

• 论 著 •

# 人乳头瘤病毒 16/18 感染与膀胱癌组织中 Rb 和 p16 蛋白表达的相关性分析

张征荣,杜均祥,谢 云,谢 群,陈俊泳,聂奇伟

(暨南大学附属珠海医院/广东省珠海市人民医院泌尿外科 519000)

**摘要:**目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)16/18 感染与膀胱癌组织中 Rb 和 p16 蛋白表达的相关性,分析 HPV 与膀胱癌发病之间的关系。方法 以 40 例膀胱癌标本、40 例正常膀胱组织标本为研究对象,采用免疫组化法检测 HPV16/18 E6 及 E7 基因编码的蛋白(E6/E7 蛋白)、RB、p16 蛋白的表达情况,分析其与膀胱癌病理分级、国际抗癌联盟(UICC)分期、复发与否间的相关关系。结果 膀胱癌标本中 HPV16/18 E6/E7 蛋白、RB、p16 阳性率分别为 65.0%、47.5%、42.5%,与正常膀胱组织标本对应阳性率 22.5%、92.5%、87.5%对比,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );HPV16/18 E6/E7 蛋白、Rb、p16 蛋白的表达均与膀胱癌病理分级、分期相关( $P<0.05$ ),与肿瘤复发无关( $P>0.05$ );HPV16/18 E6/E7 蛋白与 Rb 及 p16 蛋白的表达均无显著相关( $P>0.05$ ),Rb 与 p16 蛋白的表达呈显著负相关( $P<0.05$ )。结论 HPV 16/18 感染与膀胱癌的发生及发展有关,但其作用机制可能与 Rb 及 p16 蛋白的表达异常无关。

**关键词:**人乳头瘤病毒; 膀胱癌; Rb 蛋白; p16 蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.12.019 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2017)12-1636-03

## Correlation analysis of human papilloma virus 16/18 infection and the expression of Rb and p16 protein in bladder cancer tissue

ZHANG Zhengrong, DU Junxiang, XIE Yun, XIE Qun, CHEN Junyong, NIE Qiwei

(Department of Urology, Zhuhai People's Hospital/Zhuhai Hospital Affiliated to Jinan University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the correlation between human papilloma virus(HPV) 16/18 infection and the expression of Rb and p16 protein in bladder cancer tissue, and to analyze the relationship between HPV infection and the incidence of bladder cancer. **Methods** The expression of HPV16/18 E6 and E7 gene encoded protein, RB and p16 were detected by immunohistochemical method in 40 cases of bladder cancer and 40 cases of normal bladder tissues, and the correlation between them and pathological grading, stage of international union of cancer(UICC), whether recurrence or not after receiving surgery was analyzed. **Results** In bladder cancer tissues, HPV16/18 E6 and E7 gene encoded protein, RB and p16 positive rates were 65%, 47.5%, 42.5%, compared with the positive rate of normal bladder tissue samples(22.5%, 92.5%, 87.5%), the differences were statistically significant( $P<0.05$ ). The expression of HPV16/18 E6 and E7 gene encoded protein, Rb and p16 proteins were associated with pathological grading and staging of bladder cancer( $P<0.05$ ), but were not related to the tumor recurrence( $P>0.05$ ). The expression of HPV16/18 E6 and E7 gene encoded protein and Rb, p16 protein were not significantly correlated( $P>0.05$ ). The expression of Rb and p16 protein were negatively correlated( $P<0.05$ ). **Conclusion** HPV 16/18 infection is related to the occurrence and development of bladder cancer, but its mechanism might not be related to the abnormal expression of Rb and p16 protein.

**Key words:** human papilloma virus; bladder cancer; Rb protein; p16 protein

膀胱癌是常见的人类泌尿系统恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,研究证实细胞周期紊乱与多种肿瘤的发生与发展有密切关系<sup>[2]</sup>。部分针对宫颈癌的研究显示人乳头瘤病毒(HPV)感染能够影响宫颈上皮细胞的正常细胞周期,导致上皮细胞永生化和细胞生长增殖失控,细胞异常凋亡,是宫颈癌发生与发展的重要影响因素<sup>[3]</sup>,也有研究显示在膀胱癌组织中可检出 HPV16/18 的高表达<sup>[4]</sup>;p16/cyclin/pRb 蛋白通路则是 G1/S 细胞周期检查点的关键信号通路<sup>[5]</sup>。本研究采用免疫组化法检测了高危型 HPV16/18 E6/E7 蛋白在膀胱癌组织中的表达,并探讨了其与 p16/cyclin/pRb 蛋白通路关键蛋白 Rb 和 p16 的相关性,旨在探讨 HPV 感染与膀胱癌之间的关系及其作用机制,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2003 年 1 月至 2015 年 5 月本院膀胱癌患者

