

血清蛋白磷酸酯酶 2A 水平与宫颈癌的相关性研究*

郑红云¹, 李 艳^{1△}, 申复进² (武汉大学人民医院: 1. 检验科; 2. 妇产科 430060)

【摘要】 目的 宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 本研究拟在血清学和组织学水平共同探讨宫颈癌患者蛋白磷酸酯酶 2A (PP2A) 水平的变化。**方法** 分别选择同期宫颈无病变健康体检者 (健康对照组) 30 例, 高危型人乳头瘤病毒 (hsHPV) 感染患者 17 例和宫颈癌患者 23 例, 采用酶联免疫吸附试验检测血清 PP2A 蛋白表达水平; 另选取健康对照者 24 例, hsHPV 感染患者 18 例和宫颈癌患者 14 例, 采用酶活试剂盒检测组织 PP2A 活性。**结果** 与健康对照组相比, hsHPV 感染组血清 PP2A 水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 同时组织 PP2A 酶活性下调, PP2A 活性仅为健康对照组的 66%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 宫颈癌组血清 PP2A 水平下降明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 同时组织酶活性显著下调, PP2A 酶活性仅为健康对照组的 45%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 hsHPV 感染组相比, 宫颈癌组患者血清 PP2A 水平下调差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 组织酶活性水平下调差异也有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 宫颈癌患者血清 PP2A 蛋白表达水平显著下调, 同时组织学水平 PP2A 酶活性亦下降。该研究结果为宫颈癌发病机制提供了新的资料, 为宫颈癌的早期诊断提供了新的靶标分子。

【关键词】 宫颈癌; 蛋白磷酸酯酶 2A; 人乳头瘤病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)24-3614-03

The correlation between serum protein phosphatase 2A level and cervical cancer* ZHENG Hong-yun¹, LI Yan^{1△}, SHEN Fu-jin² (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

【Abstract】 Objective Cervical cancer was one of the most common gynecologic malignancy, this study aimed to discuss serum protein phosphatase 2A (PP2A) levels in patients with cervical cancer at the serological and histological levels. **Methods** 30 cases of healthy people without cervical lesions (normal control group), 17 cases of patients infected by hsHPV (hsHPV group), and 23 cases of patients with cervical cancer (cervical cancer group) were selected. The serum PP2A levels of three groups were detected by ELISA, and the tissue protein PP2A levels were detected by enzyme activity assay. **Results** Comparing with normal control group, the serum level of PP2A in hsHPV group significantly decreased ($P < 0.05$), and the PP2A activity in tissues also decreased in the hsHPV group ($P < 0.05$), accounting for only 66% of normal control group. The serum PP2A level in cervical cancer group was significantly lower than normal control group ($P < 0.05$), and as well as the PP2A activity in tissues ($P < 0.05$), accounting for only 45% of normal control group. Comparing with hsHPV group, cervical cancer group had significantly lower serum PP2A and tissue PP2A activity ($P < 0.05$). **Conclusion** Both of the serum PP2A level and its activity in tissues significantly decreased in patients with cervical cancer. The result of this study could provide new data for the mechanism research of cervical cancer and a new target molecule for its early diagnosis.

【Key words】 cervical cancer; protein phosphatase 2A; HPV

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 严重威胁着女性的健康, 其发病率呈逐年升高的趋势^[1]。全球每年大约有 37 万宫颈癌新发病例, 且病死率高达 50%。据临床研究资料显示, 宫颈癌发病需要一个较长的癌前病变过程, 而早期宫颈癌未出现极其明显的临床症状或体征, 且经过有效治疗可保证存活率高达 90% 以上^[2]。因此, 宫颈癌的早期筛查显得尤为重要。目前宫颈癌筛查主要为宫颈涂片和高危型人乳头瘤病毒 (hs-HPV) 检测, 宫颈涂片敏感度低, 重复性差; hsHPV 检测特异性差, 易污染, 操作要求高。故寻找新型的宫颈癌筛查方法十分必要。近年相关研究表明, 蛋白磷酸酯酶 2A (PP2A) 作为信号通路中的特洛伊木马, 参与细胞代谢、DNA 复制、基因表达、

