

妇产科疾病研究专题

宫颈癌中 uc. 189 的表达及其临床病理意义

邓玉霞^{1, 2}, 颜 云³, 王成海³, 於晓平⁴, 卢 丹¹

- (1. 扬州大学临床医学院 妇产科, 江苏 扬州, 225009;
2. 江苏省宝应县人民医院 妇产科, 江苏 宝应, 225800;
3. 扬州大学医学院 病理教研室, 江苏 扬州, 225009;
4. 扬州大学附属医院 健康体检中心, 江苏 扬州, 225009)

摘 要: **目的** 检测 uc. 189 在宫颈鳞癌中的 RNA 表达水平,观察 uc. 189 外泌体的数量及其与临床的病理意义。**方法** 应用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 uc. 189 在 58 例宫颈鳞癌和癌旁正常组织中的 RNA 表达水平,电镜下观察宫颈鳞癌组织中 uc. 189 外泌体的数量,并分析其与宫颈鳞癌患者病理参数的相关性。**结果** uc. 189 在宫颈鳞癌组织中的表达水平高于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肿瘤组织中高含量的 uc. 189 外泌体与宫颈鳞癌的分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期均密切相关($P < 0.05$)。**结论** uc. 189 可能是一种宫颈癌的新促癌基因,其可通过外泌体形式参与宫颈鳞癌的发生、发展和转移过程。

关键词: uc. 189; 外泌体; 宫颈鳞癌; 临床病理意义; 淋巴结转移

中图分类号: R 365; R 737.33 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2021)06-049-04 DOI: 10.7619/jcmp.20201871

Expression of uc. 189 exosomes in cervical carcinoma and its clinicopathological significance

DENG Yuxia^{1, 2}, YAN Yun³, WANG Chenghai³, YU Xiaoping⁴, LU Dan¹

- (1. Department Gynecology and Obstetrics, Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225009; 2. Department Gynecology and Obstetrics, Baoying County People's Hospital of Jiangsu Province, Baoying, Jiangsu, 225009;
3. Pathological Teaching and Research Office, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225009; 4. Health Examination Center, Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225009)

Abstract: Objective To detect the RNA expression level of uc. 189 in cervical squamous cell carcinoma, and to observe the number of exosomes of uc. 189 as well as its clinicopathological significance. **Methods** Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of uc. 189 RNA in 58 cases of cervical squamous cell carcinoma and adjacent normal tissues. The number of uc. 189 exosomes in cervical squamous cell carcinoma was observed under electron microscope, and the correlation between the number of uc. 189 exosomes and pathological parameters of cervical squamous cell carcinoma was analyzed. **Results** The expression level of uc. 189 in the cervical squamous cell carcinoma was significantly higher than that in the adjacent normal tissues ($P < 0.05$). The high number of uc. 189 exosomes in tumor tissue was all closely related to the differentiation degree, lymph node metastasis and TNM stage of cervical squamous cell carcinoma ($P < 0.05$). **Conclusion** The uc. 189 may be a new oncogene of cervical cancer. The uc. 189 promotes the occurrence, development and metastasis of cervical squamous cell carcinoma through exosome.

Key words: uc. 189; exosome; cervical squamous carcinoma; clinicopathologic significance; lymphatic metastasis

宫颈癌是最常见的妇科癌症,该病主要由持续性宫颈癌人乳头瘤病毒(HPV)感染导致,目前认为长期宫颈炎会增加 HPV 感染概率,进而发生癌变^[1]。超保守 RNA uc. 189 是一种非编码 RNA,定位于人类染色体 6p21 上。研究^[2-3]表明 uc. 189 在女性恶性肿瘤中的表达水平升高,提示该病患者的预后较差。食管癌的 uc. 189 与食管鳞状细胞癌(ESCC)的浸润深度、转移及分期密切相关,但 uc. 189 以外泌体形式对宫颈鳞状细胞癌影响的研究较少。本研究采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和电镜检测 uc. 189 及其外泌体在子宫颈鳞癌细胞的表达情况,探讨 uc. 189 的临床病理学意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

