论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411042

宫颈鳞癌组织中 HPV E6 与野生型 p53 和 PinX1 表达的关系及其临床意义

王 婉[1],黄团明[1],王 滨[2],闫晓欢[1],郑英如[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨宫颈鳞癌、宫颈鳞癌癌旁及正常宫颈组织中 HPV E6、野生型 p53 及 PinX1 表达及其关系。**方法** 收集第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科 2013 年 3 月至 2014 年 2 月 17 例宫颈鳞癌患者宫颈鳞癌、宫颈鳞癌癌旁组织,选取 10 例正常宫颈组织作为对照。采用 Real-Time PCR、Western blot、免疫组织化学方法检测 3 组组织中 HPV E6、野生型 p53 和 PinX1 的 mRNA、蛋白的表达及分布。**结果** 宫颈鳞癌组织中 mRNA 及蛋白水平结果均显示 HPV E6 的表达水平显著高于癌旁组织($P<0.01$),而野生型 p53 和 PinX1 的表达水平明显低于癌旁及正常组织($P<0.05$)。相关性分析提示:宫颈鳞癌组织中野生型 p53($R=-0.605$,$P<0.01$)和 PinX1($R=-0.496$,$P<0.05$)表达水平的下降与 HPV E6 的表达水平升高存在负相关,野生型 p53 与 PinX1 的表达呈正相关($R=0.824$,$P<0.01$)。**结论** 宫颈鳞癌组织中 HPV E6 表达上调与野生型 p53、PinX1 的表达负相关,PinX1 的表达与野生型 p53 密切相关,HPV E6 可能通过抑制野生型 p53、PinX1 导致宫颈鳞癌的发生、发展。

[关键词] 宫颈鳞癌;HPV E6;野生型 p53;PinX1

[中图法分类号] R362;R730.43;R737.33 [文献标志码] A

Correlation of HPV E6 with wild type p53 and PinX1 in cervical squamous carcinoma and clinical significance

Wang Wan[1], Huang Tuanming[1], Wang Bin[2], Yan Xiaohuan[1], Zheng Yingru[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression and relationship of human papillomavirus (HPV) E6, wild type p53, and PinX1 in cervical squamous carcinoma tissues, adjacent tissues, and normal cervical tissues. **Methods** Seventeen cases of cervical squamous carcinoma and adjacent tissues were collected from Department of Obstetrics and Gynecology, Daping Hospital of the Third Military Medical University during March 2013 to February 2014, and 10 cases of normal cervical tissues were selected as control. Real-time PCR, Western blotting and immunohistochemistry assay were used to detect the expression and distribution of HPV E6, wild type p53, and PinX1 in cervical squamous carcinoma tissues, adjacent tissues, and normal cervical tissues. **Results** The mRNA and protein levels of HPV E6 in the cervical squamous carcinoma tissues were significantly higher than those in the adjacent mucosa ($P<0.05$), and the expression levels of wild type p53 and PinX1 were dramatically decreased compared with adjacent and normal mucosa ($P<0.05$). HPV E6 had a negative correlation with the decreased expression levels of wild type p53 ($R=-0.605$, $P<0.01$) and PinX1 ($R=-0.496$, $P<0.05$) in cervical squamous carcinoma, however, a positive correlation was seen between the expression levels of wide type p53 and PinX1 ($R=0.824$, $P<0.01$). **Conclusion** HPV E6 expression is negatively related with wild type p53 and PinX1 in cervical squamous carcinoma, and PinX1 is closely related with the expression of wild type p53. HPV E6 may result in the carcinogenesis and development of cervical squamous carcinoma through inhibiting wild type p53 and PinX1.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272865);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2012jjB10025)

[通信作者] 郑英如,E-mail:zyrdaping@aliyun.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150309.0836.010.html(2015-03-09)

[**Key words**] cervical squamous carcinoma; HPV16 E6; wild type p53; PinX1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272865) and the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjB10025). Corresponding author: Zheng Yingru, E-mail: zyrdaping@aliyun.com