信号转导、细胞周期、细胞分化及凋亡, 在抑制肿瘤方面也起到十分重要的作用^[3]。目前, 已有研究证实了 PP2A 与乳腺癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、白血病等肿瘤的发展相关, 然而有关 PP2A 与宫颈癌的相关性研究在国内少见报道^[4]。因此, 本研究拟采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定无宫颈病变体检者、hsHPV 感染者和宫颈癌患者血清 PP2A 水平, 并检测各組人群组织水平 PP2A 酶活性。该研究将为宫颈癌早期筛查提供理论依据, 同时也将为宫颈癌的早期筛查提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 标本来源

1.1.1 外周血标本 选择 2014 年 9 月至 2015 年 2 月武汉大

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81100959); 国家临床重点专科建设资助项目 (财社 [2010]305 号)。

作者简介: 郑红云, 女, 博士, 主管技师, 主要从事分子诊断与个体化医疗方面的研究。△ 通讯作者, E-mail: yanlitf@163.com。

学人民医院妇科住院的宫颈癌患者 23 例,平均年龄(56.50±10.77)岁(患者均为首次发病,并经宫颈病理组织化学检查确诊,且未接受放疗、化疗及其他治疗,同时已排除严重内科疾病及其他恶性肿瘤等);hsHPV 感染患者 17 例,平均年龄(55.90±8.27)岁(患者均为首次检验,并排除上述疾病);健康对照组选择同期无宫颈病变健康体检者 30 例(且均已排除上述疾病),平均年龄(55.73±0.86)岁。收集 3 组检查者外周血,分离血清于洁净无酶 EP 管,置-20℃贮藏待检。

1.1.2 组织标本 留取 2015 年 1~4 月武汉大学人民医院妇科住院宫颈癌患者新鲜肿瘤组织 24 例、hsHPV 感染患者宫颈组织与健康对照组无病变宫颈组织分别为 18 例和 14 例,平均年龄分别为(56.16±21.12)、(55.16±10.88)和(55.16±9.58)岁。患者诊断同上。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 HPV 检测 HPV 采用透景 HPV26 分型检测试剂盒,Luminex200 液态芯片仪检测。

1.2.2 血清 PP2A 蛋白水平检测 试剂盒购于上海博谷生物科技有限公司,采用 BioRad 全自动酶标仪检测。

1.2.3 PP2A 酶活性检测 采用 Promega 公司的酶活性检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 ELISA 检测血清 PP2A 蛋白水平 采用竞争法并设置复孔按照如下步骤进行检测:每个检测标本设 3 个复孔。基本步骤如下:复温(室温放置 30 min);分组(宫颈癌组、hsHPV 感染患者、健康对照组、标准品组、空白组);加样(100 μL);加酶标溶液(50 μL);温育(37℃,1 h);洗板(5 次);显色(显色剂 A、B 各 50 μL);终止(室温避光反应 15 min,加终止液 50 μL);读板(450 nm,30 min 内);绘制标准曲线,计算每个样品 PP2A 水平。

1.3.2 PP2A 酶活性测定 种植细胞(培养 24 h)采用工具药或转染质粒处理;洗细胞(冷 PBS,3 次);裂解(加温和裂解液 100 μL,冰置 10 min);细胞刮子刮出细胞,置 EP 管内;离心(4℃,16 000 g,15 min);吸上清液,测定样品蛋白水平;过柱(Sephadex G-25),置于冰上备用;制备自由磷标准曲线;依次加入反应液,底物,孵育(30℃,2 min);加待检样品(设置 3 种平行水平),孵育(30℃,30 min);加等体积终止液,室温放置 15~30 min;读板(600 nm 或 630 nm);绘制标准曲线,计算每个样品自由磷水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间采用两独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组血清 PP2A 蛋白水平见图 1。与健康对照组相比,hsHPV 感染患者和宫颈癌组患者血清 PP2A 蛋白水平均下调,其中宫颈癌组下降最显著(图 1)。

2.2 3 组血清 PP2A 水平 见表 1。与健康对照组相比,hsHPV 感染组血清 PP2A 水平下降,差异有统计学意义(*P*<0.05);宫颈癌组血清 PP2A 水平下降明显,差异有统计学意义(*P*<0.05)。与 hsHPV 感染组相比,宫颈癌组血清 PP2A 水平下调差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

2.3 3 组 PP2A 酶活性 见图 2。与健康对照组相比,hsHPV 感染组 PP2A 酶活性下调,PP2A 活性仅为健康对照组的

66%,差异有统计学意义(*P*<0.05);宫颈癌组酶活性显著下调,PP2A 酶活性仅为健康对照组的 45%,差异有统计学意义(*P*<0.05)。与 hsHPV 感染组相比,宫颈癌组酶活性水平下调,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

