**分 类 号：R711.74 单位代码：10183**

**研究生学号： 200906100301405** **密** **级：公开**

吉 林 大 学硕士学位论文

**（专业学位）**

宫颈鳞状细胞癌中 c-myc、ephrinB2 及 TM4SF1 的表达及其临床意义

The expression and significance of c-myc、ephrinB2 and TM4SF1 genes in cervical cancer

**作 者 姓 名 ：刘 凌**

**类** 别 **：临床医学硕士领域（方向）：妇产科学**

**指 导 教 师 ：张松灵** **副教授 培 养 单 位 ：白求恩第一医院**

**2016 年 5 月**

宫颈鳞状细胞癌中 c-myc、ephrinB2 及 TM4SF1 的表达及其临床意义

The expression and significance of c-myc、ephrinB2 and TM4SF1 genes in cervical cancer

作 者 姓 名 ：刘凌领域（方向）：妇产科

指 导 教 师 ：张松灵 副教授 类 别 ：临床医学硕士

答 辩 日 期 ： 2016 年 6 月 3 日

**未经本论文作者的书面授权，依法收存和保管本论文书面版本、电子版本的任何单位和个人，均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用（但纯学术性使用不在此限）。否则，应承担侵权的法律责任。**

吉林大学博士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导 下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内 容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作 品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中 以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期：2016 年 月 日

《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》投稿声明

研究生院：

本人同意《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》出版章程的内容， 愿意将本人的学位论文委托研究生院向中国学术期刊（光盘版）电子杂 志社的《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》投稿，希望《中国优秀 博硕士学位论文全文数据库》给予出版，并同意在《中国博硕士学位论 文评价数据库》和 CNKI 系列数据库中使用，同意按章程规定享受相关权益。

论文级别：■硕士 □博士学科专业：

论文题目：

作者签名： 指导教师签名：

年 月 日

作者联系地址（邮编）： 吉林省长春市朝阳区新疆街与清华路交汇处吉林大学新民四舍

作者联系电话：

前 言

人类肿瘤的发生和发展是一个相当复杂的过程，体内微环境的改变、基因的异常激活和突变以及肿瘤干细胞的形成等都被认为参与人类肿瘤的形成、发展，并且影响其治疗和预后。宫颈癌是世界范围内常见的妇科肿瘤之一，具有较高的死亡率，其中宫颈鳞状细胞癌最常见，在女性恶性肿瘤中居第二位，仅次于乳腺癌的发病率，每年新发病例接近50万，超过27万女性死于宫颈癌。大量研究表明c-myc、ephrinB2及TM4SF1在人类许多肿瘤中高表达。c-myc被认为是具有胚胎干细胞样标记物特性的宫颈癌干细胞特异性标记物，在正常宫颈储备细胞中高表达，它的激活与HPV基因片段的插入密切相关，而ephrinB2及TM4SF1均为前期基因芯片筛选出的差异性基因，在宫颈癌细胞SP亚群中高度表达，但三者的表达与宫颈癌的关系尚未完全阐明。本研究利用免疫组织化学SP染色法对正常宫颈及宫颈癌组织进行染色并行相应的统计学分析，拟阐明c-myc、ephrinB2及TM4SF1在宫颈癌中的表达情况，探讨它们的表达在宫颈癌发生和发展中的关系以及三者间是否存在一定的相关性，希望能找到一些新的理论依据为宫颈癌的早期诊断、基因治疗和判定预后提供帮助。

II



**中文摘要**

**宫颈鳞状细胞癌中c-myc、ephrinB2及TM4SF1的表达及其临床意义**

**研究目的：**

c-myc、ephrinB2及TM4SF1高表达于许多人类肿瘤组织中，在肿瘤血管的重塑以及癌细胞的转移中起着重要作用，直接或间接影响肿瘤患者的治疗效果和预后。本研究旨在阐明c-myc、ephrinB2及TM4SF1在宫颈癌中的表达情况，探讨它们的表达在宫颈癌发生和发展中的作用以及三者在宫颈癌中表达的相关性，为宫颈癌的早期诊断、治疗和预后判定提供帮助。

**研究方法：**

应用免疫组织化学SP染色法检测c-myc、ephrinB2及TM4SF1在正常宫颈组织及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达水平。应用SPSS19.0统计软件，根据实验数据资料类型进行χ2检验，两者之间采用spearman进行相关性分析。P<0.05表示差异显著，有统计学意义。

**研究结果：**

1.宫颈鳞状细胞癌及正常宫颈组织中均可见c-myc、ephrinB2及TM4SF1蛋白的表达。正常宫颈组织中，c-myc主要定位于宫颈基底细胞的细胞核中，TM4SF1几乎均表达于棘细胞层细胞膜及胞浆中，ephrinB2主要定位于宫颈上皮组织棘细胞层和基底细胞层细胞膜及胞浆中，且后两者在正常血管平滑肌细胞胞浆中均可见表达。

2.在宫颈鳞状细胞癌中，c-myc主要定位于癌细胞的胞核中，在胞浆中可见弱阳性表达；c-myc蛋白的阳性率随着肿瘤分化程度的降低而明显升高，且低分化组表达强阳性部位更趋向于癌巢边缘（P<0.05），与患者年龄段及临床FIGO分期无明显相关性，而c-myc强阳性表达部位明显趋于癌巢侵袭前沿者淋巴结转移率显著高于表达部位无明显差异者（P<0.05）。

3.在宫颈鳞状细胞癌中，TM4SF1及ephrinB2主要定位于癌细胞的胞浆及胞膜中；TM4SF1的表达强度随着患者年龄的增加及淋巴结转移而增强；ephrinB2

III

的表达强度随着宫颈癌分化程度降低及淋巴结转移相关而增强，差异均具有统计学意义（P<0.05）。

4. c-myc与TM4SF1及ephrinB2蛋白在宫颈癌中的表达无明显相关性；

TM4SF1与ephrinB2在宫颈癌中的表达呈显著的正相关。**研究结论：**

1.宫颈癌组织中c-myc、TM4SF1及ephrinB2呈显著的高表达。

2. c-myc蛋白的阳性率及表达部位与肿瘤分化程度、侵袭以及有无淋巴结转移具有显著相关性，提示c-myc的阳性表达和表达部位在宫颈癌的发生以及淋巴结转移中起着重要作用。

3. ephrinB2的表达强度与宫颈癌淋巴结转移及病理分级相关，TM4SF1的表达强度与宫颈癌淋巴结转移及患者年龄分段呈正相关。

4. TM4SF1与ephrinB2在宫颈癌中的表达呈显著的正相关，提示TM4SF1 及

ephrinB2在宫颈癌的发生、发展中可能起协同作用。

**关键词：**

宫颈癌、免疫组织化学SP染色、c-myc、TM4SF1、ephrinB2

IV

**Abstract**

**The expression and significance of c-myc、ephrinB2 and TM4SF1 gene in cervical cancer**

**Objective:**

C-myc, ephrinB2 and TM4SF1 are highly expressed in many human tumor tissues, and play important roles in the remodeling of tumor vessels and metastasis of cancer cells, directly or indirectly affect the treatment effect and prognosis of tumors. The purpose of this study is to elucidate the expression and correlation of c-myc, TM4SF1 and ephrinB2 in cervical cancer. For the early diagnosis, therapy and prognosis determine of cervical cancer to offer help.

**Methods:**

Application of immunohistochemical SP staining method to test the the expression level of c-myc, ephrinB2 and TM4SF1 in normal cervical tissues and cervical squamous cell cancer. Chi-square test using SPSS19.0 statistical software, depending on the type of the experimental data, correlation analysis using the spearman. (P <0.05) showed significant differences, with statistical significance.

**Results:**

1. The positive expression of c-myc, ephrinB2 and TM4SF1 protein can be seen in both Cervical squamous cell carcinoma and normal cervical tissues. c-myc expressed mainly in the nucleus of the basal cells, TM4SF1 almost are expressed in the membrane and cytoplasm of the prickle cell, ephrinB2 expresses in the membrane and cytoplasm of cervical epithelial tissue prickle cell and the basal cell, and the latter two are positively expressed in the cytoplasm of normal vascular smooth muscle.

2. In cervical cancer tissues, c-myc expressed mainly in the nucleus of cervical squamous cancer cells, weakly-positive in the cytoplasm. And positive expression rate of c-myc protein are significantly associated with the degree of tumor differentiation (P <0.05), while the parts with a strong c-myc positive expression in the nests frontier

V

Has a significantly higher lymph node metastasis rate than those express parts have no obvious difference (P <0.05), and the positive expression rate of c-myc protein has no obvious correlation with patient's age and clinical FIGO staging.

3. In cervical cancer tissues, TM4SF1 and ephrinB2 mainly located in the cytoplasm and membrane of cancer cells. The expression of TM4SF1 intensity is related to patient's age segment and lymph node metastasis; The expression of ephrinB2 intensity associated with pathological grading and lymph node metastasis of the cervical cancer, the differences were statistically significant (P <0.05).

4. The expression of c-myc has no obvious correlation with TM4SF1 and ephrinB2 protein in cervical cancer; the expression of TM4SF1 has significantly positive correlation with ephrinB2 in cervical cancer.

**Conclusions:**

1. The c-myc, TM4SF1 and ephrinB2 was highly expressed in cervical cancer. 2. The positive expression rate and location of c-myc protein has significant

Correlation with the degree of tumor differentiation, invasion and presence of lymph node metastasis, indicates that the positive expression and the location of c-myc plays an important role in lymph node metastasis and the occurrence of cervical cancer.

3. The expression of ephrinB2 intensity is associated with cervical lymph node metastasis and pathological grading, TM4SF1 expression intensity was positively correlated with cervical lymph node metastasis and patients age segmentation.

4. TM4SF1 and ephrinB2 expression in cervical cancer were significantly positive correlation, and TM4SF1 and ephrinB2 up synergy in the occurrence and development of cervical cancer.

