

维、汉族妇女宫颈病变进程与雌激素受体1(ESR1)蛋白表达缺失的关系

贺 慧¹, 阿比达·阿不都卡德尔², 纳菲沙·卡德尔³, 丁 岩², 阿布力孜·阿布杜拉¹

1. 新疆医科大学生物化学暨分子生物学教研室, 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830054

3. 新疆医科大学生物化学教研室, 乌鲁木齐 830011

摘要 以往的报道显示宫颈癌组织内的雌激素受体1(Estrogen Receptor 1, ESR1)基因启动子发生高度甲基化,并提示其基因表达水平可能下降或基因休眠。本研究从蛋白质水平观察 ESR1 表达缺失与宫颈病变进程的关系及其维、汉妇女族群差异。收集维吾尔族和汉族妇女宫颈炎、宫颈内上皮瘤样病变(Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN)I/II/III 和宫颈鳞癌患者的福尔马林浸泡与石蜡包埋宫颈组织标本共 180 例,采用免疫组织化学方法鉴定 ESR1 蛋白表达水平。结果显示,ESR1 蛋白在宫颈上皮和间质细胞均有表达,但是随着 CIN 和宫颈鳞癌的发病进程,其在上皮细胞内的表达逐渐发生缺失;ESR1 蛋白表达缺失率在宫颈炎和 CIN I 组较低(22%),CIN II/III 组明显升高(64%),宫颈鳞癌达到最高(76%),各组之间差异显著($P<0.01$),但是在个体年龄之间无统计学差异($P>0.05$)。维、汉妇女族群 ESR1 表达缺失率的变化趋势有共性,其族群差异也无统计学意义($P>0.05$)。由此表明,ESR1 表达缺失可能是宫颈鳞癌的早期预警指标,这为揭示该基因高度甲基化相关的表观遗传学机制提供了重要依据。

关键词 雌激素受体1(ESR-1);宫颈鳞癌;免疫组织化学;维吾尔族妇女;汉族妇女

中图分类号 R737.33

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)07-0032-05

Association of Cervical Disease Pathogenesis of Uighur and Han Women with the Loss of Estrogen Receptor 1 (ESR1) Protein Expression

HE Hui¹, ABUDUKADEER Abida², KADEER Nafeisha³, DING Yan², ABUDULA Abulizi¹

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

3. Department of Biology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract Previous reports show a hypermethylation of estrogen receptor 1 (ESR1) gene promoter in cervical carcinoma and it was suggested that this may lead to down regulation of gene expression or gene silencing. This paper studies the association of ESR1 loss at the protein level with the cervical disease pathogenesis, and its relation to ethnic differences between Uighur and Han women. A total of 180 cases of formalin fixed and paraffin-embedded cervical tissue specimens were collected from Uighur and Han women with cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I/II/III and cervical squamous cell carcinoma, and the ESR1 protein expression was detected by immunohistochemistry. Experimental results show that ESR1 protein is ubiquitously expressed in both epithelial and stroma cells of the uterine cervix, but gradually lost in epithelial cells with the development of CIN and cervical squamous cell carcinoma. The loss rate of ESR1 protein expression is relatively low in the group of cervicitis and CIN I, is markedly increased in the group of CIN II/III (64%), to reach the highest level in cervical carcinoma (76%), and the difference is significant among groups ($P<0.01$), but no statistical difference in

收稿日期: 2009-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760279);新疆高校科研计划基金项目(XJEDU2007125)

作者简介: 贺慧,硕士研究生,研究方向为宫颈癌诊断学基础,电子信箱:sxfyhehui@yahoo.com.cn; 阿布力孜·阿布杜拉(通信作者),教授,研究方向为宫颈癌诊断学基础,电子信箱:abulizi_a@126.com

ages of the individuals ($P>0.05$); the alteration trend of the loss rate of ESR1 is common to women from both Uighur and Han ethnic groups, and the difference between two ethnic groups is also not statistically significant ($P>0.05$). These results indicate that the loss of ESR1 expression may be an early prediction marker of cervical squamous cell carcinoma, which may serve as an important evidence for revealing epigenetic mechanisms related to the hypermethylation of this gene.

