

宫颈癌细胞过表达酪氨酸激酶受体 1 对其肿瘤相关内皮细胞恶性生物学行为的影响

孙倩玉^{1,2}, 韦 艳^{1,2}, 白 瑞^{1,2}, 杨 萍^{1,2}

摘要 目的 探讨宫颈癌细胞过表达酪氨酸激酶受体 1 (Tie-1) 对其肿瘤相关内皮细胞 (TREC) 恶性生物学行为的影响。方法 用免疫组化法检测 96 例宫颈癌患者组织中宫颈癌细胞 (CCC) 与其 TREC 中 Tie-1 蛋白表达的相关性, 分析宫颈癌 TREC 中 Tie-1 的表达与患者临床病理特征及预后的相关性。构建过表达 Tie-1 的 HeLa 细胞 (HeLa-Tie1OE), 采用 Transwell 小室共培养法将 HeLa-Tie1OE 与人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 共培养获得宫颈癌 TREC; 通过细胞划痕实验、Transwell 侵袭和迁移实验、小管生成实验检测 TREC 的迁移、侵袭及小管生成能力变化。结果 96 例宫颈癌患者 CCC 与 TREC 中 Tie-1 的表达呈正相关; Tie-1 在 FIGO 分期为 I B2-II A2 期、肿瘤直径 ≥ 4 cm、宫颈肌层浸润深度 $\geq 1/2$ 全层、腺癌、中低分化宫颈癌患者 TREC 中高表达率分别高于 I A1-I B1、肿瘤直径 < 4 cm、宫颈肌层浸润深度 $< 1/2$ 全层、鳞癌、高分化宫颈癌患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Tie-1 在宫颈癌患者 TREC 中的高表达与患者年龄、淋巴结转移及淋巴脉管间隙浸润无相关性; Tie-1 在宫颈癌 TREC 中的高表达与患者 5 年无瘤生存时间及总生存时间呈负相关 ($P < 0.05$)。Tie-1 在宫颈癌 TREC 中表达上调且使 TREC 侵袭、迁移、小管生成能力增强。结论 Tie-1 在宫颈癌 TREC 的高表达与患者 FIGO 分期、肿瘤直径、分化程度、宫颈肌层浸润深度、宫颈癌类型有关, 且与患者不良预后有关。过表达 Tie-1 的 CCC 可促进其 TREC 侵袭、迁移及小管生成能力。

关键词 酪氨酸激酶受体 1; 肿瘤相关内皮细胞; 宫颈癌; 血管生成; 共培养

中图分类号 R 711.74

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1756-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.013

宫颈癌居全球女性常见恶性肿瘤第四位, 居女性癌症死亡原因的第四位^[1]。据统计, 我国 2020 年宫颈癌新发病例达 11 万, 已成为第二位宫颈癌负担国^[2]。在肿瘤微环境中, 肿瘤相关内皮细胞 (tumor related endothelial cells, TREC) 受肿瘤细胞直接或间接影响生成新生血管, 为肿瘤恶性进展提供条件^[3-4]。血管生成素 (angiopoietin, Ang) / 酪氨酸激酶受体 (tyrosine kinase receptor, Tie) 通路参与血管新生机制^[5-6], Tie-1 为此通路重要成员。课题组前期研究^[7]表明, Tie-1 在部分宫颈癌细胞 (cervical cancer cells, CCC) 中高表达与患者不良预后有关; 但 Tie-1 在 TREC 中表达情况及其是否与患者预后相关性尚不明确。该研究进一步扩大样本量以探究 CCC 与其 TREC 中 Tie-1 表达的相关性, 并通过细胞共培养法探究过表达 Tie-1 的宫颈癌细胞对其 TREC 生物学行为的影响, 为宫颈癌抗肿瘤血管生成治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 选择 2008 年 11 月—2019 年 12 月在石河子大学第一附属医院妇科经病理学检查确诊为宫颈癌的 96 例患者为研究对象, 年龄为 35 ~ 83 (53.16 $\pm$ 11.36) 岁, 术前均未接受过放化疗。收集患者年龄、FIGO 分期 (2018 年版)、肿瘤直径、分化程度、宫颈肌层浸润深度、肿瘤类型、淋巴脉管间隙浸润、淋巴结转移等临床病理资料, 按照不同病理特征分组 (见表 1)。对患者术后随访, 记录患者无瘤生存时间 (progression-free survival, PFS) 和总生存时间 (overall survival, OS)。无瘤生存时间是指从手术日至有证据标明肿瘤复发之日或末次随访日的时间; 总生存时间是指手术日至死亡日或末次随访日的时间。