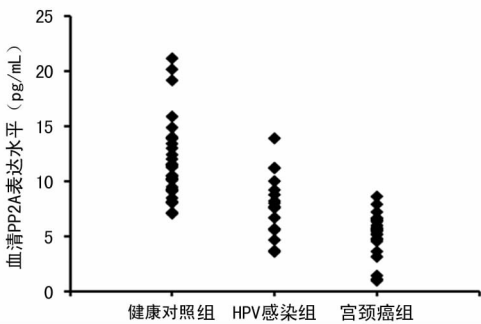


图 1 3 组血浆 PP2A 蛋白水平

表 1 3 组血清 PP2A 水平($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄 (岁)	体质量指数 (kg/m ²)	PP2A (pg/mL)
健康对照组	30	55.73±0.86	24.28±0.76	11.50±1.07
hsHPV 感染组	17	55.90±8.27	24.52±0.85	7.87±0.95*
宫颈癌组	23	56.50±10.77	24.18±0.68	5.35±0.48*#

注:与健康对照组相比,**P*<0.05;与 HPV 感染组相比,#*P*<0.05。

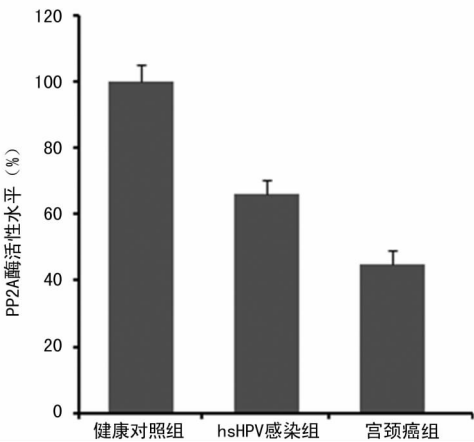


图 2 3 组 PP2A 酶活性

3 讨 论

宫颈癌是目前唯一一个病因明确的恶性肿瘤,HPV 感染与宫颈癌发生密切相关^[5]。根据其致病能力将 HPV 分为高危型和低危型,高危型 HPV 是导致宫颈癌发生的主要原因,99%的宫颈癌都与生殖器官感染高危型 HPV 有关^[6]。诱发上皮组织恶性增生的高危型 HPV 包括 HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-58、HPV-59、HPV-68、HPV-73 和 HPV-82 共 15 种型别。其中又以 HPV-16、HPV-18、HPV-58 最为常见。

目前用于宫颈癌早期筛查的方法主要有:(1)宫颈细胞学检查(敏感度低,重复性差,需结合阴道镜检查进行诊断);(2)组织病理学(一般用于确诊,早期筛查仅针对肉眼可见宫颈病灶的患者);(3)HPV 检测(特异性差,易污染);(4)宫颈搔刮术

(灵敏度低,针对阴道镜阴性但高度怀疑宫颈癌的患者);(5)鳞状上皮细胞抗原检测(仅针对年轻患者的早期诊断有参考意义);(6)阴道超声检查(特异性差,不易与慢性宫颈炎、宫颈息肉等良性病变相鉴别)。宫颈癌的早期筛查方法虽然众多,但都存在一定的方法学缺陷,故寻找新的血清学筛查指标很有必要。

PP2A 全酶由异三聚体构成,包括结构亚基-A 亚基、调节亚基-B 亚基和催化亚基-C 亚基^[7]。其作为一种丝/苏氨酸磷酸酶,能对蛋白进行可逆性磷酸化修饰,参与了细胞代谢、DNA 修复、基因表达、信号转导、细胞周期、细胞分化及凋亡,与肿瘤的发生密切相关,其在机体能拮抗大多数蛋白激酶的活性,有望成为肿瘤筛查新的靶标分子^[8-9]。本研究结果显示,hsHPV 感染和宫颈癌患者血清中 PP2A 水平均显著下调,且宫颈癌患者血清中 PP2A 水平下调更显著,该研究结果提示血清学 PP2A 联合 hsHPV 水平检测可能是宫颈癌早期诊断的良好指标。

