

• 基础实验研究论著 •

p16 基因表达及高危 HPV 感染在宫颈癌中相关性的研究

李文兵¹, 骆海军², 刘 跃¹, 王 鹏¹, 张吉才^{1△}

(1. 湖北医药学院附属太和医院, 湖北十堰 442000; 2. 贵阳医学院, 贵州贵阳 550000)

摘要:目的 探讨 p16 基因的表达和高危 HPV 感染(HR-HPV)在宫颈癌发生、发展中的意义。方法 运用实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 p16 基因在宫颈癌组织、上皮内瘤组织(CIN)、正常宫颈组织中的表达,原位杂交检测上述标本中 HR-HPV 感染。结果 p16 基因在宫颈癌组织、CIN、正常宫颈组织中的表达水平分别为 0.79 ± 0.34 、 0.70 ± 0.36 、 0.26 ± 0.21 , 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。p16 基因的表达水平在不同临床分期之间的差异具有统计学意义($P < 0.05$),但肿瘤分化程度、淋巴结转移、肿瘤大小等其他临床病理特征对其无显著影响($P > 0.05$);HR-HPV 阳性患者的 p16 基因的表达水平明显高于 HR-HPV 阴性患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 p16 基因在宫颈癌中呈高表达状态,并且与 HR-HPV 感染密切相关,基因的高表达可能在宫颈癌的发生和发展中发挥重要作用。

关键词:宫颈癌; p16 基因; 人乳头瘤病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)11-1377-03

Correlation of HR-HPV infection and p16 gene expression in cervical cancer

Li Wenbing¹, Luo Haijun², Liu Yue¹, Wang Peng¹, Zhang Jicai^{1△}

(1. Taihe Hospital, Hubei University of Medical, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550000, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression of p16 and discuss the significance in genesis and development of cervical cancer. **Methods** FQ-PCR method was used to detect the expression levels of p16 mRNA in cervical cancer(CC), cervical intraepithelial neoplasia(CIN), and normal tissues. And in situ hybridization was used to detect HR-HPV in these tissues. **Results** The expression levels of p16 were 0.79 ± 0.34 , 0.70 ± 0.36 , 0.26 ± 0.21 in CC, CIN and normal cervical tissues, respectively. The difference was significant ($P < 0.05$). The expression level of p16 was significantly associated with FIGO stage ($P < 0.05$), but it showed no significant relationship with age, tumor size, cell differential degree and lymphoid node metastasis ($P > 0.05$). The expression level of p16 in HR-HPV positive cases was significantly higher than that in HR-HPV negative cases ($P < 0.05$). **Conclusion** p16 shows high expression level in cervical cancer, which is closely related to the infection of HR-HPV infection. It suggests that the high expression of p16 play an important role in genesis and development of cervical cancer.

Key words: cervical cancer; p16 gene; human papilloma virus

宫颈癌是常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一,在所有女性恶性肿瘤中发病率仅次于乳腺癌,列第二位。现已证实高危人乳头瘤病毒(HR-HPV)感染是宫颈癌主要的致癌因素^[1]。但宫颈癌的发生是一个长期复杂的过程,单纯的 HR-HPV 感染不足以引起宫颈癌,并且在宫颈癌得到临床确诊前,患者的宫颈组织已经发生了癌变,这就给宫颈癌的早期诊断带来了一定的困难。所以除 HR-HPV 感染外,宫颈癌的发生还应该有其他因素的存在。分子生物学的快速发展可以让人们更好地从基因水平了解肿瘤的发生与发展。本文就采用实时荧光定量(FQ-PCR)法检测宫颈癌、上皮内瘤样病变以及正常宫颈组织中 p16 基因的表达,以及原位杂交检测组织中 HR-HPV16/18 感染,从分子水平揭示 p16 基因的异常表达在宫颈癌发生、发展过程中的作用,进而提高宫颈癌的早期诊断率。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2012 年 4 月至 2013 年 8 月新鲜宫颈癌组织标本 47 例、宫颈上皮内瘤样组织 30 例以及正常宫颈组织 12 例,所有收集的标本均经病理证实,且临床资料完整。标本收集后立即存放于液氮中保存,以备 mRNA 的提取。上述标本的采集均获得患者的知情同意,符合伦理学要求。患者的一般临床病理特征见表 1。上述患者的一般临床资料之间

