

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.006>

细胞核因子 κ B 受体活化因子在宫颈鳞癌中的表达及其与临床病理因素和预后的关系

李丹, 陈岚

(华中科技大学同济医学院附属协和医院西院妇产科, 武汉 430000)

[摘要] 目的: 探讨细胞核因子 κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor-kappa B, RANK)在宫颈鳞癌中的表达及其与临床病理因素和预后的关系。方法: 回顾性分析2012年11月至2015年5月在华中科技大学同济医学院附属协和医院西院妇产科行手术治疗的57例宫颈鳞癌患者, 收集其病理及随访资料, 采用免疫组织化学法检测宫颈鳞癌及癌旁组织中RANK的表达情况, 分析RANK表达与临床病理因素的关系, 采用单因素及多因素分析影响宫颈鳞癌患者总生存率及累计复发率的预后因素。结果: 肿瘤组织中RANK表达较癌旁组织高(7.263 ± 2.349 vs 5.018 ± 2.303 , $P < 0.001$), 且RANK高表达与国际妇产科联合会(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期($P = 0.047$)、淋巴结转移($P = 0.011$)、淋巴脉管浸润(lymph vascular space invasion, LVSI) ($P = 0.002$)相关; 与RANK低表达组比, RANK高表达组5年总生存率更低(32.14% vs 79.31% , $P = 0.036$), 术后5年累计复发率更高(64.29% vs 17.24% , $P = 0.032$); 单因素分析示FIGO分期、淋巴结转移及RANK高表达为影响患者总生存率和累计复发率的预后因素($P < 0.05$)。多因素分析示FIGO分期及RANK高表达为影响总生存率和累计复发率的预后因素($P < 0.05$)。结论: RANK在宫颈鳞癌中高表达, RANK高表达与宫颈癌恶性临床病理因素相关, RANK高表达提示宫颈癌预后不良。

[关键词] 宫颈鳞癌; 细胞核因子 κ B受体活化因子; 预后

Expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B in cervical squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathological factors and prognosis

LI Dan, CHEN Lan

(Department of Gynaecology and Obstetrics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) in cervical squamous cell carcinoma, and analyze its clinical significance and prognosis. **Methods:** Fifty-seven patients

收稿日期 (Date of reception): 2018-03-15

通信作者 (Corresponding author): 李丹, Email: lidanuh@sina.com

with cervical squamous cell carcinoma patients who underwent curative resection between November 2012 and May 2015 in our hospital was retrospectively analysed. Immunohistochemistry was performed to determine the expression of Rank in tumor and paratumor tissue. The connection between RANK expression and pathological characteristics and clinical feature was analysed. Also, prognostic factors of overall survival and cumulative recurrence rate were analyzed by univariate and multi-logistic regression analysis. **Results:** RANK protein expression was significantly higher in tumour tissues (7.263 ± 2.349 vs 5.018 ± 2.303 , $P < 0.001$) and a high expression of RANK was significantly correlated with FIGO-stage ($P = 0.047$), lymph node metastasis ($P = 0.011$), and lymph vascular space invasion ($P = 0.002$). Patients with high expression of RANK had a significantly lower 5-year overall survival rate (32.14% vs 79.31%, $P = 0.036$) and higher cumulative recurrence rate (64.29% vs 17.24%, $P = 0.032$) than those with low expression. FIGO-stage, lymph node metastasis and RANK staining was prognostic factors of overall survival and cumulative recurrence rate by univariate analysis ($P < 0.05$). FIGO-stage and RANK staining was independent risk factor of overall survival and cumulative recurrence rate by multi-logistic regression analysis ($P < 0.05$). **Conclusion:** RANK expression is higher in tumor than in paratumor tissues. Overexpression of RANK is closely related to invasion and metastasis. Overexpression of RANK protein suggests poor progress in cervical squamous cell carcinoma.

