

SIRT2 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义*

陈 静^{1,2}, 王红静^{1,2△}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇女儿童疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】 目的 研究沉默信息调节因子 2 (silencing information regulatory 2, SIRT2) 在宫颈癌组织、宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 组织的表达及临床意义。方法 免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 检测 262 例宫颈癌组织、75 例 CIN 组织及 75 例正常宫颈组织石蜡标本中 SIRT2 蛋白的表达, 并分析 SIRT2 蛋白表达与宫颈癌临床病理特征的关系; 采用 Western blot 法验证 40 例宫颈癌和 40 例正常宫颈新鲜组织标本中 SIRT2 蛋白的表达差异; 采用短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA)-SIRT2 沉默 SIRT2 在 HeLa 细胞中的表达, 通过 MTT、划痕实验检测下调 SIRT2 表达对 HeLa 细胞增殖、迁移能力的影响。结果 ① IHC 结果显示, 正常宫颈、CIN、宫颈癌组织中 SIRT2 蛋白的表达逐渐升高 ($P < 0.001$)。Western blot 也证实 SIRT2 蛋白的表达在宫颈癌组织较正常宫颈组织中高 ($P < 0.001$); ② SIRT2 在宫颈癌组织中高表达与宫颈癌的病理类型(腺癌)、FIGO 分期高、有淋巴结转移及有高危 HPV 感染有关 (P 均 < 0.05), SIRT2 表达水平与年龄、肿瘤分化程度、有无盆腔转移、有无累及宫颈间质及深度、有无累及颈体交界及阴道断端等无关 (P 均 > 0.05), 宫颈癌 SIRT2 蛋白高表达组患者的死亡率高于 SIRT2 蛋白低表达组 ($P < 0.05$); ③ shRNA-SIRT2 能抑制 HeLa 细胞中 SIRT2 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 且下调 SIRT2 蛋白表达后, HeLa 细胞的增殖和迁移能力减弱 ($P < 0.05$)。结论 SIRT2 在宫颈癌变过程中可能有促进作用, SIRT2 可能与宫颈癌的恶性程度发展有关。

【关键词】 SIRT2 宫颈癌 免疫组化 临床病理特征 生存分析

Expression Level of SIRT2 in Cervical Cancer Tissue and Its Clinical Significance CHEN Jing^{1,2}, WANG Hong-jing^{1,2△}. 1. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: whjcdx@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression level of silencing information regulatory 2 (SIRT2) in cervical cancer and CIN tissues and its clinical significance. **Methods** Immunohistochemistry was carried out to examine the expression of SIRT2 in 262 cases of cervical cancer tissues, 75 cases of precancerous lesions and 75 cases of normal cervical tissues, and the clinical implications of SIRT2 was further analyzed. The protein expression level of SIRT2 in 40 cervical cancer fresh tissue samples and 20 normal cervical tissue samples was detected by Western blot. shRNA-SIRT2 virus was transfected into HeLa cells to obtain the SIRT2-down-regulated HeLa cells. And the influence of down-regulation of SIRT2 on cell proliferation and migration was investigated by MTT and Scratch test. **Results** Immunohistochemical results showed that SIRT2 protein expression level gradually increased in cervical cancer, CIN and normal cervix tissues ($P < 0.001$). Western blot confirmed that SIRT2 expression level was higher in cervical cancer tissues than in normal cervix tissues ($P < 0.001$). The expression level of SIRT2 in cervical cancer was correlated with some factors, such as lymph node metastasis, histological type, clinical staging and HPV infection ($P < 0.05$). At the same time, it was independent of some factors including age, differentiation degree, pelvic metastasis, whether involving the cervical interstitial and the involvement depth and whether involving the neck junction and vaginal ends ($P > 0.05$). Mortality in SIRT2 high expression patient group was higher than that of SIRT2 low expression patient group ($P < 0.05$). shRNA interference technique could effectively inhibit the expression level of SIRT2 in HeLa cells ($P < 0.05$). MTT assay and Scratch test indicated that down-regulation of SIRT2 expression inhibited the proliferation and migration of HeLa cells ($P < 0.05$). **Conclusion** SIRT2 may play a promoting role in the progress of cervical cancer, and SIRT2 may be related to the development of malignant degree of cervical cancer, and the inhibition of SIRT2 expression may be a potential therapeutic target for cervical cancer.

