

高危型人乳头瘤病毒 E2 在宫颈癌中的表达及其生物学意义*

罗晓辉, 高玲娟, 钟天鹰[△] (南京医科大学附属南京市妇幼保健院检验科, 南京 210004)

【摘要】 目的 探讨高危型人乳头瘤病毒(HPV)E2 在宫颈癌中的表达及其生物学意义。**方法** 采用基因芯片技术对 56 例宫颈炎症性组织、55 例宫颈上皮内瘤变(CIN)组织、58 例宫颈鳞癌组织进行 HPV 分型检测;免疫印迹技术对宫颈组织中高危型 HPV E2 蛋白表达水平的检测;流式细胞技术进行宫颈癌细胞凋亡的检测及 Transwell 试验进行细胞侵袭能力的检测。**结果** 基因芯片技术结果显示,与宫颈炎症性组比较,宫颈鳞癌组的 HPV16、HPV18 感染阳性率明显增高,而 CIN 组的 HPV16、HPV18 感染阳性率无明显变化。免疫印迹结果显示,与宫颈炎症性组比较,宫颈鳞癌组高危型 HPV E2 蛋白的水平明显降低,而 CIN 组中 HPV E2 蛋白水平无明显变化。与空载体组比较,高危型 HPV E2 质粒组宫颈癌细胞凋亡率明显增加,宫颈癌细胞侵袭能力明显下降。**结论** 高危型 HPV E2 蛋白具有诱导宫颈鳞癌细胞凋亡的作用,有望成为宫颈癌防治的有效靶标。

【关键词】 高危型 HPV E2; 宫颈癌; 凋亡; 侵袭

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.05.010 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)05-0600-02

Expression and biological significance of high risk human papillomavirus E2 in cervical cancer* LUO Xiao-hui, GAO Ling-juan, ZHONG Tian-ying[△] (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Nanjing Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210004, China)

【Abstract】 Objective To study the expression and biological significance of high risk human papillomavirus (HPV) E2 in cervical carcinoma. **Methods** The gene microarray technology was adopted to detect HPV genotypes in the cervicitis tissues (56 cases), cervical intraepithelial neoplasia tissues (CIN, 55 cases) and cervical squamous carcinoma tissues (58 cases). The immunoblot assay was applied to detect the expression levels of high risk HPV E2 protein in cervical tissues. The flow cytometry technology was used to detect the apoptosis of cervical cancer cells and the Transwell test was used to detect the cell invasion ability. **Results** The microarray analysis showed that the HPV16 and HPV18 infection positive rates in the cervical squamous carcinoma group were significantly increased compared with the cervicitis group, while which in the CIN group had no significant change. The immunoblot results showed that the expression level of high risk HPV E2 protein in the cervical squamous carcinoma group was significantly decreased compared with the cervicitis group, while which in the CIN group had no significant change. The apoptosis rate of cervical squamous cancer cell in the high risk HPV E2 plasmid group was significantly increased compared with the empty carrier group, while the invasion ability of cervical cancer cells was reduced significantly. **Conclusion** High risk HPV E2 protein owns the ability to induce apoptosis of cervical squamous cancer cells and is expected to be an effective target for the control and treatment of cervical cancer.

【Key words】 high risk HPV E2; cervical cancer; apoptosis; invasion

宫颈癌是世界范围内危害女性生殖健康的常见恶性肿瘤,占世界女性恶性肿瘤的第二位、发展中国家恶性肿瘤的第一位^[1]。研究表明,99.7%宫颈癌的发生与高危型人类乳头瘤病毒(HPV)感染有关,且同一亚型高危型 HPV 持续感染是导致宫颈癌发生的主要原因^[2]。早期编码区 2(E2)是 HPV 的一种早期蛋白,在病毒的复制和转录调节方面发挥着重要的作用。本研究旨在探讨高危型 HPV E2 在宫颈组织中的表达及其生物学意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1~11 月本院妇科肿瘤科收治的宫颈疾病患者,根据宫颈组织病理学诊断结果的不同分为 3 组:宫颈炎症性组 56 例,年龄 25~62 岁,平均(46.31±4.77)岁;

宫颈上皮内瘤变(CIN)55 例,年龄 32~59 岁,平均(47.12±5.21)岁;宫颈鳞癌组 58 例,年龄 30~60 岁,平均(46.98±4.96)岁,各组一般情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有标本病理诊断明确,以活体组织检查或手术切除方式收集,手术取材后立即置于-80℃冻存备用。

