

· 论 著 ·

宫颈癌患者肿瘤组织中弗林蛋白酶的表达 与临床病理因素及局部免疫功能的关系

石冲, 蔺杰, 韩宝生

唐山市妇幼保健院遗传生殖科, 河北 唐山 063000

摘要: **目的** 观察宫颈癌患者肿瘤组织中弗林蛋白酶的表达与肿瘤浸润、T 淋巴细胞亚群的关系。**方法** 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月收集的 56 例宫颈癌患者作为研究对象, 检测患者肿瘤组织中弗林蛋白酶表达水平, 并计数局部免疫细胞 T 淋巴细胞亚群: CD8⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、颗粒酶 B (granzyme B)⁺、CD134⁺ 及叉头翼状螺旋转录因子 (forkhead box protein P3, FOXP3)⁺ 细胞。采用 Spearman 相关分析分析肿瘤组织中弗林蛋白酶表达水平与患者临床病理因素及肿瘤组织中 CD8⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、颗粒酶 B⁺、CD134⁺ 及 FOXP3⁺ 细胞计数的相关性。**结果** 患者年龄、肿瘤分化程度与弗林蛋白酶表达水平无显著相关性 (P 均 >0.05), 国际妇产科联盟 (FIGO) 宫颈癌分期、浸润深度及淋巴结转移与弗林蛋白酶表达水平具有显著相关性 (P 均 <0.05)。弗林蛋白酶表达水平与 CD4⁺ 细胞计数、CD4⁺/CD8⁺ 及 FOXP3⁺ 细胞计数呈显著正相关 (P 均 <0.05), 与 CD8⁺ 细胞、颗粒酶 B⁺ 细胞、CD134⁺ 细胞细胞计数呈显著负相关 (P 均 <0.05)。**结论** 宫颈癌患者肿瘤组织弗林蛋白酶表达水平与肿瘤分期、浸润深度、淋巴结转移及局部免疫功能具有相关性。

关键词: 宫颈癌; 弗林蛋白酶; 临床病理特征; T 淋巴细胞亚群; 局部免疫功能

中图分类号: R 737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)10-1315-04

Association of Furin protease expression in tumor tissue with clinicopathological factors and local immune function in cervical cancer patients

SHI Chong, LIN Jie, HAN Bao-sheng

Department of Genetics and Reproduction, Tangshan Maternal and Child Health
Care Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between Furin protease (Furin) expression in tumor tissues and tumor infiltrating, local immunocytes T-lymphocyte subsets in patients with cervical carcinoma. **Methods** A total of 56 patients with cervical carcinoma were selected as study objects from January 2014 to December 2015 to detect Furin expression level in tumor tissues and take count the local immunocyte, T-lymphocyte subsets CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, Granzyme B⁺, CD134⁺ and FOXP3⁺ cells. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlations of Furin expression levels with clinicopathological factors and cell counts of CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, Granzyme B⁺, CD134⁺ and FOXP3⁺ cells. **Results** Furin expression level was not significantly correlated with patients' age and tumor differentiation degree (all $P > 0.05$), but was significantly positively correlated with the staging of cervical cancer by International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO), tumor invasion depth and lymph node metastasis (all $P < 0.05$). Moreover, Furin expression level was significantly positively correlated with CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and FOXP3⁺ cells counts (all $P < 0.05$), and was significantly negatively correlated with CD8⁺, Granzyme B⁺ and CD134⁺ cell counts (all $P < 0.05$). **Conclusion** Furin expression level in tumor tissues is associated with tumor staging, tumor invasion depth, lymph node metastasis and local immune functions in cervical carcinoma patients.

