

宫颈鳞癌组织中 TPX2 和 Aurora-A 蛋白的表达水平及预后意义

董洁¹, 胡观丽¹, 况蕾¹, 庄涛¹, 张蓓^{1,2}

作者单位:¹徐州医科大学研究生学院, 江苏 徐州 221000; ²徐州市中心医院妇产科, 江苏 徐州 221000

通信作者: 张蓓, 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为妇科肿瘤, E-mail: bettyzhang10@163.com

摘要:目的 探究 TPX2 和 Aurora-A 蛋白在宫颈鳞癌组织中的表达水平及预后意义。方法 回顾性选取 2011 年 6 月至 2013 年 6 月徐州市中心医院 85 例宫颈鳞癌、30 例宫颈上皮内瘤变(CIN)Ⅱ~Ⅲ、30 例 CIN I 和 20 例慢性宫颈炎四组病人为研究对象。运用免疫组织化学方法检测 TPX2 和 Aurora-A 蛋白在各组宫颈组织中的表达情况;本课题组对宫颈鳞癌病人进行随访,采用 Kaplan-Meier 法以及 Cox 比例风险回归模型分析 TPX2 和 Aurora-A 蛋白表达水平与宫颈鳞癌病人总生存期的关系。结果 TPX2 蛋白在宫颈鳞癌、CIN Ⅱ~Ⅲ、CIN I 和慢性宫颈炎四组病人宫颈组织中的表达阳性率分别为 60.0%、50.0%、6.7%、5.0%, Aurora-A 蛋白在四组病人宫颈组织中的表达阳性率分别为 63.5%、53.3%、10.0%、5.0%。TPX2 和 Aurora-A 的蛋白表达水平在宫颈鳞癌和 CIN Ⅱ~Ⅲ宫颈组织中显著高于 CIN I 和慢性宫颈炎($P < 0.05$),在宫颈鳞癌组与 CIN Ⅱ~Ⅲ组、CIN I 组与慢性宫颈炎组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。相关分析显示 TPX2 与 Aurora-A 的蛋白表达水平呈正相关($r = 0.229, P = 0.035$)。Kaplan-Meier 生存分析显示,TPX2 和 Aurora-A 蛋白阳性表达病人的总生存期显著低于阴性表达病人($P < 0.05$)。多因素 Cox 回归分析显示,TPX2 和 Aurora-A 蛋白可作为宫颈鳞癌病人预后的独立危险因素[风险比(HR) = 2.449, 95% 置信区间(CI): 1.056~5.676, $P = 0.037$; $HR = 2.354$, 95% CI : 1.182~4.688, $P = 0.015$]。结论 宫颈鳞癌组织中 TPX2 和 Aurora-A 蛋白表达水平增高,其阳性表达与宫颈鳞癌的预后相关,有望成为指导临床治疗和预后的分子靶标。

关键词: 宫颈肿瘤; 宫颈上皮内瘤样病变; 宫颈炎; 危险因素; TPX2; Aurora-A; 预后

Expression and prognostic significance of TPX2 and Aurora-A protein in cervical squamous cell carcinoma