2022-06-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82072893); 新疆建设兵团科技攻关项目 (编号: 2017DB012); 石河子大学成果转化与技术推广计划项目 (编号: CGZH201702); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (编号: 2020-PT330-003)

作者单位: ¹石河子大学医学院第一附属医院妇科, 石河子 832008

²国家卫生健康委中亚高发防治重点实验室, 石河子 832008

作者简介: 孙倩玉, 女, 硕士研究生;

白 瑞, 男, 住院医师, 责任作者, E-mail: 1873887541@qq.com;

杨 萍, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yangping5127@163.com

1.1.2 试剂与材料 Tie-1 过表达慢病毒购自上海和元生物技术有限公司(货号: H17481); Tie-1 及 β -actin 抗体购自英国 Abcam 公司; DMEM 培养基(货号: C11995500BT)、胎牛血清(货号: 10099141)、Hy-clone 胰酶(货号: 25200-056)等购自德国 Gibco 公司; 细胞共培养 Transwell 小室(货号: 3413)、细胞侵袭迁移 Transwell 小室(货号: 3422)、Matrigel 基质胶(货号: 354234)购自美国康宁公司。

1.1.3 细胞 人宫颈癌 HeLa 细胞(货号: XF0314)、人脐静脉内皮细胞 HUVEC(货号: XF1122)购自上海复祥生物科技有限公司。所有细胞均用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 采用免疫组化染色检测 96 例宫颈癌患者石蜡组织切片中 CCCs 及 TRECs Tie-1 的表达,实验步骤参考文献^[9], Tie-1 抗体工作过浓度为 1 : 500。Tie-1 在 CCCs 及 TRECs 中的表达均为胞质内棕黄色颗粒,呈全或无染色,且染色均匀。随机选取 3 个视野,根据 CCCs 或 TRECs 细胞染色的强度分别评分: 无染色记为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。染色评分小于 2 分为低表达, ≥ 2 分为高表达。

1.2.2 细胞转染 本实验按照慢病毒转染说明书所示操作步骤进行。将宫颈癌 HeLa 细胞接种于 6 孔板中,待细胞汇合度约 60% 时加入含过表达 Tie-1 基因序列(Tie1-Overexpression, Tie1OE)或空载体基因序列(natural control, NC)的慢病毒,12 h 后更换新鲜的完全培养基,24 h 后更换含嘌呤霉素(2 μ g/ml)的完全培养基连续筛选 7 d。用 Western blot 法检测过表达 Tie-1 的 HeLa 细胞(HeLa-Tie1-Overexpression, HeLa-Tie1OE)及空转染对照组 HeLa 细胞(HeLa-Natural control, HeLa-NC) Tie-1 蛋白表达水平。

1.2.3 细胞共培养实验 本实验采用膜孔径为 0.4 μ m 的 Transwell 小室构建细胞共培养模型,于上室接种 HeLa-Tie1OE 或 HeLa-NC 细胞,下室接种 HUVEC 细胞,细胞数均为 2×10^4 个,在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中共培养。48 h 后移除上室,下室中的 HUVECs 即为宫颈癌 TRECs^[9],根据共培养时上室的 HeLa 细胞不同,将共培养后获得的 TRECs 分别记为 HUVECs + HeLa-Tie1OE、HUVECs + HeLa-NC,以单独培养的 HUVECs 原株作为空白对照组。Western blot 检测不同共培养体系下获得

的 TRECs 细胞 Tie-1 蛋白表达水平。

1.2.4 Western blot 实验 实验步骤参考文献^[9]。用细胞裂解液于冰上提取细胞总蛋白,取等质量蛋白行凝胶电泳,将目的蛋白转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,将膜置于含 β -actin(1 : 1 000)或 Tie-1(1 : 1 000)的一抗反应液中 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后用相应二抗(1 : 10 000)孵育 1.5 h,再次洗膜后用 ECL 化学发光液显影,通过分析条带灰度值计算相应蛋白表达水平。

1.2.5 细胞划痕实验 将共培养体系中获得的 2 种 TRECs(HUVECs + HeLa-Tie1OE、HUVECs + HeLa-NC)及 HUVECs,分别以 5×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板中,每孔加入 2 ml 完全培养基培养,待细胞汇合度近 100% 时进行划痕处理并换为无血清 DMEM 培养基培养。分别于划痕后 0、12、24 h 用显微镜定点观察并拍照。Image J 软件分析图片中划痕剩余面积,计算细胞迁移面积并进行统计分析。