Keywords cervical neoplasms; receptor activator of nuclear factor-kappa B; prognosis

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一^[1], 癌症统计报告显示美国2016年新发病例12 990名, 预计死亡人数4 120例^[2]; 而相应发病率及病死率在欠发达地区则更高^[3], 3年和5年总体生存率 $< 50\%$ ^[4]。细胞核因子 κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor-kappa B, RANK)及其配体RANKL(ligand of RANK)又称破骨细胞分化因子, 既往对RANK及RANKL的研究集中于骨代谢及内分泌等相关领域^[5]。在原位乳腺癌及乳腺癌细胞系中均可检测到RANK及其配体RANKL的表达^[6]; 且RANKL可调控孕激素介导的乳腺癌的发生及进展^[7-8]; RANK与子宫内膜癌肿瘤预后不良相关^[9]。但在宫颈癌中的相关研究仍缺乏。本研究旨在探讨RANK在宫颈鳞癌中的表达, 了解RANK表达与宫颈鳞癌临床病理因素的关系, 探讨RANK表达与宫颈鳞癌预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般临床资料

收集华中科技大学同济医学院附属协和医院西院2012年11月至2015年5月期间57例宫颈鳞癌患者病例资料, 年龄(56.71 ± 8.56)岁。纳入标准: 经病理诊断为宫颈鳞癌患者; 均行根治性手术治疗者; 病例及随访资料齐全者。剔除标准:

无法区分原发为子宫内膜癌累及宫颈的患者; 5年内曾患其他恶性肿瘤病史的患者; 病例随访资料不全者。患者肿瘤分期采用国际妇产科联合会(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)标准^[10]。本研究获得华中科技大学同济医学院附属协和医院西院伦理委员会批准实施。

1.2 免疫组织化学染色

首先获得组织切片, 在60 °C条件下烤片2 h, 再用二甲苯溶液浸泡2次, 每次15 min, 然后分别放于入100%, 95%, 90%, 75%, 70%5种浓度的酒精溶液中脱水, 每次5 min。

抗原修复采用柠檬酸钠(10 mmol/L, pH 6.0)100 °C维持10 min, 于室温冷却30 min, 对内源性过氧化物酶阻断采用3%过氧化氢溶液, 阻断20 min, 然后用5%脱脂牛奶封闭2 h, 采用RANK一抗(1:200, 英国Abcam公司, 货号ab89912)于4 °C孵育过夜, 二抗(山羊抗兔二抗, 上海翊圣生物科技有限公司)于37 °C条件下孵育2 h, 在DAB液下显色, 以苏木精复染, 风干后在显微镜下观察并拍照。

1.3 免疫组织化学结果判读

免疫组织化学评分结果分别由两位病理科医

师在盲法下进行评估。分别根据染色强度及细胞阳性百分率进行读片。根据染色强度：0分(阴性)，1分(弱阳性，淡黄色)，2分(中等强度，黄色)和3分(强阳性，棕黄色或褐色)。阳性细胞百分率：0分(0~5%)，1分(6%~25%)，2分(26%~50%)和3分(51%~75%)；4分(>75%)。将所得两类分值相乘，5个视野评分结果取均值，0分定为阴性(-)，总分 ≤ 6 分定义为低表达；>6分定义为高表达。

1.4 患者分组

依据总评分 ≤ 6 或>6分，将患者分成RANK低表达组和RANK高表达组，其中RANK低表达组29例，RANK高表达组28例。

1.5 病例随访

采用电话或门诊随访的方式进行随访，截止时间为2018年2月1日，随访内容包括肿瘤复发时间、部位及死亡原因等，共失访4人，随访期为(22.3 \pm 17.2)个月。

1.6 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行分析，计数资料采用 χ^2 检验，两组间的比较采用配对 t 检验。生存分析采用Kaplan-Meier法log-rank检验，评估生存预后采用Cox比例风险模型。检验结果取双侧，检验