**KEy words:**

Cervical cancer, immunohistochemical SP staining method, c - myc, TM4SF1, ephrinB2

VI

目 录

[前 言](#_Toc686641655) 3

**[Abstract](#_Toc686641656)** 4

[4.2 ephrinB2在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况.. 15](#_Toc686641657) 5

[4.3 TM4SF1在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况...17](#_Toc686641658) 5

[4.4 宫颈鳞状细胞癌中c-myc、ephrinB2与TM4SF1表达的相关性](#_Toc686641659) 6

[第 1 章 绪 论](#_Toc686641660) 6

[第 2 章 综 述](#_Toc686641661) 7

**[2.1](#_Toc686641662)****[C-myc](#_Toc686641662)**[基因的结构与功能](#_Toc686641662) 7

**[2.2](#_Toc686641663)****[c-myc](#_Toc686641663)**[与肿瘤](#_Toc686641663) 8

**[2.2.1](#_Toc686641664)****[c-myc](#_Toc686641664)**[与肝癌](#_Toc686641664) 8

**[2.2.2](#_Toc686641665)****[c-myc](#_Toc686641665)**[与乳腺癌](#_Toc686641665) 8

**[2.2.3](#_Toc686641666)****[c-myc](#_Toc686641666)**[与宫颈癌](#_Toc686641666) 8

**[2.3](#_Toc686641667)****[C-myc](#_Toc686641667)**[与干细胞](#_Toc686641667) 8

**[2.4](#_Toc686641668)** [展望](#_Toc686641668) 9

[第](#_Toc686641669)**[3](#_Toc686641669)**[章 实验内容与方法](#_Toc686641669) 9

**[3.1](#_Toc686641670)** [材料](#_Toc686641670) 9

**[3.1.1](#_Toc686641671)** [实验对象](#_Toc686641671) 9

**[3.1.2](#_Toc686641672)** [主要试剂](#_Toc686641672) 10

**[3.1.3](#_Toc686641673)** [主要仪器和设备](#_Toc686641673) 11

**[3.2](#_Toc686641674)** [内容与方法](#_Toc686641674) 11

**[3.2.1](#_Toc686641675)** [切片制作](#_Toc686641675) 11

**[3.2.2](#_Toc686641676)****[HE](#_Toc686641676)**[染色](#_Toc686641676) 11

**[3.2.3](#_Toc686641677)** [对照](#_Toc686641677) 11

[3.2.4. 免疫组织化](#_Toc686641678)**[S-P](#_Toc686641678)**[法染色](#_Toc686641678) 11

**[3.2.5](#_Toc686641679)** [结果判定](#_Toc686641679) 11

**[3.2.6](#_Toc686641680)** [统计方法](#_Toc686641680) 12

[第](#_Toc686641681)**[4](#_Toc686641681)**[章 结 果](#_Toc686641681) 12

**[4.1](#_Toc686641682)****[C-myc](#_Toc686641682)** [在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况](#_Toc686641682) 12

**[4.2](#_Toc686641683)****[ephrinB2](#_Toc686641683)** [在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况](#_Toc686641683) 16

**[4.3](#_Toc686641684)****[TM4SF1](#_Toc686641684)** [在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况](#_Toc686641684) 19

**[4.4](#_Toc686641685)** [宫颈鳞状细胞癌中](#_Toc686641685)**[c-myc](#_Toc686641685)**[、](#_Toc686641685)**[ephrinB2](#_Toc686641685)**[与](#_Toc686641685)**[TM4SF1](#_Toc686641685)**[表达的相关性](#_Toc686641685) 22

[第](#_Toc686641686)**[5](#_Toc686641686)**[章 讨 论](#_Toc686641686) 24

**[5.1](#_Toc686641687)****[c-myc](#_Toc686641687)**[与宫颈癌](#_Toc686641687) 24

**[5.2](#_Toc686641688)****[ephrinB2](#_Toc686641688)**[与宫颈癌](#_Toc686641688) 24

**[5.3](#_Toc686641689)****[TM4SF1](#_Toc686641689)**[与宫颈癌](#_Toc686641689) 25

**[5.4](#_Toc686641690)****[c-myc](#_Toc686641690)**[、](#_Toc686641690)**[ephrinB2](#_Toc686641690)**[与](#_Toc686641690)**[TM4SF1](#_Toc686641690)**[在宫颈癌中表达的相关性](#_Toc686641690) 25

**[5.5](#_Toc686641691)** [展望](#_Toc686641691) 25

[第 6 章 小 结](#_Toc686641692) 26

[参考文献](#_Toc686641693) 26

表格目录

表1 临床病例资料 10

表2 C-myc在正常宫颈及宫颈癌组织中的表达情况 12

表3 在分化程度不同的宫颈癌组织中c-myc的表达情况 13

表4 c-myc的表达部位与淋巴结转移的关系 14

表5 c-myc的表达部位与临床病理分级的关系 15

表6 ephrinB2在正常宫颈及宫颈癌组织中的表达情况 16

表7 ephrinB2的表达与宫颈癌临床病理因素间的关系 17

表8 TM4SF1在正常宫颈及宫颈癌组织中的表达情况 19

表9 TM4SF1的表达与宫颈癌临床病理因素间的关系 20

表10 TM4sf1与ephrinB2在宫颈癌组织中表达的相关性 23

## [4.2 ephrinB2在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况.. 15](#_bookmark16)

## [4.3 TM4SF1在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况...17](#_bookmark17)

## [4.4 宫颈鳞状细胞癌中c-myc、ephrinB2与TM4SF1表达的相关性](#_bookmark18)

VIII

# 第 1 章 绪 论

宫颈癌是世界范围内常见的妇科肿瘤之一，具有较高的死亡率，其中宫颈鳞状细胞癌最常见，在女性恶性肿瘤中居第二位，仅次于乳腺癌的发病率，每年新发病例接近50万，超过27万女性死于宫颈癌[1]。调查显示相对于发达国家来说，宫颈癌在社会经济地位较低地区和发展中国家比较流行。近年来因为生活水平的不断提高，宫颈细胞学及高危型HPV病毒筛查的普及以及医疗体系的逐渐完善，多数宫颈癌患者在患病初期就能及时得到很好的诊断和治疗。但在我国，宫颈癌发病率仍居妇科恶性肿瘤之首，且近年来呈现患病年轻化的趋势。众所周知高危型HPV持续感染是导致宫颈癌的高危因素，但单独的高危型HPV感染并不具备引导宫颈正常组织向恶性组织转化的条件，如环境因素的改变、癌基因的激活、突变以及肿瘤干细胞的形成都被认为是参与宫颈癌的发生、发展、侵袭及转移的关键性因素。一些研究通过对比正常宫颈细胞、癌前细胞和宫颈癌细胞发现数百种表达具有差异性的基因，为学者们研究参与宫颈癌发生和发展相关的潜在分子机制提供重要的资源[2]。大量研究表明c-myc、ephrinB2及TM4SF1在人类许多肿瘤中高表达，c-myc被认为是具有胚胎干细胞样标记物特性的宫颈癌干细胞特异性标记物，在正常宫颈储备细胞中高表达，它的激活与HPV基因片段的插入密切相关[3]，而TM4SF1及ephrinB2均为前期基因芯片筛选出的差异性基因，在宫颈癌细胞SP侧群中高度表达。Ben-Porath[4]等通过对胚胎干细胞样基因在人类低分化肿瘤中表达情况的研究发现在胚胎干细胞中高表达的c-myc等基因在低分化肿瘤中表达频率显著高于高分化肿瘤，并且与雌激素受体阴性的乳腺癌及较差的临床预后有关。

c-myc编码核转录因子，能驱动细胞从G0/G1期进入S期，在大多数人类肿瘤中高表达，具有调节细胞增殖和凋亡，参与肿瘤细胞核糖体和线粒体的生物合成等作用[5]，但其在肿瘤的发生、发展中的具体作用机制尚未完全清楚。跨膜配体ephrinB2与它的络氨酸激酶受体EphB4分别是胚胎动脉和静脉内皮细胞的分子标记物，在血管再生中起着不可或缺的重要作用。ephrinB2主要表达在动脉内皮细胞和平滑肌细胞胞膜中，调控毛细血管丛的再生和主要脉管系统的形成[6]，在肿瘤细胞的转移和肿瘤血管网的新生中起着重要作用。研究发现ephrinB2 在

1

宫颈癌细胞中高表达可促进癌细胞侵袭及转移[7]。TM4SF1编码一种浆膜相关的分子糖蛋白，并选择性的高度浓度表达于肿瘤细胞胞膜、胞浆和肿瘤相关血管内皮细胞中，调控肿瘤细胞的侵袭及转移，因此，Sciuto T E[8]等学者认为TM4SF1可能成为抗体-药物共轭（ADC）方法治疗肿瘤的一个双向治疗靶点基因。

本研究应用免疫组化染色方法检测正常宫颈组织及宫颈鳞状细胞癌患者癌组织中c-myc、ephrinB2及TM4SF1的表达情况，并结合临床特征进行分析，旨在探讨c-myc、ephrinB2及TM4SF1的在宫颈癌的发生和发展中的作用，及其相关性。

1

# 第 2 章 综 述

**C-MYC基因的研究进展**

c-myc属于MYC基因家族中的一员，是一种可调的原癌基因。Myc蛋白控制许多细胞过程，包括细胞增殖，细胞周期，细胞生长，程序性凋亡，代谢，血管生成，分化，细胞粘附和运动。同时，我们发现它在多种动物和人类胚胎组织及肿瘤中呈现高表达。大量研究也表明c-myc的激活可能直接或间接参与了恶性肿瘤的发生和发展。但其致癌的确切机理尚不完全明确，就其是否为判断肿瘤预后的指标也尚未达成共识。本文将针对c-myc的结构功能、与肿瘤及干细胞的相关研究情况进行综述。

## **2.1** **C-myc**基因的结构与功能

c-myc基因属于原癌基因MYC家族，MYC最初由Vennstrom等人发现与禽骨髓细胞瘤病毒（Avian Myelocytomatosis virus）中的v-myc同源，因而得名，属核转录因子类癌基因，包括：s-myc、c-myc、n-myc、l-myc、b-myc等数种基因，虽然它们的结构和功能彼此都相关，但其中只有c-myc、L-myc、N-myc有致瘤性，而c-myc是我们研究最多的基因[9-11]. c-myc基因定位于染色体8号长臂

