

人宫颈癌基因在子宫颈上皮内瘤变和子宫颈鳞癌中的表达及其与 HPV16 整合状态的关系

徐启英 郭桂兰 沙仁高娃

【摘要】 目的 探讨人宫颈癌基因 (human cervical cancer oncogene,HCCR) 在宫颈上皮内瘤变 (CIN) 和宫颈鳞癌 (SCC) 中的表达及其与 HPV16 整合状态的关系。方法 选取 2013 年 1 月 -2015 年 3 月收治的 HPV16 阳性宫颈炎患者 20 例、CIN 患者 44 例和 SCC 患者 20 例。采用多重实时 PCR 技术检测宫颈脱落细胞中的 E2 和 E6 基因,通过 E2 / E6 比值,评估 HPV16 型 DNA 的体内整合状态。采用免疫组化 SP 法测定各组患者宫颈脱落细胞 HCCR 表达情况。结果 宫颈炎、CIN 和 SCC 组 HPV16 DNA 游离型分别是 95.00% (19/20)、43.18% (19/44) 和 15.00% (3/20) HPV16 DNA 混合型分别是 5.00% (1/20)、50.00% (22/44) 和 55.00% (11/20) HPV16 DNA 整合型分别是 0、6.82% (3/44) 和 30.00% (6/20), 各组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 HPV16 DNA 游离型及混合型组患者中, 宫颈炎、CIN 和 SCC 组 HCCR 表达逐渐增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SCC 组 HPV16 DNA 整合状态与年龄、临床期别、分化程度及淋巴结转移无关。结论 HPV 感染可能与 HCCR 及 HPV16 整合状态有关, HCCR 及 HPV16 存在状态检测可能作为细胞学筛查的一种补充手段, 以期早发现 CIN 及 SCC 的高危患者。

【关键词】 子宫颈上皮内瘤变; 子宫颈鳞癌; 人宫颈癌基因; 人乳头瘤病毒; 整合

Expression of HCCR in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma and its relationship with HPV16 infection

XU Qiyang, GUO Guilan, Sharengaowa.

(Department of Gynaecology, the Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of human cervical cancer oncogene(HCCR) in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical carcinoma and its relationship with HPV16 infection. Methods 84 cases including 44 cases with CIN, 20 cases with cervical cancer and 20 cases with cervicitis who were treated in our department from January 2013 to March 2015, recruited in this study. Cervical liquid-based cytological samples were collected to detect E2 and E6 genes of HPV type 16 by using multiple real PCR time polymerase chain reaction (PCR). E2 / E6 ratio was used to evaluate the physical status of HPV16 DNA in host cell genome. The SP immunohistochemical method was used to detect the expression of HCCR in cervical lesions. Results The expression of free type of HPV16 DNA in cervicitis, CIN and SCC was 95%, 43.18% and 15%, the expression of hybrid type of HPV16 DNA in cervicitis, CIN and SCC was 5%, 50% and 55%, the expression of integrated type of HPV16 DNA in cervicitis, CIN and SCC was 0, 6.82% and 30%. The difference was statistically significant. In the group of free and hybrid type of HPV16 DNA, the expression of HCCR grew with the disease progression. In SCC, HPV16 DNA exists status had nothing to do with age, clinical stage, differentiation, lymph node metastasis. Conclusions The infection of HPV is related to the status of HCCR and HPV16, which may be a additional method for the screening of cervical cancer.

【Key words】 cervical intraepithelial neoplasia; cervical squamous cell carcinoma; human cervical cancer oncogene; human papillomavirus; infection

Chin J Clin Obstet Gynecol, 2016, 17:505-507

高危型 HPV 持续感染对宫颈上皮内瘤变 (CIN) 的进展起着主要的促进作用, HPV 的整合状态被认

为是宫颈病变恶性进展的重要标志^[1]。人宫颈癌基因 (human cervical cancer oncogene, HCCR) 是 Ko 等^[2]在 2003 年新发现的癌基因, 定位于 12q 染色体, 其表达情况与宫颈癌及 CIN 等的发生和进展相关。HPV16 是宫颈癌最常见感染类型之一, 然而对

doi:10.13390/j.issn.1672-1861.2016.06.008

基金项目: 青海省科技计划项目基金资助 (2014-ZJ-740)

作者单位: 810001 西宁 青海大学附属医院妇科

通信作者: 郭桂兰 Email: 09717513976gg1@163.com

于 HPV DNA 整合状态与宫颈细胞的恶性转化仍是目前争议的问题。为进一步探讨宫颈癌患者 HPV DNA 在宫颈癌组织中的表达及存在状态,本研究选择 HPV16 阳性患者 84 例进行研究,探讨正常宫颈、CIN、宫颈鳞癌患者的 HPV16 DNA 存在状态及 HCCR 表达情况。