1.2 仪器与试剂 宫颈癌细胞株 C33A 由杭州赫贝生物技术有限公司提供;抗 HPV E2 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司;抗小鼠 Ig 的二抗购自美国 Cell Signaling 公司。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒由北京宝赛生物公司生产。

1.3 方法

1.3.1 HPV 分型检测 采用 HPV 分型检测试剂盒(基因芯片法)对上述 169 例宫颈组织(其中宫颈炎症性组 56 例、CIN 组

* 基金项目:南京市科技发展计划项目(201308041)。

作者简介:罗晓辉,女,在读硕士,主要从事高危型 HPV 与宫颈癌方面的研究。△ 通讯作者, E-mail: gaolingjuan@njmu.edu.cn。

55 例、宫颈鳞癌组 58 例)进行 HPV 基因分型。

1.3.2 免疫印迹 提取宫颈组织的胞浆蛋白,每个样本取 100 μg 总蛋白上样。湿法电转移至硝酸纤维素膜后,室温封闭 1~2 h,置于抗 HPV E2 单克隆抗体(购自 Cell Signaling 公司)的稀释液中孵育 1 h。将膜放进抗小鼠 Ig 的二抗(购自美国 Cell Signaling 公司)的稀释液室温孵育 1 h,显色液显色。以 Bio-Rad 凝胶成像分析仪进行灰度扫描分析目的蛋白,相对表达量用目的条带与内参 β -actin 灰度值的比值表示。

1.3.3 宫颈癌细胞凋亡检测 收集细胞制成细胞悬液,PBS 洗涤 2 次,调整细胞数为 $5\times 10^6/\text{mL}$ 。500~1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。用预冷 4 $^{\circ}\text{C}$ 无菌的 PBS 充分洗涤细胞两次,用 250 μL 结合缓冲液重新悬浮细胞。取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶溶液,混匀后室温下避光孵育 10 min。加入 400 μL 结合缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.4 宫颈癌细胞侵袭实验 细胞体外侵袭能力测定在重建基底膜的 8 μm 孔径的聚碳酸酯膜 transwell 小室中进行,用细胞外基质 Matrigel 来模拟体内细胞外基质环境,从而考察细胞穿透细胞外基质向外浸润和扩散的能力。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料采用百分率表示,三组资料经检验均属于正态分布资料,且具有方差齐性,组间比较采用方差分析,运用 LSD-*t* 检验进行进一步的两两比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 宫颈病变组织 HPV16、18 阳性率比较 基因芯片结果显示,宫颈鳞癌组 HPV16、18 阳性率明显高于宫颈炎性组,差异有统计学意义($P<0.01$),而 CIN 组中 HPV16、18 阳性率与宫颈炎性组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 宫颈病变组织 HPV16、18 阳性率比较[n(%)]

组别	<i>n</i>	高危型 HPV16	高危型 HPV18	高危型 HPV16+18
宫颈炎性组	56	16(28.60)	2(3.57)	1(1.78)
CIN 组	55	17(30.90)	3(5.45)	1(1.81)
宫颈鳞癌组	58	44(75.80)*	8(13.80)*	3(5.17)*

注:与宫颈炎性组比较,* $P<0.01$ 。

2.2 宫颈病变组织中高危型 HPV E2 蛋白的表达 宫颈鳞癌组织中高危型 HPV E2 蛋白的相对含量较宫颈炎性组织明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$);CIN 组中高危型 HPV E2 蛋白的相对含量与宫颈炎性组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 宫颈病变组织高危型 HPV E2 蛋白的表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	E2 蛋白/ β -actin 灰度比值
宫颈炎性组	20	0.785 $\pm$ 0.083
CIN 组	20	0.644 $\pm$ 0.075
宫颈鳞癌组	20	0.307 $\pm$ 0.054*

注:与宫颈炎性组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 宫颈癌细胞的凋亡和侵袭能力 与空载体组比较,HPV E2 质粒组宫颈癌细胞凋亡率明显增加,而宫颈癌细胞侵袭能

力明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 宫颈癌细胞的凋亡率和侵袭细胞数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡率(%)	侵袭细胞数(<i>n</i>)
空载体组	10.77 $\pm$ 1.20	231.42 $\pm$ 12.45
HPV E2 载体组	26.26 $\pm$ 1.84*	96.23 $\pm$ 6.45*