（8q24）上，由3个外显子和2个内含子组成，第一个外显子无编码序列，只起调

节作用，外显子2和3编码包含439个氨基酸的蛋白质，约49KD，在核内结合于DNA链上，对转录过程实施调节，进而激活或抑制靶基因[12]。c-myc基因的正常表达发生在各类处于增殖状态的细胞，包括胚胎组织和成熟组织，是细胞增殖、分化、凋亡的主要调节因子。在正常成人组织中，c-myc基因仅低水平表达甚至不显示转录活性；当受到某些因子刺激时，c-myc基因会大量表达，产生转录因子，进而调控其他基因的转录、表达。

目前已经发现了一系列能被c-myc蛋白调控的靶基因，可被c-myc蛋白促进表达的基因包括：CDK4(cyclin-dependent kinase 4) [13]，cad[14]，odc[15]，cyclin

（D1、D2）[16-17]和eIF-4E[18]等，能被抑制的基因包括：Gadd45(growth-arrest and DNA-damage)[19]，pdgfbr[20]，INK4b[21]以及c-myc[22]自身（负反馈）等。

2



从c-myc的细胞生物学功能上讲c-myc参与细胞的分裂、分化、新陈代谢和细胞的程序性死亡。Eischen CM[23]等于1998年指出：在小鼠胚胎成纤维细胞

（MEFs）增值过程中，c-myc可以迅速激活肿瘤抑制基因P53和ARF，启动凋亡程序，触发复制危机，但c-myc过度表达且缺乏P53或ARF的MEFs可无限增值。

C-myc基因转录水平低或缺乏时，细胞处于G1期并且诱导其凋亡或延迟进入S期[13]。近期的研究结果也显示，在cyclin E-CDK2、cyclinD2等基因的参与下c-myc基因可促进细胞从G0-G1期向S期转换，从而引起细胞过度增殖，并协同其他癌基因导致细胞癌变。此外，Grandori C[24]等学者在2005年的研究中证实：c-myc在rRNA聚合酶（II/III）的参与下可促进核糖体RNA的合成、堆积，此机制可能导致细胞生长、癌变。

## **2.2** **c-myc**与肿瘤

人们发现许多肿瘤都伴有c-myc基因的激活、扩增、易位，如肺癌、胰腺癌、乳腺癌、直肠癌、宫颈癌、卵巢癌、白血病、视网膜母细胞瘤及头颈部肿瘤等。大多数人认为其扩增程度与肿瘤的分化程度、分期及转移密切相关。姚德生[25]等人在小鼠卵巢上皮细胞的研究中发现单独c-myc基因作用并不能引起恶性肿瘤，但当c-myc被激活后它可以增强Kras基因的致瘤性，并增强癌细胞的增殖能力。

c-myc与其他原癌基因一样在肿瘤中的激活方式有多种：①外源序列的插入激活。在研究HPV、c-myc与宫颈癌关系时，多数学者认为HPV16 E6基因常插入、整合在c-myc基因附近，启动该基因的扩增与重排[3]，然后与其他癌基因等协同引发癌症。ALV病毒整合到B淋巴细胞c-myc基因位点附近，随之插入病毒长末端重复序列（包含病毒启动子和增强子）使c-myc基因处在病毒启动子下而被活化[26]；②染色体异位。首次在Burkitt淋巴瘤中发现，可通过染色体易位而活化，最常见的是通过8号染色体与14号染色体间易位，使得8号染色体上的MYC基因或其相邻区域与14号染色体的免疫球蛋白重链融合而被活化[27]。在B细胞淋巴瘤中c-myc的主要激活方式为染色体异位。移位后的位点为编码免疫球蛋白基因所在，其表达相当活跃，故c-myc基因的转录因此大大增强。③基因扩增。c-myc基因扩增在肿瘤中是一个常见现象，见于白血病、卵巢癌、宫颈癌等肿瘤。④点突变。这在c-myc基因激活中少见。

3

进一步研究表明c-myc可通过调控核糖体生物合成和翻译、参与细胞的新陈代谢从而间接加快肿瘤细胞增殖需要的蛋白质合成[5]。同时可调节血管生长因子（VEGF）的表达[28]，在肿瘤血管生成中起重要作用，并具有降低细胞分化程度

[4]，促进基因组的不稳定性[29]、参与端粒酶活性的调节的作用[30]（作用机制尚不完全明确）。这可能导致癌细胞分化程度降低、恶性程度增高、容易侵袭和转移。但也有大量学者的研究显示c-myc基因的扩增与卵巢癌及宫颈癌的预后及患者的生存率并无重大关系[31]。

大多数学者认为肿瘤中c-myc基因的高度扩增预示着预后及生存率较

差。同时，各种学者用Southern杂交检可发现c-myc在宫颈癌组织中的过度表达及基因扩增倍数高于癌旁组织，但在正常组织中未能检测出c-myc mRNA表达。所以，了解c-myc如何参与肿瘤的形成、发展，有望设计新型的抗癌方法及药物并提高肿瘤患者的生存率、生存时间及生活质量。

### **2.2.1** **c-myc**与肝癌

Shachaf CM[32]等人认为原癌基因MYC的灭活可以使癌细胞分化成为干细胞和胆道细胞形成单管结构，并伴随着肿瘤标记物甲胎蛋白的消失。应用活体发光成像技术观察发现许多这些细胞处于休眠状态，只要激活MYC基因，它们会立刻恢复致瘤性，同时证明了肝癌细胞能分化成正常细胞的潜能。

1999年Kawate S[33]等在42例手术切除的肝癌组织中应用聚合酶链反应检测出14（33.3%）例存在c-myc基因扩增，在年轻的、肿瘤体积较大的和分化程度低的肿瘤组织中扩增比率更高。提示c-myc的扩增程度可能成为肿瘤恶性程度及预后不良的指标。

同样，Wang L[34]等人于2014年通过54例原发性肝癌的研究发现c-myc与EZH2的共同过表达能降低肿瘤抑制因子miR-101的表达，提示预后不良。此外，曹骥[35]等人应用免疫组织化学法检测肝细胞癌中c-myc的表达情况，发现c-myc在肝癌中的阳性表达明显高于癌旁，尤其在癌巢周增殖活跃的细胞，可能提示细胞中存在某种相同的刺激因素致使原癌基因活化并持续表达利于细胞增生与癌变，特别是癌旁肝硬化结节中的细胞是具有高度癌变倾向的癌巢周细胞，同时具有浸润转移能力，与肝细胞的恶性转化密切相关。抑制c-myc基因可能在未来的肝癌的治疗中成为一种新的治疗方法。

4

### **2.2.2** **c-myc**与乳腺癌

Rose-Hellekant[36]等在转基因小鼠模型的研究中观察到c-myc能在小鼠怀孕期间明显促进乳腺生长并在经过平均约8个月的潜伏期后发生乳腺癌。此外，Bodvarsdóttir SK[30]等为证明c-myc通过刺激端粒酶催化亚单位（TERT）与P53协同参与乳腺癌的形成，应用荧光原位杂交法检测27例乳腺癌组织中有16（59%）例出现了c-myc基因的扩增，并发现c-myc的扩增和TERT的表达与基因组的高度不稳定性相关。

c-myc基因扩增是否提示乳腺癌患者预后不良尚存在争议，但大多数学者认为c-myc基因扩增是预后不良的指标。Corzo C[37]等应用带LSI c-MYC/CEN8/IgH

探针的FISH方法对15例乳腺癌病人标本的不同病变区域（正常组织区、良性增生区、原位癌区、浸润癌区）进行了分析，发现c-myc基因扩增仅出现于浸润癌区域，8号染色体的多倍体有5例，也仅出现于原位癌与浸润癌区域。乳腺正常细胞与良性的增生区均未发现c-myc扩增和8号染色体的异常改变。该结果提示c-myc不仅与乳腺癌的发生发展相关，还与其浸润和向恶性转换密切相关。

2000年，Deming SL[38]通过对29项研究进行文献检索和meta分析发现c-myc的扩增不仅与乳腺癌的临床分级（RR = 1.61），淋巴结转移（RR = 1.24），孕激素受体阴性（RR = 1.27）以及绝经后状态的相关（RR = 0.82），还预示着乳腺癌的高复发率（RR = 2.05）和和死亡率（RR = 1.74）。这些结果表明，c-myc的扩增是在乳腺癌是常见现象，并且可以提供独立的预后信息。

### **2.2.3** **c-myc**与宫颈癌

众所周知高危型HPV持续感染是导致宫颈癌的高位因素。但单独的高危型

HPV感染并不具备形成宫颈癌的条件。宫颈癌的发生是一个多因素、多步骤、多基因共同作用的结果。而原癌基因c-myc在肿瘤的发生发展中起着不可磨灭的作用。c-myc阳性表达在宫颈磷癌的癌巢中呈弥漫分布，间质为阴性c-myc阳性表达见于上皮内非典型增生的细胞，而正常上皮细胞及间质为阴性，各种学者

southern杂交检测出宫颈癌及癌旁组织均有c-myc基因扩增，癌组织的扩增倍数高于癌旁组织。

进一步的究表明c-myc基因及其产物在宫颈癌发生过程中与HPV关系密切，Arends MJ[3]等认为HPV16 E6基因常插入、整合在c-myc基因附近，启动该基因

5

的扩增与重排，然后与端粒酶RNA等其他癌基因等协同引发癌症。Gimenes F[39]等人通过PCR和FISH分析法检测37例宫颈癌标本中c-myc基因扩增和HPV感染情况发现，只有在HPV阳性标本中才能检测出c-myc的扩增。

阮永华[40]等人在应用原位分子杂交技术对37例宫颈鳞癌组织（其中11为化疗后组织）、21例癌前病变组织及5例正常宫颈组织的检测中发现其对应的c-myc基因扩增率分别为75.7%、42.9%、0%，且c-myc的表达强度随恶性（CIN III比CIN II和CIN I表达强），此外，化疗前c-myc表达率比化疗后高。这与Riou

G等人在1987年的研究结论一直。

2015年Kübler K[41]等人在宫颈上皮内瘤变的研究中发现，大多数CIN（I-III）在不经过外界干扰的情况下都能自然回归，但在有c-myc高度扩增的宫颈上皮内瘤变中很难回归，最终导致宫颈癌。说明c-myc基因扩增在上皮内瘤变细胞的转型起着非常大的作用，并可用来指导上皮内瘤变的治疗决策及判断预后。