DONG Jie¹, HU Guanli¹, KUANG Lei¹, ZHUANG Tao¹, ZHANG Bei^{1,2}

Author Affiliations: ¹Graduate School of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Abstract: Objective To investigate the expression level and prognostic significance of TPX2 and Aurora-A protein in cervical squamous cell carcinoma. **Methods** Eighty-five patients with cervical squamous cell carcinoma, 30 patients with cervical intraepithelial neoplasias (CIN) Ⅱ-Ⅲ, 30 patients with CIN I, and 20 patients with chronic cervicitis in Xuzhou Central Hospital from June 2011 to June 2013 were selected retrospectively. Immunohistochemistry was used to detect the expression of TPX2 and Aurora-A protein in cervical tissues of each group. Patients were followed up by ourselves, Kaplan-Meier method and Cox proportional hazards regression model were used to analyze the relationship between TPX2 and Aurora-A expression and the overall survival of cervical squamous cell carcinoma patients. **Results** The positive rates of TPX2 expression in cervical tissues of the four groups (cervical squamous cell carcinoma, CIN Ⅱ-Ⅲ, CIN I, chronic cervicitis) were 60.0%, 50.0%, 6.7% and 5.0%, respectively. The positive rates of Aurora-A expression in cervical tissues of the four groups were 63.5%, 53.3%, 10.0% and 5.0%, respectively. The protein expression levels of TPX2 and Aurora-A in cervical squamous cell carcinoma and CIN Ⅱ-Ⅲ patients were significantly higher than that in CIN I and chronic cervicitis ($P < 0.05$). However, there were no significant difference between the cervical squamous cell carcinoma group and the CIN Ⅱ-Ⅲ group, the CIN I group and the chronic cervicitis group ($P > 0.05$). The protein expression levels of TPX2 and Aurora-A were positively correlated ($r = 0.229, P = 0.035$). Kaplan-Meier survival analysis showed that patients with positive expression of TPX2 and Aurora-A had shorter overall survival than patients with negative expression ($P < 0.05$). Multivariate Cox regression analysis revealed that TPX2 and Aurora-A could be used as independent risk factors for prognosis in patients with cervical squamous cell carcinoma [hazard ratio (HR) = 2.449, 95% CI : 1.056-5.676, $P = 0.037$; $HR = 2.354$, 95% CI : 1.182-4.688, $P = 0.015$, respectively]. **Conclusion** The expression of TPX2 and Aurora-A protein in cervical squamous cell carcinoma is increased. The positive expression of TPX2 and Aurora-A protein is related to the prognosis of cervical squamous cell carcinoma. TPX2 and Aurora-A could be molecular targets for clinical treatment and prognosis.

Key words: Uterine cervical neoplasms; Cervical intraepithelial neoplasia; Uterine cervicitis; Risk factors; TPX2; Aurora-A; Prognostic

宫颈癌位居所有女性肿瘤致死原因第3位^[1]。宫颈上皮内瘤变(CIN)被广泛认为是宫颈癌的癌前病变,从CIN进展到宫颈癌的过程中涉及一系列分子表达及功能的异常变化^[2]。TPX2(targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2)蛋白为微管相关蛋白,参与有丝分裂纺锤体形成和稳定性形成,Aurora-A(serine/threonine-protein kinase 6)主要功能为在细胞分裂的过程中调节G2/M转变,在染色体稳定性方面起了重要作用^[3]。TPX2和Aurora-A蛋白已被证明在多种恶性肿瘤中存在基因扩增或者过表达,并且与肿瘤的进展和预后密切相关^[3]。然而,TPX2和Aurora-A在宫颈鳞癌组织中的蛋白表达水平与病人预后的关系仍有待于进一步研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性收集2011年6月至2013年6月于徐州市中心医院行手术治疗或宫颈活检的宫颈鳞癌、CIN及慢性宫颈炎病人的宫颈组织。我们将纳入的病人分为四组。宫颈鳞癌组:宫颈鳞癌85例,年龄范围为22~78岁,平均年龄48.6岁;临床分期按国际妇产科联盟(FIGO)标准^[4],Ⅰ期50例,Ⅱ期25例,Ⅲ期10例;高分化6例,中分化59例,低分化20例。CINⅡ~Ⅲ组:病人(细胞学检查为高级别鳞状上皮内瘤变)30例,年龄范围为27~76岁,平均年龄46.9岁。CINⅠ组:(细胞学检查为低级别鳞状上皮内瘤变)病人30例,年龄范围为27~65岁,平均年龄45.6岁。慢性宫颈炎组:慢性宫颈炎20例,取自同期因子宫肌瘤行子宫切除手术的宫颈组织标本,年龄范围为28~60,平均年龄46.25岁。