【Key words】 SIRT2 Cervical cancer Immunohistochemistry Clinicopathological features Survival analysis

* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2017FZ0068)资助

△ 通信作者, E-mail: whjcdx@163.com

宫颈癌发病率在发展中国家的妇女恶性肿瘤高居第二位^[1]。反复高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈癌及宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)发生的重要致病因素之一^[2]。大多数宫颈癌患者能检测到高危型 HPV 的存在,而在高危型 HPV 中以 HPV16、18 型最为常见,宫颈癌患者中至少 50% 以上能检测到感染 HPV16、18^[3]。但是仅一部分受感染的女性发展为宫颈癌及少部分 HPV 阴性的女性发展为宫颈癌,因此可能存在其他发挥独立作用的致病因素或协同高危型 HPV 发挥致病作用,但其具体的致病因素和作用机制尚不清楚^[4-6]。

沉默信息调节因子 2 (silencing information regulatory 2, SIRT2) 是 Sirtuins 蛋白家族成员, Sirtuins 蛋白家族是近来发现的依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 的Ⅲ类组蛋白脱乙酰化酶类^[7]。人类 Sirtuins 蛋白家族中公认的成员有 7 个: SIRT1~SIRT7, 其功能与许多人体关键的生理病理学变化有关, 例如 DNA 损伤、DNA 修复、细胞应激、新陈代谢和调节基因的表达等, 并且与寿命延长、神经变性和年龄相关的疾病等有关^[7]。近年来对 Sirtuins 蛋白家族的研究越来越多, 尤其 Sirtuins 蛋白家族在肿瘤发生、发展的作用引起大量学者的关注^[7]。为进一步明确 SIRT2 在宫颈癌发生发展中的作用, 本研究首次采用免疫组织化学(IHC)检测宫颈癌、CIN 及正常宫颈组织中 SIRT2 的表达, 探讨 SIRT2 的表达与宫颈癌临床病理特征的关系, 同时采用短发夹 RNA (shRNA)-SIRT2 沉默在 HeLa 细胞中的表达, 探讨其对 HeLa 细胞增殖、迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 资料及标本来源

收集四川大学华西第二医院 2005 年 1 月至 2014 年 12 月(除 2012 年 1 月至 2013 年 1 月)行手术治疗, 并且经病理组织学检查证实确诊为宫颈癌患者(宫颈癌组, 262 例)、CIN 患者(CIN 组, 共 75 例, 包括 CIN II 35 例, CIN III 37 例, 原位癌 3 例)的临床资料及存档的石蜡标本, 同时收集正常宫颈组织石蜡标本 75 例(正常宫颈组, 其中包括因多发性子宫肌瘤行子宫全切除术 35 例, 因子宫腺肌症行子宫全切除术 40 例)。宫颈癌组患者年龄 23~74 岁, 平均(46.40±22.55)岁; 其中肿瘤高、中、低分化各 35、74、153 例; FIGO 分期 I a~I b₁、I b₂~

II a 期、II b~III 期各 75、124、63 例; 鳞癌 181 例、腺癌 81 例; 有 HPV 感染 158 例, 无 HPV 感染 104 例; 有淋巴结转移 57 例, 无淋巴结转移 205 例; 有盆腔转移 129 例, 无盆腔转移 133 例; 未累及宫颈间质(深度≤1/2)123 例, 累及宫颈间质(深度>1/2)139 例; 未累及颈体交界和阴道断端 133 例, 累及颈体交界和阴道断端 129 例。CIN 组患者年龄 20~69 岁, 平均(43.50±20.32)岁; 正常宫颈组年龄 32~51 岁, 平均(36.40±12.36)岁。

随机选择 2014 年 9 月至 2015 年 9 月行手术治疗、并且经病理组织学检查证实确诊为宫颈癌患者的新鲜组织标本 40 例〔患者年龄 29~57 岁, 平均(45.39±6.57)岁〕, 正常宫颈新鲜组织标本 40 例〔正常宫颈取自因子宫腺肌症及子宫肌瘤行子宫全切患者, 年龄 25~50 岁, 平均(44.50±5.45)岁〕。所有组织标本手术切除后立即放入液氮保存。该研究获四川大学华西第二医院伦理委员会批准, 所有参与该研究患者或患者家属均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

HeLa 细胞由四川大学华西第二医院西部妇产科研究院妇科姜长安实验室提供。SIRT2 抗体(英国 Abcam 公司), 鼠抗人 β-actin 单克隆抗体(美国 Sigma 公司), 荧光标记鼠、兔二抗 DyLight 680(美国 KPL 公司), IHC 试剂盒 DAB 显色剂(DAKO 公司), BSA(Solarbio 公司), 正常兔血清(Boster 公司), EDTA(pH 9.0)抗原修复液、PBS 缓冲液、苏木素染液(武汉谷歌生物科技有限公司), 凝胶成像分析系统、蛋白垂直电泳槽、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司), 干燥烘箱、二氧化碳培养箱、无菌操作超净台、电热恒温水浴箱(美国 Thermo 公司), shRNA-SIRT2 序列(5'-GCTCATCAACAAGGAGAAA GC-3')及阴性对照(shRNA NC)序列(5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3')由上海吉玛有限公司设计并合成。