40 例纳入膀胱癌组,其中男 28 例,女 12 例,手术时年龄 27~81 岁,平均(49.5±10.7)岁。均由手术病理证实为原发性膀胱癌,均为移行细胞癌,治疗及随访资料完整。参考世界卫生组织(WHO)分级标准:Ⅰ级 13 例,Ⅱ级 19 例,Ⅲ级 8 例。参考国际抗癌联盟(UICC)分期:T0~T1 期 22 例,T2~T4 期 18 例。术后持续随访至少 12 个月,其中复发 12 例,未复发 28 例。2010 年 1 月至 2015 年 1 月本院非膀胱癌患者 40 例纳入对照组,其中男 27 例,女 13 例,手术时年龄 28~80 岁、平均(49.1±12.8)岁。病理检查证实 40 份膀胱组织均为正常膀胱黏膜标本,10 份为肾移植供体提供,30 份为远离癌组织的正常膀胱组织。

**1.2 检测方法** 采用免疫组化(SP)技术检测标本中 HPV16/18 E6/E7 蛋白,以此代表 HPV16/18 水平,检测 Rb 及 p16 蛋

白表达水平,HPV16/18 鼠抗人单克隆抗体由 zymed 公司生产,p16 鼠抗人多克隆抗体、Rb 鼠抗人单克隆抗体由 Santa 公司生产。检测以 DAB 显色、苏木素复染,RBS 替代一抗作为阴性对照,肾癌阳性标本为阳性对照,另设单纯荧光标记物。结果判定方法:位于细胞核和胞浆中的棕黄色或棕褐色颗粒为阳性染色,根据染色程度将结果划分为- (未见阳性细胞)、+(阳性细胞小于 30%)、++ (阳性细胞为 30%~<70%),+++ (阳性细胞大于或等于 70%),其中阳性例数指+、++与+++总例数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析,等级资料多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,2 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验,计数资料组间对比比较采用  $\chi^2$  检验,相关性分析采用 Spearman 相关分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPV 16/18 E6/E7 蛋白、Rb 及 p16 蛋白在 2 组中的表达 膀胱癌组中 HPV16/18 E6/E7 蛋白阳性率明显高于对照

组,膀胱癌组 Rb、p16 蛋白阳性率明显低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 HPV16/18 E6/E7 蛋白、Rb 及 P16 蛋白在 2 组中的表达[n(%)]

| 组别       | n  | HPV16/18 E6/E7 蛋白 | Rb 蛋白    | p16 蛋白   |
|----------|----|-------------------|----------|----------|
| 膀胱癌组     | 40 | 26(65.0)          | 19(47.5) | 17(42.5) |
| 对照组      | 40 | 9(22.5)           | 37(92.5) | 35(87.5) |
| $\chi^2$ |    | 14.679            | 19.286   | 17.802   |
| P        |    | 0.001             | 0.000    | 0.000    |

2.2 HPV16/18 E6/E7 蛋白、Rb 及 p16 蛋白与膀胱癌病理特征关系分析 HPV16/18 E6/E7 蛋白、Rb、p16 蛋白的表达均与膀胱癌病理分级、UICC 分期相关,各组间对比,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与肿瘤复发无关,各组间比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。

表 2 HPV16/18、Rb 及 p16 蛋白与膀胱癌病理特征关系分析(n)