的差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。上述患者手术前没有进行过放疗和化疗。

1.2 仪器与试剂 主要试剂:PE7500(ABI 公司)、PCR 试剂(北京赛百盛)、Trizol Reagent、Reverse Transcription System A3500(Promega)、HPV16/18 原位杂交试剂盒(福建泰普生物科学有限公司)、SYBR Green I 染料(Gene 公司)、DNA 标记物(上海生工);主要仪器:CF 16RX 台式高速冷冻离心机(日立公司)、ND-2000 微量核酸定量仪(Thermo 公司)、G-BOX 紫外凝胶成像系统(Gene 公司)。

1.3 方法

1.3.1 引物合成 p16 mRNA 上游引物:5'-CCC AAC GCA CCG AAT AGT TAC-3';下游引物:5'-ATT CCA ATT CCC CTG CAA ACT-3',扩增产物 115 bp。GAPDH:上游引物 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3',下游引物 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3',扩增产物 226 bp 引物的合成由北京赛百盛公司完成。

1.3.2 基因组总 RNA 的提取以及 cDNA 的逆转录 正常组织和癌组织中总 RNA 提取按照试剂盒说明书的操作步骤进行,提取的总 RNA 经微量核酸定量仪测定其浓度和纯度后溶于无 RNA 酶的双蒸水中,逆转录按照 A3500 逆转录试剂盒操

作步骤进行,扩增体系为:总 RNA 2 μ L, AMV 逆转录酶 0.6 μ L, 10 $\times$ buffer 2 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合液 2 μ L, Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μ L, Oligo(dT)引物 1 μ L, 补齐体积至 20 μ L。逆转录条件为 42 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min。逆转后的 cDNA 用无 RNA 酶的双蒸水 5 倍稀释后-20 $^{\circ}$ C 保存备 PCR 扩增使用。

1.3.3 mRNA 扩增 根据各反应体系终浓度调整反应物的反应浓度,反应体系为: Taq 0.3 μ L, 10 $\times$ buffer 3 μ L, 10 $\times$ SYBR-Green I 1.5 μ L, Mg²⁺ 2.5 μ L, dNTP 1.5 μ L、上下游引物各 2 μ L、扩增样本 5 μ L,用无菌水补齐体积共 30 μ L。扩增条件:93 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 35 s,70 $^{\circ}$ C 1 min,共 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3.4 HPV16/18 感染的检测 组织标本取出后进行切片,然后按照试剂盒操作说明书的步骤进行检测。

1.3.5 结果判断 *p16* 基因表达产物采用 2%琼脂糖凝胶电泳,紫外线下观察 115 bp、226 bp 处出现特异性目的条带为阳性,并在紫外凝胶成像系统中照相分析结果。利用 PCR 扩增仪检测得到 Ct 值和扩增效率 E,以 *GAPDH* mRNA 内参的量为参照,计算 *p16* mRNA 相对表达量。*p16* mRNA/*GAPDH* mRNA 用下述公式计算: $(1 + E_{GAPDH}) Ct(GAPDH) / (1 + E_{LRP1}) Ct(p16)$ 。HPV16/18 感染以原位杂交后细胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞。

1.4 统计学处理 应用 SPSS10.0 分析,计数资料用率表示,采用 χ^2 检验;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