宫颈鳞癌病人纳入标准:病理切片确诊为宫颈鳞癌,病人的临床特征资料完整,均进行治疗后随访,主要包括门诊、电话随访。排除标准:合并其他系统恶性肿瘤、来自于生殖系统其他器官肿瘤的转移癌(包括原发性双癌)、有院外治疗史病人。本研究病人均签署知情同意书,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 免疫组织化学检测 免疫组织化学TPX2和Aurora-A一抗抗体购于Abcam公司。组织蜡块按照4 μm厚度连续切片,采用浓度为3%的过氧化氢处理切片后,高温环境进行抗原修复。取出小鼠抗人TPX2单抗,按照1:100稀释后4℃孵育过夜。37℃孵育二抗30 min后进行DAB显色。阴性对照中采用PBS缓冲液替代一抗处理。Aurora-A蛋白表达检测按照相同实验方式进行。TPX2阳性染色为棕黄色着色于细胞核,Aurora-A阳性为细胞核及胞质内出现黄褐色颗粒。采用半定量法,随机在显微镜下

选取10个高倍视野,每个视野观察100个细胞,计算每个视野阳性细胞数的百分比:<5%为阴性表达,>5%为阳性表达。

1.3 随访 本课题组对85例宫颈鳞癌病人均进行门诊或电话随访,以病人开始治疗的时间为随访起始时间,2018年6月30日为随访截止的日期。总生存期定义为病人从随访开始至出现宫颈鳞癌致死的时间。由于意外或其他不相关的疾病导致死亡的病人定义为截尾事件进行处理。

1.4 统计学方法 采用SPSS 19.0软件进行统计分析。观测资料均为计数资料,以例数及百分率表示,采用整体+分割 χ^2 检验进行组间比较。采用Spearman相关分析评估TPX2和Aurora-A蛋白水平的表达相关性。采用Kaplan-Meier建立生存分析模型,采用Log-rank检验比较两组总生存率的差异。采用Cox比例风险回归模型分析进行多因素分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TPX2和Aurora-A蛋白在宫颈鳞癌、CIN和慢性宫颈炎病人宫颈组织中的表达情况 TPX2蛋白四组病人宫颈组织中的表达阳性率差异有统计学意义($P<0.001$)。组间两两比较结果显示,宫颈鳞癌和CINⅡ~Ⅲ中TPX2蛋白表达阳性率高于CINⅠ和慢性宫颈炎($P<0.05$);宫颈鳞癌与CINⅡ~Ⅲ、CINⅠ与慢性宫颈炎之间差异无统计学意义($P>0.05$)。Aurora-A蛋白在四组病人宫颈组织中的表达阳性率也差异有统计学意义($P<0.001$)。组间两两比较结果显示,宫颈鳞癌和CINⅡ~Ⅲ中Aurora-A蛋白表达阳性率高于CINⅠ和慢性宫颈炎($P<0.05$);宫颈鳞癌与CINⅡ~Ⅲ、CINⅠ与慢性宫颈炎之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 TPX2和Aurora-A蛋白在宫颈鳞癌、CIN和慢性宫颈炎病人宫颈组织中的表达情况/例(%)

组别	例数	TPX2蛋白阳性	Aurora-A蛋白阳性
宫颈鳞癌组	85	51(60.00) ^{ab}	54(63.53) ^{ab}
CINⅡ~Ⅲ组	30	15(50.00) ^{ab}	16(53.33) ^{ab}
CINⅠ组	30	2(6.67)	3(10.00)
慢性宫颈炎组	20	1(5.00)	1(5.00)
χ^2 值		38.753	40.435
P值		<0.001	<0.001

注:a、b分别为与慢性宫颈炎组、CINⅠ组相比, $P<0.05$

2.2 宫颈鳞癌组织中TPX2和Aurora-A蛋白的表达相关性 进一步利用Spearman相关分析,研究TPX2和Aurora-A蛋白水平在宫颈鳞癌组织中表达水平的相关性发现,TPX2和Aurora-A的蛋白表达水