Gao K[42]对不同年龄宫颈癌的筛查（25-34, 35-44, 45-54和55-66岁）单

一应用C-myc基因敏感度分别为：50.0, 90.9, 80.0和100%；特异度为：97.2, 97.3, 93.4和97.6%；相对于单独使用TCT和HPV在年龄较大组敏感度和特异度均较高，因此如果结合将目前的宫颈癌的筛查手段与c-myc基因检测结合起来将大大提高宫颈癌的检出率。

何志连[43]等应用免疫组织化学的方法检测出c-myc在正常宫颈组织、CIN及宫颈癌中阳性表达率分别为20%(2/10),45%(9/20)和66.7%(20/30)，并发现C-myc阳性表达随FIGO分期、病理学分级、淋巴结转移而升高，提出C-myc对宫颈癌治疗效果的评价及预后的判断有重要的价值。

## **2.3** **C-myc**与干细胞

一项全球性的从基因表达水平研究低分化肿瘤的实验发现了13类为干细胞标志的核心代表基因，其中具有代表性的有MYC靶基因。

2006年，Takahashi K[44]等人通过引入Oct3/ 4, Sox2的，c-Myc和Klf4四个因子证实了小鼠胚胎或成年小鼠的成纤维细胞能被诱导成为多功能干细胞，将这种多功能干细胞移植到裸鼠的皮下后会导致包含多种来自三个胚层的组织的肿瘤。但是，Nakagawa M[45]等人于2008年的进一步研究中发现，小鼠成纤维细胞经c-myc逆转录病毒转导后重编产生的诱导性多功能干细胞（iPS）具有致瘤

6

性，阻碍了iPS的临床应用；另外，他们意外的发现在缺乏c-myc转录因子的条件下能诱导出在实验中不致瘤的iPS，并成功从成人皮肤成纤维细胞中诱导出c-myc(-) iPS，但是效率比c-myc(+) iPS降低了500倍。在Knoepfler PS[46]指出通过调查显示在一半的实验中，缺乏c-myc, iPS过程是失败的。

另外，已证实c-myc在胚胎干细胞中可与大量基因组座位结合的能力。也有研究表明单一c-myc在Hela细胞中高度表达[47]，可维持干细胞的分化潜能，但对于其向恶性肿瘤方向转化仍需其他基因同时参与。

## **2.4** 展望

综上所述，c-myc的激活与大多数肿瘤密切相关，并参与了维持肿瘤干细胞的未分化状态；通过研究c-myc的作用机制及其与干细胞的关系，了解肿瘤的发病原理，有利于发现全新有效的靶向治疗和干预途径，有望成为肿瘤早期诊断及判断预后的指标之一，亦有益于完善现有的肿瘤治疗措施。

7

# **第3**章 实验内容与方法

## **3.1** 材料

### **3.1.1** 实验对象

所有宫颈鳞状细胞癌组织及正常宫颈组织均选取2010年3月至2015年11

月吉林大学第一医院住院患者，共计80例。其中宫颈鳞状细胞癌70例，年龄

26-76岁，平均年龄51±1岁。正常宫颈组织10例，取自因良性疾病（如子宫

肌瘤、子宫腺肌病等）行全子宫切除，年龄38-63岁，平均年龄50±1岁。所有标本均经严格筛选及病理科医生进行病理诊断。标本均经10％福尔马林固定，经取材、脱水、透明、浸蜡、包埋后切片。切片厚为4µm，烤干后备用（见表1）。

表1 临床病例资料

例

病理类型

数

FIGO

分化程度

淋巴结转移

紫杉醇、卡

年龄

铂化疗后

中低

IB1 IB2 IIA1 IIA2分分 有 无

化化

<45

岁

≧45 岁

宫颈癌70 23 23 23 1 38 32 20 50 9 25 45

正常宫颈10组织

### **3.1.2** 主要试剂

（1）抗体：多克隆兔抗人TM4SF1抗体购自Proteintech中国分公司；多克隆兔抗人ephrinB2（H-83）抗体购自美国Santa Cruz公司；即用型单克隆兔抗人c-myc抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司。

（2）通用型SP超敏试剂盒（鼠/兔）购自福州迈新生物技术开发有限公司：内含试剂：

A：内源性过氧化物酶阻断剂（无色）

B：动物非免疫血清（羊）（蓝色）

C：生物素标记的羊抗鼠/兔IgG（黄色）

D：链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶（红色）

8

（3）底物显色剂：氨基联苯胺DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司，内含：

试剂A: DAB缓冲液（20\*）试剂B: DAB底物（20\*）试剂C: DAB色原（20\*）

使用方法：在小试管中加0.85ml蒸馏水，按顺序加A、B、C试剂各50μl(1-2滴)混匀，即成1ml的DAB显色液，若出现沉淀可过滤后使用。配制好的溶液避光存放，30分钟内有效。染色结果为棕色。室温下染色时间约3-5分钟，可以在显微镜下根据颜色的发展掌握染色时间。

（４）0.01M pH6.0柠檬酸盐抗原修复液

储备液：A液柠檬酸10.5g加蒸馏水溶解定容至500ml

B液柠檬酸钠14.7g加蒸馏水溶解定容至500ml工作液：9mlA液+41mlB液+450ml蒸馏水

（５）0.01M PBS缓冲液：

a. 250ml蒸馏水中加入NaH2P04·2H20 7.8005g. b. 250ml蒸馏水中加入Na2HP04·12H20 17.9070g。

工作液：在1000ml蒸馏水中加入a液14ml、b液36ml和NaCL9.0g,调节PH值为7.4.

（6）防脱片剂：多聚赖氨酸（Poly-L-Lysine）,工作液为1: 6稀释。

### **3.1.3** 主要仪器和设备

（１）半自动切片机（型号：RM2145德国LELCA公司）

（２）全自动包埋机（型号：EG1160德国LELCA公司）

（３）电热恒温水箱（型号：BHW2-I北京市医疗设备总厂）

（４）电热鼓风干燥箱（型号：101A-1型上海市实验仪器总厂）

（５）冰箱（型号: BCD-217B Haier公司）

（６）移液器200μl（德国）

（７）湿盒30片（迈新试剂公司）

（８）显微镜（型号：AX-70日本OLYMPUS）

（９）连续成像系统（型号: U-CMAD-2日本OLYMPUS）

9

## **3.2** 内容与方法

### **3.2.1** 切片制作

所有标本应用半自动切片机做连续切片（厚度为4um），每例切4片，将切好的标本在温水中充分展开后，收放在经过防脱片处理后的干净载玻片上，将其烘干并置于60℃的恒温箱内1小时，待标本紧密附着在载玻片上后装盒。

### **3.2.2** **HE**染色

切片常规行染HE色，光镜下观察结果，作为复查诊断和组织学分级，并与免疫组化结果对照观察。

### **3.2.3** 对照

阴性对照：用PBS液代替一抗体阴性对照。阳性对照：用已知的阳性切片作为阳性对照。

### 3.2.4. 免疫组织化**S-P**法染色

实验步骤：

（1）组织石蜡切片用二甲苯脱蜡，浓度分别为100%, 100%, 95%, 95%, 80%的酒精梯度脱水。

（2）PBS（PH7.4）冲洗3次，每次5分钟。

（3）每张切片滴加1滴内源性过氧化物酶阻断溶剂（试剂A），室温下孵育

15分钟，以阻断内源性过氧化物酶的活性。重复步骤（2）。

（4）除去PBS液，每张切片滴加1滴正常非免疫动物血清（试剂B），室温下孵育15分钟。

（5）除去血清，每张切片滴加1滴第一抗体（多克隆兔抗人TM4SF1抗体和

ephrinB2抗体浓度分别为1: 50与1:200，即用型c-myc）室温下孵育4℃过夜。重复步骤（2）。

（6）除去PBS液，每张切片滴加1滴生物素标记的第二抗体（试剂C），室温下孵育15分钟。重复步骤（2）

（7）除去PBS液，每张切片滴加1滴链霉素抗生物素－过氧化物酶溶液（D液），室温下孵育15分钟。重复步骤（2）

（8）除去PBS液，每张切片滴加2滴新鲜配置的DAB溶液发色，显微镜下观

10

察3-10分钟，显色适当后，水洗终止。

（9）自来水冲洗，Mayer苏木素覆盖组织复染细胞核，水洗。

（10）弱氨水返蓝，水洗。

（11）用浓度分别为100%, 100%, 95%, 95%, 80%的梯度酒精进行常规脱水，二甲苯透明，中性树脂封固。

### **3.2.5** 结果判定

结果判定方法：c-myc以细胞膜或细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。

TM4SF1与phrinB2蛋白定位于细胞膜或胞浆。于高倍镜（200×）下取5个有代表性的区域，根据阳性细胞在全部癌细胞中所占比例及阳性细胞染色强度判断结果。按阳性细胞百分比计分：0～10％为0分11％～24％为１分25％～49％为 2

分50％～74％为3分75％为4分。同时对染色强度进行评分，无染色为0分；

淡黄色为1分；棕黄色为2分；棕褐色为3分。两者相加为最终免疫组化结果0～

1分为阴性；2～3分为弱阳性（＋）；4～5分为阳性（＋＋）6～7分为强阳性

（＋＋＋） 。

### **3.2.6** 统计方法

应用SPSS19.0统计软件，根据实验数据资料类型进行χ2检验，两者之间采用spearman进行相关性分析。P<0.05表示差异显著，有统计学意义。

11

# **第4**章 结 果

利用免疫组织化学SP染色方法检测80例标本中c-myc、ephrinB2及TM4SF1的表达情况，结果显示如下：

## **4.1** **C-myc** 在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况

（一）通过免疫组织化学染色观察发现，C-myc在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中均有表达，表达情况如下：

1. 正常宫颈组织中，c-myc主要表达于宫颈基底细胞的细胞核中，阳性率为70%。（见图1）

2. 宫颈鳞状细胞癌中，c-myc则主要定位于癌细胞的细胞核中，呈强阳性表达，部分胞浆呈弱阳性表达，阳性率为85%（见图2；图3）

表2 C-myc在正常宫颈及宫颈癌组织中的表达情况

| 分组 | 例数 | - | + | ++ | +++ | 阳性数 | 阳性率 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 正常宫颈组织 | 10 | 3 | 0 | 1 | 6 | 7 | 70% |
| 宫颈癌 | 67 | 10 | 12 | 17 | 28 | 57 | 85% |