58 例子宫颈癌组织及邻近正常宫颈组织标本均来源于扬州大学附属医院及苏北人民医院妇科手术患者,标本来源时间为 2019 年 1 月—2020 年 11 月,年龄 48~73 岁,中位年龄为 61 岁。所有患者术前未经过放射治疗和药物治疗。子宫颈鳞状细胞癌由扬州大学附属医院病理科医师明确诊断。癌症样本的实验运用及临床参数的收集均经扬州大学医学院伦理委员会批准,且患者签署知情同意书。新鲜子宫颈鳞状细胞癌组织采集后立即放入液氮罐,于-80℃冰箱内长期保存。

1.2 qRT-PCR

首先,萃取子宫颈鳞癌组织总 RNA,通过逆转录酶将 RNA 逆转录成 cDNA,然后使用 Takara 生物公司 qRT-PCR 反应试剂盒。反应体系为 50 μL, cDNA 为 1 μL, 12 × SYBR Premix ExTaqTMII 50 μL,上下游引物各 1 μL,加水调整反应体系至 50 μL,每组样本有 3 组复孔,内参为 U6(uc. 189 和 U6 的引物序列见表 1)。最后在 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system 仪器上进行 qRT-PCR 反应,读取 Ct 值,结果以 2^{-ΔΔCt} 计算。

表 1 荧光定量引物信息表

引物名称	引物序列(5'-3')
uc. 189	F: GATGGTTGTACTGATGGC
	R: TGGTACATGACGCTGAA
U6	F: CGCTTCGGCAGCACATATAC
	R: TTCACGAATTTGCGTGTCTAT

1.3 外泌体的检测和验证

1.3.1 外泌体的电镜检测:采用电镜技术对宫颈癌组织中外泌体进行检测,将肿瘤组织研磨成粉末溶解于 12 mL 培养液中,然后与 ExoQuick™ 试剂盒中的外泌体沉淀液混合,并根据试剂盒说明书步骤分离外泌体。分离的外泌体用 2% 戊二醛固定,加载到碳涂层网格上,透射电镜观察(放大倍数 250k ×)。外泌体计数方法:电镜下对鳞状细胞癌组和癌旁正常组织的每个组织片随机取 5 个视野,统计并计数外泌体数量,并比较 2 组的差异。

1.3.2 外泌体的蛋白免疫印迹法(Western blot)验证:Western blot 实验步骤参考已经发表的文章中所述^[4]。主要使用的验证抗体有:抗 CD9(#ab2215, Abcam 公司)、抗 CD81(#ab109201, Abcam 公司)和内参抗体 GAPDH(#2118, CST 公司)。

1.4 uc. 189 外泌体含量与临床病理参数

相关性分析

对 58 例宫颈癌患者的临床病理资料进行整理,包括患者年龄、性别、HPV 感染、肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期。统计 uc. 189 外泌体的含量与临床病理参数的相关性。根据宫颈鳞癌组织中 uc. 189 外泌体的含量,将其分为高含量组和低含量组,分组依据:高含量组数值 > 对照组数值,低含量组数值 < 实验对照组数值。

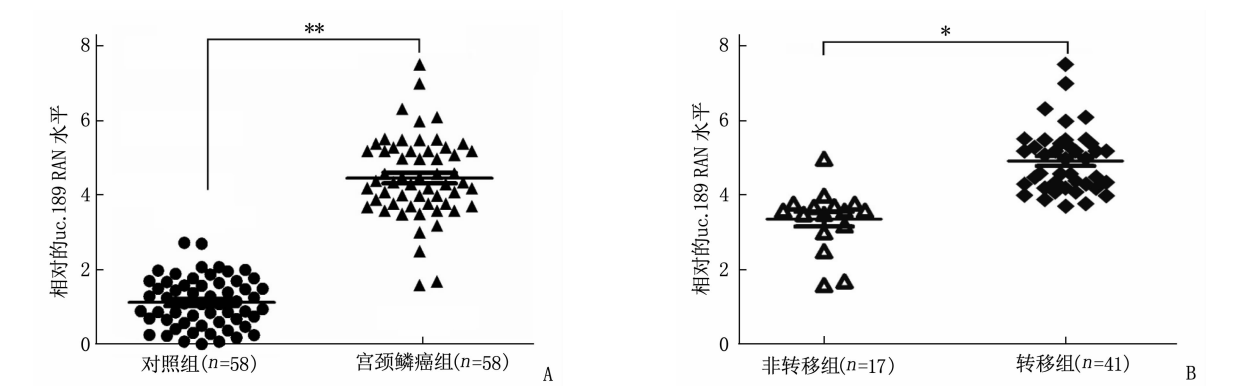
1.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计学软件对临床病理数据进行统计分析,采用 Microsoft Office Excel 2007 软件数据进行绘制。计量资料 2 组间比较采用配对样本 t 检验,计数资料比较采用 χ² 检验分析。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 uc. 189 在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况