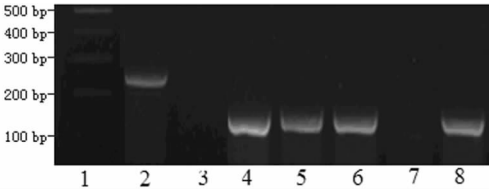
2 结 果

2.1 HPV16/18 感染与 *p16* 基因在不同宫颈组织中的表达 本文采用 FQ-PCR 检测 *p16* 在不同宫颈组织中的表达时发现,其在宫颈癌组织、上皮内瘤样(CIN)组织以及正常宫颈组织中的表达水平分别为 0.79 ± 0.34 、 0.70 ± 0.36 、 0.26 ± 0.21 ,表达越来越低,宫颈癌组织与正常宫颈组织、CIN 组织与正常宫颈组织中 *p16* 表达水平之间的差异具有统计学意义(*t* 分别为 5.18、3.97, $P < 0.01$)。HPV16/18 在宫颈癌中的阳性表达率为 85.1%(40/47),明显高于 CIN 组织的 60.0%(18/30)和正常宫颈组织的 8.3%(1/12)。并且在 HPV16/18 阳性的宫颈癌组织标本中, *p16* 的表达(0.84 ± 0.32)明显高于 HPV16/18 阴性的标本(0.49 ± 0.34),差异有统计学意义($t = -2.74, P = 0.009$)。

表 1 <i>p16</i> mRNA 的表达与宫颈癌病理参数之间的关系			
病理特征	<i>n</i>	<i>p16</i> 表达水平	<i>P</i>
大小			
≥4 cm	19	0.74 ± 0.35	0.39
<4 cm	28	0.82 ± 0.33	
FIGO 分期			
I + II	30	0.71 ± 0.30	0.04
III	17	0.92 ± 0.36	
分化程度			
高、中分化	26	0.74 ± 0.32	0.24
低分化	21	0.85 ± 0.36	
淋巴转移			
有	20	0.73 ± 0.35	0.33
无	27	0.83 ± 0.33	

2.2 *p16* 基因的表达与宫颈癌临床病理特征之间的关系 经统计学分析后发现, *p16* mRNA 的表达水平在不同临床病理分期之间的差异具有统计学意义($P < 0.05$),而宫颈癌其他临床病理特征如肿瘤大小、分化程度以及淋巴转移等对 *p16* mRNA 的表达水平无显著影响($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增后经 1.8%琼脂糖凝胶电泳后,基因表达产物在 115、226 bp 处出现特异性的目的条带,见图 1。



1:DNA 标记物;2:GAPDH;3:空白对照;4~6:宫颈癌组织;7:正常组织;8:CIN 组织。

图 1 *p16* 表达电泳图

3 讨 论

目前 HR-HPV 感染与宫颈癌之间的密切关系已经得到了证实, HPV16/18 是最常见的 HR-HPV 型别。但单纯的 HPV16/18 感染并不足以导致宫颈癌的发生。宫颈癌的早期癌前病变诊断主要还是依靠三阶梯筛查的方法,这种方法简单易行,但容易受到主观和客观因素的影响而导致漏检病例产生,并且由 CIN 发展为宫颈癌往往需要十几年的时间,所以除 HR-HPV 感染外,宫颈癌的发生还应该有其他因素的存在。*p16* 基因是一种重要的抑癌基因,是细胞周期依赖性激酶抑制因子基因家族重要成员之一,作为一种细胞周期中的基本基因, *p16* 基因可以直接参与细胞周期的调控,负调节细胞增殖及分裂。在许多的肿瘤(如胃癌^[2]、食管癌^[3]、乳腺癌^[4])中均发现有 *p16* 基因的异常表达。本文从基因水平检测 *p16* 基因在宫颈癌、CIN 以及正常宫颈组织中的表达情况,探讨了 *p16* 基因异常表达在宫颈癌发生和发展中的作用,并分析了 *p16* 基因的表达与 HPV16/18 感染之间的关系,为 *p16* 基因能否作为检测宫颈癌的肿瘤标志物提供了一定的实验依据。