平呈正相关,且差异有统计学意义($r=0.229$, $P=0.035$)。见表2。

表2 TPX2和Aurora-A蛋白在85例宫颈鳞癌组织中的表达相关性/例

TPX2蛋白	Aurora-A蛋白		r 值	P 值
	阴性	阳性		
阴性	17	17	0.229	0.035
阳性	14	37		

2.3 宫颈鳞癌组织中TPX2和Aurora-A蛋白的表达与病人生存时间的关系 利用Kaplan-Meier生存分析方法,分别分析TPX2和Aurora-A蛋白的表达与宫颈鳞癌病人总生存期的关系。结果显示,TPX2和Aurora-A蛋白阳性表达病人的平均生存时间显著短于阴性表达病人($P<0.05$),见图1。TPX2蛋白表达阳性和阴性病人的5年生存率分别为37.8%和77.7%,Aurora-A蛋白表达阳性和阴性病人的5年生存率分别为37.3%和83.5%。

多因素Cox回归分析显示FIGO分期、病理分级、肌层浸润深度、淋巴结转移及TPX2、Aurora-A蛋白表达与宫颈鳞癌病人预后有关($P<0.05$)。在校正了可能的混杂因素后,TPX2和Aurora-A蛋白可作为宫颈鳞癌病人预后的独立危险因素[风险比(HR)=2.449,95%置信区间(CI):1.056~5.676, $P=0.037$; $HR=2.354$,95% CI :1.182~4.688, $P=0.015$]。见表3。

表3 Cox多因素回归分析宫颈鳞癌85例的预后影响因素

因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	P 值	HR 值	95%置信区间
TPX2蛋白	0.896	0.429	4.360	0.037	2.449	1.056~5.676
Aurora-A蛋白	0.856	0.352	5.928	0.015	2.354	1.182~4.688
年龄	0.011	0.016	0.500	0.479	1.011	0.981~1.043
FIGO分期	1.029	0.283	13.238	<0.001	2.798	1.607~4.871
分化程度	-0.631	0.334	3.582	0.058	0.532	0.277~1.023
肌层浸润深度	1.169	0.547	4.573	0.032	3.220	1.103~9.403
淋巴结转移	1.013	0.433	5.488	0.019	2.755	1.180~6.432

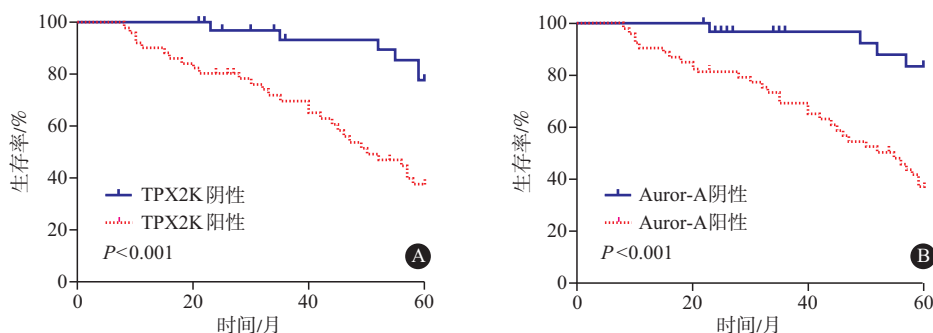


图1 TPX2和Aurora-A蛋白表达与85例宫颈鳞癌病人预后的关系:A为TPX2蛋白,B为Aurora-A蛋白

3 讨论

TPX2蛋白是一种微管相关蛋白,介导Xklp2的COOH-末端与微管的连接,在从G1/S期过渡到胞质分裂时显著表达^[5]。TPX2蛋白对细胞纺锤体的形成具有重要作用并且可以作为评估肿瘤细胞增殖能力的生物标志物^[6]。研究表明,TPX2蛋白在多种肿瘤组织中呈现高表达,包括乳腺癌^[7]、肺癌^[8]以及前列腺癌^[9]等。在细胞功能方面,TPX2可以促进肿瘤细胞的增殖,抑制细胞凋亡进而在多种肿瘤中发挥促癌基因的作用^[10]。在宫颈鳞癌细胞中,干扰TPX2基因的表达可以抑制宫颈鳞癌细胞在体外的增殖,并且可以抑制宫颈鳞癌细胞在裸鼠体内的生长,说明TPX2在宫颈鳞癌中扮演着促癌基因的作用^[11]。