Keywords estrogen receptor 1 (ESR1); cervical squamous cell carcinoma; immunohistochemistry; Uighur women; Han women

0 引言

在以往的研究中发现,雌激素受体 1(Estrogen Receptor 1, ESR1)与腺癌密切相关,提出 ESR1 成为转移性乳腺癌标志物的可能性,对子宫内膜癌和宫颈腺癌的临床诊断具有一定的应用价值^[1-2]。尽管大多数报道提示,雌激素对腺癌有促进作用,但也有一些研究证明雌激素对某些肿瘤有抑制作用^[3-4]。ESR1 基因启动子异常甲基化是宫颈鳞癌发生与发展的重要标志之一,故有人提出该基因可能是抑癌基因^[5-6]。从表观遗传学角度分析,ESR1 基因的甲基化修饰必然引起该基因转录下降或基因休眠,体现在蛋白质表达水平下降或缺失,但是关于宫颈癌组织内 ESR1 基因转录或蛋白质表达水平尚未见任何研究报道。新疆是中国宫颈癌高发地区之一,维吾尔族妇女宫颈癌发病率和死亡率均高于中国平均水平,其收治比例明显高于新疆其他民族,是同一地区汉族的 3~4 倍^[7]。本研究选择汉族和维吾尔族妇女宫颈癌资源,利用免疫组织化学方法鉴定宫颈病变和宫颈癌的 ESR1 蛋白质水平差异,评价 ESR1 作为宫颈癌标志物的临床应用价值和族群特异性,为揭示宫颈鳞癌发病机制及个体化治疗提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

ESR1 特异性多克隆抗体(兔抗人 ESR1, Santa Cruz 公司),免疫组织化学 SP 方法试剂和酶标二抗(北京中杉金桥生物技术公司),光学显微镜(BA210, Motic)。

1.2 研究对象

选择新疆医科大学第一附属医院病理科在 2006~2008 年期间保存的维、汉两族妇女宫颈病变患者的福尔马林浸泡与石蜡包埋组织标本共 180 例(维吾尔族 77 例,汉族 103 例),包括宫颈炎、宫颈内上皮瘤样病变(Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) I/II/III 和宫颈鳞癌,其个体年龄分布在 27~60 岁,平均 43 岁。

1.3 免疫组织化学方法

采用免疫组织化学 SP 法检测。取石蜡包埋组织,制作厚度为 4 μ m 的组织切片,经常规脱蜡、水化和加热法(微波)抗原修复。然后以 H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶活性,滴加 1:300 稀释的 ESR1 特异性抗体(一抗,兔抗人多克隆抗体),4℃过夜。次日,滴加 1:2 稀释的 SP 标记二抗(山羊抗兔,辣根过氧化物酶标记),在 37℃孵育 1h,依次加入 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)和苏木精显色,并常规脱水和透明封片。以磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)代

替 ESR1 抗体作为阴性对照。

1.4 免疫组织化学结果判定

ESR-1 主要以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性。

细胞染色百分率判定:在显微镜下观察,记录各切片的染色细胞百分比例,染色细胞数少于 5%视为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~75%为 2 分;>75%者为 3 分。

染色强度判定:不显色或显色不清为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕色为 3 分。综合积分按以下公式计算