p16 基因作为一种抑癌基因与许多种恶性肿瘤的发生和发展均有关系,所以也被称为多重肿瘤抑制基因。但在宫颈癌中 *p16* 基因不存在低表达或者基因失活现象。相反的是,在宫颈癌组织以及 CIN 组织中出现的是 *p16* 基因的过度表达。存在这种现象的主要原因是由于 HR-HPV 的 E7 蛋白可以结合 Rb 通路中的磷酸化 Rb(pRb),并使得其磷酸化失活,从而导致 pRb-E2F 复合物分离,而 E2F 能促进肿瘤细胞的过度增殖,同时 pRb-E2F 复合物的浓度持续性降低,解除了对 *p16* 基因表达的负反馈抑制,从而导致了 *p16* 基因的过表达^[5]。有可能就是 HR-HPV 感染过的宫颈组织,其癌基因 E6 和 E7 可以整合到宿主细胞内,进而使得 Rb 通路失控,导致 *p16* 反馈性高表达。田琦等^[6]在研究 *p16* 在宫颈鳞癌及 CIN 组织中的表达时发现 *p16* 在宫颈鳞癌组织和 CIN 组织中有丰富的表达,而在正常宫颈组织中不表达;Salit 等^[7]在 HR-HPV 感染的宫颈鳞癌中也发现了 *p16* 的过度表达现象。本研究发现,从正常宫颈组织到 CIN 组织再到宫颈癌组织, *p16* 基因的表达水平越来越高,从另一方面也表明了 *p16* 基因在宫颈癌的发展过程中起到了一定的作用。这与国内外目前的研究结果一致。并且 *p16* 基因的过度表达与宫颈癌的临床分期有关,也表明了 *p16* 基因的过度表达是宫颈癌发生过(下转第 1381 页)

润只见于周边部和导管区。见图 3。

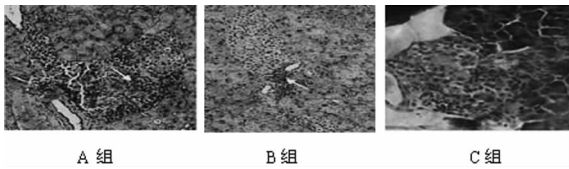


图 3 各组小鼠胰岛的病理变化(HE 染色,10×10)

3 讨 论

1 型糖尿病是一种自身免疫性疾病,导致 1 型糖尿病自身免疫反应是由 CD4⁺ T 细胞介导的。CD4⁺ T 细胞分为 2 种亚型,即 Th1 和 Th2。Th1 亚型可以促进 IL-2 及 IFN- γ 等细胞因子分泌,增强免疫应答,而这种免疫反应是针对自身组织就导致致病性免疫作用或炎性损伤作用;相反,Th2 亚型可以促进 IL-4、IL-10 等细胞因子分泌,而抑制 Th1 型细胞的作用。在正常情况下,这 2 种亚型细胞互相制约,从而达到免疫平衡。但是当平衡被打破,Th1 亚型的作用超过 Th2 亚型,CD4⁺ T 细胞调节功能的失衡,就会引起一系列的炎性反应,导致自身免疫性疾病的发生,例如可以进一步引起胰岛 β 细胞破坏而导致 1 型糖尿病的发生^[5]。

研究表明日本血吸虫 SEA 具有较强的抗原性,诱导机体发生明显的 Th2 免疫反应^[6],实验结果也显示 IL-4 水平明显升高,说明 SEA 具有使免疫反应向 Th2 转化的作用。已有报道:曼氏血吸虫的虫卵抗原因为其内在特点,可以活化 Th2 免疫反应的细胞转导信号,同时又可以抑制 Th1 免疫反应的细胞信号转导,导致树突状细胞诱导免疫反应向 Th2 转化,抑制 Th1 应答引起的免疫病理损伤,从而减轻炎性反应的发生^[7-8],使糖尿病症状缓解。本次研究也证明了日本血吸虫 SEA 可以使 IL-4 水平显著升高,使 IFN- γ 水平下降,导致机体免疫反应向 Th2 型偏移。日本血吸虫的 SWA 免疫糖尿病模型小鼠后,IL-4 水平无明显变化,与糖尿病模型组相似,不能对 T 细胞免疫应答类型进行调节,对糖尿病无拮抗作用。

以往人们普遍认为,日本血吸虫对人体是有害无益的,但从目前的流行病学调查和一些研究机构显示,日本血吸虫除了对机体造成一定的损伤,也能降低一些自身免疫性疾病的发病

率。但是日本血吸虫对 1 型糖尿病等自身免疫性疾病的拮抗作用仍处于研究的初级阶段,Th1 向 Th2 反应偏移或 Th1 反应下调只是其中的可能机制,还有许多其他未知机制的参与,有待今后进一步研究。