1.3 实验方法

1.3.1 IHC 法检测宫颈组织中 SIRT2 蛋白的表达
采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法(streptavidin-peroxidase, SP)进行免疫组化染色。石蜡标本 5 μm 切片, 常规脱蜡, 梯度酒精脱水, 组织切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液(pH9.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复, PBS 冲洗 5 min×3 次; 3%过氧化氢室温孵育 25 min(避光)阻断灭活内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 5 min×3 次, 切片加用 10%正常兔血清室温封闭 30 min, 在

切片上滴 SIRT2 山羊一抗(工作浓度 1:500),切片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜;PBS 冲洗 5 min×3 次,加与一抗相应种属的 HRP 标记二抗(工作浓度 1:1500)覆盖组织,室温孵育 50 min;二氨基联苯氨(DAB)显色,苏木素复染,常规脱水、干燥、封片。结果的判定:以细胞质内有棕黄色颗粒者为染色阳性(SIRT2 主要定位在细胞质中)。根据阳性染色细胞所占比例及染色强度和范围进行结果判断^[8]。具体为:显微镜下随机取切片中 3 个高倍视野(×400),细胞染色阳性率≤25%为阴性,>25%为阳性。阳性细胞按着色强度和范围分级:阳性细胞呈淡黄色或阳性细胞率为 26%~50%为弱阳性,着色强度 51%~75%为中度阳性,着色强度≥75%为强阳性。以细胞染色阳性(>25%)和染色强度和范围为弱阳性(25%~50%)、中度阳性(51%~75%)、强阳性(≥75%)结果计算阳性表达率,将宫颈癌组织细胞染色阳性+染色强度和范围弱阳性判为 SIRT2 蛋白水平低表达,细胞染色阳性+染色强度和范围为中度阳性、强阳性判为 SIRT2 蛋白水平高表达。结果判断由研究者和两名经验丰富的病理医生阅片完成。

1.3.2 Western blot 检测 SIRT2 蛋白的表达 提取新鲜宫颈组织标本组织总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。经电泳、电转、封闭后分别与 SIRT2 及 β -actin 抗体作用(抗体滴度分别为 1:1000 和 1:5000),最后采用化学发光法检测目的条带,用凝胶成像仪拍照并测定各显色条带的灰度值。以 SIRT2/ β -actin 灰度的比值为 SIRT2 蛋白的相对表达量。

1.3.3 shRNA-SIRT2 对 HeLa 细胞表达 SIRT2 蛋白的影响 HeLa 细胞用含 10% FBS、青-链霉素(100 U/mL 青霉素+100 μ g/mL 链霉素)的 DMEM 培养液培养。将 HeLa 细胞随机分为 shRNA NC 组(即对照组)和 shRNA-SIRT2 组。细胞培养 48 h 后,按转染试剂盒说明书,将构建后的载体 shRNA NC(5 μ g/mL)和 shRNA-SIRT2(5 μ g/mL)分组转染入 HeLa 细胞。转染 HeLa 细胞后 72 h 用 Western blot 检测细胞中 SIRT2 蛋白的表达(方法同 1.3.2)。

1.3.4 MTT 实验检测 shRNA-SIRT2 对 HeLa 细胞增殖的影响 取生长良好的 HeLa 细胞,将细胞按 4×10^3 mL⁻¹ 密度接种于 96 孔板,培养 48 h 后加入 shRNA-SIRT2(5 μ g/mL)及 shRNA NC(阴性对照,5 μ g/mL),每组设 3 复孔,处理 24 h 后每孔加入 15 μ L、5 g/L 的 MTT 培养箱中继续培养 24、

48 h,弃上清,每孔再加入 150 μ L 的 DMSO,微量振荡器振荡 10 min,酶标仪测定 490 nm 波长处吸光度(A)值,重复实验 3 次,检测 HeLa 细胞的增殖情况。