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,是导致女性死亡的重要原因[1]。由于宫颈癌的发病机制不清楚,因此治疗效果较差。研究已证实宫颈癌的发生、发展与高危型人乳头瘤病毒(high risk human papilloma virus, HR-HPV)感染有密切关系[2]。HPV 可能通过一些机制启动癌基因的激活进而使正常细胞发生转化,其中 E6 原癌蛋白在宫颈癌的发生和维持恶性表达中的作用极其重要,被认为是宫颈癌发生、发展的重要危险因素[3]。

研究发现,端粒酶活性的异常升高与包括宫颈癌在内的多种肿瘤的发生、发展密切相关[4],在宫颈癌中 HPV 主要通过原癌蛋白 E6(HPV E6)来促进端粒酶活性。端粒酶的强效抑制因子 PinX1 是高度保守的核蛋白[5],是维持细胞处于最佳生存状态的平衡器。在正常的组织几乎都表达,并且在大部分的肿瘤中都可以发现 PinX1 的缺失[6],因此被公认为是一种重要的抑癌基因。

宫颈癌细胞系中 PinX1 作为野生型 p53 的一个新靶基因,可以被 HPV E6 沉默[7],参与宫颈癌的发生、发展,但是在宫颈癌组织中是否存在上述信号通路机制尚不清楚。流行病学研究证实,鳞癌的发病率更高[8]。因此,本研究选择宫颈鳞癌患者的组织标本,从基因及蛋白水平分别检测 HPV E6、野生型 p53、PinX1 的表达,并分析探讨上述几个分子在宫颈鳞癌发生、发展中的相关性,以期为宫颈鳞癌的临床诊治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 临床标本和试剂

选择 2013 年 3 月至 2014 年 2 月第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科 17 例临床分期为ⅠB1 ~ ⅡA2 期的宫颈鳞癌患者宫颈鳞癌及距病灶 2 cm 的癌旁组织,标本均经病理证实,宫颈鳞癌纳入标准依据国际妇产科联盟(FIGO,2009 年)临床分期标准,患者术前未行放、化疗,年龄 30 ~ 58(45.1 ± 6.7)岁。选取正常宫颈组织 10 例作为对照,纳入标准:无 HPV 感染、无恶性肿瘤、子宫颈疾病的子宫肌瘤患者,年龄 44 ~ 58(49.3 ± 5.6)岁。本研究经第三军医大学大坪医院野战外科研究所伦理委员会批准,研究对象均签署知情同意书。

TRIzol 总 RNA 提取试剂盒购自康为世纪公司,M-MLV 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司,Oligo DT 和 dNTP 混合液购自天根公司,HPV E6、p53、PinX1 和 β-actin 的特异性引物由上海生工合成,2 × SYBR Green Supermix 购自 TaKaRa 公司;一抗:鼠抗人 HPV16 + HPV18 E6 抗体(ab70)、鼠抗人 p53 抗体(ab28)、兔抗人 PinX1 抗体(ab118255)均购自 Abcam 公司,GADPH 抗体购自碧云天公司;二抗:HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 购自碧云天公司,二抗:二步法免疫组化试剂 PV-9000 购自北京中杉金桥公司。

1.2 Real-time PCR 检测 HPV E6、p53、PinX1 mRNA 表达

根据总 RNA 试剂盒 TRIzol 使用说明书,提取宫颈组织中的总 RNA 并逆转录 cDNA。各引物序列见表 1。Real-time PCR 总反应体系 20 μL:上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,cDNA 1 μL,2 × SYBR Green Supermix 10 μL,灭菌超纯水 8 μL;Real-time PCR 反应条件:95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 40 个循环;为计算基因的变化量,用 β-actin 作为内参,每个样品 3 个复孔,每个复孔之间循环数相差 <0.5 作为有效数据取平均值(CT)。根据所得各组 CT 值计算宫颈鳞癌、癌旁及正常组织中 HPV E6、p53、PinX1 的 mRNA 相对表达量,用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 值表示。