参考文献

- [1] 王智峰,朱峰,李秋梅.我国 2 型糖尿病的发病现状、原因及防治探讨[J].亚太传统医药,2010,6(9):151-152.
- [2] Araújo MI, Hoppe BS, Medeiros M Jr, et al. Schistosoma mansoni infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004, 99 (5 Suppl 1):S27-32.
- [3] Sewell D, Qing Z, Reinke E, et al. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization[J]. Int Immunol, 2003, 15(1):59-69.
- [4] Zaccane P, Fehervari Z, Jones FM, et al. Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(5): 1439-1449.
- [5] Tzifi F, Kanariou M, Tzanoudaki M, et al. Flow cytometric analysis of the CD4⁺ TCR V β repertoire in the peripheral blood of children with type 1 diabetes mellitus, systemic lupus erythematosus and age-matched healthy controls[J]. BMC Immunol, 2013, 14 (1):1-12.
- [6] 许馨予,苏川,张兆松,等.抗原活化诱导的辅助性 T 细胞凋亡参与血吸虫感染不同阶段 Th1/Th2 免疫应答极化的研究[D].南京:南京医科大学,2008.
- [7] Zaccane P, Burton O, Miller N, et al. Schistosoma mansoni egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(4):1098-1107.
- [8] El-Wakil HS, Aboushousha TS, El Haddad O, et al. Effect of schistosoma mansoni egg deposition on multiple low doses streptozotocin induced insulin dependent diabetes[J]. J Egypt Soc Parasitol, 2002, 32(3):987-1002.

(收稿日期:2014-01-08)

(上接第 1378 页)

程中的早期事件,可以作为宫颈癌早期诊断的一个指标。

本研究发现 p16 基因的过表达与 HR-HPV 感染有关。有研究表明 p16 基因几乎全部在 HR-HPV 感染过的宫颈癌和癌前病变中过表达^[8],表明 HR-HPV 感染可能是通过其病毒癌基因的作用参与了 p16 基因的高表达,从而导致了宫颈癌变的发生。从宫颈上皮不典型增生到原位癌再到宫颈癌,宫颈癌的发生和发展是一个非常复杂的病变过程,并且根据宫颈上皮不典型增生的程度和范围的不同,CIN 又可分为 CIN I、II、III 级。所以对于宫颈癌的早期诊断依靠三阶梯筛查还是远远不够,需要找出三阶梯筛查以外的肿瘤标志物对其进行早期诊断。根据本课题组目前的研究表明,p16 基因在宫颈癌的发生和发展中起到非常重要的作用,可以作为宫颈癌前病变和宫颈癌早期诊断的分子标记物。

参考文献

- [1] Deligeorgiou E, Christopoulos P, Aravantinos L, et al. Human papilloma virus molecular profile and mechanisms of cancerogenesis: a review[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2009, 30(2):128-132.

- [2] 郭玉凤,张志伟,贺修胜,等.组织芯片检测 p16 蛋白在不同胃癌组织中的表达意义[J].肿瘤学杂志,2012,18(10):746-749.
- [3] 杨春梅,陈卫刚,郑义,等.新疆哈萨克族食管鳞癌中 p16 蛋白的表达及其意义[J].肿瘤防治研究,2012,39(3):289-291.
- [4] 杨洋,郑荣生. Chk1 和 p16 在三阴乳腺癌中的表达及其相关性分析[J].临床肿瘤学杂志,2012,17(2):126-130.
- [5] 张玉阳,郑飞云,赵云琴,等.人乳头状瘤病毒感染与 p16 蛋白表达在宫颈鳞癌中的意义[J].中华医院感染学杂志,2011,21(14): 2965-2967.
- [6] 田琦,孟刚. p16/Ki-67 在宫颈鳞癌及宫颈上皮内瘤变组织中的表达及临床意义[J].中国老年学杂志,2011,9(31):3378-3379.
- [7] Salit IE, Tinmouth J, Chong S, et al. Screening for HIV-associated anal cancer: correlation of HPV genotypes, P16 and E6 transcripts with anal pathology[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(7):1886-1892.
- [8] Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, et al. Motility related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer[J]. Laryngoscope, 2001, 111(7):1285-1289.

(收稿日期:2014-01-08)