1.2.6 细胞侵袭实验 实验前将 Matrigel 基质胶于 4 °C 冰箱中解冻,将基质胶按 1 : 4 用 DMEM 稀释,在 Transwell 上室中加入 50 μ l 稀释后的基质胶,放入 37 °C 培养箱中 30 min 至胶凝。用 DMEM 分别将 HUVECs + HeLa-Tie1OE、HUVECs + HeLa-NC 及 HUVECs 细胞的浓度调整为 15×10^4 个/ml,于上室加入 200 μ l 细胞悬液,下室加入 800 μ l 含 20% 胎牛血清的 DMEM,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。48 h 后取出上室,用棉签擦去上层基质胶和未穿过膜的细胞,将小室置于 4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 30 min 后 PBS 洗 3 次。于 200 倍镜下随机选取 4 个视野拍照,计算穿过小室的细胞数。

1.2.7 细胞迁移实验 与细胞侵袭实验步骤基本相同,其中 Transwell 小室上室不加基质胶,且细胞接种后于培养箱培养 24 h 后取出行固定、染色、拍照、计数。

1.2.8 小管生成试验 将基质胶按 1 : 5 用 DMEM 稀释,在 96 孔板中每孔加入 50 μ l 稀释后的基质胶,放入 37 °C 培养箱中至基质胶凝固,分别将 HUVECs + HeLa-Tie1OE、HUVECs + HeLa-NC、HUVECs 用 DMEM 调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,每孔接种 100 μ l。接种 9 h 后于 200 倍镜下选取 4 个视野拍照并对每组细胞所形成的血管节点进行计数。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 23.0 软件进行数据处理及分析,计量资料经正态性检验符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,率的比较采用 χ^2 检验,等级资料相关性分析用 Spearman 法,生存曲线采用 Kaplan-Meier

法,多组比较采用 F 检验,所有检验均为双尾检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tie-1 在 CCCs 和 TRECs 的表达 免疫组化结果显示,Tie-1 在 96 例宫颈癌患者癌组织中 CCCs 及 TRECs 的高表达率分别为 51.0% (49/96) 和 53.1% (51/96)。相关性分析结果显示,Tie-1 在宫颈癌患者癌组织中 CCCs 的表达与其在 TRECs 中的表达呈正相关 ($r = 0.709, P < 0.001$)。见图 1。

2.2 Tie-1 在宫颈癌患者组织中 TRECs 的表达与患者临床病理特征的相关性 Tie-1 在 FIGO (2018) 分期为 I B2-II A2 期、肿瘤直径 ≥ 4 cm、腺癌、中低分化、宫颈肌层浸润深度 $\geq 1/2$ 全层的宫颈癌 TRECs 中的高表达率分别高于 I A1-I B1、肿瘤直径 < 4 cm、鳞癌、高分化、宫颈肌层浸润深度 $< 1/2$ 全层宫颈癌患者,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

2.3 Tie-1 在宫颈癌 TRECs 中的表达及与患者预后的关系 对 96 例宫颈癌患者进行随访,失访 7 例,中位随访时间为 48 (22 ~ 123) 个月,其中 24 例

复发,19 例死亡。Kaplan-Meier 生存分析显示,89 例患者中 TRECs Tie-1 高表达者 5 年累积 PFS [3.0% (29/46)] 及 OS [7.4% (31/46)] 均低于 TRECs Tie-1 低表达者的 PFS [3.7% (36/43)] 及 OS [0.7% (39/43)],差异有统计学意义 ($P_{\text{PFS}} = 0.019, P_{\text{OS}} = 0.005$),见图 2A、B。

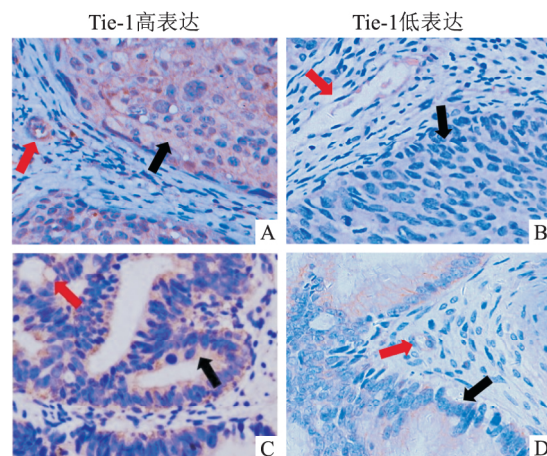


图1 Tie-1 在宫颈癌组织中 CCCs 及 TRECs 的表达强度呈正相关 IHC $\times 400$

A、B: 宫颈鳞癌; C、D: 宫颈腺癌; 黑箭头: CCCs; 红箭头: TRECs

表1 Tie-1 在宫颈癌 TRECs 中的表达与患者临床病理特征的关系 [n (%)]

