD2 高表达和低表达患者生存率的差异

Fig.2 The survival rate between patients with high and low CISD2 expression was analyzed by Kaplan-Meier curves with univariate analyses (Log-rank)

差异无统计学意义^[13-14]。这类的研究尚存在争议, 因此进一步寻找新的且能更加有效地反映宫颈腺癌独立预后的肿瘤分子标记物具有重要临床意义。

CISD2 是包含 CDGSH 铁硫簇结合结构域的基因家族的成员之一, 是高度保守的基因, 位于被与人类寿命密切相关的第四号染色体长臂上^[6]。CISD2 蛋白主要位于线粒体外膜上, 有研究表明 CISD2 对维持线粒体结构和功能具有重要的作用, CISD2 的缺失可导致线粒体结构破坏和功能丧失, 并引发细胞自噬死亡反应^[8-9]。2009 年台湾阳明大学蔡亭芬等^[6-8]发现 CISD2 表达缺失后对线粒体的作用可最终影响寿命。他们发现敲除 CISD2 后的小鼠提前出现衰老的变化, 而持续稳定表达 CISD2 的小鼠可以延长寿命, 延缓衰老。不过虽然 CISD2 与线粒体关系密切, 且非常值得怀疑它是否参与肿瘤细胞的代谢, 但很长时间都没有 CISD2 在人类肿瘤中的相关报道。日前有研究发现 CISD2 可作为癌基因在乳腺癌细胞系 MCF-7, MDA-MB-468 和 HCC-70 中表达升高, 而且在乳腺癌细胞中抑制 CISD2 的表达后线粒体的氧自由基和铁呈失控性堆积, 细胞自噬反应激活, 肿瘤

表 2 早期宫颈腺癌患者中 CISD2 的表达与临床病理特点的关系

Table 2 Correlation between CISD2 expression and clinicopathologic characteristics of early-stage cervical adenocarcinoma patient

Characteristics	Total	Total	CISD2		Chi-square test <i>P</i> value
			Low expression	High expression	
Age (years)	≤44	30	15	15	0.386
	> 44	26	16	10	
Types of tumor growth	Exogenous	17	10	7	0.898
	Endogenous	25	13	12	
	Ulcerative	14	8	6	
Histological types	Mucus adenocarcinoma	54	29	25	0.196
	Adenosquamous carcinoma	2	2	0	
Pathological grading	Highly differentiated	11	8	3	0.104
	Moderately	29	12	17	
	Poorly	10	8	2	
	Unclassified	6	3	3	
Carcinoma diameter	≤4 cm	45	26	19	0.461
	>4 cm	11	5	6	
Myometrium invasion	<1/2	38	25	13	0.023
	≥1/2	18	6	12	
Property of surgical margin	Negative	54	31	23	0.109
	Positive	2	0	2	
Lymph node metastases	No	46	30	16	0.001
	Yes	10	1	9	
Ovarian metastases	No	51	31	20	0.009
	Yes	5	0	5	

表 3 COX 单因素和多因素回归分析早期宫颈腺癌的预后参数

Table 3 Cox-regression univariate and multivariate analyses of various prognostic parameters in patients with early-stage cervical adenocarcinoma

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	No. patients	<i>P</i>	Regression coefficient(SE)	<i>P</i>	Relative risk	95% confidence interval
CISD2		0.006	0.573(1.589)	0.027	4.010	1.168-13.768
Low expression	31					
High expression	25					
Myometrium invasion		0.048	0.487(0.962)		NA	
< 1/2	38				NA	
≥ 1/2	18					
Lymph node metastases		0.042	0.510(1.035)			
No	46					
Yes	10					

细胞的增殖和肿瘤的生长明显抑制^[10]。不过关于 CISD2 与人类肿瘤临床特点和预后之间的关系国内外尚未见报道。而在本研究中,笔者首次报道了

CISD2 与早期宫颈腺癌临床病理特点和预后的关系, 本研究发现在早期宫颈腺癌中高表达 CISD2 的患者更易发生深肌层浸润, 淋巴结转移和卵巢

转移。而且高表达 CISD2 的患者生存时间明显短于低表达的患者,即高表达 CISD2 的患者预后更差。多因素分析还表明 CISD2 高表达是患者预后不良的独立预测因素。这些研究结果表明高表达的 CISD2 与早期宫颈腺癌的侵袭和转移有关, CISD2 或许是预测早期宫颈腺癌预后的新型肿瘤分子标志物。不过 CISD2 在早期宫颈腺癌中发挥作用的分子机制尚未探索,但笔者推测这可能与线粒体相关的细胞凋亡通路有关。有研究表明 CISD2 与线粒体相关的细胞凋亡家族中 BCL2 在调控细胞内钙离子负荷的调控中相互作用^[15],因此 CISD2 或许是通过 BCL2 来调控线粒体相关的细胞死亡进而影响宫颈腺癌细胞的侵袭和转移。