水准 $\alpha=0.05$ ， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RANK 在宫颈鳞癌及癌旁组织中的表达

免疫组织化学示：在癌旁组织中，RANK在少数细胞质中表达(图1A)。而在宫颈癌组织中，RANK在胞质中强表达(图1B)。评分后，肿瘤组织和癌旁组织得分分别为7.263 \pm 2.349和5.018 \pm 2.303，差异有统计学意义($t=5.145$ ， $P<0.001$ ，图2)；肿瘤组织高表达率为49.12%(28/57)，癌旁组织高表达率为19.30%(11/57)，RANK在肿瘤组织中表达显著高于癌旁组织。

2.2 RANK 的表达与宫颈癌临床病理因素的关系

临床病理因素分析示：RANK高表达与淋巴结转移、FIGO分期、淋巴脉管浸润(lymph vascular space invasion, LVSI)相关，而与年龄、肿瘤分化、肿瘤直径无相关性(表1)。

2.3 宫颈癌总体生存率及累计复发率预后因素分析

单因素分析示：影响总生存率的单因素包括FIGO分期($P=0.009$)、淋巴结转移($P=0.003$)及RANK高表达($P=0.007$)；影响累计复发率的单因素包括FIGO分期($P=0.015$)、淋巴结转移($P=0.026$)及RANK高表达($P=0.003$ ，表2)。

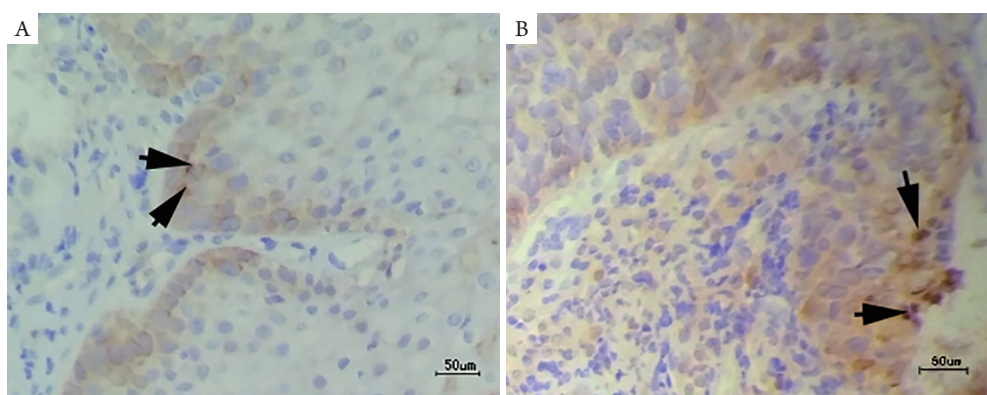


图1 RANK在宫颈鳞癌及癌旁组织中的表达(IHC, $\times 200$)

Figure 1 Expression of RANK protein in tumor and paratumor tissue of cervical squamous cell carcinoma (IHC, $\times 200$)

(A) RANK在癌旁组织中低表达；(B) RANK在宫颈癌组织中高表达。箭头指RANK阳性细胞。

(A) RANK protein was under-expressed in paratumor tissue; (B) RANK protein was over-expressed in tumor tissue. Arrows show RANK positive cell.

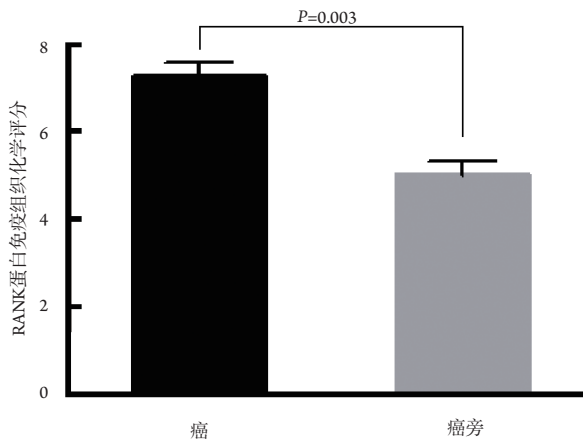


图2 肿瘤组织与癌旁组织中RANK蛋白免疫组织化学评分比较

Figure 2 Comparison of immunohistochemical score of RANK protein in tumor and paratumor tissues