$$\text{综合积分} = (\text{染色细胞分数} + \text{染色强度分数}) / 2$$

综合判定:积分<0.5 分为表达缺失,0.5~1.5 分为部分表达,>1.6 分为正常表达。

1.5 统计分析

采用 SPSS16.0 统计软件处理数据,进行 χ^2 检验分析, $P<0.05$ 视为显著性差异, $P<0.01$ 为极显著性差异。

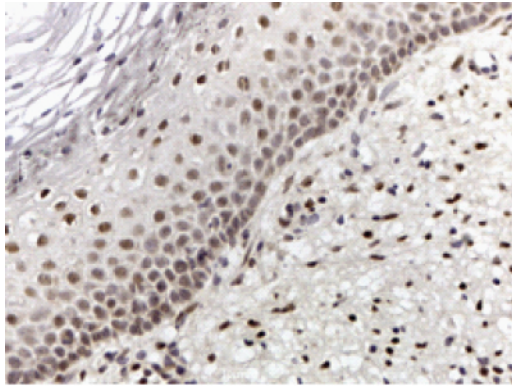
2 结果与分析

2.1 不同宫颈病变组织内 ESR1 蛋白表达的形态学观察

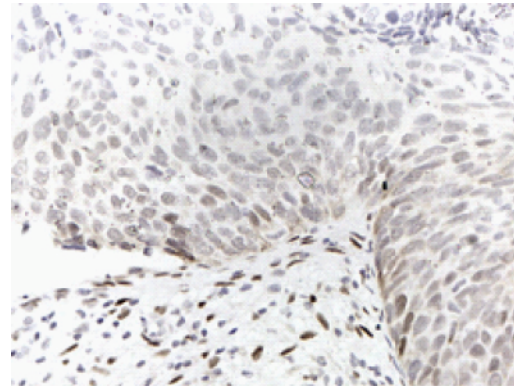
ESR1 蛋白表达主要分布在细胞核,在宫颈上皮细胞和间质细胞内均有表达。从形态学角度研究 ESR1 蛋白质表达水平变化,可以区分该基因表达差异的组织细胞特异性,并弥补其他研究方法的不足和缺失。通过不同宫颈组织上皮的观察,发现 ESR1 蛋白在宫颈炎和 CIN I 组织内表达呈现均匀分布或部分缺失,在大部分 CIN II 和 III 组织上皮内发生局部表达或全部缺失,在宫颈癌组织内的表达缺失现象最为严重(图 1(a)、(b)和(c))。此外,在宫颈癌组织内,发现 ESR1 的细胞质分布现象,提示该蛋白的翻译后加工修饰和成熟过程受阻,因而可能发生 ESR1 在亚细胞器滞留(图 1(d))。

2.2 ESR1 蛋白的表达缺失伴随着宫颈病变与肿瘤发生的病理进程

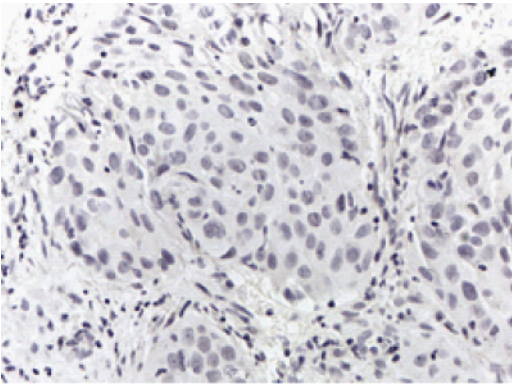
绝大部分宫颈炎和 CIN I 患者的宫颈上皮细胞内 ESR1 蛋白正常表达,其表达缺失率较低(22%);CIN II/III 患者中明显升高(64%),在宫颈鳞癌患者达到最高(76%)。经 χ^2 检验分析,其总体差异有统计学意义($\chi^2=36.220, P<0.01$) (表 1)。宫颈炎和 CIN I 组与 CIN II/III 组两者之间差异极显著($\chi^2=23.451, P<0.01$),但是 CIN II/III 组与宫颈鳞癌组之间差异无统计学意义($\chi^2=1.934, P>0.05$)。由于 ESR1 表达水平的变化能够反映雌激素生理效应,而雌激素水平又随着女性年龄和生理状况变化而发生变化,因而本研究以 46 岁作为界限对所有患者分组,其结果表明两组之间 ESR1 表达缺失率无统计学差异($\chi^2=3.286, P>0.05$)。



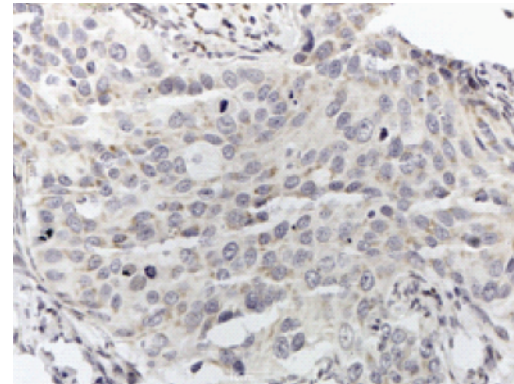
(a) 宫颈炎上皮和间质细胞核均有 ESR1 蛋白正常表达
(a) Normal expression of ESR1 protein in the nucleus of both cervical epithelial and stroma cells in cervicitis



(b) CINII/III 组织上皮基底细胞核内 ESR1 蛋白弱表达
(b) Weak expression of ESR1 protein in the nucleus of basal epithelial cells in CINII/III tissues