Key words: Cervical carcinoma; Furin protease; Clinicopathological feature; T-lymphocyte subsets; Local immune function

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤,在全球育龄女性最易罹患的恶性肿瘤中,其病死率占第二位,严重威胁我国女性的健康^[1]。既往研究发现,宫颈癌肿瘤组织中存在大量的炎症细胞浸润,多种炎症细胞分泌的多种细胞因子与肿瘤的进展具有一定的相关性^[2]。弗林蛋白酶(Furin)是目前研究较为清楚的哺乳动物前体蛋白加工酶,研究发现其在多种肿瘤组织中表达水平升高,且与肿瘤细胞的增殖及转移具有一定的相关性;同时研究证明弗林蛋白酶在肿瘤免疫中发挥一定的作用,但临床上关于弗林蛋白酶在宫颈癌中的研究较少^[3-4]。本研究旨在分析宫颈癌中弗林蛋白酶的表达与患者临床病理因素及肿瘤局部免疫功能的关系,探讨其免疫学机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 56 例我院 2014 年 1 月至 2015 年 12 月诊治的国际妇产科联盟(FIGO)宫颈癌分期为 I B ~ IV 期,且经病理确诊的宫颈癌患者作为研究对象,所有患者均确诊为鳞癌,年龄 47 ~ 73 (61.1 ± 11.8) 岁。收集患者的临床资料,包括年龄、FIGO 分期、浸润深度、分化程度及是否出现淋巴结转移:年龄 < 60 岁者 19 例, ≥ 60 岁者 37 例; I B 期 12 例, II 期 17 例, III 期 16 例, IV 期 11 例; 浸润深度 < 4 cm 者 31 例, ≥ 4 cm 者 25 例; 组织学分级高中分化 24 例,低分化 32 例; 淋巴结转移 31 例,无淋巴结转移 25 例。

1.2 宫颈癌组织弗林蛋白酶表达水平检测 对患者手术获取的宫颈癌标本采用免疫组化法进行弗林蛋白酶表达水平检测,试剂盒由上海雅吉生物科技提供。操作方式如下: 刺取肿瘤组织并固定,应用二甲苯脱脂并梯度酒精水化组织切片; 0.01 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,每次 3 min; 高压修复抗原后快速冷冻切片, PBS 冲洗 3 次; 采用 3% 的过氧化氢阻断 20 min, PBS 冲洗 3 次, 甩去 PBS 后滴加一抗, 37 °C 孵育 90 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 甩去 PBS 后滴加二抗, 37 °C 孵育 30 min, 甩去 PBS。每张切片滴两滴二氨基联苯胺(DAB)溶液, 显微镜下观察。自来水冲洗后苏木素染色, 0.1% 盐酸酒精分化, PBS 冲洗。梯度酒精脱水干燥后二甲苯透明, 封片。结果判定: 弗林蛋白酶呈棕色颗粒状染色, 于显微镜下观察细胞的着色情况, 据着色情况评分: 不着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分。根据着色细胞数量评分: < 25% 为 1 分, 25% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分。二者相乘, 0 分为阴性, 1 ~ 2 分为弱阳性, 3 ~ 5 分为阳性, 6 ~ 8 分为强阳性。

1.3 局部免疫细胞计数 制作切片, 免疫组化法检测局部免疫水平变化: 分别滴加 CD8⁺、CD4⁺、颗粒酶 B (granzyme B)⁺、CD134⁺ 及叉头翼状螺旋转录因子(forkhead box protein P3, FOXP3)⁺ 抗体, 颗粒酶 B 染色定位于细胞质, CD134 及 CD8 阳性染色定位于细胞质及细胞膜; CD4 染色阳性定位于细胞膜; FOXP3 染色阳性定位于细胞核。每张切片在 400 倍显微镜下随机选择 5 个视野, 各个视野内的免疫细胞直接进行计数, 取 5 个视野的平均值。