采用 qRT-PCR 对 uc. 189 RNA 在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达进行检测。结果表明,相对于 58 例癌旁正常宫颈黏膜组织(对照组)的(1.12 ± 0.66), uc. 189 RNA 在宫颈鳞状细胞癌组织(n = 58)中的表达水平为(4.47 ± 1.10),见图 1A。58 例宫颈鳞癌中,有淋巴结转移 41 例(转移组),无淋巴结转移 17 例(非转移组);与非转移组(3.36 ± 0.82)相比, uc. 189 RNA 在转移组中的表达水平显著升高,为(4.92 ± 0.85),见图 1B。



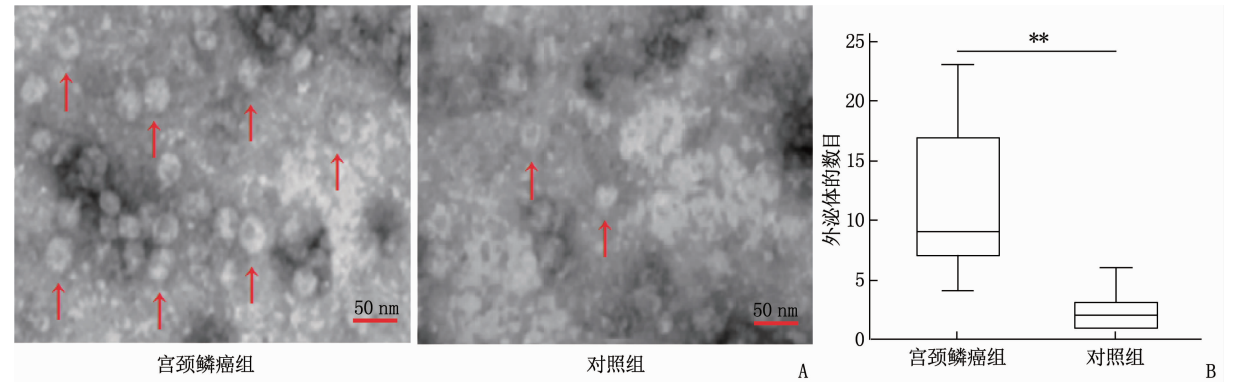
A: uc. 189 RNA 在宫颈组织中的表达。与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。
B: uc. 189 RNA 在宫颈鳞癌转移组中的表达。与非转移组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 uc. 189 RNA 在宫颈鳞癌组织中的表达情况

2.2 uc. 189 外泌体电镜检测结果

uc. 189 外泌体是一个圆形或椭圆形囊泡,染色为灰黑色或黑色,直径为 40 ~ 100 nm。在宫颈

鳞癌组中, uc. 189 外泌体的数量为 (11.16 ± 5.66) 多于对照组的 (2.21 ± 1.39) , 差异有统计学意义 ($t = 12.51, P < 0.01$), 见图 2。



A: 外泌体形态图(放大倍数 250 万倍); B: 外泌体数量图。与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 宫颈癌中 uc. 189 外泌体形态和数量电镜图