多因素分析示：影响总生存率的多因素包括FIGO分期(HR=0.713, 95%CI 0.541~0.940, $P=0.016$)、RANK高表达(HR=2.060, 95%CI 1.172~3.620, $P=0.012$)；影响累计复发率的多因素包括FIGO分期(HR=0.550, 95%CI 0.330~0.917, $P=0.022$)和RANK高表达(HR=1.718, 95%CI 1.132~2.607, $P=0.011$, 表3)。

2.4 RANK 表达与宫颈鳞癌生存分析的关系

生存分析示：RANK高表达组5年总体生存率为32.14%，RANK低表达组5年生存率为79.31%，RANK高表达组5年总体生存率低于RANK低表达组($P=0.036$)；RANK高表达组5年累计复发率为64.29%，RANK低表达组为17.24%，RANK高表达组5年累计复发率高于RANK低表达组($P=0.032$, 图3)。

表1 RANK表达与宫颈鳞癌患者临床病理因素的关系

Table 1 Relationship between RANK expression and clinicopathological characteristics in cervical squamous cell carcinoma patients

参数	RANK染色		χ^2	P
	高表达	低表达		
年龄/岁			0.144	0.704
≥ 45	20	22		
< 45	8	7		
淋巴结转移			6.447	0.011
有	16	7		
无	12	22		
FIGO分期			3.959	0.047
III/IV	18	11		
I/II	10	18		
肿瘤分化			4.686	0.109
高	17	10		
中	4	4		
低	7	15		
LVSI			9.652	0.002
有	22	11		
无	6	18		
肿瘤最大径/cm			0.562	0.454
≥ 5	20	18		
< 5	8	11		

表2 总体生存率和累计复发率的单因素分析

Table 2 Univariate analysis of overall survival and cumulative recurrence rate

因素	总体生存率		累计复发率	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
年龄(<45岁 vs \geq 45岁)	1.182 (0.676~2.068)	0.558	1.226 (0.716~2.010)	0.458
FIGO分期(I/II vs III/IV)	0.415 (0.214~0.805)	0.009	0.311 (0.121~0.799)	0.015
肿瘤分化(低 vs 中 vs 高)	0.756 (0.443~1.290)	0.305	0.926 (0.529~1.621)	0.788
LVISI(是 vs 否)	0.486 (0.206~1.147)	0.099	0.631 (0.324~1.229)	0.176
肿瘤最大径(\leq 5 cm vs >5 cm)	0.813 (0.397~1.665)	0.571	0.645 (0.330~1.261)	0.120
淋巴结转移(是 vs 否)	0.402 (0.220~0.735)	0.003	0.491 (0.263~0.917)	0.026
RANK染色(高 vs 低)	2.251 (1.248~4.060)	0.007	2.062 (1.279~3.326)	0.003

表3 总体生存率和累计复发率的多因素分析

Table 3 Multi-logistic regression analysis of overall survival and cumulative recurrence rate

因素	总体生存率		累计复发率	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
淋巴结转移(是vs否)	0.639 (0.374~1.092)	0.101	0.651 (0.314~1.350)	0.249
FIGO分期(III/IV vs I/II)	0.713 (0.541~0.940)	0.016	0.550 (0.330~0.917)	0.022
RANK染色(高vs低)	2.060 (1.172~3.620)	0.012	1.718 (1.132~2.607)	0.011