变 量	n	TRECs Tie-1 表达情况		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄(岁)				1.710	0.191
<45	22	9(40.9)	13(59.1)		
≥ 45	74	42(56.8)	32(43.2)		
FIGO 分期(2018 年版)				13.496	<0.001
I A1-I B1	33	9(27.3)	24(72.7)		
I B2-II A2	63	42(66.7)	21(33.3)		
肿瘤直径(cm)				13.267	<0.001
<4	83	38(45.8)	45(54.2)		
≥ 4	13	13(100.0)	0(0)		
肿瘤类型				4.854	0.028
鳞癌	76	36(47.4)	40(52.6)		
腺癌	20	15(75.0)	5(25.0)		
分化程度				4.665	0.031
中低分化	79	46(58.2)	33(41.8)		
高分化	17	5(29.4)	12(70.6)		
宫颈肌层浸润深度				21.926	<0.001
<1/2 全层	46	13(28.3)	33(71.7)		
$\geq 1/2$ 全层	50	38(76.0)	12(24.0)		
淋巴脉管间隙浸润				1.113	0.292
无	79	40(50.6)	39(49.4)		
有	17	11(64.7)	6(35.3)		
淋巴结转移				0.551	0.458
无	85	44(51.8)	41(48.2)		
有	11	7(63.6)	4(36.4)		

2.4 HUVECs 与过表达 Tie-1 的宫颈癌细胞共培养后其 Tie-1 表达情况 用慢病毒转染法构建 Tie-1 过表达的 HeLa 细胞,结果显示,与 HeLa-NC 组及 HeLa 组相比,HeLa-Tie1OE 组细胞 Tie-1 的表达水平明显升高,差异有统计学意义($F = 50.78, P < 0.001$),如图 3A、B; HeLa 细胞 Tie-1 过表达成功后,将 HeLa-Tie1OE、HeLa-NC 细胞细胞分别与 HUVECs 共培养,结果显示,相较于 HUVECs + HeLa-NC 共培养获得的 TREC_s 或 HUVEC 原株细胞, HUVECs + HeLa-Tie1OE 共培养获得的 TREC_s 其 Tie-1 的表达水平升高($F = 3.867, P = 0.018$),图 3C、D。

2.5 过表达 Tie-1 的宫颈癌 HeLa 细胞对其 TREC_s 侵袭和迁移能力的影响 细胞划痕实验显示,与 HUVECs 及 HUVECs + HeLa-NC 共培养获得的 TREC_s 相比, HUVECs + HeLa-Tie1OE 共培养获

得的 TREC_s 在第 12、24 小时迁移距离均增加,差异有统计学意义($F_{12h} = 8.916, P < 0.001, F_{24h} = 13.068, P < 0.001$),见图 4A、B。Transwell 侵袭及迁移实验显示,与 HUVECs 及 HUVECs + HeLa-NC 共培养获得的 TREC_s 相比, HUVECs + HeLa-Tie1OE 共培养获得的 TREC_s 穿过小室的细胞数更多,差异有统计学意义($F_{迁移} = 124.1, P < 0.0001; F_{侵袭} = 17.90, P < 0.001$),见图 4C、D。

2.6 宫颈癌 HeLa 细胞 Tie-1 过表达对其 TREC_s 小管生成能力的影响 体外小管生成试验显示,与 HUVECs 原株细胞及 HUVECs + HeLa-NC 共培养获得的 TREC_s 相比, HUVECs + HeLa-Tie1OE 共培养获得的 TREC_s 生成血管节点数更多,差异有统计学意义($F = 10.86, P = 0.0012$),见图 5A、B。

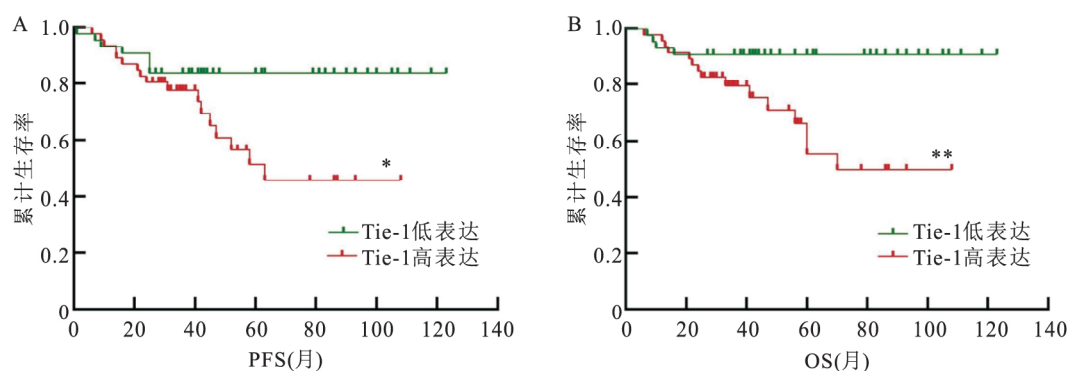


图2 TREC_s 中 Tie-1 的不同表达的宫颈癌患者 PFS(A) 和 OS(B) 对应的生存曲线图
与 Tie-1 低表达组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