2.3 uc. 189 外泌体的验证

运用 qRT-PCR 明确外泌体中包含 uc. 189, 同时运用 Western blot 验证灰黑色圆形或椭圆形囊泡是外泌体,主要是检测外泌体的标志物 CD9 和 CD81。实验结果显示,宫颈鳞癌组织的外泌体含有丰富的 uc. 189 RNA, 与对照组相比,宫颈鳞癌组的外泌体中 uc. 189 RNA 的表达升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3A。Western blot 实验检测出外泌体的标志物 CD9 和 CD81, 内参为 GAPDH, 见图 3B, 外泌体中 CD9 和 CD81 的蛋白量均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述结果说明,宫颈癌细胞能产生丰富的 uc. 189 外泌体,参与了宫颈癌的发生、发展。

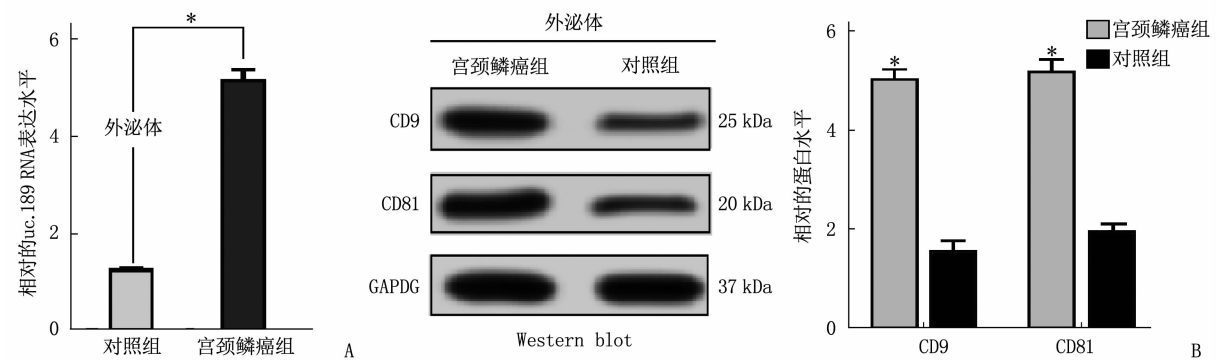
2.4 uc. 189 外泌体含量与临床病理参数的相关性

分析结果显示, uc. 189 外泌体的高含量组与分化程度 ($P = 0.004$)、淋巴结转移 ($P = 0.001$)、

TNM 分期 ($P = 0.003$) 密切相关,而 uc. 189 外泌体的高含量组与患者的年龄 ($P = 0.781$)、HPV 感染 ($P = 0.397$) 和肿瘤大小 ($P = 0.252$) 均无关联,见表 2。

3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统中常见的恶性肿瘤之一^[1],是由子宫颈慢性炎症逐渐癌变转化而来。研究^[4]表明该病与 HPV 感染有关。转移和复发往往是宫颈癌患者预后不良的主要原因,具体的癌变机制目前还未彻底阐明。因此,研究宫颈癌的发生机理、寻找诊断指标和治疗靶点变得尤为重要。外泌体是由细胞分泌到细胞外的内源性盘状囊泡^[5],内容含有各种 RNA 和蛋白质,直径 40 ~ 100 nm^[6-9]。在正常及病理状态下,正常细胞和恶性肿瘤细胞均可分泌外泌体^[10-11]。这种细胞外囊泡可在细胞之间传递通讯信息,并能作为膜



A: 对照组和宫颈鳞癌组 uc. 189 RNA 表达水平图; B: Western blot 检测外泌体标志物图。与对照组比较, **P* < 0.05。

图 3 uc. 189 外泌体的验证

表 2 宫颈鳞癌组织中 uc. 189 外泌体的含量及其意义 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理参数		高含量组 (<i>n</i> = 39)	低含量组 (<i>n</i> = 19)	χ^2	<i>P</i> 值
患者年龄	<55 岁	18	10	0.215	0.781
	≥55 岁	21	9		
HPV 感染	有	15	5	0.834	0.397
	无	24	14		
肿瘤大小	<3 cm	12	11	1.988	0.252
	≥3 cm	27	8		
分化程度	高~中	10	13	9.771	0.004
	低	29	6		
淋巴结转移	阳性	30	4	16.441	0.001
	阴性	9	15		
TNM 分期	I ~ II	8	12	10.284	0.003
	III ~ IV	31	7		

