

• 短篇论著 •

# HPV L1 蛋白、XPO4、HOXA9 与宫颈癌发生及病变程度的相关性研究\*

马婉莹, 李涛<sup>△</sup>, 邓玉艳, 许鑫玥

西南交通大学附属医院四川省成都市第三人民医院妇产科, 四川成都 610031

**摘要:**目的 探究人乳头瘤病毒 L1(HPV L1)蛋白、输出蛋白 4(XPO4)、同源盒 A9(HOXA9)与宫颈癌(CC)发生及病变程度的相关性。方法 选取 2021 年 6 月至 2023 年 6 月在该院门诊及住院部接受治疗的宫颈病变患者 150 例为病例组,通过病理检查确诊分为低级别病变组(50 例)、高级别病变组(50 例)、CC 组(50 例),同时选取 50 例宫颈炎患者作为对照组,比较各组 HPV L1 蛋白、XPO4、HOXA9 阳性表达率以及 HPV L1 mRNA、XPO4 mRNA、HOXA9 mRNA 表达水平。结果 病例组非避孕套避孕方式、性伴侣个数 $\geq 2$  个患者比例较对照组更高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。伴随对照组,低级别病变组、高级别病变组、CC 组等病变级别的增加,HPV L1 mRNA、XPO4 mRNA 表达水平逐渐降低,HOXA9 mRNA 表达水平逐渐升高( $P < 0.05$ )。与对照组和低级别病变组相比,高级别病变组、CC 组 HPV L1、XPO4 阳性率降低,HOXA9 阳性率升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与高级别病变组相比,CC 组 HPV L1、XPO4 阳性率降低,HOXA9 阳性率升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 HPV L1 蛋白、XPO4 在宫颈病变组织中下调表达、HOXA9 上调表达,3 者与 CC 发生以及病变程度有密切关系。

**关键词:**宫颈癌; 人乳头瘤病毒 L1 蛋白; 输出蛋白 4; 同源盒 A9; 病变程度; 相关性

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2024.21.024

**文章编号:**1673-4130(2024)21-2685-04

**中图法分类号:**R737.33

**文献标志码:**A

宫颈癌(CC)是全球女性第三大常见癌症,是妇女癌症死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。尽管目前的治疗方法包括手术、放化疗和免疫治疗已极大地改善了预后,但晚期 CC 患者的临床结果仍然不容乐观,对女性的健康和生命安全造成了巨大威胁<sup>[2-3]</sup>。随着生活方式的改变,CC 的发病率呈逐年上升趋势。CC 的发生是一个复杂的过程。有研究表明,人乳头瘤病毒(HPV)影响 CC 的发生,是主要致病因素<sup>[4]</sup>。相关研究表明,随着宫颈病变程度的增加,病变组织中人乳头瘤病毒 L1(HPV L1)蛋白表达下调<sup>[5]</sup>。据研究报道,输出蛋白 4(XPO4)作为抑癌基因参与癌症或病理过程<sup>[6]</sup>。同源盒 A9(HOXA9)是同源盒基因家族中的一员,负责参与调控细胞分化和胚胎发育过程,并且与多种肿瘤的形成有关<sup>[7]</sup>。目前,HPV L1 蛋白、XPO4、HOXA9 与 CC 发生及病变程度的相关性尚不清楚,本研究通过对宫颈病变及 CC 患者病变组织中 HPV L1 蛋白、XPO4、HOXA9 的表达进行研究,为 CC 的临床研究提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2021 年 6 月至 2023 年 6 月在本院门诊及住院部接受治疗的宫颈病变患者 150 例纳入病例组,年龄 23~41 岁,平均(32.75 $\pm$ 5.06)岁,

孕次: $< 3$  次有 101 例、 $\geq 3$  次有 49 例,产次: $< 2$  次有 103 例、 $\geq 2$  次有 47 例,避孕方式:非避孕套 72 例、避孕套 78 例,性伴侣个数: $< 2$  个有 86 例、 $\geq 2$  个有 64 例。进行身体检查并通过病理确诊分为低级别病变组(50 例)、高级别病变组(50 例)、CC 组(50 例),同时选取 50 例宫颈炎(无宫颈病变)患者作为对照组,年龄 22~40 岁,平均(32.83 $\pm$ 5.27)岁,孕次: $< 3$  次有 36 例、 $\geq 3$  次有 14 例,产次: $< 2$  次有 37 例、 $\geq 2$  次有 13 例,避孕方式:非避孕套 10 例、避孕套 40 例,性伴侣个数: $< 2$  个有 45 例、 $\geq 2$  个有 5 例。两组年龄、孕次、产次方面比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与对照组比较,病例组非避孕套避孕方式、性伴侣个数 $\geq 2$  个患者比例较高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