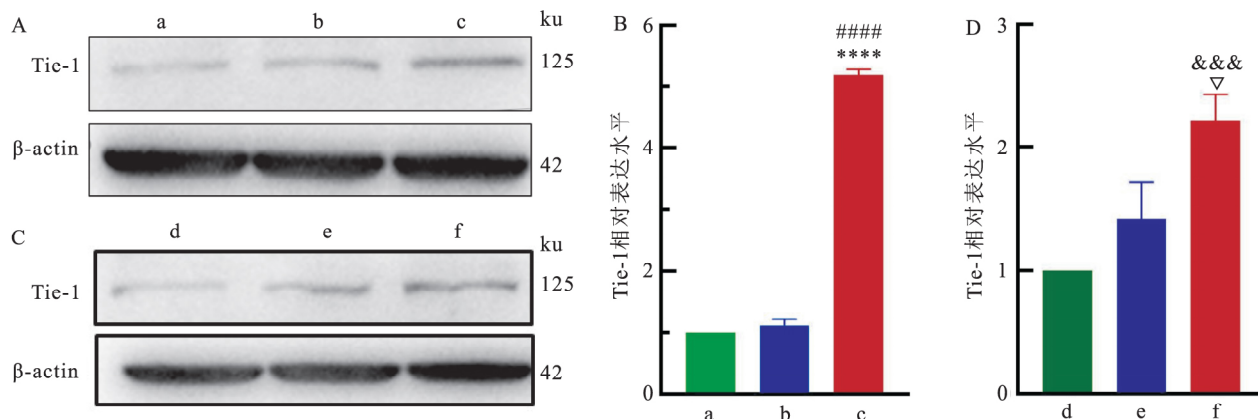


图3 HUVECs 与过表达 Tie-1 的 HeLa 细胞共培养后 TREC_s Tie-1 表达情况

A、B: Western blot 检测各转染组 HeLa 细胞 Tie-1 表达情况灰带图及图灰度值统计分析图; C、D: Western blot 检测共培养体系下各组 TREC_s 的 Tie-1 的表达情况灰带图及图灰度值统计分析图; a: HeLa 组; b: HeLa-NC 组; c: HeLa-Tie1OE 组; d: HUVECs 组; e: HUVECs + HeLa-NC 组; f: HUVECs + HeLa-Tie1OE 组; 与 HeLa 组比较: ##### $P < 0.0001$; 与 HeLa-NC 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 HUVECs 组比较: &&& $P < 0.001$; 与 HUVECs + HeLa-NC 组比较: ∇ $P < 0.05$