1.3.5 划痕实验检测 shRNA-SIRT2 对 HeLa 细胞迁移能力的影响 取生长良好的 HeLa 细胞,以密度为 4×10^5 mL⁻¹ 接种于 6 孔板,培养 48 h 后加入 shRNA-SIRT2(5 μ g/mL)及 shRNA NC(阴性对照,5 μ g/mL),每组设 3 个复孔。培养 24 h,待细胞铺满约 80% 孔,用无血清的培养基漂洗一遍,用 200 μ L 的移液枪头垂直于培养板划“一”字划痕,1640 培养基清洗细胞 3 次,弃上清中细胞后,每孔加入 2 mL 不含血清的培养基,37℃、体积分数为 5%CO₂ 条件下继续培养 24 h、48 h,再在倒置显微镜下观察细胞的迁移情况,并以每组相应时点划痕宽度与 0 h 划痕宽度的比值计算 24 h、48 h 的相对距离。相对距离值越小,迁移能力越强。

1.4 统计学方法

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,单因素分析采用 log-rank 检验(时序检验)。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IHC 检测各组宫颈组织 SIRT2 蛋白的表达

如图 1 所示,SIRT2 阳性染色主要定位于细胞质内,阳性显色为不均质棕色颗粒。在正常宫颈组、CIN 组及宫颈癌组患者的宫颈组织中 SIRT2 阳性表达率分别为 6.67%(5/75)、37.33%(28/75)、84.73%(222/262),组间差异有统计学意义($\chi^2=174.115,P<0.001$),提示随着病情进展,SIRT2 的阳性表达逐渐增加。

2.2 SIRT2 表达与宫颈癌临床病理特征及预后的关系

将宫颈癌 SIRT2 表达分为低表达组和高表达组,由表 1 可见,SIRT2 在宫颈癌组织的表达水平在肿瘤不同临床分期、病理类型、淋巴结是否转移、是否有高危型 HPV 感染间的差异有统计学意义(P 均 <0.05)。而在患者不同年龄、分级、有无盆腔转移、有无累及宫颈间质及深度、有无累及颈体交界及阴道断端间的差异无统计学意义(P 均 >0.05)。截止末次随访时间(2016 年 12 月 30 日)宫颈癌 SIRT2 高表达组患者死亡率高于 SIRT2 低表达组,差异有统计学意义($P<0.001$)。

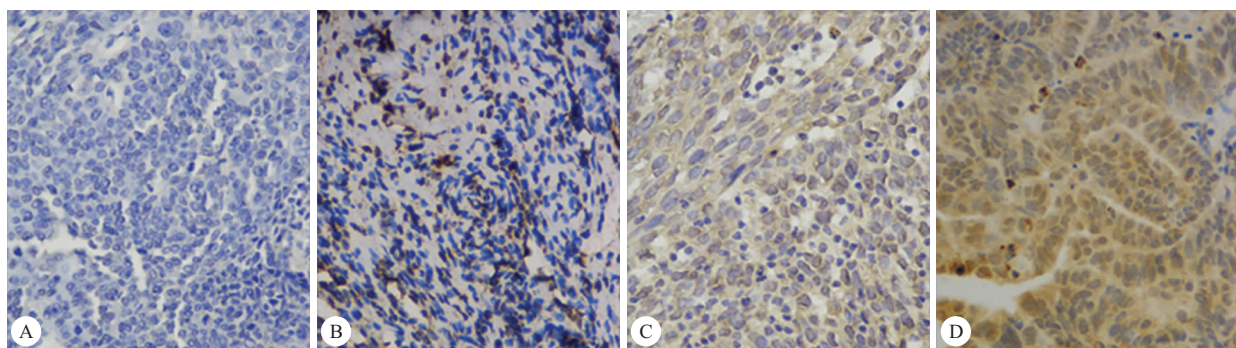


图 1 IHC 检测各组宫颈组织中 SIRT2 蛋白的表达。SP $\times 400$

Fig 1 The expression of SIRT2 protein in cervical tissues of each group was detected by IHC. SP $\times 400$

A: Normal cervical tissues; B: CIN tissues; C: Squamous cell carcinoma of the cervix tissues; D: Adenocarcinoma of the cervix tissues

表 1 SIRT2 表达与宫颈癌临床病理特征及预后的关系

Table 1 The relationship between SIRT2 expression and clinicopathological characteristics and prognosis of cervical cancer