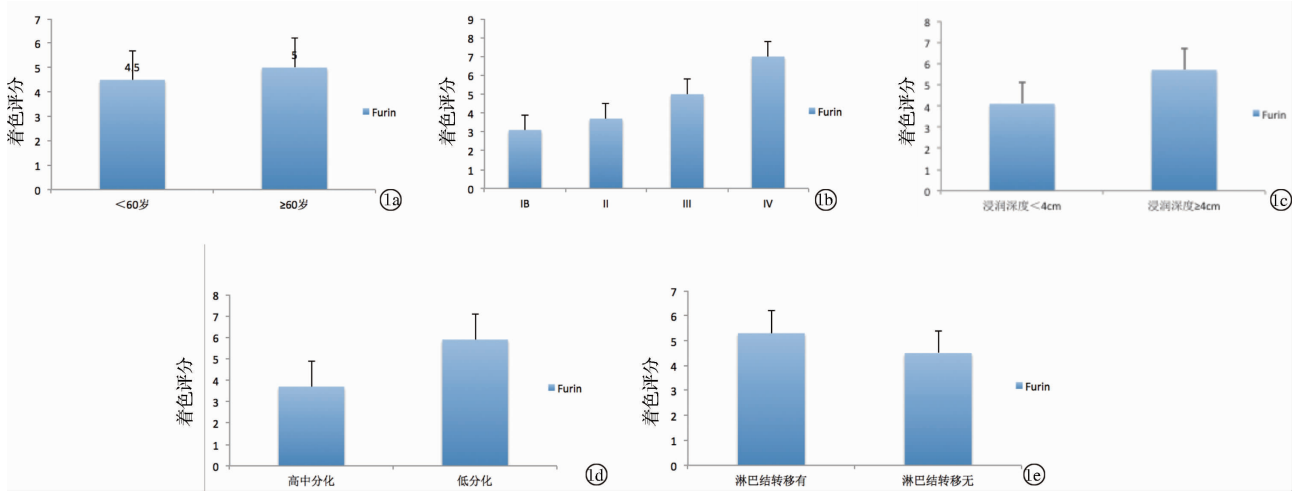
1.4 统计学处理 对所得数据采用 SPSS21.0 软件进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 不同变量之间的相关性采用 Spearman 相关分析。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌患者临床病理因素与弗林蛋白酶表达水平相关性分析 患者不同临床病理因素的弗林蛋白酶表达水平见图 1。相关分析表明患者年龄 ($r = 0.118, P > 0.05$)、肿瘤分化程度 ($r = 0.276, P > 0.05$) 与弗林蛋白酶表达无显著相关性, 肿瘤 FIGO 分期 ($r = 0.551, P < 0.05$)、浸润深度 ($r = 0.421, P < 0.05$) 及淋巴结转移 ($r = 0.338, P < 0.05$) 与弗林蛋白酶表达有显著相关性。

2.2 宫颈癌患者临床病理因素与局部免疫细胞计数的相关性 宫颈癌患者年龄与不同亚群细胞分布无明显相关性 (P 均 > 0.05)。FIGO 分期与 CD8⁺ 细胞、CD134⁺ 细胞数目呈显著负相关 (P 均 < 0.05), 与 CD4⁺ 细胞数目、CD4⁺/CD8⁺ 及 FOXP3⁺ 细胞数目显著正相关 (P 均 < 0.05), 与颗粒酶 B⁺ 细胞数目无明显相关性 ($P > 0.05$)。浸润深度与 CD8⁺ 细胞、CD134⁺ 细胞数目呈显著负相关 (P 均 < 0.05), 与 CD4⁺ 细胞数目显著正相关 ($P < 0.05$), 与 CD4⁺/CD8⁺、颗粒酶 B⁺ 细胞及 FOXP3⁺ 细胞无明显相关性 (P 均 > 0.05)。肿瘤分化程度与 CD4⁺ 细胞数目呈显著正相关 ($P < 0.05$), 淋巴结转移与 CD134⁺ 细胞数目呈显著负相关 ($P < 0.05$), 肿瘤分化程度和淋巴结转移与其他 T 淋巴细胞分布无明显相关性 (P 均 > 0.05)。见表 1。

2.3 弗林蛋白酶表达与局部免疫细胞计数的相关性 弗林蛋白酶表达水平与 CD4⁺ 细胞数目、CD4⁺/CD8⁺ 及 FOXP3⁺ 细胞数目呈显著正相关 (P 均 < 0.05), 与 CD8⁺ 细胞、颗粒酶 B⁺ 细胞、CD134⁺ 细胞数目呈显著负相关 (P 均 < 0.05)。见表 2。