Aurora-A是Aurora家族最重要的成员之一,主要功能是参与中心体的复制、分离与成熟,纺锤体微管的组装与稳定,以及染色体的正常分离等^[12]。Aurora-A蛋白的异常表达与较高的肿瘤发病率相关^[12]。在促癌作用机制方面,Aurora-A蛋白可以通过诱导基因组不稳定性,增强癌细胞的增殖、存活、迁移和侵袭等能力,进而促进癌症的进展^[13]。在宫颈鳞癌中,研究表明Aurora-A可能参与人乳头状瘤病毒(HPV)诱导的宫颈鳞癌的发生,并且可能作为有效的分子靶标,治疗HPV诱导的宫颈鳞癌^[14]。

在本研究中,我们重点检测了TPX2和Aurora-A蛋白在宫颈鳞癌组织中的表达,并且与CIN病人、慢性宫颈炎病人进行对比。我们发现,TPX2和Aurora-A蛋白在宫颈鳞癌和CIN II~III组织中表达阳性率显著高于CIN I和慢性宫颈炎病人。前期已有的研究表明,TPX2和Aurora-A蛋白在宫颈鳞癌和CIN组织中呈现出阳性表达^[15-17]。我们的结果与之类似,更进一步明确发现,TPX2和Aurora-A蛋白在CIN II~III中的表达阳性率开始显著升高。我们的研究提示,TPX2和Aurora-A蛋白可能在CIN I进展为CIN II~III的过程中,发挥着重要的促癌作用。此外

此外我们还发现,TPX2和Aurora-A蛋白在宫颈鳞癌病人组织中表达显著正相关。在分子机制上,TPX2可以作为Aurora-A的辅助因子,促进Aurora-A定位于纺锤体并发挥生物学功能;反之,Aurora-A也能促进TPX2功能的发挥^[18]。因此,TPX2和Aurora-A蛋白在宫颈鳞癌发生和进展过程中,可能发挥着协同促癌的作用。

本研究还发现,肿瘤组织中TPX2和Aurora-A蛋白的阳性表达与宫颈鳞癌病人较短的总生存期相关。TPX2和Aurora-A蛋白表达阳性的宫颈鳞癌病人5年生存期显著降低,提示TPX2和Aurora-A蛋白可能在宫颈鳞癌进展恶化的过程中发挥重要的作用。这与TPX2和Aurora-A蛋白在其它肿瘤中的预后意义类似。在消化道恶性肿瘤中,TPX2的阳性表达与病人较差的预后相关^[19];在非小细胞肺癌病人中,Aurora-A高水平表达也与病人的耐药及总生存期相关^[20]。本研究还利用多因素Cox回归分析发现,TPX2和Aurora-A蛋白可作为宫颈鳞癌病人预后的独立危险因素,提示TPX2和Aurora-A蛋白可以作为预后生物标志物,在宫颈鳞癌病人治疗效果预测中起到一定的临床意义。

本研究也存在一定的局限性。本研究仅关注宫颈鳞癌组织中TPX2和Aurora-A的蛋白表达,未能研究宫颈腺癌中TPX2和Aurora-A的蛋白表达水平及预后意义。

综上所述,本研究显示,TPX2和Aurora-A蛋白在宫颈鳞癌、CIN II~III组织中高表达,TPX2和Aurora-A蛋白可能在宫颈鳞癌从癌前病变进展为浸润癌的过程中发挥促癌的作用。同时,TPX2和Aurora-A蛋白阳性表达与宫颈鳞癌较差的预后相关,可以作为宫颈鳞癌病人预后的独立危险因素。因此,TPX2和Aurora-A可能作为新的分子靶点,为宫颈鳞癌的治疗和预后提供新的思路。