病例组纳入标准:(1)患者确诊为宫颈病变<sup>[8]</sup>;(2)患者无血液疾病、免疫疾病或其他肿瘤;(3)资料完整;(4)所有入试者知情同意、签署同意书并配合研究。排除标准:(1)CC 复发患者;(2)年龄小于 20 岁的患者;(3)妊娠/哺乳期患者;(4)存在阴道炎、盆腔炎患者;(5)阴道或子宫畸形患者;(6)存在严重感染性疾病患者。本次研究通过本院伦理委员会审核、批准后实施。

## 1.2 方法

\* 基金项目:成都市医学科研课题计划(2022585)。

<sup>△</sup> 通信作者,E-mail:h53bse@163.com。

**1.2.1 标本采集和保存** 所有患者在手术过程中分别取相应的宫颈组织、低级别病变组织、高级别病变组织、CC 组织标本,分为两份,一份标本用生理盐水冲洗后,立即放置 -80℃ 冷冻保存;另一份进行石蜡包埋,用于免疫组织化学。

**1.2.2 免疫组织化学检测蛋白表达水平** 用免疫组化法检测 HPV11 蛋白、XPO4、HOXA9 表达。将石蜡标本放置于 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,完成后用乙醇溶液脱水,用二甲苯溶液进行透明处理,随后常规包埋、切片,用二甲苯溶液脱蜡,0.01 mol/L 枸缘酸钠进行冲洗,加 5% 的牛血清白蛋白封闭,常温静置 30 min 后,每个切片滴加 HPV11 一抗(厂商:赛默飞世尔,货号:MA1-34821,规格:1 mL),XPO4 一抗(厂商:赛默飞世尔,货号:PA1-41633,规格:100 μg),HOXA9(厂商:赛默飞世尔,货号:PA5-102516,规格:100 μL),孵育过夜后,滴加二抗(厂商:赛默飞世尔,货号:C3146010、C3143010,规格:100 μL),DAB(厂商:Abcam,货号:ab64238,规格:125 mL)染色,显色后用缓冲液冲洗,显色后用苏木素复染。用显微镜进行观察。根据染色强度以及阳性细胞数进行分级;染色强度:无着色,淡黄色,黄色,棕黄色,分别记为 0、1、2、3 分;阳性细胞数:< 5%、5%~25%、> 25%~50%、> 50%~75%、> 75%,分别记为 0、1、2、3、4 分。以两项评分的乘积为阳性表达强度:得分 0~2 分为阴性(-),> 2~5 分为弱阳性(+),> 5~9 分为强阳性(++),> 9 分为强阳性(+++)。

**1.2.3 HPV11 mRNA、XPO4 mRNA、HOXA9 mRNA 表达水平检测** 采用逆转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测各组织中的 HPV11 mRNA、XPO4 mRNA、HOXA9 mRNA 表达水平。首先,使用 Trizol 试剂(厂商:赛默飞世尔;货号:15596026)提取 RNA,逆转录试剂盒(厂商:赛默飞世尔;货号:K1691)将 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,Prim5.0 软件设计引物,然后,采用 RT-qPCR 试剂盒(厂商:赛默飞世尔;货号:11736059)配制反应体系,

使用 RT-qPCR 仪(厂商:Bio-Rad;型号:CFX96)上机检测,得出 Ct 值,最后根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算 HPV11 mRNA、XPO4 mRNA、HOXA9 mRNA 表达水平,引物由上海生工生物工程有限公司合成,GAPDH 为内参,引物见表 1。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析,计数资料采用例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,用 Bonferroni 法进行多重比较;符合正态分布的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,对照组、低级别病变组、高级别病变组和 CC 组比较采用单因素方差分析,用 LSD-*t* 检验进行组间两两比较,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 引物序列(5'-3')