注:1a:年龄;1b:FIGO 分期;1c:浸润深度;1d:分化程度;1e:淋巴结转移。

图 1 患者不同临床病理因素间弗林蛋白酶的表达水平

表 1 宫颈癌患者临床病理因素与免疫细胞数目的相关性 ($\bar{x} \pm s$)

临床资料	CD8 ⁺ 细胞		CD4 ⁺ 细胞		CD4 ⁺ /CD8 ⁺		颗粒酶 B ⁺ 细胞		CD134 ⁺ 细胞		FOXP3 ⁺ 细胞	
	细胞数目	r 值	细胞数目	r 值	细胞数目	r 值	细胞数目	r 值	细胞数目	r 值	细胞数目	r 值
年龄												
<60 岁	5.2 ± 1.7		6.7 ± 1.6		1.3 ± 0.9		7.5 ± 0.7		2.5 ± 0.3		2.8 ± 0.7	
≥60 岁	5.2 ± 1.5	0.102	6.9 ± 1.5	0.098	1.3 ± 0.8	0.073	7.6 ± 0.8	0.071	2.1 ± 0.4	-0.078	2.6 ± 0.6	0.104
FIGO 分期												
I B	6.5 ± 0.8		5.9 ± 1.4		0.9 ± 0.4		8.3 ± 0.7		3.1 ± 0.2		1.5 ± 0.4	
II	5.4 ± 1.3		6.5 ± 1.3		1.2 ± 0.5		7.7 ± 0.6		2.7 ± 0.4		2.1 ± 0.3	
III	5.2 ± 1.4	-0.514*	6.8 ± 1.4	0.478*	1.3 ± 0.5	0.397*	7.4 ± 0.7	-0.297	1.9 ± 0.3	-0.381*	3.2 ± 0.5	0.407*
IV	1.4 ± 0.7		7.5 ± 1.4		5.4 ± 1.2		6.7 ± 0.8		1.1 ± 0.4		3.7 ± 0.5	
浸润深度												
<4 cm	6.1 ± 1.5		5.8 ± 1.4		1.0 ± 0.4		7.4 ± 0.8		2.8 ± 0.4		2.5 ± 0.5	
≥4 cm	4.5 ± 1.6	-0.492*	7.9 ± 1.5	0.397*	1.4 ± 0.7	0.114	7.7 ± 0.7	-0.119	1.7 ± 0.3	-0.449*	2.9 ± 0.8	0.175
分化												
高中分化	5.1 ± 1.6		6.1 ± 1.6		1.2 ± 0.6		7.1 ± 1.1		2.5 ± 0.4		2.5 ± 0.9	
低分化	5.3 ± 1.8	-0.114	7.5 ± 1.7	0.326*	1.4 ± 0.5	0.105	8.0 ± 0.7	-0.291	2.1 ± 0.3	0.217	2.9 ± 0.8	0.141
淋巴结转移												
有	4.9 ± 1.8		6.2 ± 1.4		1.3 ± 0.7		7.3 ± 0.7		1.9 ± 0.4		2.1 ± 0.5	
无	5.5 ± 1.5	-0.197	7.4 ± 1.4	0.217	1.3 ± 0.8	0.068	7.8 ± 0.6	-0.125	2.6 ± 0.3	-0.359*	2.3 ± 0.8	0.298

注: *表示其 P 值 < 0.05。

表 2 弗林蛋白酶表达与免疫细胞数目的相关性

细胞数目	弗林蛋白酶	
	r 值	P 值
CD8 ⁺ 细胞	-0.577	<0.05
CD4 ⁺ 细胞	0.336	<0.05
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.311	<0.05
颗粒酶 B ⁺ 细胞	-0.317	<0.05
CD134 ⁺ 细胞	-0.325	<0.05
FOXP3 ⁺ 细胞	0.342	<0.05