和细胞溶质蛋白、脂质和 RNA 细胞之间的载体^[12]。目前,已知外泌体的功能包括参与机体免疫应答、抗原提呈、细胞迁移、细胞分化、肿瘤侵袭等方面^[13-14]。

本研究通过 qRT-PCR 实验得出, 58 例宫颈鳞癌组织中 uc. 189 表达水平显著上调, 转移组中 uc. 189 表达水平显著更高, 说明 uc. 189 可能参与了宫颈癌的发生发展, 是一种新的促癌基因。电镜观察结果显示, 在宫颈鳞癌组织中有大量圆形或椭圆形囊泡, 染色为灰黑色或黑色, 直径为 30 ~ 100 nm, 符合外泌体的形态特点。qRT-PCR 实验得出宫颈鳞癌外泌体中的 uc. 189 含量丰富, 同时 Western blot 结果表明外泌体标志物 CD9 和 CD81 的存在, 验证了圆形或椭圆形囊泡即为 uc. 189 外泌体。此外, 电镜观察外泌体计数显示, 在宫颈鳞癌组织中外泌体的数量显著多于癌旁正常组织, 说明宫颈癌能产生丰富的 uc. 189 外泌体, 可能参与癌症的发生、发展。本研究统计分析了 uc. 189 外泌体的含量与患者临床病理参数的相关性。统

计数据表明 uc. 189 外泌体高含量组与宫颈鳞癌的分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期密切相关, 即 uc. 189 外泌体的含量越多, 宫颈鳞癌的分化程度越低, 癌细胞恶性程度越高; uc. 189 外泌体的含量越多, 癌细胞越容易从宫颈旁淋巴结转移, 更易出现远处转移, 且患者的预后越差, 死亡率越高。这一结果提示 uc. 189 外泌体可能作为宫颈鳞癌检测和预后判断的一种新指标。

综上所述, 本实验探讨 uc. 189 外泌体在宫颈癌中的检测情况及与患者的临床病理意义, 为下一步研究其功能性变化提供理论基础, 也为宫颈癌的诊断和治疗提供新的研究策略。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA: a Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.

[2] WANG L, WANG X C, LI X Y, *et al.* Expression of uc. 189 and its clinicopathologic significance in gynecological cancers[J]. Oncotarget, 2018, 9(7): 7453-7463.

[3] GUO Y, WANG C H, MIAO X, *et al.* Upregulation of uc. 189 in patients with esophageal squamous cell carcinoma and its clinicopathologic value [J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(11): 1400-1403.

[4] ZHOU C F, MA J, HUANG L, *et al.* Cervical squamous cell carcinoma-secreted exosomal miR-221-3p promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by targeting VASH1[J]. Oncogene, 2019, 38(8): 1256-1268.

[5] ALENQUER M, AMORIM M J. Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection [J]. Viruses, 2015, 7(9): 5066-5083.

[6] MATHIVANAN S, JI H, SIMPSON R J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication[J]. J Proteom, 2010, 73(10): 1907-1920.

[7] SIMPSON R J, LIM J W, MORITZ R L, *et al.* Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential [J]. Expert Rev Proteomics, 2009, 6(3): 267-283. (下转第 59 面)

关性^[14]。本研究发现,URAHP 基因与 KISS1R 共表达一致,基因表达下调与子痫前期的发生有关,与 KAPUSTIN R V 等研究结果一致。作者将进一步研究 URAHP 调控 GAS8 的机制及 URAHP 的下游靶基因。

综上所述,本研究首次证明假基因 URAHP 可能与子痫前期发病有关,且其上调表达可能是导致滋养细胞生物学功能异常的关键启动子,这可为子痫前期的治疗提供理论依据。

参考文献

[1] 李冠琳,杨慧霞. 子痫前期的发病机制及亚型分类[J]. 中华围产医学杂志, 2017, 20(12): 899-903.