基因	引物序列
HPV11 mRNA	F:CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA R:CTGCAACAAGACATACATGGACCG
XPO4 mRNA	F:GGGGGTACCAATGGTCAATAATGAACAA R:GGGGATATCTTATTTTACACAAAGGAG
HOXA9 mRNA	F:TGTCCCTGACTGACTATGCTT R:TGCTCGGTCTTTGTGATTTT
GAPDH	F:GTTGTCTCTCGGACTTCA R:TGGTCCAGGGTTTCTTACTC

注:F 为正向引物,R 为反向引物。

## 2 结果

**2.1 各组 HPV11 mRNA、XPO4 mRNA、HOXA9 mRNA 表达水平比较** 对照组、低级别病变组、高级别病变组和 CC 组 HPV11 mRNA、XPO4 mRNA、HOXA9 mRNA 表达水平比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );随着病变级别的升高,HPV11 mRNA、XPO4 mRNA 表达水平逐渐降低,HOXA9 mRNA 表达水平逐渐升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组 HPV11 mRNA、XPO4 mRNA、HOXA9 mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HPV11 mRNA/GAPDH	XPO4 mRNA/GAPDH	HOXA9 mRNA/GAPDH
对照组	50	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.20
低级别病变组	50	0.78 ± 0.19*	0.75 ± 0.17*	1.23 ± 0.24*
高级别病变组	50	0.57 ± 0.11*#	0.62 ± 0.13*#	1.47 ± 0.31*#
CC 组	50	0.32 ± 0.08*#&	0.44 ± 0.10*#&	1.65 ± 0.34*#&
F		171.209	106.510	51.875
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与低级别病变组比较,# $P < 0.05$ ;与高级别病变组比较,& $P < 0.05$ 。

## 2.2 HPV11 蛋白在不同病变组织中的表达水平

高级别病变组、CC 组 HPV11 阳性率均低于对照组、

低级别病变组,CC 组 HPVL1 阳性率低于高级别病变组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 HPVL1 蛋白在不同病变组织中的表达水平比较[n(%)]

组别	n	HPVL1 阳性率
对照组	50	34(68.00)
低级别病变组	50	30(60.00)
高级别病变组	50	18(36.00)
CC 组	50	9(18.00)*
$\chi^2$		31.515
P		<0.001

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

**2.3 XPO4 蛋白在不同病变组织中的表达** 高级别病变组、CC 组 XPO4 阳性率均低于对照组、低级别病变组,CC 组 XPO4 阳性率低于高级别病变组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 4。

表 4 XPO4 蛋白在不同病变组织中的表达比较[n(%)]

组别	n	XPO4 阳性率
对照组	50	36(72.00)
低级别病变组	50	28(56.00)
高级别病变组	50	18(36.00)
CC 组	50	7(14.00)*
$\chi^2$		38.283
P		<0.001

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

**2.4 HOXA9 蛋白在不同病变组织中的表达** 高级别病变组、CC 组 HOXA9 阳性率均高于对照组、低级别病变组,CC 组 HOXA9 阳性率高于高级别病变组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 5。

表 5 HOXA9 蛋白在不同病变组织中的表达比较[n(%)]

组别	n	HOXA9 阳性率
对照组	50	6(12.00)
低级别病变组	50	12(24.00)
高级别病变组	50	29(58.00)*
CC 组	50	41(82.00)*
$\chi^2$		62.175
P		<0.001

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

在世界范围内,CC 是女性第四大常见肿瘤,仅次于乳腺癌、结直肠癌和肺癌,通过接种 HPV 疫苗进行预防,其慢性感染被认为是 CC 癌前病变和恶性病变的致病因素<sup>[9-10]</sup>。据报道,CC 局部晚期疾病患者的 5 年无病生存率为 68%,5 年总生存率为 74%;晚期和淋巴结转移导致预后差,由于 CC 的最佳治疗在很大

程度上取决于疾病阶段,因此了解 CC 病变程度非常重要<sup>[11]</sup>。本研究发现,病例组非避孕套避孕方式、性伴侣个数 $\geq 2$  个患者比例高于对照组,说明避孕方式以及性伴侣个数可能对 CC 发生有一定影响。