资料与方法

一、一般资料

选择 2013 年 1 月 - 2015 年 3 月青海大学附属医院收治的 HPV16 阳性患者 84 例,分为宫颈炎组 (20 例), CIN 组 (44 例) 和 SCC 组 (20 例),患者的平均年龄分别为 (41.2 ± 12.7) 岁 (25~60 岁)、(38.9 ± 7.1) 岁 (28~57 岁) 和 (47.6 ± 9.8) 岁 (31~59 岁),其中 CIN1 级 15 例、CIN2 级 18 例、CIN3 级 11 例。三组患者的年龄比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。宫颈癌分期依据 2009 年 FIGO 分期,所选病例均经病理专家复核,临床资料完整,无子宫切除和宫颈手术史、初查时为非妊娠状态、无盆腔放疗史。

二、宫颈脱落细胞 DNA 的提取

采用 DNA 提取试剂盒 (广州凯普有限公司),按推荐步骤行 HPV16 DNA 的提取,所有细胞标本提取 DNA 后于 -80 °C 冰箱保存。

三、多重实时 PCR 技术检测 HPV16 DNA 整合状态

1. 引物设计: HPV16E2 上游引物: CTTGGGCACCGAAGAAACAC, 下游引物: CATATACCTCACGTCGCAG, 核苷酸位置: 3438~3457, 3770~3789, PCR 产物长度 352 bp; HPV16E6 上游引物: AAGGGCGTAACCGAAATCGGT, 下游引物: CATATACCTCACGTCGCAG, 核苷酸位置: 26~46, 215~233, PCR 产物长度 208 bp; β -actin 上游引物: CTCCATCTGGCCTCGCTGT, 下游引物: GCTGTCACCTTCACCGTTCC, PCR 产物长度 268 bp。

2. 测定方法: 应用多重 PCR 进行 HPV16 整合

状态检测,同时扩增 HPV16 E2、E6 2 个基因。取 0.5 ml 离心管,依次加入 10 × PCR 缓冲液, dNTP、上下游引物、提取 DNA 模板,离心,上 PCR 仪扩增,2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

3. 结果判断标准: 应用凝胶电泳图像分析软件分析 HPV16E2、E6 基因 PCR 扩增所得的产物电泳条带面积灰度值,从而确定 HPV16 的存在状态^[3]。游离型: E2/E6 比值 > 0.9; 整合型: 0 < E2/E6 比值 < 0.15; 混合型: 0.15 < E2/E6 比值 < 0.9。

四、免疫组化 SP 法检测 HCCR 的表达

采集宫颈液基细胞剩余液, SP 法对 HCCR 表达情况进行分析, HCCR 蛋白定位于细胞质,黄棕色颗粒出现于细胞质内部即显示为阳性^[4]。

五、统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理。计数资料采用 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、不同宫颈病变中 HPV16 DNA 存在状态

宫颈炎组、CIN 组和 SCC 组中 HPV16 DNA 存在状态比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),其中,宫颈炎组和 CIN1 组以游离型为主, CIN2/3 组及 SCC 组以混合型为主,见表 1。

二、HPV 不同存在状态中 HCCR 的表达情况

HPV 游离型、混合型中 HCCR 阳性比例在不同宫颈病变中比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

三、HPV16 DNA 整合状态与宫颈癌临床病理参数的关系

SCC 组不同 HPV16 型 DNA 整合状态与临床期别、分化程度、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$),而与年龄无关 ($P > 0.05$),见表 3。

讨 论

HPV 是宫颈癌发病的重要危险因素,尤以 HPV16, 18 危险性最高。E6 蛋白是一种 HPV 病毒

表1 不同宫颈病变中 HPV16 DNA 存在状态

组别	例数	游离型		混合型		整合型	
		例数	百分率 (%)	例数	百分率 (%)	例数	百分率 (%)
宫颈炎组	20	19	95.00	1	5.00	0	0
CIN1组	15	9	9/15	6	6/15	0	0
CIN2/3组	29	10	34.48	16	55.17	3	10.34
SCC组	20	3	15.00	11	55.00	6	30.00

表2 不同宫颈病变中HPV存在状态与HCCR表达

组别	游离型			混合型			整合型		
	例数	HCCR阳性		例数	HCCR阳性		例数	HCCR阳性	
		例数	百分率 (%)		例数	百分率 (%)		例数	百分率 (%)
宫颈炎组	19	0	0	1	0	0	0	0	0
CIN1组	9	0	0	6	0	0	0	0	0
CIN2/3组	10	2	2/10	16	6	6/16	3	1	1/3
SCC组	3	2	2/3	11	8	8/11	6	4	4/6
合计	41	4	9.76	34	14	41.18	9	5	5/9