注:与空载体组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨 论

宫颈癌是女性生殖道最为常见的恶性肿瘤。据世界卫生组织报道,中国宫颈癌发病率(14.6/10 万)仅次于智利(15.4/10 万),病死率位居全球第四位^[3-4]。研究显示,持续性的高危型 HPV 感染在正常宫颈细胞向宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的转化的过程中,发挥了重要作用^[5]。宫颈癌病例中 HPV 感染率在 88.4%~99.7%,其中半数以上的宫颈癌与 HPV16 感染有关^[6],其次是 18、45、31 和 33 型^[7]。本研究结果发现,58 例宫颈鳞癌组织中高危型 HPV 检出率 94.76%,其中 HPV16 型阳性 44 例(75.8%),HPV18 型阳性 8 例(13.8%),均明显高于宫颈炎性组,此结论与国内外相关研究结果是一致的^[8-9]。且本研究发现 HPV16 是本地区宫颈鳞癌患者的优势亚型,这为本地区 HPV 疫苗的应用提供了重要的线索和依据。

HPV 基因组编码长控区(LCR)、早期区(E 区)和晚期区(L 区),其中 E 区编码早期蛋白 E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7。在高危 HPV 感染的细胞中,E2 蛋白通过与 E6、E7 启动子上特异的 DNA 识别序列相结合,进而下调病毒 E6、E7 癌基因的转录,也可通过 p53 和 pRb 途径抑制细胞生长,诱导细胞凋亡^[10-12]。本研究结果显示,成功转染高危型 HPV E2 质粒后宫颈癌细胞凋亡率明显增加,而宫颈癌细胞侵袭能力明显下降,该研究结果进一步证明高危型 HPV E2 蛋白能明显影响宫颈癌细胞生物学的效应。

综上所述,HPV16 E2 蛋白在体外具有促进细胞凋亡的能力,HPV E2 有望成为清除 HPV 感染,为宫颈癌的防治提供了广阔的应用前景。

参考文献

[1] Agnetha M,Josefsson F. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ a nested case-control study[J]. Lancet, 2000,355(9222):2189-2193.

[2] 李力. 宫颈癌与人乳头瘤病毒感染[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2006,22(1):13-15.

[3] 马丁,奚玲. 宫颈癌流行病学及病因学研究进展[J]. 实用妇产科杂志,2001,17(2):61-62.

[4] 梁华茂. 宫颈癌的病因学研究进展[J]. 中国全科医学, 2010,13(29):3239-3241.

[5] 雷静,万霖,李惠新,等. 薄层液基细胞学在宫颈癌及其癌前病变筛查中的价值[J]. 现代生物医学进展,2011,11(16):3123-3125.

[6] Clifford GM,Smith JS,Plummer M,et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide:a meta-analysis[J]. Br J Cancer,2003,88(1):63-73.

[7] 吕跃峰,雷艳,王雪,等. HPV-18 病毒 E2、E6 与 Brd4 对宫颈癌及癌前病变的意义分析[J]. 现代(下转第 603 页)

1.4 观察指标 观察两组胎儿 UA 及 MCA 的阻力 RI、PI、S/D 的差别。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 两组胎儿 UA、MAC 各血流频谱指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	UA			MAC		
		RI	PI	S/D	RI	PI	S/D
健康孕妇组	35	0.71±0.07	1.03±0.45	2.51±0.19	0.72±0.06	1.99±0.12	4.53±0.31
宫内窘迫组	11	0.82±0.13*	1.95±0.07*	3.55±0.26*	0.55±0.03*	1.48±0.23*	3.42±0.20*

注:与健康孕妇组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨 论

中晚期妊娠时胎儿发生宫内窘迫是导致胎儿死亡的主要原因之一,量化缺氧胎儿监测的客观指标有助于提高围产期质量。胎儿 UA 受终末血管阻力和心肌收缩力影响较大。当外周阻力减小时,多普勒频谱表现为舒张期血流持续存在,反之,当外周阻力增大时,表现为舒张期出现负性血流或血流消失。正常妊娠中晚期呈“局部血量多、血管阻力小”的特点,当某些病理因素导致胎盘绒毛血管狭窄而造成 UA 舒张末期血流量减少,导致 UA 外周阻力增高。故检测其血流频谱的改变可反映胎盘及胎儿的缺氧缺血性改变。本研究健康妊娠组 RI 值为(0.71±0.07),PI 值为(1.03±0.45),S/D 值为(2.51±0.19)。而高危组 RI 值为(0.82±0.13),PI 值为(1.03±0.45),S/D 值为(1.95±0.07),宫内窘迫组各血流 RI 明显高于健康孕妇组,和相关文献报道一致^[4]。但是影响 UA 血流参数的因素很多,如母体胎盘的血流异常也会引起 UA 舒张末期血流量减少的情况,单纯检测 UA 相关参数可能造成假阳性结果^[5-6]。当胎儿发生宫内窘迫时,胎儿机体为适应缺氧的病理改变而出现血流重新分配的情况,此时胎儿 MCA 管径增粗,血流量增多,血流阻力下降。而 MCA 血流阻力可直接反映胎儿颅内血管的阻力,其敏感性较高。有研究显示,当胎儿 MCA 的 PI<1.6、S/D<4 即可判断宫内缺氧的存在,联合检测胎儿 UA、孕子宫动脉的血流参数有助于提高诊断的准确率^[7]。本研究中宫内窘迫组 RI、PI、S/D 明显低于健康孕妇组。