相关研究表明,HPVL1 蛋白对 CC 癌前病变的预测和 CC 的诊断有临床价值<sup>[12]</sup>。通过组织病理学发现,HPVL1 蛋白阳性率随宫颈病变严重程度的增加而降低<sup>[13]</sup>。本研究发现,HPVL1 mRNA 表达水平随着病变程度的增加而降低,提示 HPVL1 可能与 CC 的发生和发展有关。还有研究证明,HPVL1 蛋白表达水平的阳性率与宫颈病变程度呈负相关,HPVL1 蛋白阳性表达率随着宫颈病变程度的增加而降低,并进一步发现 HPVL1 蛋白可用来预测 CC 癌前病变的进展<sup>[14]</sup>。本研究发现,CC 组 HPVL1 蛋白阳性表达率最低,高级别病变组 HPVL1 蛋白阳性率低于低级别病变组和对照组,提示随着宫颈病变级别的增加,HPVL1 蛋白表达水平下调,可能与患者病变程度有关。

XPO4 是细胞核转运蛋白的一种,通过介导 Smad3/TGF- $\beta$  信号通路发挥生物学作用,有研究发现,子宫内膜癌(EC)组织中 XPO4 阳性表达率较低,并且 XPO4 表达与肿瘤最大径、浸润程度有关,可能参与了 EC 的发展<sup>[15]</sup>。相关研究表明,XPO4 在 EC 组织中表达下调,其表达水平与患者淋巴结转移、国际妇产科学联盟(FIGO)分期、组织病理分级及生存率显著相关,在评估 EC 患者疾病进展及预后具有重要意义<sup>[16]</sup>。还有研究发现,XPO4 在 EC 患者的病变组织中呈低表达,检测 XPO4 水平有助于预测患者病情情况<sup>[17]</sup>。本研究中,CC 患者癌组织中 XPO4 mRNA 表达水平最低,并且随着病变程度增加,XPO4 mRNA 表达水平逐渐降低,提示 XPO4 表达水平可能与宫颈病变程度有关。本研究通过分析还发现,XPO4 蛋白阳性表达率随着病变级别的升高而降低,说明 XPO4 蛋白阳性表达下调可能与宫颈病变级别有关。

HOXA9 是 HOX 基因家族中的成员,在女性生殖系统发育的过程中表达,作为转录因子参与调节多个相关癌症肿瘤的生物行为,并与预后有关,有研究指出,HOXA9 在人卵巢癌细胞中呈高表达<sup>[18-19]</sup>。本研究分析发现,随着宫颈病变级别的增加,HOXA9 mRNA 水平逐渐升高,并且 CC 组和高级别病变组 HOXA9 蛋白表达阳性率显著高于低级别病变组和对照组,提示患者的病变程度可能随着 HOXA9 表达上调,从而不断进展,猜测可能的原因是 HOXA9 可能作为促癌基因促进 CC 的发展。另有研究发现,卵巢癌中 HOXA9 的表达水平与其分级和转归有关,可作为临床治疗的特异性标志物<sup>[20]</sup>。HOXA9 在乳腺癌和卵巢癌中呈高表达,通过诱导间充质标志物胎盘

钙黏素的表达水平促进肿瘤生长并刺激肿瘤细胞附着于腹膜表面<sup>[21]</sup>,而甲基化 HOXA9(meth-HOXA9)有高度的癌症特异性,可作为卵巢恶性肿瘤的诊断标志物<sup>[22]</sup>。本研究结果通过与以往的研究对比,提示 HOXA9 可能也具有成为 CC 诊断标志物的潜能。

综上所述,HPV L1 蛋白、XPO4 在宫颈病变组织中呈低表达,HOXA9 呈高表达,与 CC 发生及病变程度有一定关系。但本研究存在样本量小的局限性,结果可能存在偏倚,后续需要扩大样本量深入研究。