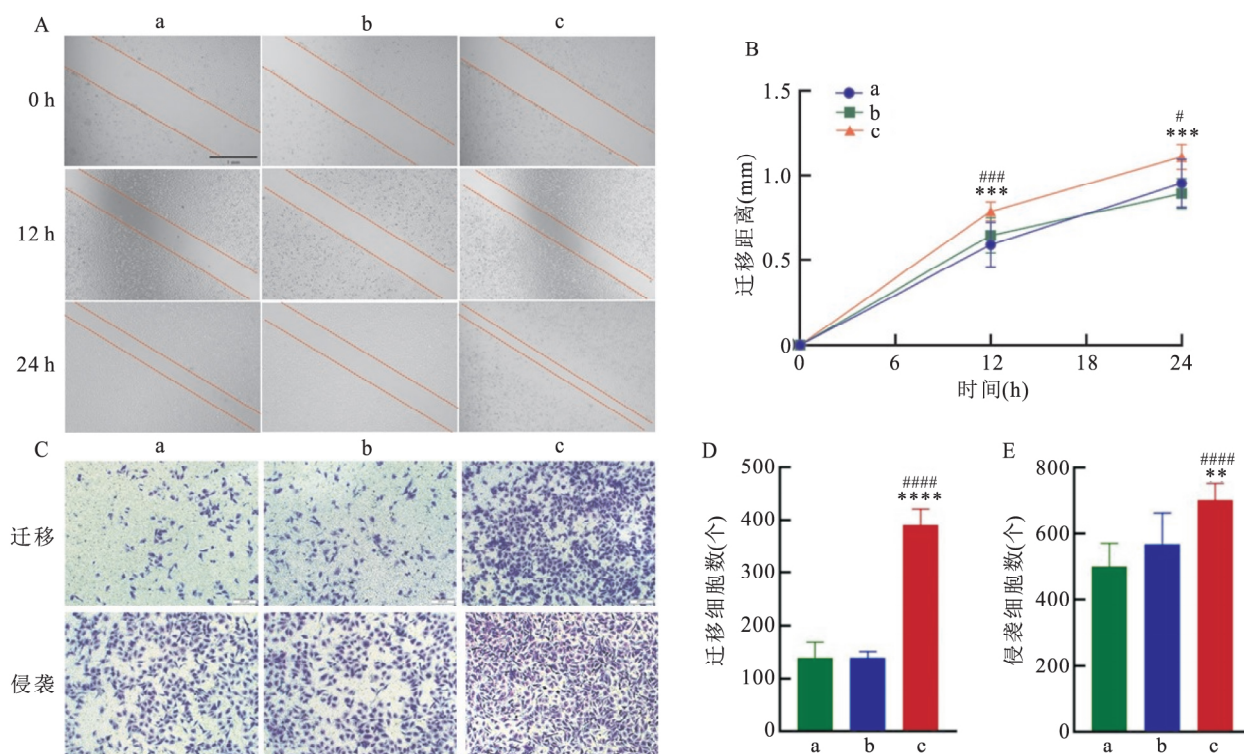


图4 过表达 Tie-1 的宫颈癌 HeLa 对其 TRECs 侵袭和迁移能力的影响

A: 细胞划痕实验白光图 $\times 100$; B: 细胞划痕实验统计分析折线图; C: Transwell 细胞侵袭和迁移实验白光图 结晶紫染色 $\times 200$; D、E: Transwell 细胞迁移和侵袭实验统计分析柱状图; a: HUVECs 组; b: HUVECs + HeLa-NC 组; c: HUVECs + HeLa-Tie1OE 组; 与 HUVECs 组比较: $^{\#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$, $^{####}P < 0.0001$; 与 HUVECs + HeLa-NC 组比较: $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$

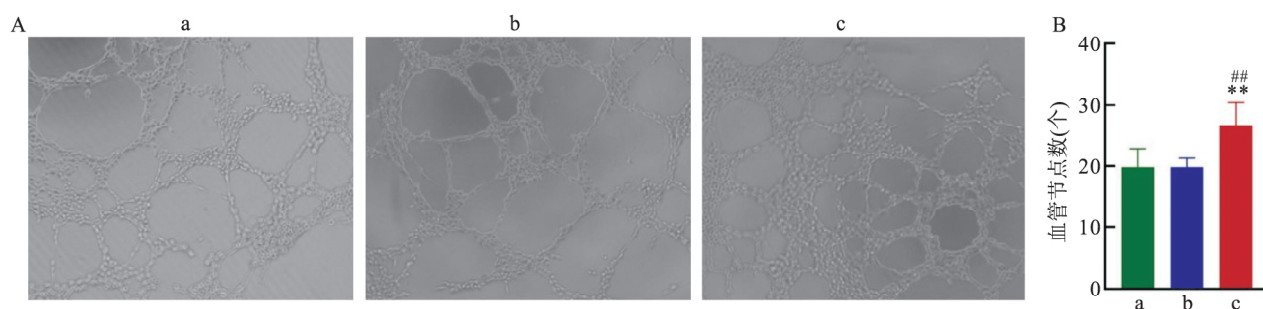


图5 过表达 Tie-1 的宫颈癌 HeLa 细胞对其 TRECs 小管生成能力的影响

A: 小管生成试验白光图 $\times 200$; B: 小管节点生成数量统计分析图; a: HUVECs 组; b: HUVECs + HeLa-NC 组; c: HUVECs + HeLa-Tie1OE 组; 与 HUVECs 组比较: $^{##}P < 0.01$; 与 HUVECs + HeLa-NC 组比较: $^{**}P < 0.01$

3 讨论

近年来我国宫颈癌发病率和病死率逐年增高^[10],早期宫颈癌患者尚能得到有效治疗,但晚期宫颈癌患者常因缺乏有效治疗手段预后较差。目前抗肿瘤血管生成已成为难治性宫颈癌的治疗手段之一,其中抗血管内皮生长因子类药物被广泛应用,但此类药物存在多种副作用,治疗效果也因人而异^[11]。研究^[9]表明,除常见的血管内皮生长因子外,Tie-1 所在的 Ang/Tie 通路也参与肿瘤血管生成

过程。目前,Tie-1 在多种肿瘤中被发现呈高表达,其在肿瘤生长和进展中的作用已成为研究热点,但在宫颈癌中的研究报道尚少。

Tie-1 在一些肿瘤的癌细胞或 TRECs 中高表达并提示患者不良预后^[5,7,12]。有研究^[9]表明,Tie-1 在胃腺癌细胞高表达与患者的生存率呈负相关,并且在结直肠腺癌中的表达与肿瘤组织学分级、肿瘤浸润深度、Duke 分类和淋巴浸润存在显著相关性。在卵巢癌中,Tie-1 在癌细胞中高表达不仅提示患者预后差,还与顺铂耐药性有关^[12]。前期,该课题