图1 正常宫颈组织中c-myc在基底细胞的细胞核中呈强阳性表达（SP×200）

图2 宫颈鳞状细胞癌组织中c-myc主要定位于癌细胞的细胞核中（SP×200）

12



图3 宫颈鳞状细胞癌中c-myc在癌巢侵袭前沿的细胞核中呈强阳性表达（SP×200）

（二）宫颈鳞状细胞癌中c-myc的表达与临床病理分级的关系

比较在中分化宫颈癌与低分化宫颈癌组织中c-myc的表达情况，结果显示：在低分化宫颈鳞状细胞癌中c-myc的阳性表达率为96％(31／32)，中分化中阳性率为74％(26／35)，两者比较有统计学意义(P<O．05)。（见表3，图4，图5）

表3 在分化程度不同的宫颈癌组织中c-myc的表达情况

c-myc

例数

分组阴性阳性

阳性率P 值

| 分化程度 | 低分化 | 32 | 1 | 31 | 96% | <0.05 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 中分化 | 35 | 9 | 26 | 74% |  |



图 4 低分化组宫颈癌中c-myc的表达情况

（SP×200）

图5 中分化组宫颈癌中c-myc的表达情况

（SP×200）

（三）宫颈鳞状细胞癌中c-myc的表达部位与淋巴结转移的关系

比较c-myc阳性表达的宫颈鳞状细胞癌中伴有淋巴结转移与不伴有淋巴结

13

转移组中c-myc表达部位的情况，结果显示：在c-myc表达阳性的宫颈癌患者中，c-myc在癌巢侵袭前沿强阳性表达者17例（29%），表达部位主要位于癌巢侵袭前缘组淋巴结转移率约为59%（10/17），明显高于表达部位不在癌巢侵袭前缘组15%(6/40)，差异有统计学意义（P＜0.05）。（见图6及表4）。

表4 c-myc的表达部位与淋巴结转移的关系

淋巴结转移

| 表达部位 |  | 例数 | - + | χ2 值 | P 值 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表达部位主要位于侵袭前 | - | 40 | 34 6 | 11.347 | <0.05 |
| 缘 | + | 17 | 7 10 |  |  |



图6 肿瘤侵袭前沿c-myc的表达情况（SP×200）

（四）宫颈鳞状细胞癌中c-myc的表达部位与临床病理分级的关系

比较c-myc阳性表达的低分化组与中分化组宫颈鳞状细胞癌c-myc表达部位的情况，结果显示：在低分化组宫颈鳞状细胞癌中c-myc更倾向于在癌巢侵袭前缘的癌细胞中高表达，癌巢侵袭前沿表达强阳性率为42%（13/31），明显高于表达中分化组宫颈癌15%(4/26)，差异有统计学意义（P＜0.05）。（见图7及表5）。

表5 c-myc的表达部位与临床病理分级的关系

表达部位于侵袭前缘

| 分组 | 例数 | - | + | 阳性率 | P 值 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分化程度 | 低分化 31 | 18 | 13 | 42% | <0.05 |
|  | 中分化 26 | 22 | 4 | 15% |  |

14

（五）宫颈鳞状细胞癌中c-myc的表达情况与临床分期及化疗的关系

1.不同临床期别的宫颈鳞状细胞癌中c-myc的阳性表达率为：IB1（86%）、

IB2(78%)、IIA1（95%），三者之间差异无统计学意义。

2.比较以卡铂、紫杉醇方案进行化学治疗1-3次后行手术治疗的宫颈鳞状细胞癌组织与未经过化学治疗的宫颈癌组织中c-myc表达情况显示：在化学治疗后宫颈癌组织中c-myc表达阳性率为75%，低于未经过化学治疗的84%，但差异无统计学意义（P> 0.05），表达部位差异也无统计学意义。（图7，图8）

3.比较不同年龄组宫颈鳞状细胞中c-myc的表达情况发现：年龄<45岁组宫颈癌中c-myc阳性表达率为80%，年龄≧45岁组为88%，差异无统计学意义。

因此，在宫颈癌中，c-myc表达阳性率与患者年龄、临床分期、病理分级、淋巴结转移及是否化疗均无明显相关。



图7 化学治疗前宫颈癌组织中c-myc的表达情况（SP×200）

图8 化学治疗后宫颈癌组织中c-myc的表达情况（SP×200）

## **4.2** **ephrinB2** 在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况

（一）通过免疫组织化学染色观察发现，ephrinB2在正常宫颈组织及宫颈鳞状细胞癌组织中均有表达，表达情况如下：

1.正常宫颈组织中ephrinB2主要定位于棘细胞和基底细胞的细胞膜及细胞浆，血管平滑肌细胞胞浆也可见强阳性表达，阳性率为30%。（图9，图10）

2.在宫颈癌组织中ephrinB2定位于癌细胞的胞浆和胞膜，部分癌巢周围可见散在强阳性表达，阳性率为88%。阳性表达率及部位与宫颈癌临床分期、病理分级、年龄、有无淋巴结转移及化疗均无明显相关。（见表6、图11、图12）

15

表6 ephrinB2在正常宫颈及宫颈癌组织中的表达情况

| 分组 | 例数 | - | + | ++ | +++ | 阳性数 | 阳性率 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 正常宫颈组织 | 10 | 7 | 1 | 1 | 1 | 3 | 30% |
| 宫颈癌 | 70 | 8 | 10 | 16 | 36 | 62 | 88% |

图9 正常宫颈组织中ephrinB2的表达情况

（SP×200）

图10 正常宫颈组织血管平滑肌细胞中

ephrinB2的表达情况（SP×200）



图11 宫颈癌组织中ephrinB2的表达情况（SP×200）

（二）ephrinB2的表达强度与宫颈鳞状细胞癌患者临床病理因素间的关系

1.对ephrinB2表达强度为“+”和“+++”的中分化和低分化两组宫颈癌组织进行比较发现，低分化组表达强度为“+++”的病例数约占91%（22/24），明显高于中分化组63%（14/22），差异具有统计学意义(P<0.05)。

2.对ephrinB2表达强度为“+”和“+++”的伴有淋巴结转移和不伴淋巴结转移两组宫颈癌进行比较发现，伴有淋巴结转移组表达强度为“+++”的病例数占100%，明显高于不伴有淋巴结转移组69%（23/33）,差异具有统

16

计学意义(P<0.05)。此外，ephrinB2的表达强度与患者年龄分段、临床分期以及是否化疗均无显相关（见表7）

表7 ephrinB2的表达与宫颈癌临床病理因素间的关系

| 临床病理因素 | 例数 | + | +++ | P 值 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 年龄  <45 岁 | 19 | 6 | 13 | P>0.05 |
| ≧45 岁 | 27 | 4 | 23 |  |
| 分化程度 |  |  |  |  |
| 低分化 | 24 | 2 | 22 | P<0.05 |
| 中分化 | 22 | 8 | 14 |  |
| FIGO 分期  IB1 | 17 | 3 | 14 | P>0.05\* |
| IB2 | 13 | 4 | 9 |  |
| IIA1、IIA2 | 16 | 3 | 13 |  |
| 淋巴结转移 |  |  |  |  |
| 无 | 33 | 10 | 23 | P<0.05 |
| 有 | 13 | 0 | 13 |  |

化学治疗

无40 8 32 P> 0.05

有6 2 4

注：\*IB1与IB2及IIA1、IIA2比较

## **4.3** **TM4SF1** 在正常宫颈及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况

（一）通过免疫组织化学染色观察发现，TM4SF1在正常宫颈组织及宫颈鳞状细胞癌组织中均有表达，表达情况如下：

1.在正常宫颈组织中TM4SF1几乎均表达于棘细胞层细胞的胞膜及胞浆中，基底细胞层细胞未见染色，血管平滑肌细胞胞浆也可见强阳性表达，表达阳性率为30%。（图12，图13）

2. TM4SF1在宫颈癌组织中表达于癌细胞胞浆及胞膜，部分癌巢周围可见散在强阳性表达，表达阳性率分别为90%。表达部位和阳性率无明显规律性，与患者年龄、有无淋巴结转移、病理分级及化学治疗无关。（见表8、图14）

17

表8 TM4SF1在正常宫颈及宫颈癌组织中的表达情况

| 分组 | 例数 | - | + | ++ | +++ | 阳性数 | 阳性率 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 正常宫颈组织 | 10 | 7 | 1 | 0 | 2 | 3 | 30% |
| 宫颈癌 | 69 | 7 | 15 | 15 | 32 | 62 | 89% |



图12 正常宫颈组织中TM4SF1的表达情况(SP×200)

图13 TM4SF1在正常宫颈组织血管平滑肌细胞中的表达情况（SP×200）



图14 宫颈癌组织中TM4SF1的表达情况（SP×200）

（二）TM4SF1的表达强度与宫颈鳞状细胞癌患者临床病理因素间的关系

1.对TM4SF1表达强度为“+”和“+++”的年龄<45岁和≧45岁两组宫颈癌组织进行比较发现，年龄<45岁组表达强度为“+++”的病例数约占50%（9/18），明显低于年龄≧45岁组79%（23/29）,差异具有统计学意义（P<0.05）。

2.对TM4SF1表达强度为“+”和“+++”的伴有淋巴结转移和不伴淋巴结转移两组宫颈癌进行比较发现，伴有淋巴结转移组表达强度为“+++”的病例数约

18

占92%（13/14），明显高于不伴有淋巴结转移组57%（19/33）,差异具有统计学意义(P<0.05)。此外，TM4SF1的表达强度与宫颈癌临床病理分级、临床分期以及是否化疗均无显相关，。见表9：

表9 TM4SF1的表达与宫颈癌临床病理因素间的关系

临床病理因素例数+ +++Χ2值P值年龄

| <45 岁 | 18 | 9 | 9 | 4.391 | P<0.05 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ≧45 岁 | 29 | 6 | 23 |  |  |
| 分化程度 |  |  |  |  |  |
| 低分化 | 23 | 5 | 18 | 2.146 | P>0.05 |
| 中分化 | 24 | 10 | 14 |  |  |
| FIGO 分期  IB1 | 15 | 7 | 8 |  | P>0.05\* |
| IB2 | 16 | 5 | 11 |  |  |
| IIA1、IIA2 | 16 | 3 | 13 |  |  |
| 淋巴结转移 |  |  |  |  |  |
| 无 | 33 | 14 | 19 |  | P<0.05 |
| 有 | 14 | 1 | 13 |  |  |
| 化学治疗 |  |  |  |  |  |
| 无 | 42 | 15 | 27 |  | P>0.05 |
| 有 | 6 | 0 | 5 |  |  |