本研究通过检测胎儿 UA、MCA 的 RI、PI、S/D 来预测患儿宫内窘迫的存在方法具有无创伤、可重复、指标客观敏感、费用低等优点,可尽早发现异常并及时诊断和防治,对降低胎儿宫内窘迫及围生儿病死率具有一定的临床价值。研究过程中发现,在此基础上联合检测孕子宫动脉是否有舒张早期切

2 结 果

与健康孕妇组相比,宫内窘迫组胎儿 UA 的 RI、PI、S/D 数值明显增高,而 MCA 各血流频谱指标明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

迹,将更加有助于综合评价胎儿-胎盘、子宫-胎盘血流灌注情况,可进一步提高超声多普勒用于诊断胎儿宫内窘迫的准确率,此项研究将在以后的工作中进一步得到验证^[8]。

参考文献

[1] Berkley E, Chauhan SP, Abuhamad A, et al. Doppler assessment of the fetus with intrauterine growth restriction [J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 206(4): 300-308.

[2] 才琪. 彩色多普勒超声对胎儿脐带颈绕颈诊断价值分析 [J]. 航空航天医学杂志, 2013, 24(4): 455-456.

[3] 吴静, 赵凯英, 林玉涓, 等. 胎儿脐动脉和大脑中动脉及脐静脉导管血流阻力指标对妊高征患者胎儿宫内窘迫的预测价值 [J]. 广东医学, 2013, 16(16): 2551-2553.

[4] 周永昌, 郭万学. 超声医学 [M]. 6 版. 北京: 人民军医出版社, 2011: 1247-1249.

[5] Schenone MH, Mari G. The MCA Doppler and its role in the evaluation of fetal Anemia and fetal growth restriction [J]. Chin Perinatol, 2011, 38(1): 83-102.

[6] 战军, 邢爱耘. 多普勒超声测量胎儿大脑中动脉血流在高危妊娠中的研究进展 [J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2012, 8(2): 220-223.

[7] 汤冬梅, 卢慧涛, 李征军, 等. 彩超检测在胎儿窘迫中应用价值的探讨 [J]. 江西医药, 2013, 48(10): 927-929.

[8] 张潇迪, 朱启英. 妊娠期高血压疾病母儿心血管功能的超声评价 [J]. 现代妇产科进展, 2012, 12(12): 973-975.

(收稿日期: 2015-07-22 修回日期: 2015-09-25)

(上接第 601 页)

生物医学进展, 2013, 13(21): 4136-4139.

[8] 王又又, 箱群英, 余茜, 等. 宫颈癌高发区妇女 HPV 感染及影响因素分析 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(3): 259-261.

[9] Salvatore V, Joannie L, Martyn P, et al. Worldwide trends in cervical cancer incidence; Impact of screening against changes in disease risk factors [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(15): 3262-3273.

[10] Xue Y, Lim D, Zhi L, et al. Loss of HPV16 E2 protein expression without disruption of the E2 ORF Correlates

With Carcinogenic Progression [J]. Open Virol J, 2012, 6: 163-172.

[11] Xue Y, Bellanger S, Zhang W. HPV16 E2 is an immediate early marker of viral infection, preceding E7 expression in precursor structures of cervical carcinoma [J]. Cancer Res, 2010, 70(13): 5316-5325.

[12] 时艳梅, 陈建玲, 肖长义, 等. HPV E2 蛋白及其在宫颈癌演变中的作用机制 [J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(15): 2162-2164.

(收稿日期: 2015-07-20 修回日期: 2015-09-20)