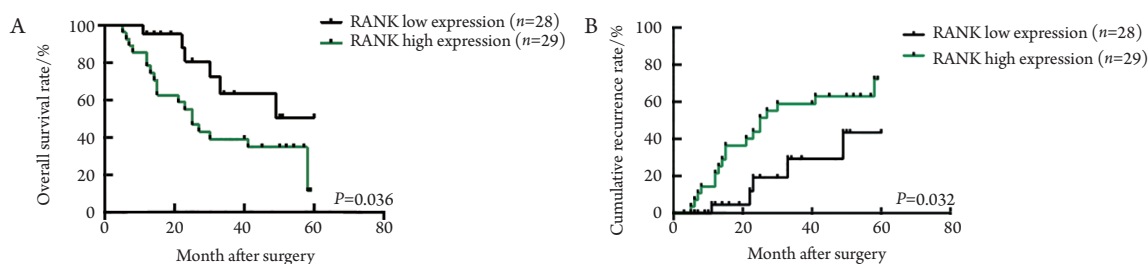


图3 RANK高低表达组的总生存率及累计复发率曲线

Figure 3 Overall survival and cumulative recurrence curve in the RANK high and low expression group

(A) 总体生存率曲线; (B) 累积复发率曲线。

(A) Overall survival curve; (B) Cumulative recurrence curve.

3 讨论

作为一种侵袭性较强的恶性肿瘤, 宫颈癌严重威胁着全球女性的健康^[11], 且欠发达地区及发展中国家病死人数占全球死亡人数的85%^[3], 其主要致死原因是肿瘤恶性侵袭造成剧烈疼痛、尿路梗阻及痿管等^[12]。通过传统手术及放疗, 早期患者治愈率可达80%~90%, 但一旦肿瘤恶性进展到晚期或有复发, 治愈率仍较差^[13]。如何抑制肿瘤恶性侵袭和转移进而降低宫颈癌患者复发和病

死率仍是目前研究的难点。研究^[14-15]表明: 多种分子标志物包括编码I类磷脂酰肌醇-3-激酶及人富含半胱氨酸蛋白61等可能与宫颈鳞癌的发生及发展相关, 但目前仍无研究提示其可明确用于宫颈癌预后并进一步指导临床诊治。

RANK是含有616个氨基酸的跨膜蛋白。与其配体RANKL结合后, 主要参与骨代谢及免疫调节, 但有研究^[16]表明其在恶性肿瘤的迁移和侵袭中也起重要作用。Schramek等^[8]的研究显示: 通过敲除乳腺上皮中RANK的表达, 可显著降低乳腺癌

的发生率并延缓肿瘤发生发展。Park等^[17]研究则显示尽管RANK的表达与否并不与临床病理参数相关, 但无论是单因素还是多因素分析结果均显示RANK表达与无瘤生存率(disease-free survival, DFS)呈负相关。本研究显示在宫颈癌中RANK高表达与FIGO分期、淋巴结转移、淋巴管浸润相关; 在生存分析结果中RANK高表达的患者5年总体生存率较低, 且5年累计复发率更高, 因此推测RANK可作为肿瘤治疗的潜在靶向指标。有趣的是在Pfitzner等^[18]的研究中, 高表达RANK的原位乳腺癌患者对化疗具有更高的敏感性, 但与此同时, 与高敏感性相对的, RANK高表达组患者肿瘤复发及病死率仍较高。在本研究中无论单因素还是多因素总体生存率和累计复发率分析结果均显示RANK与预后不良相关。针对骨肉瘤的研究^[19]通过阻断RANK/RANKL通路观察18个月, 发现可以明显缓解整体代谢情况, 从而确定了RANK/RANKL潜在的靶向治疗能力。此外, 研究^[20]显示: RANK可表达于不同肿瘤细胞系中, 而其配体RANKL不仅可由肿瘤细胞产生也可由肿瘤周围微环境分泌, 因此RANKL可通过自分泌或旁分泌途径作用于肿瘤细胞。旁分泌的典型例子之一是在骨巨细胞瘤中的研究, 即RANK表达于肿瘤组分中的巨破骨细胞及巨噬细胞中, 而RANKL则由基质细胞分泌^[21]。因此本研究主要检测肿瘤组织中RANK的表达, 而并未检测其配体RANKL的表达情况。在初步验证RANK表达及与预后相关性的基础上, 本研究可为后续进一步分子及体内外实验提供临床病理数据支持。