注：\*IB1与IB2及IIA1、IIA2比较

## **4.4** 宫颈鳞状细胞癌中**c-myc**、**ephrinB2**与**TM4SF1**表达的相关性

分析在宫颈鳞状细胞癌中c-myc、ephrinB2与TM4SF1表达的相关性发现：宫颈癌中c-myc与ephrinB2及TM4SF1的表达无明显相关性（rs=-0.154、-0.143

P=0.213、0.248）；在TM4SF1阳性表达的宫颈癌组织中ephrinB2也趋于阳性表达，二者在宫颈癌组织中共同阳性表达数为61例，共同阴性表达数为7例；相关分析表明ephrinB2与TM4SF1在宫颈癌组织的表达呈正相关（rs=0.928

19

P<0.001). 见表10:

表10 TM4sf1与ephrinB2在宫颈癌组织中表达的相关性

ephrinB2

|  | | 阴性 | 阳性 | 合计 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| TM4Sf1 | 阴性 | 7 | 0 | 7 |
|  | 阳性 | 1 | 61 | 62 |
| 合计 |  | 8 | 61 | 69 |

rs=0.928 P<0.001

注：TM4sf1与ephrinB2在宫颈癌组织中表达呈正相关

20

# **第5**章 讨 论

近年来人们在多种肿瘤中发现c-myc、ephrinB2与TM4SF1一种或两种，甚至三种基因同时高表达，它们单独或共同地在肿瘤发生、发展，乃至预后中起着重要作用，并逐渐发现这三种基因，尤其是c-myc可能是干细胞和肿瘤干细胞的特异性表面标记物。本研究通过免疫组化方法检测宫颈鳞状细胞癌中三种基因的表达情况，进一步了解三者在肿瘤发生、发展中所起到的作用。

## **5.1** **c-myc**与宫颈癌

c-myc基因定位于染色体8号长臂(8q24)上，由3个外显子和2个内含子组成，是MYC家族中的一员，属于核转录因子类癌基因，编码c-myc蛋白。c-myc基因首次于1982年在骨髓瘤病毒相关的研究中报道，因发现它与人类许多肿瘤密切相关而受到广泛关注与研究。Chen，DZ[48]等学者发现mtDNA整合到宫颈上皮细胞核时可以激活c-myc基因表达，并引起宫颈上皮内瘤变甚至宫颈癌。

c-myc普遍存在于人类正常细胞中，但通常处于静止状态（不表达或仅低表达），当受到外界因子刺激时c-myc就会被激活从而大量产生转录因子，激活或抑制其他基因的转录，进而抑制细胞分化，并促进细胞增殖、分裂或凋亡。大量研究表明：当c-myc异常高度表达时可诱导正常组织向肿瘤组织转化，为细胞的永生化和基因组的不稳定性提供有利条件[29]，已被证实在一定的条件下c-myc逆转录病毒可诱导小鼠成纤维细胞生成多功能干细胞（ips）；作为干细胞标志的核心代表基因中的一员[49]，c-myc基因可通过控制Fas / CD95途径的活性调控小鼠M1型急性髓系白血病细胞的终末分化和成熟[50]。c-myc是参与导致40%人类肿瘤的诱因之一，在肿瘤细胞中Myc可以直接上调下游基因LDH-A参与糖酵解，或间接抑制microRNAs miR-23a/b的表达从而上调谷氨酰胺的代谢和GLS蛋白的表达，驱动有氧糖酵解或氧化磷酸化，在肿瘤微环境中为细胞的生长和繁殖提供充足的能量和代谢底物[51]。同时还可调节血管生长因子的表达，促进肿瘤血管网的生成[28]。这可能导致癌细胞分化程度降低、恶性程度增高、容易侵袭和转移。有人认为单独的c-myc基因激活是不能形成肿瘤的，但它可以促进Kras基因的成

21

瘤性[25]。大多数学者认为c-myc的表达程度可以作为观察肿瘤恶性程度及预后的指标，抑制c-myc基因的表达可以作为干预肿瘤生长、发展的重要手段。

大量针对宫颈癌的研究[31、40、43]认为c-myc在宫颈癌、癌前病变及癌旁组织中均有表达，且阳性率逐渐降低，正常组织中鲜有表达。c-myc的表达率与临床分期、宫颈癌恶性程度、淋巴结转移及侵袭程度呈正相关，此外化疗前表达阳性率比化疗后高。与组织学类型、年龄等无明显相关性。

在本次研究结果中显示：c-myc在正常宫颈组织中表达部位主要在宫颈基底细胞的细胞核中，阳性率为70%。在宫颈鳞状细胞癌中c-myc的阳性表达率为85%，主要定位于癌细胞胞核中。为判断c-myc的阳性表达率及表达部位与宫颈鳞状细胞癌的病理分级及淋巴结转移的关系进行统计比较，结果表明c-myc的阳性表达率随着肿瘤分化程度的降低和淋巴结转移而升高（P<0.05）。且相对于中分化组和无淋巴结转移组，低分化组和淋巴结转移组c-myc强阳性表达部位更倾向于癌巢侵袭前沿。提示c-myc的高表达可能与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关，此结果与大多数学者的观点一致。另外，c-myc的阳性表达率及表达部位与患者年龄、有无化疗及临床分期无明显相关性。

## **5.2** **ephrinB2**与宫颈癌

ephrinB2（EFNB2）是目前己知的酪氨酸蛋白激酶受体（RTK）家族中最大的一个亚家族Eph/ephrin家族成员之一[52]。Eph受体为单跨膜蛋白，最初由人肝癌细胞系Hep3B中分离出来[53]。ephrinB群为单跨膜蛋白，由胞外区、跨膜区及胞内曲三个部分组成。ephrinB2蛋白可与EphB1、EphB3及EphB4等受体相结合，其中与EPHB4亲和力最高。EphrinB2及EphB4均属于结合型蛋白，只有膜附着形式，可溶形式没有活性且被认为具有拮抗作用，所以只在细胞之间相互接触时才能传导信号，同时这种传导途径是双向的，通常认为配体EphrinB2激活受体

EphB4，后者自身磷酸化，进而激活下游不同途径的信号转导级联反应是正向信号，相反则为反向信号。过去的研究表明[54-60]: EphB4-EphrinB2通路与许多生物学功能和病理过程有关，如该通路的激活可促进成骨细胞的分化和降低破骨细胞的产生；ephrinB2的高表达在血管的重塑、分化和发生中发挥着至关重要的作用，为组织提供赖以生存的养分，敲除ephrinB2可抑制小鼠胚胎卵黄囊血管重塑，降低血管网的复杂性和动静脉的嵌合，甚至导致小鼠死亡；ephrinB2通过调

22

节细胞骨架动力学，细胞迁移、粘附以及细胞动力和形态的改变，参与肿瘤的侵袭和转移；ephrinB2与内皮细胞上的血管内皮细胞生长因子（VEGF）及Notch信号通路共同调节肿瘤淋巴管的形成，继而影响肿瘤的侵袭、转移和预后，因此受到人们广泛关注。

大量研究表明[61]，ephrinB2在许多种肿瘤组织细胞及其血管内皮细胞胞浆中高表达，包括肺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、男性的前列腺癌、血液系统肿瘤、结直肠癌、胃癌等、胰腺癌、神经胶质细胞瘤、头颈部癌等。M. Tachibana[62]等学者通过对61例食管癌患者中ephrinB2 mRNA检测发现其检出率为62.3%（38例），与肿瘤的转移和临床分期显著相关，ephrinB2 mRNA阳性者5年生存率为

23%明显比阴性者低（55%）

本研究结果显示：ephrinB2主要表达于正常宫颈组织的棘细胞和基底细胞的胞膜及胞浆中，在癌组织中呈弥散分布，血管平滑肌细胞胞浆也可见强阳性表达，表达阳性率为30%。在70例宫颈癌组织中ephrinB2主要定位于癌细胞的胞浆和胞膜，部分癌巢周围可见散在强阳性表达，表达阳性率为88%。在低分化组和伴有淋巴结转移组宫颈癌中ephrinB2的表达强度明显高于中分化组和不伴有淋巴结转移组，（P<0.05）差异具均有统计学意义，提示：ephrinB2与宫颈癌的发生和发展密切相关，且它的强阳性表达影响着宫颈癌的分化程度和淋巴结转移，与患者的预后密切相关。另外，ephrinB2的阳性表达率与表达强度与患者临床期别、年龄分段及化学治疗无关。

## **5.3** **TM4SF1**与宫颈癌

TM4SF1（Transmembrane-4-L-six-family-1）也称L6或肿瘤相关蛋白L6

（Tumor-associated antigen L6, TAL6），为四次跨膜蛋白超家族（TM4SF）成员之一，首次发现于肺癌，TM4SF成员如CD9、CD63、CD82和CD151都被证明了能调控肿瘤细胞的能动和转移，并且与患者的预后和生存率密切相关[63-69]。

TM4SF1因其在大的胞外环上缺少CCG（Cys-Cys-Gly）模序及缺乏与其他33 个

TM4SF家族成员的整体序列同源性而被划分到一个新的包括TM4SF4/IL—TMP、

TM4SF5／L6H、TM4SF18／L6D、TM4SF19／OCTM4及TM4SF20／TCCE518在内的超

家族[70]。研究表明[71-74]: TM4SF1在许多上皮性肿瘤中高表达，如肺癌、直肠癌、乳腺癌和卵巢癌等，并且和抗体介导的治疗密切相关，但其在肿瘤细胞中的大部