3 讨论

宫颈癌的肿瘤组织中浸润有多种炎症细胞,肿瘤细胞、炎症细胞及免疫因子之间存在复杂的相互调控关系^[5],上述细胞与肿瘤微环境的局部免疫相关。既往研究发现,肿瘤抗原的大量释放能够刺激机体的抗肿瘤免疫反应,其中细胞毒性 T 细胞在免疫反应中发挥主要作用。

本研究分别对宫颈癌肿瘤组织中的 CD8、CD4、颗粒酶 B、CD134 及 FOXP3 标记的细胞进行计数。CD8⁺T 细胞通过溶细胞作用和分泌细胞因子两种机制杀伤肿瘤细胞,被认为是肿瘤免疫最重要的防线之一。初始 CD8⁺T 细胞与肿瘤抗原接触,并在多种细胞因子的协同作用下分化为细胞毒性的细胞,特异性杀伤肿瘤细胞,抑制肿瘤进展^[6-7]。既往研究对 CD4⁺T 细胞在肿瘤免疫中发挥作用的研究较少,效应 CD4⁺T 细胞又称辅助性 T 细胞(Th),能够发挥多种免疫作用:包括抗体分泌、免疫细胞及炎症细胞的募集、分泌细胞因子及趋化因子。Th 细胞主要通过间接机制发挥抗肿瘤作用:既往研究发现输注特异性 Th 细胞能够引起迟发性免疫反应及浸润肿瘤组织,通过分泌白细胞介素及肿瘤坏死因子抑制肿瘤血管新生及刺激肿瘤特异性巨噬细胞杀伤肿瘤组织;同

时, Th 细胞能够增强 CD8⁺ T 的抗肿瘤免疫作用^[8]。本研究中, 宫颈癌 FIGO 分期与 CD8⁺ 细胞呈显著负相关, 而与 CD4⁺ 细胞数目及 CD4⁺/CD8⁺ 显著正相关, 肿瘤分期高的患者 CD4⁺ 数目及 CD4⁺/CD8⁺ 高于低分期患者, 其原因可能是随着肿瘤分期的升高及患者抗肿瘤治疗的进程, 局部杀伤性肿瘤细胞数量下降, 患者 CD4⁺ T 细胞数量代偿性升高。

颗粒酶 B⁺ 标记细胞毒性 T 细胞及自然杀伤细胞 (NK), 上述细胞对肿瘤细胞具有直接杀伤作用^[9]。CD134 是 OX40 超家族细胞中的成员, 一过性表达于活化 T 细胞表面, 既往研究发现 T 细胞活化是抗感染及抗肿瘤细胞的启动环节, CD134 标记细胞计数能够反映近期 T 细胞激活状态, 本研究中 CD134⁺ T 细胞与肿瘤分期呈负相关, 随着肿瘤的进展, 患者局部免疫功能抑制加重^[10-11]。FOXP3⁺ 细胞又称调节性 T 细胞 (Treg 细胞), Treg 细胞能够抑制 Th 细胞、细胞毒性 T 细胞及杀伤细胞的作用, 抑制肿瘤免疫反应, 促进肿瘤的进展^[12]。

肿瘤组织中弗林蛋白酶的表达水平显著升高^[13], 弗林蛋白酶能够活化多种分子的前体, 包括多肽激素、神经生长因子、生长因子受体的前体, 血浆蛋白质 (凝血因子、白蛋白) 前体, 黏附分子、基质金属蛋白酶和某些病毒如艾滋病病毒、人乳头状瘤病毒等的包装糖蛋白以及细菌外毒素等。既往研究发现, 弗林蛋白酶在肿瘤细胞增殖、转移及肿瘤免疫的调控中发挥重要的作用, 且其表达水平与肿瘤恶性程度相关, 可以作为肿瘤预后的评价因子^[14-16]。本研究发现, 弗林蛋白酶表达水平与宫颈癌的 FIGO 分期、浸润深度及淋巴结转移具有明显的相关性; 同时, 与 CD4⁺ 细胞计数、CD4⁺/CD8⁺ 及 FOXP3⁺ 细胞计数呈显著正相关, 与 CD8⁺ 细胞、颗粒酶 B⁺ 细胞、CD134⁺ 细胞数目呈显著负相关。