表 1 基因引物扩增序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
HPV E6	上游:5′- GCAATGTTTCAGGACCCACAG -3′ 下游:5′- ACTGTTGCTTGCAGTACACAC -3′	112
p53	上游:5′-TGCGTGTGGAGTATTTGGATGAC-3′ 下游:5′-CAGTGTGATGATGGTGAGGATGC-3′	170
PinX1	上游:5′-GAAAGGGTTTAGGGGCTCAG -3′ 下游:5′-TCCGAGGAATCTGTGGTTTC -3′	187
β-actin	上游:5′-GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT-3′ 下游:5′-GAAGTGGGGTGGCTTTTAGGA-3′	157

1.3 Western blot 检测 HPV E6、p53、PinX1 的蛋白表达

加入含有蛋白酶抑制剂(Roche)的 RIPA 裂解液(1∶10)1 mL,玻璃匀浆器充分研磨,裂解,震荡,于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清并用 BCA 法测量蛋白浓度,经浓度标化后进行 Western blot 检测。取 60 μg 蛋白样品上样进行 10% SDS-PAGE(12% SDS-PAGE 用于 HPV E6);一抗工作浓度:鼠抗人 HPV16 + HPV18 E6(1∶250),鼠抗人 p53(1∶1 000),兔抗人 PinX1(1∶1 000),内参 GADPH(1∶5 000),一抗 4 ℃摇床过夜;用含 0.1% Tween20 的 PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,二抗:使用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔

IgG(1∶5 000),37 ℃摇床2 h;按ECL试剂盒说明书进行电化学发光检测。

1.4 免疫组化检测HPV E6、p53、PinX1的表达、分布

标本组织用4%多聚甲醛溶液固定24 h,切片,厚度5 μm,60 ℃烤片2 h,二甲苯脱蜡,柠檬酸高温高压抗原修复;一抗4 ℃过夜,一抗工作浓度:鼠抗人HPV16+HPV18 E6(1∶100),鼠抗人p53(1∶100),兔抗人PinX1(1∶100);二抗pv-9000孵育;DAB染色,复染,梯度酒精脱水,中性树脂封片,40倍物镜拍片。

1.5 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$形式表示,采用SPSS 17.0统计软件对计量数据行单因素方差分析及t检验,采用Spearman相关分析分析HPV E6、野生型p53和PinX1表达水平的关系。

2 结果

2.1 正常组织、癌旁组织和宫颈鳞癌组织中HPV E6、p53、PinX1 mRNA表达

在宫颈鳞癌中HPV E6的表达明显高于癌旁($P<0.01$),p53及PinX1在宫颈鳞癌组织中表达下降($P<0.05$),低于癌旁组织及正常组织(表2)。

表2 Real-time PCR检测HPV E6、p53、PinX1 mRNA表达($\bar{x}\pm s$)

组别	HPV E6	p53	PinX1
宫颈鳞癌组织	2.27±0.32	0.22±0.06	0.24±0.06
癌旁组织	1.09±0.19[a]	0.47±0.08[a]	0.46±0.09[a]
正常组织	–	0.99±0.09[a]	1.03±0.10[a]

a:$P<0.05$,与宫颈鳞癌组织比较

2.2 正常组织、癌旁组织和宫颈鳞癌组织中HPV E6、p53和PinX1蛋白的表达及分布

免疫组化结果(图1)显示:HPV E6阳性细胞呈棕黄色,主要定位于肿瘤细胞的细胞核和细胞质,以细胞质表达为主;而p53及PinX1阳性表达主要定位于细胞核。Western blot结果(图2)显示:10例正常组织中,8例HPV E6几乎无表达,2例HPV E6微量表达;宫颈鳞癌组织中HPV E6的表达水平明显高于癌旁组织,而p53和PinX1的表达水平在宫颈鳞癌组织中有降低。