| 病理特征    | n  | HPV16/18 E6/E7 蛋白 |        |    | Rb 蛋白 |   |        |     | p16 蛋白 |   |        |     |  |
|---------|----|-------------------|--------|----|-------|---|--------|-----|--------|---|--------|-----|--|
|         |    | —                 | +      | ++ | —     | + | ++     | +++ | —      | + | ++     | +++ |  |
| 分级      |    |                   |        |    |       |   |        |     |        |   |        |     |  |
| I       | 13 | 7                 | 4      | 2  | 3     | 4 | 5      | 1   | 3      | 8 | 2      | 0   |  |
| II      | 19 | 6                 | 10     | 3  | 11    | 4 | 4      | 0   | 13     | 1 | 4      | 1   |  |
| III     | 8  | 1                 | 2      | 5  | 7     | 1 | 0      | 0   | 7      | 1 | 0      | 0   |  |
| Z       |    |                   | 6.412  |    |       |   | 9.077  |     |        |   | 6.913  |     |  |
| P       |    |                   | 0.041  |    |       |   | 0.011  |     |        |   | 0.032  |     |  |
| UICC 分期 |    |                   |        |    |       |   |        |     |        |   |        |     |  |
| T0~T1   | 22 | 11                | 9      | 2  | 7     | 8 | 5      | 2   | 8      | 9 | 4      | 1   |  |
| T2~T4   | 18 | 3                 | 7      | 8  | 14    | 1 | 3      | 0   | 15     | 1 | 2      | 0   |  |
| Z       |    |                   | —2.756 |    |       |   | —2.464 |     |        |   | —2.647 |     |  |
| P       |    |                   | 0.006  |    |       |   | 0.014  |     |        |   | 0.008  |     |  |
| 复发      |    |                   |        |    |       |   |        |     |        |   |        |     |  |
| 是       | 12 | 5                 | 6      | 1  | 6     | 4 | 2      | 0   | 7      | 4 | 1      | 0   |  |
| 否       | 28 | 9                 | 10     | 9  | 15    | 5 | 6      | 2   | 16     | 6 | 5      | 1   |  |
| Z       |    |                   | —1.197 |    |       |   | —1.162 |     |        |   | —0.365 |     |  |
| P       |    |                   | 0.231  |    |       |   | 0.871  |     |        |   | 0.715  |     |  |

2.3 HPV16/18 E6/E7 蛋白、Rb 及 p16 蛋白表达水平相关分析 HPV16/18 E6/E7 蛋白与 Rb 及 p16 蛋白的表达均无显著相关( $r=-0.230,P=0.154;r=-0.098,P=0.549$ );Rb 与 p16 蛋白的表达呈显著负相关( $r=-0.346,P=0.029$ )。

3 讨 论

HPV 16/18 是双链闭环 DNA 病毒,其基因早期编码区的 E6、E7 基因产物与病毒的致病作用有关,其中 E6 基因产物可与 p53 肿瘤抑制基因蛋白产物结合,导致 p53 降解<sup>[6]</sup>,而 E7 基因产物则主要与磷酸化 Rb 蛋白结合,导致蛋白失活<sup>[7]</sup>,而后者也是重要的肿瘤抑制基因产物,故 HPV 感染可能与多种肿

瘤的发生与发展有关。HPV16/18 为常见的高危型 HPV,既往有报道指出在膀胱癌组织中,能够检出 HPV16/18 蛋白的高表达,如韩韬等<sup>[8]</sup>报道膀胱癌组织的 HPV 总体阳性率为 23.1%,并指出 HPV 诱发膀胱癌的机制与干扰抑癌基因 p16 功能有关;杨琳等<sup>[9]</sup>开展的 Meta 研究显示亚洲膀胱癌患者中 HPV 总感染率为 35.67%,并指出高危型 HPV 感染可能会增加膀胱癌罹患的危险性。本研究结果也显示在膀胱癌组织中存在 HPV16/18 E6/E7 蛋白的高表达,阳性率为 65.0%,结果的差异可能与环境差异、病例选择及检测方案的不同有关,但均可提示高危型 HPV 感染与膀胱癌的发生及发展有关。

p16、Rb 基因均直接参与细胞周期<sup>[10-11]</sup>,在细胞周期 G1/S 期中,Rb 去磷酸化,作用于 EIF、ATF2 等转录因子进而调控细胞周期;p16 蛋白则能够抑制 Rb 蛋白磷酸化,使后者在去磷酸化后才能结合 EIF、ATF2 等转录因子不能活化,从而使细胞周期停滞于 G1 期<sup>[12]</sup>。本研究检出膀胱癌组织中 p16 和 Rb 蛋白表达均下降,提示细胞周期已紊乱,进一步提示 p16 及 Rb 蛋白的异常表达与膀胱癌的发生有关。

本研究还显示 HPV16/18 E6/E7 蛋白、p16、Rb 蛋白均与膀胱癌临床分级及分期有关,表现为膀胱癌的临床分级及分期越低,HPV16/18 E6/E7 蛋白的阳性表达率越低,p16 及 Rb 蛋白的阳性表达率越高。这提示 HPV16/18 E6/E7 蛋白高表达可能持续参与了因 HPV 感染所致膀胱癌的发生及发展,而 p16 及 Rb 蛋白可能仅参与了此类膀胱癌的早期发生。