蛋白磷酸 2A 的癌性抑制因子(CIP2A)作为一种与 PP2A 相互作用的内源性蛋白,在恶性肿瘤中可以负性调节 PP2A 活性^[10]。其在多数良性组织中不表达或者低表达,而在多种恶性肿瘤中均为高表达,包括胃癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、食管癌、肝癌等。而 PP2A 正好与之相反,更进一步证实了 PP2A 的抗肿瘤功能。PP2A 通过以下机制抑制肿瘤发生:(1)自身突变;(2)抑制蛋白激酶 B 活性;(3)调节 Raf 活性;(4)抑制 S6K 活性;(5)影响 c-Myc 稳定性;(6)调控 p53;(7)激活 Rb 家族;(8)调控 Wnt 信号通路。在人类黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、神经胶质瘤、结肠瘤、人类多发性骨髓瘤和上皮鳞状细胞癌等恶性肿瘤的癌细胞内均已发现了 PP2A 水平下调,但是 PP2A 与宫颈癌的相关性研究较少^[11]。最新的研究进展表明,CIP2A 是通过抑制 PP2A 对 c-Myc 蛋白第 62 位丝氨酸去磷酸化稳定 c-Myc 的表达水平,维持细胞恶性表型,抑制细胞衰老和凋亡,促进细胞增殖和恶性转化。本研究结果显示,hsHPV 感染和宫颈癌患者组织 PP2A 酶活性显著下调,且宫颈癌患者组织 PP2A 酶活性下降更显著,该研究进一步证实了 hsHPV 和宫颈癌感染患者 PP2A 水平显著下调,血清 PP2A 水平可能成为宫颈癌良好的预测和诊断因子。

综上所述,本研究结果揭示了血清学 PP2A 联合 hsHPV 水平检测可能成为宫颈癌的良好预测和诊断靶标,该研究结果不仅为宫颈癌的发病分子机制提供了新的资料,而且可为临床宫颈癌的早期诊断提供新的靶点。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] 孙小蓉, 李玉兰, 车冬缓, 等. 用细胞 DNA 定量分析方法进行宫颈癌普查的临床研究[J]. 诊断病理学杂志, 2005, 12(1): 12-16.
- [3] Sontag E. Protein phosphatase 2A: the trojan horse of cellular signaling[J]. Cell Signal, 2001, 13(1): 7-16.
- [4] Janssens V, Vanhoof C, Martens E, et al. Identification and characterization of alternative splice products encoded by the human phosphotyrosyl phosphatase activator gene[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(14): 4406-4413.
- [5] Powell NG, Hibbitts SJ, Boyde AM, et al. The risk of cervical cancer associated with specific types of human papillomavirus: a case-control study in a UK population[J]. Int Cancer, 2011, 128(7): 1676-1682.
- [6] 王玉丰, 林玲, 刘春雨, 等. 三亚地区妇女人乳头瘤病毒感染的分子流行病学调查[J]. 检验医学, 2012, 27(8): 628-630.
- [7] 李天祝, 向本琼. 蛋白磷酸酶 PP2A 的结构及其肿瘤抑制因子功能[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(2): 133-136.
- [8] Janssens V, Rebollo A. The role and therapeutic potential of Ser/Thr phosphatase PP2A in apoptotic signalling networks in human Cancer cells[J]. Curr Mol Med, 2012, 12(3): 268-287.
- [9] Kalew P, Sablina AA. Protein phosphatase 2A as a potential target for anticancer therapy[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11(1): 38-46.
- [10] Junttila MR, Puustinen P, Niemela M, et al. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies[J]. Cell, 2007, 130(1): 51-62.
- [11] Woo MM, Salamanca CM, Symowicz J, et al. SV40 early genes induce neoplastic properties in serous borderline ovarian tumor cells[J]. Gynecol Oncol, 2008, 111(1): 125-131.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-06-15)

(上接第 3613 页)

- 磷酸化修饰的生物质谱分析[J]. 分析化学, 2013, 41(11): 1653-1658.
- [8] Uchida S, Kuma A, Ohtsubo M, et al. Binding of 14-3-3beta but not 14-3-3sigma controls the cytoplasmic localization of CDC25B; binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 14): 3011-3020.
 - [9] Oh JS, Han SJ, Conti M, Wee1B, Myt1, and Cdc25 func-

tion in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption[J]. J Cell Biol, 2010, 188(2): 199-207.

- [10] Xiao JY, Liu C, Hou JJ, et al. Ser149 is another potential PKA phosphorylation target of Cdc25B in G2/M transition of fertilized mouse eggs[J]. J Biol Chem, 2011, 286(12): 10356-10366.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-06-15)