(c) 宫颈鳞癌组织内 ESR1 蛋白表达完全缺失
(c) Total loss of ESR1 protein expression in cervical squamous cell carcinoma specimens



(d) 宫颈癌组织内 ESR1 蛋白表达定位于胞质
(d) Cytoplasmic localization of ESR1 protein expression in cervical squamous cell carcinoma specimens

图 1 不同宫颈病变组织内 ESR1 蛋白的免疫组织化学染色

Fig.1 Immunohistochemical staining of ESR1 protein in different cervical disease specimens

注:以上均为免疫组化 SP 法(400×)

Note: All with immunohistochemical SP staining (Original magnification 400×)

肿瘤的发生可能与种族或人群的遗传背景密切相关,并体现在基因表达调控的不同层次和水平上。根据维、汉妇女族群的对比分析(表 2),两族妇女宫颈病变的 ESR1 表达水平变化趋势具有共性(维族: $\chi^2=17.282, P<0.01$;汉族: $\chi^2=18.015, P<0.01$),且族群之间的 ESR1 表达缺失率没有任何统计学差异($P>0.05$),提示 ESR1 可能成为共同的分子标志物。

3 讨论

雌激素受体(ESR)是一种类固醇激素类受体,是雌激素调节的转录因子,已发现 ESR1 和 ESR2 两种亚型。ESR1 介导的生物学效应主要发生在传统的雌激素靶器官,如子宫、下丘脑/垂体、骨骼等;而 ESR2 主要在卵巢、心血管系统、脑组织、炎性病变及内膜异位症中有明确作用^[8]。作为核受体,ESR 与其配体结合,发生构象变化形成复合物,随后与靶基因上的雌激素反应元件结合,在多种辅助因子或蛋白协同作

用下,启动靶基因转录,产生其生物学效应^[9]。此外,有人证实一种配体非依赖性 ESR 信号转导途径的存在^[10],ESR 及其功能途径受多重调控,通过自身的磷酸化,或与不同生长因子、共调节因子、癌基因或抑癌基因蛋白结合或相互作用,调节靶细胞的生长分化。

近年来,人们逐渐认识到 ESR 在妇科肿瘤的发生中可能起着重要作用。ESR 表达水平随着子宫内膜病变和肿瘤的发生而升高^[11],在子宫肌瘤组织中的阳性率也明显高于正常平滑肌组织^[12]。有关 ESR 与宫颈鳞癌病理进程的关系的研究报道甚少。

随着肿瘤组织内基因异常甲基化现象的发现,不少研究者对肿瘤异常甲基化基因进行系统筛选,发现一系列肿瘤甲基化标记基因。基因高甲基化主要发生在基因启动子区 CpG 岛屿,不影响基因编码序列,但是引起基因转录降低或基因休眠^[13-14]。Wisman 等^[6]发现 ESR1 在宫颈癌的甲基化率较高,而且与其他甲基化敏感基因联合检测,可以大大提高肿瘤检

参考文献 (References)

- [1] Lee B H, Hecht J L, Pinkus J L, *et al.* WT1, estrogen receptor, and progesterone receptor as markers for breast or ovarian primary sites in metastatic adenocarcinoma to body fluids[J]. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117 (5): 745-750.
- [2] 肖觉, 宋荣, 叶学正, 等. ER PR 和 P16 联合检测在子宫内膜腺癌和宫颈腺癌鉴别诊断中的应用[J]. *四川肿瘤防治*, 2007, 20(2): 121-123.
Xiao Jue, Song Rong, Ye Xuezheng, *et al.* *Sichuan Journal of Cancer Control*, 2007, 20(2): 121-123.
- [3] Schabath M B, Wu X, Vassilopoulou-Sellin R, *et al.* Hormone replacement therapy and lung cancer risk: A case-control analysis [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 113-123.
- [4] Elliott A M, Hannaford P C. Use of exogenous hormones by women and lung cancer: Evidence from the royal college of general practitioners' oral contraception study[J]. *Contraception*, 2006, 73: 331-335.
- [5] Wisman G B, Nijhuis E R, Hoque M O, *et al.* Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119: 1908-1914.
- [6] Henken F E, Wilting S M, Overmeer R M, *et al.* Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 2007, 97: 1457-1464.
- [7] 拉莱·苏祖克, 彭玉华, 周康, 等. 新疆不同民族宫颈鳞癌发病趋势分析[J]. *新疆医科大学学报*, 2006, 29(7): 569-571.