综上所述,本研究探讨了 CISD2 在早期宫颈腺癌中的临床意义,并为 CISD2 成为早期宫颈腺癌患者新的预后分子标志物提供了比较可靠的依据。我们推测 CISD2 在早期宫颈腺癌中的分子作用机制可能与 BCL2 有关,不过这有待在以后的研究中进一步证实。

参考文献:

- [1] Mathew A, George PS. Trends in incidence and mortality rates of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of cervix—worldwide [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009, 10(4): 645-650.
- [2] 李清,冯炜炜. 宫颈腺癌的研究进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2012, 39(4): 330-333.
Li Q, Feng WW. Research progress of cervical adenocarcinoma [J]. *J Int Obstet Gynecol*, 2012, 39(4): 330-333.
- [3] 吴国华. 液基薄层制片技术在宫颈/阴道脱落细胞学与诊断子宫颈癌中的探讨[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2008, 29(S2): 102-104.
Wu GH. The role of liquid-based cytology test in cervical/vaginal exfoliated cytology and diagnosis of cervical cancer [J]. *J Sun Yat-Sen Univ: Med Sci*, 2008, 29(S2): 102-104.
- [4] Kokawa K, Takekida S, Kamiura S, et al. The incidence, treatment and prognosis of cervical carcinoma in young women: a retrospective analysis of 4,975 cases in Japan [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2010, 31(1): 37-43.
- [5] 吴素林. 早期宫颈腺癌患者的预后状况及其影响因素研究[J]. *实用癌症杂志*, 2014, 29(7): 846-848.
- Wu SL. Prognosis and influence factor of early cervical adenocarcinoma [J]. *Prat J Cancer*, 2014, 29(7): 846-848.
- [6] Wu CY, Chen YF, Wang CH, et al. A persistent level of Cisd2 extends healthy lifespan and delays aging in mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(18): 3956-3968.
- [7] Chen YF, Wu CY, Kirby R, et al. A role for the CISD2 gene in lifespan control and human disease [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2010, 12(1): 58-64.
- [8] Chen YF, Kao CH, Chen YT, et al. Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(10): 1183-1194.
- [9] Chen YF, Wu CY, Kirby R, et al. Cisd2 mediates mitochondrial integrity and life span in mammals [J]. *Autophagy*, 2009, 5(7): 1043-1045.
- [10] Sohn YS, Tamir S, Song L, et al. NAF-1 and mitoNEET are central to human breast cancer proliferation by maintaining mitochondrial homeostasis and promoting tumor growth [J]. *PNAS*, 2013, 110(36): 14676-14681.
- [11] Li J, Zhang N, Song LB, et al. Astrocyte elevated gene-1 is a novel prognostic marker for breast cancer progression and overall patient survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(11): 3319-3326.
- [12] 李华,章文华,张蓉,等. 子宫颈癌 159 例预后影响因素分析[J]. *中华妇产科杂志*, 2005, 9(3): 234-237.
Li H, Zhang WH, Zhang R, et al. Analysis of prognostic factors in 159 cases of cervical adenocarcinoma [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2005, 9(3): 234-237.
- [13] 周新华,宋磊. 联合检测血清 CA125 和 CA199 在宫颈腺癌患者中诊断价值[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 198(7): 158-164.
Zhou XH, Song L. Combined detection of serum CA125 and CA199 diagnostic value in patients with cervical adenocarcinoma [J]. *J Chin Pract Diag Ther*, 2011, 198(7): 158-164.
- [14] 郭敏敏,孟祥菊,盛修贵. 宫颈腺癌主要肿瘤标志物研究进展[J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(8): 630-634.
Guo MM, Meng XJ, Sheng XG. Research progress in mainly markers for cervical adenocarcinoma [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2005, 12(8): 630-634.
- [15] Chang NC, Nguyen M, Shore GC. BCL2-CISD2: an ER complex at the nexus of autophagy and calcium homeostasis? [J]. *Autophagy*, 2012, 8(5): 856-857.

(编辑 王晓鹰)