HPV16/18 E6/E7 蛋白的表达与 Rb 及 p16 蛋白均无明显相关性,说明高危型 HPV 感染致癌的机制可能与 Rb 及 p16 蛋白相关通路的作用机制无明显相关性。Rb 及 p16 蛋白均参与 G1/S 期细胞周期;HPV 的致癌机制除与磷酸化 Rb 结合以外,还可能与 p53 蛋白通路受影响有关。本研究结果显示,对 HPV 感染为主要致病因素的膀胱癌,p53 蛋白通路受影响可能与肿瘤发生间的关系更为密切。

综上所述,HPV 16/18 感染与膀胱癌的发生及发展有关,但其作用机制可能与 Rb 及 p16 蛋白的表达异常无关。

参考文献

[1] 韩韬,吕洪,王友宝,等.人乳头瘤状病毒 P53 基因与膀胱癌关系的研究[J].国际泌尿系统杂志,2013,33(1):65-68.

[2] 肖建华,游艳,董自强,等.人乳头瘤病毒感染参与膀胱疾病发生的研究进展[J].广东医学,2013,34(3):490-492.

[3] Singh MP, Kaur M, Gupta N, et al. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and cervical smear ab-

normalities in female sex workers in Chandigarh, India [J]. Indian J Med Microbiol, 2016, 34(3): 328-334.

[4] 付子乾,黎玮. E-CD 和 p16 在膀胱移行细胞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(2): 284-285.

[5] 刘炜,胡森,童占表,等. 在膀胱癌组织中的 E2F3 和 RB 表达情况及其对患者预后的影响[J]. 现代预防医学, 2016, 43(4): 750-752.

[6] 郭毅,赵楠,李天人,等. HPV16 E6 通过阻碍 ING4 对 p53 作用而抑制细胞凋亡的研究[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(3): 56-60.

[7] 任占平,石喆,张莞,等. HPV16 E7、RB 和 MCM7 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中的表达及意义[J]. 广东医学, 2014, 35(7): 1033-1036.

[8] 韩韬. HPV 在膀胱肿瘤中的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2012, 32(3): 357-359.

[9] 杨琳,李霓,陈玉恒,等. 人乳头瘤病毒感染与亚洲人膀胱癌罹患危险度的 Meta 分析[J]. 中国肿瘤, 2011, 20(8): 573-578.

[10] 王新华,崔涌,孟宪杰,等. PTEN、p16、突变型 p53 在膀胱癌组织中的表达及意义[J]. 山东医药, 2013, 53(9): 37-39.

[11] 刘跃新,刘小超,康雯婷,等. 荧光原位杂交技术在膀胱癌检测中的临床应用研究[J]. 北京医学, 2013, 35(1): 1-3.

[12] Chaitanya NC, Allam NS, Gandhi Babu DB, et al. Systematic meta-analysis on association of human papilloma virus and oral cancer [J]. J Cancer Res Ther, 2016, 12(2): 969-974.

(收稿日期:2017-01-13 修回日期:2017-03-19)

(上接第 1635 页)

[5] 江立千,陈恒,李荣顺. 育龄女性临床常见感染性阴道炎及病原体分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(10): 1335-1336.

[6] 石一复. 重视阴道微生态与阴道炎诊治的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2009, 44(1): 3.

[7] 孟培,麻玲玲. 未婚阴道炎女性阴道分泌物检查结果调查[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(1): 385-386.

[8] 张帝开,覃春荣,李秀云,等. 广东地区女性下生殖道感染致病微生物分析[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(1): 417-418.

[9] 何英,陆学东,李海静,等. 检测艰难梭菌感染的五种方法比较[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(12): 1139-1144.

[10] 安邦权,周湘红,凌晓午,等. 阴道分泌物常规多项目检查 3 种方法对比分析[J]. 中国妇幼保健杂志, 2009, 24(1):

127-128.

[11] Donders GG. Wet smear compared with Gram stain diagnosis in asymptomatic pregnant women[J]. Obstet Gynecol, 2001, 97(3): 482.

[12] 安邦权,凌晓午,谢森,等. 阴道分泌物常规检验质量控制[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(3): 181-182.

[13] 凌晓午,曾强武,安邦权,等. 阴道分泌物瑞氏法与悬浮法检查结果比较[J]. 重庆医学, 2012, 41(31): 3298-3299.

[14] 王武. 三种方法检测阴道分泌物常规对比分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(8): 959-960.

[15] 周晔. 383 例阴道真菌感染菌群鉴定及药敏分析[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(1): 38-39.

(收稿日期:2017-01-19 修回日期:2017-03-23)