## 参考文献

- [1] BEDELL S L, GOLDSTEIN L S, GOLDSTEIN A R, et al. Cervical cancer screening: past, present, and future[J]. *Sex Med Rev*, 2020, 8(1): 28-37.
- [2] YU S, LI X, ZHANG J, et al. Development of a novel immune infiltration-based gene signature to predict prognosis and immunotherapy response of patients with cervical cancer[J]. *Front Immunol*, 2021, 12(1): 709493.
- [3] 查平, 邓梦. 血清 lncRNA CCDC18-AS1、miR-501 在 HPV 感染宫颈癌中的表达及其与预后的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2024, 45(2): 155-159.
- [4] SHI S, MA H Y, ZHANG Z G. Clinicopathological and prognostic value of STAT3/p-STAT3 in cervical cancer: A meta and bioinformatics analysis[J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 227(1): 153624.
- [5] HU H, ZHAO J, YU W, et al. Human papillomavirus DNA, HPV L1 capsid protein and p16INK4a protein as markers to predict cervical lesion progression[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 299(1): 141-149.
- [6] 罗明, 陈旭杰. XPO4 在子宫内膜癌中的表达及与临床病理参数和预后的关系[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(13): 2328-2332.
- [7] 易秋阳, 梁陈, 姚超. 前列腺癌患者癌组织中 miR-647 和 HOXA9 表达水平及其与预后的关系分析[J]. *中国男科学杂志*, 2023, 37(1): 41-47.
- [8] 徐红, 张静. 美国国立综合癌症网络《2020 年宫颈癌临床实践指南》病理内容更新解读[J]. *中华病理学杂志*, 2021, 50(1): 9-13.
- [9] AVILA E, NORIEGA-MEJÍA B J, GONZÁLEZ-MACÍAS J, et al. The preventive role of the vitamin d endocrine system in cervical cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8665.
- [10] ZHANG Q, ZONG L, ZHANG H, et al. B7-H4 Expression in precancerous lesions of the uterine cervix[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021(1): 5857092.
- [11] MONK B J, TAN D S P, HERNÁNDEZ CHAGÜI J D, et al. Proportions and incidence of locally advanced cervi-

cal cancer: a global systematic literature review[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2022, 32(12): 1531-1539.

- [12] WEILAND T, ZGUBIC J, BRCIC L, et al. Detection of antibody subclasses IgA, IgM and IgG against HPV L1 in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma patients: a pilot study[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2024, 281(5): 2637-2644.
- [13] 何爱美, 吴继现, 程晓燕. HPV L1 壳蛋白联合 TCT、HPV E6/E7 mRNA 检测在宫颈癌筛查中的应用价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(16): 1987-1990.
- [14] 王登山, 曹磊, 钱金林, 等. HPV L1 壳蛋白联合 MCM2 检测对 HPV DNA 阳性患者宫颈病变的诊断及预后意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(2): 287-292.
- [15] 李荣, 刘晓蛟, 刘瑾. 子宫内膜癌组织中输出蛋白 4、组织驱动蛋白家族成员 23 及乳脂肪球表皮生长因子 8 表达与临床病理的相关性[J]. *中国计划生育学杂志*, 2022, 30(10): 2340-2344.
- [16] 王丽娜, 刘银萍, 赵绍杰. XPO4、MAP2K4 及 ZIC1 在子宫内膜癌组织表达及其对子宫内膜癌患者预后评估价值[J/CD]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2021, 17(4): 402-409.
- [17] 李娟, 倪惠华. 子宫内膜癌患者病灶组织中 XPO4、STC2 及 L1CAM 表达水平及对病情预后的预测价值[J]. *系统医学*, 2022, 7(21): 164-168.
- [18] FAABORG L, FREDSLUND ANDERSEN R, WALDSTRÖM M, et al. Analysis of HOXA9 methylated ctDNA in ovarian cancer using sense-antisense measurement[J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 522(1): 152-157.
- [19] SINGH A, GUPTA S, BADARUKHIYA J A, et al. Detection of aberrant methylation of HOXA9 and HIC1 through multiplex MethyLight assay in serum DNA for the early detection of epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(6): 1740-1752.
- [20] SHENOY U S, ADIGA D, ALHEDYAN F, et al. HOXA9 transcription factor is a double-edged sword: from development to cancer progression[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2023, 8(1): 1-15.
- [21] LI X F, ZHANG H B, HUO Y. High HOXA9 gene expression predicts response to chemotherapy and prognosis of high-grade serous ovarian cancer patients[J]. *J Int Med Res*, 2022, 50(11): 3000605221135864.
- [22] FAABORG L, JAKOBSEN A, WALDSTRÖM M, et al. HOXA9-methylated DNA as a diagnostic biomarker of ovarian malignancy[J]. *Biomark Med*, 2021, 15(15): 1309-1317.

(收稿日期: 2024-02-26 修回日期: 2024-06-22)