23

分作用机制尚待进一步研究。

Jia Cao[75]等人应用定量RT-PCR检测发现胰腺癌细胞株中TM4SF1mRNA表达量明显高于胰腺导管上皮细胞株（HPDE），并发现在沉默TM4SF1后胰腺癌细胞株对吉西他滨介导的化学治疗更敏感。Yonghong Sun[76]等学者将pcDNA-TM4SF1转染到乳腺癌细胞株MDA-MB-231中发现TM4SF1呈现高表达，并出现乳腺癌细胞的迁移、凋亡的下降以及（p）-AKT, p-mTOR,和p-P70的阳性表达，提示TM4SF1可能通过PI3K/AKT/mTOR通路来调控乳腺癌细胞的转移和凋亡，有望成为治疗乳腺癌的靶基因并且诠释乳腺癌发生发展和转移的机制。Chi-Iou Lin[77]等学者的研究显示TM4SF1表达在人肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞以及在人骨髓间充质细胞中高表达中，参与肿瘤血管网的建立，并证实了抗TM4SF1抗体如8G4对肿瘤是有确切疗效的。Yu-Rong Kao[78]等学者实验中发现上调人类肺癌细胞株（CL1-0）中TM4SF1基因的表达，肺癌细胞的体外侵袭能力明显增强，而转移模型SCID小鼠生存时间明显缩短，但特异性抗TAL6抗体能显著降低肺肿瘤细胞的侵袭及迁移，肺癌组织的实时反转录PCR显示TAL6的高表达与肺鳞状细胞癌的早期术后复发和较短的生存率密切相关，因此认为TM4SF1介导癌细胞的侵袭和转移。

研究表明[79-80]: TM4SF1在多种血管内皮细胞（EC）中表达，因其可以在VEGF-A或thrombin的刺激下同与其有相似细胞定位的整合素亚单位α5、β1亚单位共同参与血管的形成，沉默或敲除TM4SF1可以有效降低VEGF-A介导的血管生成、阻滞细胞分裂并促进细胞衰老；细胞的迁移和细胞间的相互作用离不开丝状伪足的形成，TM4SF1可与myosin-10和β-actin相互作用参与促进细胞丝状伪足的形成和细胞的迁移，TM4SF1表达失常使EC失去正常细胞极性，不能有效地迁移。提示TM4SF1可能调控EC的功能及病理血管的生成，并参与肿瘤细胞新陈代谢及微环境的形成，成为抗肿瘤血管形成的具有吸引力的潜在靶点。

本研究结果显示：在正常宫颈组织中TM4SF1主要表达于棘细胞的胞膜及胞浆中，在癌组织中呈弥散分布，血管平滑肌细胞胞浆也可见强阳性表达，表达阳性率为30%。在宫颈癌组织中主要表达于癌细胞的胞浆及胞膜，部分癌巢周围可见散在强阳性表达，表达阳性率为89%。在≧45岁组及伴有淋巴结转移组宫颈癌中，TM4SF1的表达强度明显高于<45岁组及不伴淋巴结转移组，本次实验中

TM4SF1的表达与病理分级、临床期别、年龄段及化学治疗无关。

24

## **5.4** **c-myc**、**ephrinB2**与**TM4SF1**在宫颈癌中表达的相关性

本次研究中, c-myc与ephrinB2及TM4SF1三者在宫颈鳞状细胞癌中的表达无明显相关性；但是在TM4SF1阳性表达的宫颈癌组织中ephrinB2也趋于阳性表达，二者在宫颈癌组织中共同阳性表达数为61例，在69例宫颈癌中占88%，共

同阴性表达数为7例，在69例宫颈癌中占10%，呈正相关。说明均编码跨膜蛋白的TM4SF1与ephrinB2可能起协同作用调节癌细胞的增殖，促进组织恶变、癌细胞转移及肿瘤血管的生成。但由于本次研究总的例数较少，淋巴结转移较少，其共同作用增加正常组织癌变可能的理论还有待证实。

## **5.5** 展望

c-myc、TM4SF1和ephrinB2均在宫颈鳞状细胞癌中呈现高表达，并与肿瘤的临床病理因素密切相关，影响着肿瘤的生物学行为。c-myc在宫颈鳞状细胞癌中明显呈现出癌巢侵袭前沿的强阳性表达，并且在正常宫颈组织中的基底细胞胞核中呈现阳性表达，考虑c-myc可能为具有胚胎干细胞样特性的宫颈癌干细胞的特异性标记物，但是否能认定为宫颈癌干细胞的特异性标志物，还需要进一步验证。TM4SF1和ephrinB2的表达具有显著的相关性，且两者的表达强度与宫颈癌的转移密切相关。研究表明抗TM4SF1抗体对肿瘤有确切疗效，所以深入研究C-myc、TM4SF1和ephrinB2的作用机制将有利于进一步了解宫颈癌的发病机制、有助于揭示恶性肿瘤侵袭、转移等生物学行为的内在联系、发现阻断恶性肿瘤侵袭转移的方法，探索全新有效的靶向治疗和干预途径，从而有效降低恶性肿瘤患者的术后复发率和病死率。有望成为肿瘤早期诊断及判断预后的指标之一，亦可作为肿瘤治疗新的靶点，给肿瘤综合治疗提供新的方向和思路。

25

# 第 6 章 小 结

1.宫颈鳞状细胞癌组织中c-myc、TM4SF1及ephrinB2呈显著的高表达；

2. c-myc蛋白的阳性率及表达部位与肿瘤分化程度、侵袭以及有无淋巴结转移具有显著相关性，提示c-myc的阳性表达和表达部位在宫颈癌的发生以及淋巴结转移中起着重要作用；

3. ephrinB2的表达强度均与宫颈癌淋巴结转移及病理分级相关，TM4SF1的表达强度与宫颈癌淋巴结转移及患者年龄分段相关。

4. TM4SF1与ephrinB2在宫颈癌中的表达呈显著的正相关，提示TM4SF1及ephrinB2在宫颈癌的发生、发展中可能起协同作用。

26

参考文献

[1] Hakim A A, Lin P S, Sharon W, et al. Indications and efficacy of the human papillomavirus vaccine. [J]. Current Treatment Options in Oncology, 2007, 8(6): 393-401.

[2] Acevedo-Rocha CG, Munguía-Moreno JA, Ocádiz-Delgado R. A transcriptome-and marker-based systemic analysis of cervical cancer. In Intech (ed) Topics on cervical cancer with an advocacy for prevention. Croacia, 2012, pp. 155–196.

[3] Arends M J, Wyllie A H, Bird C C. Human papillomavirus type 18 is associated with less apoptosis in fibroblast tumours than human papillomavirus type 16. [J]. British Journal of Cancer, 1995, 72(3): 646-9.

[4] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat Genet. 2008; 40: 499–507.

[5] Miller DM1, Thomas SD, Islam A. c-Myc and cancer metabolism. Clin Cancer Res. 2012 Oct 15; 18(20): 5546-53.

[6] Shin D, Garcia-Cardena G, Hayashi S, et al. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. Dev Biol, 2001, 230: 139-150.

[7] 唐雄志, 谢秋群, 杨炜. ephrinB2失调对宫颈癌细胞增殖的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(16): 20-24.

[8] Sciuto T E, Merley A, Lin C I, et al. Intracellular Distribution of TM4SF1 and Internalization of TM4SF1-antibody Complex in Vascular Endothelial Cells[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 465(3): 338-343.

[9] Facchini L M, Penn L Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. [J]. Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1998, 12(9): 633-651.27

[10] Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc Network: Essential Regulators of Cell Growth and Differentiation[J]. Advances in Cancer Research, 1996, 68(8): 109-82.

[11] Lemaitre J M, Buckle R S, Méchali M. c-Myc in the control of cell proliferation and embryonic development. [J]. Advances in Cancer Research, 1996, 70(08): 95-144.

[12] S otelo J, Esposito D, Duhagon M A, et al. Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(7): 3001-3005.

[13] Amendola D, De Salvo M, Marchese R, et al. Myc down-regulation affects cyclin D1/cdk4 activity and induces apoptosis via Smac/Diablo pathway in an astrocytoma cell line. Cell proliferation, 2009, 42(1): 94-109.

[14] Miltenberger RJ1, Sukow KA, Farnham PJ. An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. Mol Cell Biol. 1995 May; 15(5): 2527-35.

[15] Bello-Fernandez C1, Packham G, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Aug 15; 90(16): 7804-8.

[16] Bouchard C1, Dittrich O, Kiermaier A, et al. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. Genes Dev. 2001 Aug 15; 15(16): 2042-7.

[17] Perez-Roger I1, Kim SH, Griffiths B, et al. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). 1999 Oct 1; 18(19): 5310-20.

[18] Rosenwald IB1, Rhoads DB, Callanan LD, et al. Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 1; 90(13): 6175-8.

[19] Marhin WW1, Chen S, Facchini LM, et al. Myc represses the growth arrest gene gadd45. Oncogene. 1997 Jun 12; 14(23): 2825-34.28

[20] Oster SK1, Marhin WW, Asker C, et al. Myc is an essential negative regulator of platelet-derived growth factor beta receptor expression. Mol Cell Biol. 2000 Sep; 20(18): 6768-78.

[21] Staller P1, Peukert K, Kiermaier A, et al. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. Nat Cell Biol. 2001 Apr; 3(4): 392-9.

[22] Penn LJ1, Brooks MW, Laufer EM, et al. Negative autoregulation of c-myc transcription. EMBO J. 1990 Apr; 9(4): 1113-21.

[23] Zindy F1, Eischen CM, Randle DH, et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. Genes Dev. 1998 Aug 1; 12(15): 2424-33.

[24] Grandori C1, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, et al. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. Nat Cell Biol. 2005 Mar; 7(3): 311-8.

[25] 姚德生, 李力, Kenneth Garson, 等. 癌基因c-myc和K-ras在卵巢癌发生发展中的作用[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(3): 371-374.

[26] Hann SR, Thompson CB, Eisenman RN, et al． C-MYC oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells． Nature, 1 985, 314(6009): 366．

[27] Taub R, Kirsch I, Morton C, et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Dec; 79(24): 7837-41.

[28] Hu YH1, Kong SQ, Kong HB, et al. Targeting c-Myc on cell growth and vascular endothelial growth factor expression in IN500 glioblastoma cells. Chin Med J (Engl). 2012 Jun; 125(11): 2025-31.

[29] Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. Nat Rev Cancer 2008; 8: 976–90.

[30] Bodvarsdóttir SK1, Steinarsdóttir M, Hilmarsdóttir H, et al. MYC amplification and TERT expression in breast tumor progression. Cancer Genet Cytogenet. 2007 Jul 15; 176(2): 93-9.

29



[31] 刘桂玲, 岳瑛. 原癌基因c-myc与宫颈癌的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2013, 4(9): 229-230.