组^[1]研究表明 Tie-1 在宫颈癌上皮细胞中高表达与患者不良预后有关。另外, Tie-1 在浸润性导管性乳腺癌的 TREC_s 中高表达并且其高表达与患者癌细胞淋巴结转移相关^[2]。在具有转移潜能的黑色素瘤细胞中 Tie-1 高表达, 并且在黑色素瘤转移瘤中的微血管中检测到 Tie-1 mRNA 表达呈强阳性^[3]。该研究表明, 在宫颈癌组织 TREC_s 中 Tie-1 的高表达与患者临床分期、肿瘤直径、分化程度、肿瘤类型等病理特征相关, 并且与患者不良预后有关。有研究^[4]表明, 若没有新生血管生成, 肿瘤生长会受到抑制; 该研究显示, 当肿瘤直径分界分别为 4 cm ($P < 0.001$) 时差异有显著统计学意义(表 1), 提示宫颈癌组织 TREC_s 中 Tie-1 的高表达与肿瘤大小密切相关。另外, 局部晚期宫颈癌肿瘤直径通常大于 4 cm, 提示 Tie-1 在局部晚期宫颈癌 TREC_s 中高表达可能与宫颈癌进展有关。

Tie-1 对肿瘤血管生成及成熟具有重要作用^[6,15]。在小鼠实验模型中, Tie-1 缺陷的小鼠虽然没有明显的血管生成障碍, 但是它们的血管系统不能成熟, 胚胎在妊娠后期即死亡^[15]。另外, 在小鼠原发性肿瘤生长期间, 内皮细胞中 Tie-1 缺失会导致肿瘤微血管密度降低、血管生成减少和血管正常化增强使肿瘤内坏死逐渐增加^[6]。在 Ang/Tie 通路中, Tie-1 能与 Tie-2 结合形成多聚体, 稳定 Tie-2 磷酸化信号, 正向调控 Ang/Tie-2 信号传导, 促进内皮细胞的存活和迁移, 在肿瘤微环境中, 内皮细胞侵袭迁移能力提高可促进血管的新生^[15]。本研究显示, Tie-1 在宫颈癌组织中 CCC_s 和 TREC_s 中的表达呈正相关, 并通过体外共培养实验验证了这一结果; 其次, TREC_s 中 Tie-1 表达升高促进了其侵袭、迁移及小管生成能力。以上说明宫颈癌细胞可能通过某种方式影响了其 TREC_s 中 Tie-1 表达并促进了 TREC_s 形成新生血管, 其具体机制仍需要进一步探究。

综上所述, 该研究表明, Tie-1 在子宫颈 CCC_s 与 TREC_s 的表达呈正相关, 且 TREC_s 中 Tie-1 的高表达与患者肿瘤临床分期、肿瘤直径、癌组织浸润深度、分化程度、肿瘤类型相关, 与患者 5 年累积 PFS 及 OS 呈负相关, 提示宫颈癌 TREC_s 中 Tie-1 高表达患者生存时间相对较短, 预后较差。此外, 细胞实验表明, HUVECs 与过表达 Tie-1 的 HeLa 细胞共培养后获得的 TREC_s 其 Tie-1 表达水平升高, 且此细胞的侵袭、迁移和小管生成能力增强。因此, Tie-1 在宫颈癌 TREC_s 中的高表达有望作为潜在的宫颈癌血管标志物来预测患者预后, 并可能成为优于