Clinicopathological features	High SIRT2 expression group ($n=205$)/case (%)	Low SIRT2 expression group ($n=57$)/case (%)	χ^2	P
Age			0.382	>0.05
≤ 45 yr.	103 (79.8)	26 (20.2)		
>45 yr.	102 (76.7)	31 (23.3)		
Degree of differentiation			0.512	>0.05
Well-differentiated	27 (77.1)	8 (22.9)		
Moderately-differentiated	56 (75.7)	18 (24.3)		
Poorly-differentiated	122 (79.3)	31 (20.3)		
FIGO staging			157.420	<0.001
I a- I b ₁	21 (28.0)	54 (72.0)		
I b ₂ - II a	121 (97.6)	3 (2.4)		
II b- III	63 (100)	0 (0)		
Pathological type			14.180	<0.001
Squamous cell carcinoma	130 (71.8)	51 (28.2)		
Adenocarcinoma	75 (92.6)	6 (7.4)		
Lymphnode metastasis			5.396	<0.05
Yes	100 (63.3)	58 (36.7)		
No	39 (39.0)	61 (61.0)		
High risk-HPV infection			14.542	<0.001
Yes	51 (89.5)	6 (10.5)		
No	154 (75.1)	51 (24.9)		
Pelvic metastasis			2.013	>0.05
Yes	93 (72.1)	36 (27.9)		
No	85 (63.9)	48 (36.1)		
Involvement of the stroma and the depth of the cervix			2.620	>0.05
Yes	99 (71.2)	40 (28.8)		
No	76 (61.8)	47 (38.2)		
Involvement of the junction of the neck body and the vagina			0.053	>0.05
Yes	89 (69.0)	40 (31.0)		
No	90 (67.7)	43 (32.3)		
Prognosis			14.799	<0.001
Survival	139 (71.6)	55 (28.4)		
Death	50 (96.2)	2 (3.8)		
Missed	16 (100.0)	0 (0)		

FIGO: International federation of gynecology and obstetrics

宫颈癌 SIRT2 高表达组生存率低于低表达组，见图 2。

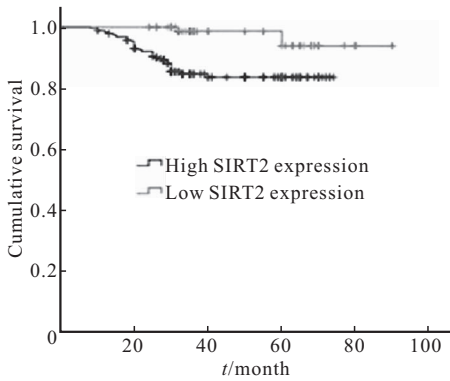


图 2 两组宫颈癌患者生存曲线的比较

Fig 2 Comparison of survival curves between two groups of cervical cancer patients

2.3 Western blot 检测新鲜宫颈组织中 SIRT2 蛋白的表达水平

宫颈癌组及正常宫颈组 SIRT2 蛋白相对表达量分别为 1.34 ± 0.56 、 0.41 ± 0.08 ，两组 SIRT2 蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.0001$)，见图 3。

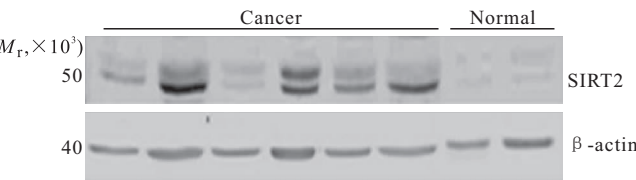


图 3 Western blot 检测 SIRT2 在宫颈癌及正常宫颈组织的表达

Fig 3 The expression of SIRT2 protein in cervical cancer and normal cervical tissues was detected by Western blot

2.4 Western blot 检测 shRNA-SIRT2 对 HeLa 细胞表达 SIRT2 蛋白的影响

shRNA NC 组和 shRNA-SIRT2 组 SIRT2 蛋白的相对表达量分别为： 3.30 ± 0.44 、 0.29 ± 0.04 ，shRNA-SIRT2 组 SIRT2 蛋白表达较 shRNA NC 组低 ($P < 0.001$)，见图 4。

2.5 MTT 检测 shRNA-SIRT2 对 HeLa 细胞增殖能力的影响

shRNA-SIRT2 组细胞 24、48 h 增殖能力低于 shRNA NC 组 ($P < 0.05$)，见图 5。

2.6 划痕实验检测 shRNA-SIRT2 对 HeLa 细胞迁移能力的影响

shRNA-SIRT2 组细胞 24 h、48 h 的迁移距离分别为 $(62.51 \pm 13.44) \mu\text{m}$ 、 $(68.00 \pm 13.38) \mu\text{m}$ ，

shRNA NC 组为 $(128.83 \pm 17.59) \mu\text{m}$ 、 $(211.34 \pm 23.96) \mu\text{m}$ ，shRNA-SIRT2 组细胞在同一时间点的迁移能力较 shRNA NC 组弱，差异有统计学意义 ($P < 0.001$)，见图 6。