[32] Shachaf C M, Kopelman A M, Arvanitis C, et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. [J]. Nature, 2004, 431(7012): 1112-7.

[33] Kawate S1, Fukusato T, Ohwada S, et al. Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma: correlation with clinicopathologic features, proliferative activity and p53 overexpression. Oncology. 1999; 57(2): 157-63.

[34] Wang L, Zhang X, Jia L T, et al. c-Myc-mediated epigenetic silencing of MicroRNA-101 contributes to dysregulation of multiple pathways in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2014, 59(5): 1850-63.

[35] 朱波, 欧超, 罗元, 等. CyclinD1 c-myc和p53的表达与肝细胞癌生物学行为关系.《中国肿瘤临床》ISTIC PKU -2006年2期.

[36] Rose-Hellekant TA1, Sandgren EP. Transforming growth factor alpha- and c-myc-induced mammary carcinogenesis in transgenic mice. Oncogene. 2000 Feb 21; 19(8): 1092-6.

[37] Corzo C1, Corominas JM, Tusquets I, et al. The MYC oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma. Cancer Genet Cytogenet. 2006 Mar; 165(2): 151-6.

[38] Deming SL1, Nass SJ, Dickson RB, et al. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. Br J Cancer. 2000 Dec; 83(12): 1688-95.

[39] Gimenes F1, Souza RP, de Abreu AL, et al. Simultaneous detection of human papillomavirus integration and c-MYC gene amplification in cervical lesions: an emerging marker for the risk to progression. Arch Gynecol Obstet. 2015 Aug 28. [Epub ahead of print].

[40] 阮永华, 魏万里, 张华献, 等. 宫颈癌组织中癌基因c-myc与抑癌基因p16的对比分析. 《癌症》ISTIC PKU -2003年6期.

[41] Kübler K1, Heinenberg S1, Rudlowski C1, 2, et al. c-myc copy number gain is a powerful prognosticator of disease outcome in cervical dysplasia. Oncotarget.

30

2015 Jan 20;6(2):825-35.

[42] Gao K, Eurasian M, Zhang J, et al. Can Genomic Amplification of Human Telomerase Gene and C-MYC in Liquid-Based Cytological Specimens Be Used as a Method for Opportunistic Cervical Cancer Screening[J]. Gynecologic&ObstetricInvestigation, 2015, 80(3).

[43] 何志连, 余立群. C-myc、HPV16/18DNA在宫颈癌及癌前病变中的表达及其相关性. 《肿瘤防治研究》ISTIC PKU -2010年12期.

[44] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors[J]. Cell, 2006, 126(4): págs. 663-676..

[45] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. [J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(1): 101-106.

[46] Knoepfler P S. Why mycAnunexpectedingredientinthestemcellcocktail. [J]. CellStemCell, 2008, 2(1): 18-21.

[47] 薛翔, 公丕军, 范引侠, 等. HeLa和SiHa细胞中Skp2、p27和C-myc的表达.《实用妇产科杂志》ISTIC PKU -2012年8期.

[48] Chen D, Xue W, Xiang J. The intra-nucleus integration of mitochondrial DNA (mtDNA) in cervical mucosa cells and its relation with c-myc expression[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2008, 27(1): 1-5.

[49] Jorge O N, Yazmín G G, Patricio G. Embryonic stem cell-specific signature in cervical cancer. [J]. Tumour Biology the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology & Medicine, 2014, 35(3): 1727-1738.

[50] Barbara H, Arshad A, Marianna S, et al. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. [J]. Oncogene, 2002, 21(21): 3414-3421.

[51] Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. Clin Cancer Res 2009; 15: 6479–83.

[52] 谢秋群, 唐雄志, 王世宣. EphB4受体及其配体ephrinB2与妇科肿瘤关系的

31

研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(3):218-220.

[53] BennettBD, Wang Z, KuangWJ, et a. l Cloning and char-acterization ofHTK, a novel transmembrane tyrosine k-inase of the EPH subfamily[ J]. Biol Chem, 1994, 269: 14211-14218

[54] PasqualeEB． Eph-ephrinbidirectionalsignalinginphysiologyanddisease[J]. Cell, 2008, 133(1): 38—52．

[55] Adams RH, Diella F, Hennig s, et al． The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is Required for vascular morphogenesis but not cranial crest mgration[J]． cell, 2001, 104(1): 57—69．

[56] wang Hu, chen ZF, Anderson DJ． Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4[J]． cell, 1998, 93(5): 741—753．

[57] EphB/ephrinB Signaling in Cell Adhesion and Migration. Inji Park, Hyun-Shik Lee. Mol Cells. 2015 January 31; 38(1): 14–19.

[58] Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. Nature, 2010, 465: 483\_486.

[59] Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, et al. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. Nature, 2010, 465: 487-491.

[60] Kyle Niessen, Gu Zhang, John Brady Ridgway, et al. The Notch 1-D114 signaling pathway regulates mouse postnatal lymphatic development. Blood, 2011, 118(7): 1989-1997.

[61] Brantley-Sieders D M. Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: Lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2012, 23(23): 102-8.

[62] Tachibana M, Tonomoto Y, Hyakudomi R, et al. Expression and prognostic significance of EFNB2 and EphB4 genes in patients with oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Digestive and liver disease, 2007, 39(8): 725-732.

[63] Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, et al. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. [J]. Journal of Experimental Medicine, 1993, 177(5): 1231-1237.32

[64] Radford K J, Thorne R F, Hersey P. Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. [J]. Journal of Immunology, 1997, 158(7): 3353-8.

[65] Dong JT; Lamb PW; Rinker-Schaeffer CW; Vukanovic J; Ichikawa T; Isaacs JT; Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. [J]. Science, 1995, 268(5212): 884-6.

[66] Testa J, Brooks P J, Quigley J. Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. [J]. Cancer Research, 1999, 59(15): 3812-20.

[67] Higashiyama M, Taki T, Ieki Y, et al. Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. [J]. Cancer Research, 1995, 55(24): 6040-4.

[68] Adachi M, Taki T, Ieki Y, et al. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. [J]. Cancer Research, 2010, 56(8): 1751-5.

[69] Miyake M, Nakano K, Itoi S I, et al. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. [J]. Cancer Research, 1996, 56(6): 1244-1249.

[70] Wright MD, Ni J, Rudy GB. The L6 membrane proteins - a new four-transmembrane superfamily. Protein Sci, 2000, 9(8): 1594-1600.

[71] Hellström I, Horn D, Linsley P, et al. Monoclonal mouse antibodies raised against human lung carcinoma. [J]. Cancer Research, 1986, 46(8): 3917-23.

[72] Goodman G E, Hellström I, Brodzinsky L, et al. Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in breast, colon, ovarian, and lung cancer. [J]. Journal of Clinical Oncology Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 1990, 8(6): 1083-92.

[73] Svensson H P, Vrudhula V M, Emswiler J E, et al. In Vitro and In Vivo Activities of a Doxorubicin Prodrug in Combination with Monoclonal Antibodyβ-Lactamase Conjugates[J]. Cancer Research, 1995, 55(11): 2357-65.33

[74] Denardo S J, Richman C M, Goldstein D S, et al. Yttrium-90/indium-111-DOTA-peptide-chimeric L6: pharmacokinetics, dosimetry and initial results in patients with incurable breast cancer. [J]. Anticancer Research, 1997, 17(3B): 1735-44.

[75] Jia Cao, Jiachun Yang, Vijaya Ramachandran, et al. M4SF1 Promotes Gemcitabine Resistance of Pancreatic Cancer In Vitro and In Vivo. Logsdon PLoS One. 2015; 10(12): e0144969.

[76] Yonghong Sun, Yahong Xu, Jie Xu, et al. Role of TM4SF1 in regulating breast cancer cell migration and apoptosis through PI3K/AKT/mTOR pathway. Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(8): 9081–9088.

[77] Chi-Iou Lin, Anne Merley, Tracey E. Sciuto, et al. TM4SF1: a new vascular therapeutic target in cancer. Angiogenesis. 2014 October; 17(4): 897–907.

[78] Yu-Rong K, Jin-Yuan S, Wei-Chun W, et al. Tumor-associated antigen L6 and the invasion of human lung cancer cells. [J]. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2003, 9(7): 2807-16.

[79] Shih SC, Zukauskas A, Li D, et al. The L6 protein TM4SF1 is critical for endothelial cell function and tumorangio genesis. Cancer Res, 2009, 69, (8) 3272-3277.

[80] Zukauskas A, Merley A, Li D, et al. TM4SF1: a tetraspanin-like protein necessary for nanopodia formation and endothelial cell migration. Angiogensis, 2011, 4(3): 345-354.

34

**作者简介及攻读硕士期间取得的科研成果**

刘凌，女，1991年出生，2009年应届考入新疆医科大学临床本硕7年制攻读学士和硕士学位，2014年作为交流生于吉林大学第一临床医学院妇产科专业攻读硕士学位，攻读硕士期间以第1作者发表1篇文章。

**攻读学位期间发表的学术文章**

1. 刘凌，张松灵. c-myc基因的研究进展. 新疆医科大学学报，2016年39卷增刊（上）：716-721.

35

致 **谢**

值此论文完成之际，我怀着无限的敬意和深深的感激，向给予我关心、理解、支持和帮助的各位老师、同学、朋友及家人致以最诚挚的谢意！

首先，我要向我尊敬的导师张松灵副教授致以崇高的敬意和诚挚的感谢！张松灵副教授以其不倦的工作热情、丰富的临床经验、严谨的治学态度深深影响着我，在二年的学习生涯中给予我无微不至的帮助，给与我面对战胜困难的勇气和力量。并对我的论文从研究课题的设计、研实验方案、论文的书写无不浸透着老师的心血，您以渊博的学识、广阔的科学视野、严谨求实的治学态度、敏捷的科研思维深深感染着我，激励着我，是我一生学习的榜样。祝您工作顺利，阖家幸福！

最后，我还要感谢吉林大学第一医院肿瘤妇科的费军伟教授、孙玉秀教授、魏振彤主治医师等老师及同学们，是你们在三年中给予诚挚的关怀、指导与帮助，带领我成长。祝你们工作顺利！同时感谢转化医学院的齐翀老师及同学们在实验中给与我的辅导与帮助，祝你们工作顺利！

最后，衷心的感谢各位评审专家，谢谢你们的指导和意见。

36