综上所述, 宫颈癌患者肿瘤组织弗林蛋白酶表达水平与肿瘤的局部免疫作用具有相关性。弗林蛋白酶作为近年来新兴的肿瘤侵袭转移相关靶分子, 参与免疫细胞的调节, 在慢性炎症致肿瘤的进展中起重要作用。

参考文献

[1] 李佩, 王金声, 康媛. TruScreen 系统在宫颈癌筛查中的应用效果

[J]. 癌症进展, 2016, 14(6): 557-558, 562.

- [2] 陈晓静, 王薇. 宫颈癌肿瘤微环境的研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(9): 1465-1468.
- [3] 张蕾蕾, 孙珠蕾, 刘强, 等. Furin 在宫颈癌变过程中的表达及其临床病理意义 [J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(1): 36-37.
- [4] 石冲, 张国彬, 韩宝生, 等. Furin 抑制剂 α 1-PDX 对宫颈癌 HeLa 细胞生长、转移和成瘤的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(3): 432-436.
- [5] Deivendran S, Marzook KH, Radhakrishna Pillai M. The role of inflammation in cervical cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 816: 377-399.
- [6] Galani IE, Wendel M, Stojanovic A, et al. Regulatory T cells control macrophage accumulation and activation in lymphoma [J]. Int J Cancer, 2010, 127(5): 1131-1140.
- [7] Wu TC, Xu K, Bancheau R, et al. Reprogramming tumor-infiltrating dendritic cells for CD103⁺ CD8⁺ mucosal T-cell differentiation and breast cancer rejection [J]. Cancer Immunol Res, 2014, 2(5): 487-500.
- [8] 李睿, 王瑜, 罗穗豫, 等. T、B 淋巴细胞和一氧化氮合酶在宫颈癌及癌前病变中的表达及其意义 [J]. 山东医药, 2012, 52(28): 16-17, 20.
- [9] 徐丽玲, 胡凡磊, 苏茵. 分泌颗粒酶 B 的调节性 B 细胞研究进展 [J]. 中华风湿病学杂志, 2016, 20(8): 564-566.
- [10] 刘龙. CD134 T 细胞亚群比例作为 allo-HCT 后免疫抑制状态评估指标的可行性研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [11] 刘扬, 王跃如, 丁光辉, 等. 甲胎蛋白特异性 CD8⁺ T 淋巴细胞肝癌疫苗杀伤肝细胞癌分子机制 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2015, 21(2): 101-104.
- [12] 黄邵洪, 覃杰, 李响, 等. 含表皮生长因子受体的外泌体诱导肿瘤特异性调节 T 细胞 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1090-1095.
- [13] Huang YH, Lin KH, Liao CH, et al. Furin Overexpression Suppresses Tumor Growth and Predicts a Better Postoperative Disease-Free Survival in Hepatocellular Carcinoma [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40738.
- [14] Ma YC, Shi C, Zhang YN, et al. The tyrosine kinase c-Src directly mediates growth factor-induced Notch-1 and Furin interaction and Notch-1 activation in pancreatic cancer cells [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33414.
- [15] Kumar V, Behera R, Lohite K, et al. p38 kinase is crucial for osteopontin-induced furin expression that supports cervical cancer progression [J]. Cancer Res, 2010, 70(24): 10381-10391.
- [16] Lee M, Ryu CH, Chang HW, et al. Radiotherapy-associated Furin Expression and Tumor Invasiveness in Recurrent Laryngeal Cancer [J]. Anticancer Res, 2016, 36(10): 5117-5125.

收稿日期: 2017-05-02 修回日期: 2017-07-12 编辑: 王国品