VEGF 的宫颈癌抗肿瘤血管生成治疗靶点。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–49.
- [2] 黄留叶, 赵雪莲, 赵方辉. 宫颈癌的发病与死亡变化趋势及其预防策略进展 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 21–5.
- [3] Hida K, Maishi N, Annan D A, et al. Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): 1272.
- [4] 肖剑波, 钟佳宁, 陈斌. 肿瘤微环境在肿瘤血管生成的研究进展 [J]. 赣南医学院学报, 2021, 41(1): 86–92, 97.
- [5] Yang P, Chen N, Jia J, et al. Tie-1: a potential target for anti-angiogenesis therapy [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2015, 35: 615–22.
- [6] La P, Roth L, Singhal M, et al. Endothelial Tie1-mediated angiogenesis and vascular abnormalization promote tumor progression and metastasis [J]. Clin Invest, 2018, 128(2): 834–45.
- [7] 秦君君, 李凯丽, 杨萍, 等. 子宫颈鳞癌细胞血管生成素和酪氨酸激酶受体的表达与患者临床病理及预后分析 [J]. 实用妇产科杂志, 2019, 35(2): 123–7.
- [8] 杨艳芳, 孟盈盈, 叶军, 等. 模拟体内肿瘤微环境的乳腺癌细胞与脐静脉内皮细胞的体外共培养 [J]. 药学报, 2018, 53(3): 403–9.
- [9] 郜庆祖, 陈亦扬, 狄文玉, 等. ETV4 在结肠癌中的表达及其对结肠癌侵袭能力的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(9): 1436–41.
- [10] 魏长慧, 朱继存, 牛媛娜, 等. 2004—2016 年中国女性生殖系统恶性肿瘤死亡趋势分析 [J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(5): 506–11.
- [11] Čerina D, Matković V, Katić K, et al. Real-world efficacy and safety of bevacizumab in the first-line treatment of metastatic cervical cancer: a cohort study in the total population of croatian patients [J]. J Oncol, 2021, 2021: 2815623.
- [12] Ishibashi M, Toyoshima M, Zhang X, et al. Tyrosine kinase receptor TIE-1 mediates platinum resistance by promoting nucleotide excision repair in ovarian cancer [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 13207.
- [13] Garcia J, Sandi M J, Cordelier P, et al. Tie1 deficiency induces endothelial-mesenchymal transition [J]. EMBO Rep, 2012, 13(5): 431–9.
- [14] D'Amico G, Korhonen E A, Anisimov A, et al. Tie1 deletion inhibits tumor growth and improves angiopoietin antagonist therapy [J]. Clin Invest, 2014, 124(2): 824–34.
- [15] Savant S, La P, Budnik A, et al. The orphan receptor Tie1 controls angiogenesis and vascular remodeling by differentially regulating Tie2 in Tip and stalk cells [J]. Cell Rep, 2015, 12: 1761–73.

Effects of overexpression of tyrosine kinase receptor 1 on malignant biological behavior of tumor-associated endothelial cells in cervical cancer cells

Sun Qianyu^{1,2}, Wei Yan^{1,2}, Bai Rui^{1,2}, Yang Ping^{1,2}

(¹Dept of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Shihezi Medical University, Shihezi 832008;

²Key Laboratory of Prevention and Treatment of Subhigh Incidence Diseases, National Health Commission of China, Shihezi 832008)

Abstract Objective To investigate the effect of overexpression of tyrosine kinase receptor 1 (Tie-1) in cervical cancer cells on the malignant biological behavior of tumor-related endothelial cells (TRECs) . **Methods** Immuno-histochemical method was used to detect the expression of Tie-1 in cervical cancer cells (CCCs) and TRECs of 96 patients with cervical cancer, and to analyze the correlation between the expression of Tie-1 in TRECs and clinicopathological features and prognosis of patients. HeLa cells overexpressing Tie-1 (Hela-Tie1OE) were constructed, and HeLa-Tie1OE was co-cultured with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by Transwell cell co-culture method to obtain cervical cancer TRECs. Western blot was used to analyze Tie-1 protein expression. The migration, invasion and tubulogenesis of TRECs were detected by cell scratch assay, Transwell invasion and migration assay and tubulogenesis assay. **Results** The expression of Tie-1 was positively correlated with CCCs and TRECs in 96 cervical cancer patients. The positive expression rate of Tie-1 in TRECs of patients with stage(FIGO) I B2-II A, tumor diameter ≥ 4 cm, cervical muscle invasion depth $\geq 1/2$ full layer, adenocarcinoma, medium and low differentiation cervical cancer was higher than that of patients with I A 1-I B 1, tumor diameter < 4 cm, cervical muscle invasion depth $< 1/2$ full layer, squamous carcinoma, and high differentiation cervical cancer, respectively. The differences were statistically significant ($P < 0.05$) . The expression of Tie-1 in TRECs of cervical cancer patients had no significant correlation with age, lymph node metastasis and lymphatic space invasion. The positive expression of Tie-1 in cervical cancer TRECs was negatively correlated with 5-year progression-free survival time and overall survival time ($P < 0.05$) . The Tie-1 expression of TRECs obtained by co-culture of Hela-Tie1OE and HUVECs was up-regulated, and the invasion, migration and tubulogenesis of TRECs cells were enhanced. **Conclusion** The high expression of Tie-1 in TRECs of cervical cancer is related to FIGO stage, tumor diameter, degree of differentiation, depth of cervical muscular invasion, type of cervical cancer, and poor prognosis of patients. Overexpression of Tie-1 can promote TRECs invasion, migration and tubulogenesis.

Key words tyrosine kinase receptor 1; tumor-related endothelial cells; cervical cancer; angiogenesis; co-culture