- Lalai Suzuk, Peng Yuhua, Zhou Kang, *et al.* *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(7): 569-571.
- [8] Harria H A. Estrogen receptor-beta: Recent lessons from in vivo studies [J]. *Molecular Endocrinol*, 2007, 21(1): 1-13.
- [9] 谈智, 王庭槐. 雌激素作用分子机制研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(10): 1422-1426.
Tan Zhi, Wang Tinghuai. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2003, 19 (10): 1422-1426.
- [10] Ignar-Trowbridge D M, Teng C T, Ross K A, *et al.* Peptide growth factors elicit estrogen receptor[J]. *Molecular Endocrinol*, 1993, 7: 992-998.
- [11] 廖秦平, 吴成, 郑虹, 等. 子宫内膜癌组织中雌激素及孕激素受体亚型的表达研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2005, 40(11): 752-755.
Liao Qingping, Wu Cheng, Zheng Hong, *et al.* *Chin J Obstet Gynecol*, 2005, 40(11): 752-755.
- [12] 李跃晨, 王永栋. 子宫肌瘤中 ER、PR 和 EGFR 的表达及意义 [J]. *河北医药*, 2009, 31(12): 1474-1475.
Li Yuechen, Wang Yongdong. *Hebei Medical Journal*, 2009, 31 (12): 1474-1475.
- [13] Egger G, Liang G, Aparicio A, *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy[J]. *Nature*, 2004, 429: 457-463.
- [14] Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future[J]. *Oncogene*, 2002, 21(35): 5427-5440.

(责任编辑 李慧政)

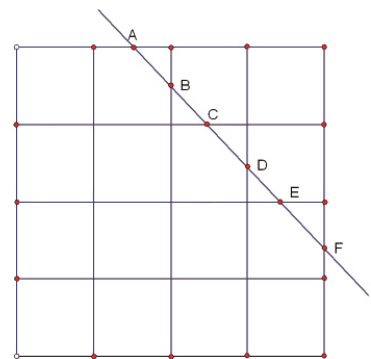
本期完词填空答案

		钱	学	森			尼	采	
		塘						菊	
	大	江	东	去				东	
			经			寄	人	篱	下
						生		下	
	白		孔	明	灯				
薰	衣	草		月					
	送			出	泥	而	不	染	
把	酒	问	青	天		石			色
				山		流	感		体

本期好玩的数学——穿方格问题答案

为了方便解答这一问题,我们可以把它转化为一个更容易的计数问题。容易看到在下图中,直线穿过的 5 个小方格分别对应于线段 AB、BC、CD、DE、EF。由这种对应可知,直线穿过的小方格数与线段的条数相同。进一步,线段条数又可以与线段端点的个数联系起来。即这 5 条线段是由 A、B、C、D、E、F 共 6 个点分成的。其中,A、F 是直线与方格外框的两个交点,而 B、C、D、E 则是直线与里面横或纵线的交点。

把同样的思路应用于我们要解决的问题:因为直线与外框有两个交点,而与里面三横三纵的格子线最多有 6 个交点,因此一条直线最多可以与 4×4 方格有 8 个交点。而这 8 个交点把直线分成 7 条相连的线段,其中每条小线段经过 16 个小方格中的其中 1 个,所以一条直线最多可以穿过 4×4 方格中的 7 个小方格。



本期推理小游戏答案

李菲是这样想的:

张强举了手,说明我和王帅之间至少有一个人是戴红帽子的。

同样,王帅也举了手,说明我和张强之间至少有一个人是戴红帽子的。

如果我头上不是戴红帽子,那么张强会怎么想呢?他一定会这样想:“王帅举了手,说明我和李菲中至少有一个人戴的是红帽子,可是李菲没有戴红帽子,那一定是我戴了红帽子。”在这种情况下,张强一定会说出自己戴的帽子是红色的。他没有这么说,可见一定是我自己戴了红帽子。

如果我头上戴的不是红帽子,那么王帅的想法一定和张强是一样的,一定也会说出自己戴的红帽子。

可见,我戴的帽子的颜色一定是红色的。