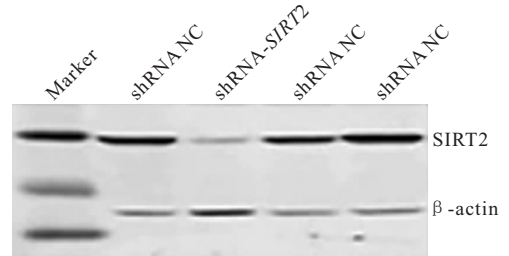


图 4 不同 HeLa 细胞组 SIRT2 的表达水平

Fig 4 The expression levels of SIRT2 in different HeLa cell groups

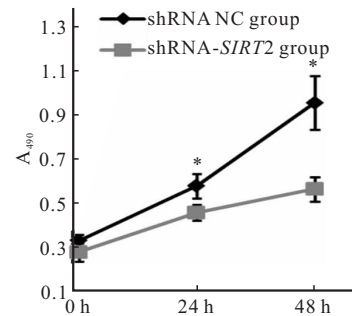


图 5 MTT 法检测 HeLa 细胞的增殖活力

Fig 5 MTT assay was used to detect the proliferation activity of HeLa cells

* $P < 0.05$, vs. shRNA-SIRT2 group

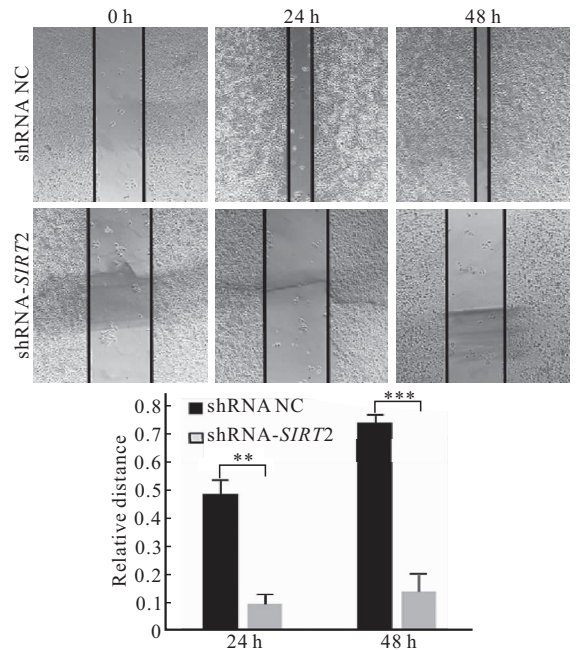


图 6 不同时段 HeLa 细胞的迁移

Fig 6 Migration of different HeLa cell groups in different periods

** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

3 讨论

妇科肿瘤中最常见是宫颈癌,其次是子宫内膜癌和卵巢癌^[9]。宫颈癌的发生发展是一个极其复杂、步骤繁多的过程。目前已有研究证实 HPV 是宫颈癌最主要的致病因素^[10],并且同一亚型的高危 HPV 反复感染是宫颈癌发生的最主要原因^[11]。但宫颈癌具体发病机制尚不明确,除外 HPV 感染,相关癌基因的激活及抑癌基因的失活、以及其他内源性因素和外源性因素也是影响宫颈癌发生发展的重要因子^[12]。

研究显示,SIRT2 通过使抑癌底物分子脱乙酰化从而发挥作用,如 Forkhead 转录因子(forkhead box protein O1,Foxo1),细胞分裂周期蛋白 20(cell division cycle 20,CDC20),乙酰化组蛋白 H3K56(histone acetyltransferase acetylating histone H3 lysine 56,H3K56)等,这些都是重要的维持细胞内环境稳定的分子^[13],若其功能障碍则可导致遗传的不稳定性和肿瘤的发生。另有研究发现 Sirtuins 家族对 H3KW 部位的染色质有去乙酰化作用,是调控葡萄糖代谢的重要基因,抑制有氧糖代谢和 Myc 依赖核糖体合成,缺失该基因将导致代谢迅速的重编程并促进肿瘤发生^[14]。

本研究结果显示,宫颈癌组织中 SIRT2 蛋白的表达高于 CIN 组织和正常宫颈组织,CIN 组织中的表达高于正常宫颈组织,即 SIRT2 蛋白在正常宫颈组织、CIN 组织及宫颈癌组织中的表达水平逐步增加。同时采用 Western blot 检测新鲜宫颈组织标本,也验证了 SIRT2 在宫颈癌组织中的表达量高于正常宫颈组织,提示在正常宫颈发生为宫颈癌的过程中,SIRT2 可能促进其发生,具有肿瘤启动子的特性。并且有报道^[15-19]显示 SIRT2 在急性髓性白血病、神经母细胞瘤、胰癌和晚期肝癌等肿瘤中高表达,与在宫颈癌中高表达一致,也具有肿瘤启动子的特性。