当然, 本研究也存在一定的局限性, 由于本研究是体内研究, RANK在宫颈癌细胞系中所起的作用如何尚不得知, 值得进一步研究。

综上, 本研究结果显示RANK在宫颈癌组织中高表达, 且与恶性临床病理特征相关, 故RANK高表达可作为预测宫颈癌组织预后的独立危险因素之一, 可指导临床实践。

参考文献

- Burki TK. Cervical cancer diagnosis and the US Affordable Care Act[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(1): e10.
- Wright JD, Chen L, Tergas AI, et al. Population-level trends in relative survival for cervical cancer[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213(5): 670.e1-670.e7.
- Elmajaoui S, Ismaili N, El Kacemi H, et al. Epidemiology and outcome of cervical cancer in national institute of Morocco[J]. *BMC Womens Health*, 2016, 16(1): 62.
- Sankaranarayanan R, Swaminathan R, Brenner H, et al. Cancer survival in Africa, Asia, and Central America: a population-based study[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 165-173.
- Zhao XL, Chen LF, Wang Z. Aesculin modulates bone metabolism by suppressing receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis and transduction signals[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488(1): 15-21.
- Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL[J]. *Nature*, 2006, 440(7084): 692-696.
- Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, et al. RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 103-107.
- Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 98-102.
- Wang J, Liu Y, Wang L, et al. Clinical prognostic significance and pro-metastatic activity of RANK/RANKL via the AKT pathway in endometrial cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5564-5575.
- Meva J, Chaudhary RK, Bhaduri D, et al. Lacunae in International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification for cervical carcinoma: observational study using TNM classification as comparator[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(6): 1071-1077.
- Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases[J]. *Ann Glob Health*, 2014, 80(5): 384-392.
- Small W Jr, Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: a global health crisis[J]. *Cancer*, 2017, 123(13): 2404-2412.
- Lim MC, Lee M, Shim SH, et al. Practice guidelines for management of cervical cancer in Korea: a Korean Society of Gynecologic Oncology Consensus Statement[J]. *J Gynecol Oncol*, 2017, 28(3): e22.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(269): p11.
- Mayer S, Gabriel B, Erbes T, et al. Cyr61 expression pattern and association with clinicopathological factors in patients with cervical cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(5): 2451-2456.
- Schieferdecker A, Voigt M, Riecken K, et al. Denosumab mimics the natural decoy receptor osteoprotegerin by interacting with its major binding site on RANKL[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6647-6653.
- Park HS, Lee A, Chae BJ, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2014, 110(7): 807-812.
- Pfitzner BM, Branstetter D, Loibl S, et al. RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer[J]. *Breast Cancer*

- Res Treat, 2014, 145(2): 307-315.
19. Cathomas R, Rothermundt C, Bode B, et al. RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward?[J]. *Oncology*, 2015, 88(4): 257-260.
 20. Renema N, Navet B, Heymann MF, et al. RANK-RANKL signalling in cancer[J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(4): e00366.
 21. Roux S, Amazit L, Meduri G, et al. RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) and RANK ligand are expressed in giant cell tumors of bone[J]. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117(2): 210-216.

本文引用: 李丹, 陈岚. 细胞核因子 κ B受体活化因子在宫颈鳞癌中的表达及其与临床病理因素和预后的关系[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(7): 1411-1417. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.006

Cite this article as: LI Dan, CHEN Lan. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B in cervical squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathological factors and prognosis[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(7): 1411-1417. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.006