参考文献

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] NEUMAYER G, BELZIL C, GRUSS OJ, et al. TPX2: of spindle assembly, DNA damage response, and cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(16): 3027-3047.
- [4] 林仲秋, 王丽娟, 刘龙阳. 国际妇产科联盟2012宫颈癌诊治指南解读[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2013, 29(5): 323-325.
- [5] ZHANG R, ROOSTALU J, SURREY T, et al. Structural insight into TPX2-stimulated microtubule assembly[J]. *Elife*, 2017, 6: e30959. DOI: 10.7554/elife.30959.
- [6] GU JJ, ZHANG JH, CHEN HJ, et al. TPX2 promotes glioma cell proliferation and invasion via activation of the AKT signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 5015-5022.
- [7] BLANCO I, KUCHENBAECKER K, CUADRAS D, et al. Assessing associations between the AURKA-HMMR-TPX2-TUBG1 functional module and breast cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e120020. DOI: 10.1371/journal.pone.0120020.
- [8] SCHNEIDER MA, CHRISTOPOULOS P, MULEY T, et al. AURKA, DLGAP5, TPX2, KIF11 and CKAP5: five specific mitosis-associated genes correlate with poor prognosis for non-small cell lung cancer patients[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2): 365-372.
- [9] ZOU J, HUANG RY, JIANG FN, et al. Overexpression of TPX2 is associated with progression and prognosis of prostate cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 2823-2832.
- [10] VAN GIJN SE, WIERENGA E, VAN DEN TEMPEL N, et al. TPX2/Aurora kinase A signaling as a potential therapeutic target in genomically unstable cancer cells[J]. *Oncogene*, 2019, 38(6): 852-867.
- [11] CHANG H, WANG J, TIAN Y, et al. The TPX2 gene is a promising diagnostic and therapeutic target for cervical cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(5): 1353-1359.
- [12] 刘晶, 黄照权. Aurora激酶在肿瘤中的作用研究进展[J]. *华夏医学*, 2016, 29(5): 118-121.
- [13] YAN M, WANG C, HE B, et al. Aurora-A kinase: a potent oncogene and target for cancer therapy[J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(6): 1036-1079.
- [14] GABRIELLI B, BOKHARI F, RANALL MV, et al. Aurora A is critical for survival in HPV-transformed cervical cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(12): 2753-2761.
- [15] 张怀念, 张咏莉. 宫颈癌分子遗传机制及其相关基因功能研究[J]. *安徽医药*, 2015, 19(2): 219-221.
- [16] 常海平, 王敬芝, 田原, 等. 宫颈鳞癌组织中TPX2的表达及其临床意义[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2012, 18(9): 685-687.
- [17] 郭厉华, 胡庆伟, 梅丽娜, 等. Aurora-A在宫颈癌组织中异常表达的意义[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(2): 301-303.
- [18] MCINTYRE PJ, COLLINS PM, VRZAL L, et al. Characterization of three druggable hot-spots in the Aurora-A/TPX2 interaction using biochemical, biophysical, and fragment-based approaches[J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(11): 2906-2914.
- [19] WANG G, WANG Q, LI Z, et al. Clinical value of Xenopus kinesin-like protein 2 as a prognostic marker in patients with digestive system cancers: a systematic review and meta-analysis[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 1229-1243.
- [20] XU J, YUE CF, ZHOU WH, et al. Aurora-A contributes to cisplatin resistance and lymphatic metastasis in non-small cell lung cancer and predicts poor prognosis[J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 200.

(收稿日期: 2018-12-21, 修回日期: 2019-02-15)