[2] XU Y, XIA X, JIANG Y, *et al.* Down-regulated lncRNA AGAP2-AS1 contributes to pre-eclampsia as a competing endogenous RNA for JDP2 by impairing trophoblastic phenotype[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(8): 4557-4568.

[3] ZHENG L L, HUANG J, SU Y, *et al.* Overexpression of tissue factor pathway inhibitor 2 attenuates trophoblast proliferation and invasion in preeclampsia[J]. Hum Cell, 2020, 33(3): 512-520.

[4] ZHU H, KONG L. LncRNA CRNDE regulates trophoblast cell proliferation, invasion, and migration via modulating miR-1277[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 5905-5918.

[5] JIANG X, NING Q. Long noncoding RNAs as novel players in the pathogenesis of hypertension[J]. Hypertension Research, 2020, 43(7): 597-608

[6] HE T Q, QIAO Y, LV Y, *et al.* lncRNA FAM99A is down-regulated in preeclampsia and exerts a regulatory effect on trophoblast cell invasion, migration and apoptosis[J]. Mol

Med Rep, 2019, 20(2): 1451-1458.

[7] ZHENG L L, ZHOU K R, LIU S, *et al.* dreamBase: DNA modification, RNA regulation and protein binding of expressed Pseudogenes in human health and disease[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D85-D91.

[8] CHEN X, WAN L, WANG W, *et al.* Re-recognition of pseudogenes: From molecular to clinical applications[J]. Theranostics, 2020, 10(4): 1479-1499.

[9] SCAROLA M, COMISSO E, PASCOLO R, *et al.* Epigenetic silencing of Oct4 by a complex containing SUV39H1 and Oct4 pseudogene lncRNA[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7631.

[10] GUO X Q, DENG L, DENG K Y, *et al.* Pseudogene PTENP1 suppresses gastric cancer progression by modulating PTEN[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2016, 16(4): 456-464.

[11] SHIN E K, KANG H Y, YANG H, *et al.* The regulation of fatty acid oxidation in human preeclampsia[J]. Reprod Sci, 2016, 23(10): 1422-1433.

[12] PATOUGHI M, GHAFOURI-FARD S, ARSANG-JANG S, *et al.* GAS8 and its naturally occurring antisense RNA as biomarkers in multiple sclerosis[J]. Immunobiology, 2019, 224(4): 560-564.

[13] KAPUSTIN R V, DROBINTSEVA A O, ALEKSEENKOVA E N, *et al.* Placental protein expression of kisspeptin-1 (KISS1) and the kisspeptin-1 receptor (KISS1R) in pregnancy complicated by diabetes mellitus or preeclampsia[J]. Arch Gynecol Obstet, 2020, 301(2): 437-445.

[14] QIAO C, WANG C, ZHAO J, *et al.* Elevated expression of KiSS-1 in placenta of Chinese women with early-onset preeclampsia[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48937.

(本文编辑:周娟)

(上接第 52 面)

[8] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 654-659.

[9] PICCIN A, MURPHY W G, SMITH O P. Circulating microparticles; pathophysiology and clinical implications[J]. Blood Rev, 2007, 21(3): 157-171.

[10] HOSSEINI M, KHATAMIANFAR S, HASSANIAN S M, *et al.* Exosome-encapsulated microRNAs as potential circulating biomarkers in colon cancer[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(11): 1705-1709.

[11] TOMASETTI M, LEE W, SANTARELLI L, *et al.* Exosome-derived microRNAs in cancer metabolism: possible implica-

tions in cancer diagnostics and therapy[J]. Exp Mol Med, 2017, 49(1): e285.

[12] SUNG B H, WEAVER A M. Exosome secretion promotes chemotaxis of cancer cells[J]. Cell Adh Migr, 2017, 11(2): 187-195.

[13] FAN Q, YANG L, ZHANG X, *et al.* The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology[J]. Cancer Lett, 2018, 414: 107-115.

[14] MILANE L, SINGH A, Mattheolabakis G, *et al.* Exosome mediated communication within the tumor microenvironment[J]. J Control Release, 2015, 219: 278-294.

(本文编辑:周娟)