本研究还发现,SIRT2 在宫颈癌的表达水平在肿瘤临床分期越高、组织病理类型为腺癌、有淋巴结转移、感染高危型 HPV 和死亡或失访者高表达(P 均 <0.05),在不同患者年龄、肿瘤分化程度、有无盆腔转移、有无累及宫颈间质及深度、有无累及颈体交界及阴道断端间的差异无统计学意义(P 均 >0.05)。

据文献报道,宫颈腺癌约占宫颈癌的 2%~5%,且宫颈腺癌的发病率呈上升趋势,从 5%上升

为 15.1%~18.5%,并且发病人群趋于年轻化^[20-23]。本研究结果显示,SIRT2 在腺癌中的表达水平高于鳞癌,提示 SIRT2 可能与宫颈癌的恶性发展相关,是促进宫颈癌进一步恶化的重要因子。

盆腔淋巴结的转移是决定宫颈癌患者治疗方案、手术范围及患者预后情况的重要因素,目前主要依靠影像学手段如 CT、MRI 等来判断有无淋巴结的转移,而部分影像学检查花费昂贵,术前术后的多次检查给部分患者造成极大的经济负担,若能发现独立的生物学肿瘤指标能准确的预测是否有盆腔淋巴结的转移,将对对患者疾病的判断有重大意义^[24-25]。本研究结果发现,SIRT2 的表达水平与有盆腔淋巴结转移有关,提示 SIRT2 蛋白水平的高表达可能是判断宫颈癌有无盆腔淋巴结转移的危险因素指标之一。

感染 HPV 往往导致良性的上皮组织病变,但若反复感染相同的高危型 HPV(如 HPV16、HV18),则将极大增加发展为宫颈癌的风险。高危型 HPV 产物 E6 蛋白可以通过结合抑癌基因 p53,从而通过刺激泛素化介导 p53 的降解,同样,高危型 HPV 产物 E7 蛋白通过结合 pRB 肿瘤抑制蛋白,并促进其降解从而促进肿瘤的发生^[26]。本研究结果发现,SIRT2 的表达水平在有高危型 HPV16、18 感染的患者中明显增高,提示 SIRT2 可能协同 HPV 导致宫颈癌的发生,另有研究报道 HPV16 DNA 在侵袭性肿瘤中明显增高,与肿瘤的侵袭性相关^[5-6],而我们的研究也提示 SIRT2 可能与宫颈癌的恶性程度相关。

运用 Kaplan-Meier 法绘制 SIRT2 低表达组及高表达组的生存曲线图,我们发现宫颈癌患者的生存率在 SIRT2 高表达组较 SIRT2 低表达组低,提示高表达 SIRT2 与宫颈癌患者生存率可能相关,应进一步扩大样本量验证。

本研究通过 shRNA 干扰 HeLa 细胞表达 SIRT2 蛋白,从而获得稳定下调 SIRT2 蛋白水平的 HeLa 细胞,发现下调 HeLa 细胞表达 SIRT2 蛋白后可减弱 HeLa 细胞的生长、增殖、迁移能力。有文献报道 SIRT2 抑制剂 tenovin-6 抑制 SIRT2 在胃癌细胞中的表达,可引起内质网应激诱导胃癌细胞系中的死亡受体 5 上调,从而导致胃癌细胞死亡增加^[27-28],其作用机制可能与 SIRT2 在宫颈癌中的一致。研究发现在原发性肝癌细胞中 SIRT2 的上调与血管浸润、肿瘤分期、淋巴结转移和生存率显著相关,通过抑制肝癌细胞系中 SIRT2 的表达水平对

其运动性和侵袭性有显著抑制^[8],与本研究结论一致。

综上所述, SIRT2 可能参与了宫颈癌的发生发展过程,减弱 SIRT2 的表达可能抑制宫颈癌恶性程度的发展,希望为宫颈癌的靶向治疗提供前期研究的理论依据,提供新的潜在治疗靶点。

参 考 文 献

[1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *J Int Cancer*, 2015, 136(5):359-386.

[2] QMICHOU Z, KHYATTI M, BERRAHO M, *et al.* Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women. *BMC Infect Dis*, 2013, 13: 378 [2019-05-17]. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-378>.