表3 不同HPV16型DNA存在状态与宫颈癌临床病理的关系 (例数)

临床病理特征	例数	游离型 (n=3)	混合型 (n=11)	整合型 (n=6)
年龄(岁)				
45	7	1	4	2
> 45	13	2	7	4
FIGO期别				
期	12	2	7	3
期	8	1	4	3
分化程度				
高分化	6	2	4	1
中分化	11	1	5	4
低分化	3	0	2	1
盆腔淋巴结转移				
否	14	3	7	3
是	6	0	4	3

癌基因，是宿主细胞转化的关键^[5]。E2基因的断裂或缺失导致其对病毒癌基因表达负调控作用缺失，促使E6基因表达失控，从而促进了细胞转化或癌变。整合后病毒转录的E6、E7 mRNA末端嵌入了宿主细胞的一些序列，使其稳定性增强，更强化了E6、E7蛋白的表达。从而使含有HPV整合的细胞更易出现染色体不稳定，包括中心粒异常、间期桥联、染色体断裂和非整倍体^[6]。本研究结果显示随着病变程度加重 HPV16-DNA 游离型比例逐渐下降，而 HPV16-DNA 混合型及整合型比例逐渐增加，提示检测病毒的混合及整合状态比单纯 HPV DNA 监测更具有临床意义和价值^[3]。

本研究将 SCC 组患者的 FIGO 分期、分化程度、淋巴结转移、年龄与 HPV16 感染后病毒存在状态进行初步分析，显示 HPV16 型 DNA 存在状态的与年龄、临床期别、分化程度、淋巴结转移均无关，可能与本研究病例数较少有关，需扩大样本量进一步研究。

HCCR 是 Ko 等^[2]于 2003 年新发现的癌基因，定位于 12q 染色体。HCCR 在宫颈癌、淋巴结转移及子宫颈癌 CUMC-6 细胞系中强表达，在正常子宫颈组织中无表达，并且 HCCR 在其它肿瘤如白血病，淋巴瘤等中均有过度表达，提示 HCCR 与多种人类恶性肿瘤的发生有关^[4]，HCCR 基因在宫颈肿瘤

早期有参与作用，可能是肿瘤干细胞表达基因，因而其可能作为肿瘤治疗靶点^[7]。本组结果显示，在 HPV16-DNA 游离型及混合型组中，随着病变程度加重，HCCR 表达逐渐增加，说明通过检测 HCCR 来辅助诊断 CIN 及 SCC 可能具有重要意义^[8]。

本研究结果显示 HCCR 在正常组织及 CIN1 中均无表达。在 CIN2 组及 SCC 组中 HCCR 的表达较高，提示 HCCR 的检测数据可作为 CIN、SCC 临床诊断以及疗效评价、预后管理的指导因素^[2]。目前对于 HCCR 与 SCC 发生的研究报道很少，其在 CIN 及 SCC 中的作用和意义尚不清楚，其与 HPV 的关系均有待于进一步研究。

本研究对 HCCR 基因在宫颈肿瘤进行了初步研究，鉴于 HCCR 是新基因，其在宫颈肿瘤发病的作用机制、传导通路及其在 HPV 感染中作用仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Woodman CB, Collins SI, Young LS. Natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer, 2007, 7: 11-22.
- [2] Ko J, Lee YH, Hwang SY, et al. Identification and differential expression of novel human cervical cancer oncogene HCCR-2 in human cancers and its involvement in p53 stabilization. Oncogene, 2003, 22, 4679-4689.
- [3] 陈庆云, 卞美璐, 陈志华, 等. 宫颈癌癌前病变中人乳头瘤病毒 16 整合状态的检测, 中华医学杂志, 2005, 85: 400-404.
- [4] 杨姗姗, 孙立新, 赵宏伟, 等. 人类子宫颈癌基因、p16 及人乳头瘤病毒 16/18 在子宫颈癌中表达的意义. 肿瘤研究与临床, 2010, 22: 383-387.
- [5] Boulet GA, Benoy IH, Depuydt CE, et al. Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16, positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia in a liquid-based cytology setting? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18: 2992-2999.
- [6] Jackson R, Tegtmeier M, Zehbe I. Subcellular localization and quantitation of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein through immunocytochemistry detection. Virology, 2013, 435: 425-432.
- [7] 张国新, 黄祖瑚. 人宫颈癌癌基因在肿瘤早期诊断治疗中的应用, 国际肿瘤学杂志, 2006, 33: 536-537.
- [8] 崔艳艳, 霍山, 郭晓宁, 等. 宫颈脱落细胞中 HCCR 的表达及意义. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19: 77-80.

(收稿日期: 2015-12-25)