[3] LI N, FRANCESCHI S, HOWELL-JONES R, *et al.* Human papillomavirus type distribution in 30 848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int Cancer*, 2011, 128(4):927-935.

[4] TJALMA W A, VAN WAES T R, VAN DEN EEDEN L E, *et al.* Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2005, 19(4):469-483.

[5] CUSCHIERI K S, WHITLEY M J, CUBIE H A. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence: implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol*, 2004, 73(1):65-70.

[6] THOMAS D, RAY R M, QIN Q. Risk factors for progression of squamous cell cervical carcinoma insitu to invasive cervical cancer: result of a multiple study. *Cancer Cause Contro*, 2002, 13(7):683-690.

[7] 冉龙宽, 宋春丽, 李宛蔚, 等. SIRT2 基因沉默后对肝癌细胞增殖的影响. *第三军医大学学报*, 2014, 36(20):2098-2102.

[8] CHEN J, CHAN A W, TO K F, *et al.* SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin signaling. *Hepatology*, 2013, 57(6):2287-2298.

[9] CONSTANTINO P, TISCHKOWITZ M. Genetics of gynaecological cancers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 42: 114-124 [2019-05-17]. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.01.004> Get rights and content.

[10] 黄立冬. 宫颈癌及其癌前病变的研究进展. *右江医学*, 2008(4):486-489.

[11] 汤冬梅. TCT、HPV 分型检测联合阴道镜检查在宫颈癌筛查

中的临床应用. *中国医药指南*, 2017, 15(28):18-19.

[12] 周文超. 宫颈癌发病机制研究进展. *山西职工医学院学报*, 2016(6):55-58.

[13] MICHAN S, SINCLAIR D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 2007, 404(1):1-13.

[14] SEBASTIÁN C, ZWAANS B M, SILBERMAN D M, *et al.* The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that control cancer metabolism. *Cell*, 2012, 151(6):1185-1199.

[15] CHA Y I, KIM H S. Emerging role of sirtuins on tumorigenesis: possible link between aging and cancer. *BMB Reports*, 2013, 46(9):429-438.

[16] KOZAKO T, SUZUKI T, YOSHIMITSU M, *et al.* Anticancer agents targeted to sirtuins. *Molecules*, 2014, 19(12):20295-20313.

[17] 戚红. Wnt5a 在卵巢癌血管生成拟态中的作用. 天津: 天津医科大学, 2014.

[18] 吴小华. 宫颈癌的新分期与临床意义. *实用妇产科杂志*, 2011, 27(6):406-407.

[19] MCGLYNN L M, ZINO S, MACDONALD A I, *et al.* SIRT2: tumour suppressor or tumour promoter in operable breast cancer. *Eur J Cancer*, 2014, 50(2):290-301.

[20] 廖震华, 陈增春, 陈桂林, 等. 190 例宫颈癌患者临床病理特征及预后分析. *中国肿瘤*, 2010, 19(4):283-286.

[21] 刘文欣, 陈颖, 杨广明. 144 例宫颈腺癌临床与预后相关因素分析. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(11):664-667.

[22] SCHWARTZ S M, WEISS N S. Increased incidence of adenocarcinoma of the cervix in young women in the United States. *Am J Epidemiol*, 1986, 124(6):1045-1047.

[23] YAMAKAWA Y, FORSLUND O, TESHIMA H, *et al.* Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix detected by polymerase chain reaction (PCR). *Gynecol Oncol*, 1994, 53(2):190-195.

[24] 周娜, 吴宜林. MA 宫颈癌 1、c-Met 蛋白在宫颈癌中的表达及与盆腔淋巴结转移的关系研究. *实用妇产科杂志*, 2014, 30(3):199-203.

[25] 冯淑瑜, 张彦娜, 刘建刚. 宫颈癌淋巴结转移的高危因素及预后分析. *癌症*, 2005, 24(10):1261-1266.

[26] GAO G, SMITH DI. Human papillomavirus and the development of different cancers. *Cytogenet Genome Res*, 2016, 150(3/4):185-193.

[27] LI Y, MATSUMORI H, NAKAYAMA Y, *et al.* SIRT2 down-regulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent 300 decrease, eventually leading to apoptosis. *Genes Cells*, 2011, 16(1):34-45.

[28] JING H, HU J, HE B, *et al.* A SIRT2-selective inhibitor promotes c-Myc oncoprotein degradation and exhibits broad anticancer activity. *Cancer Cell*, 2016, 29(3):297-310.

(2019-03-02 收稿, 2019-05-26 修回)

编辑 沈进