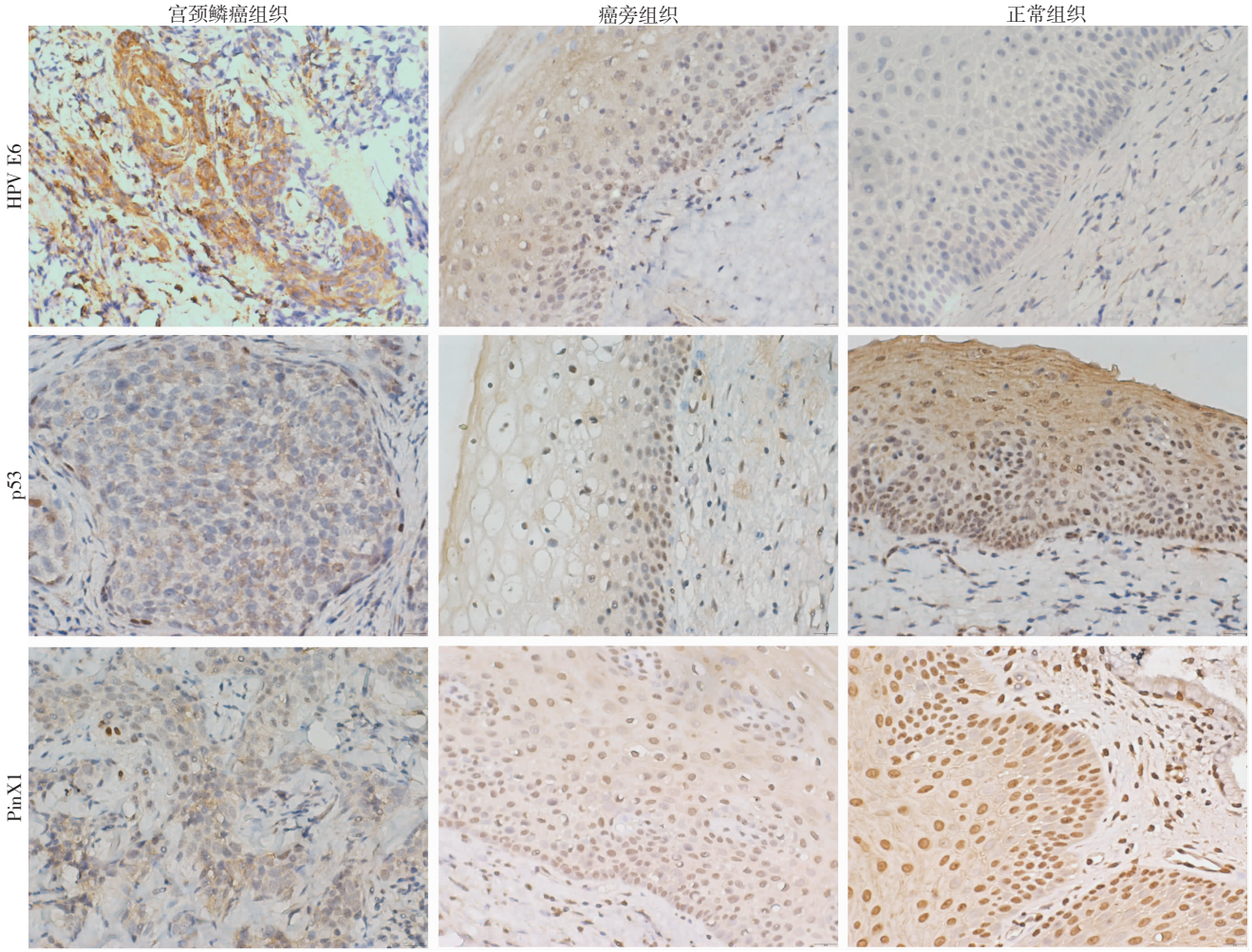
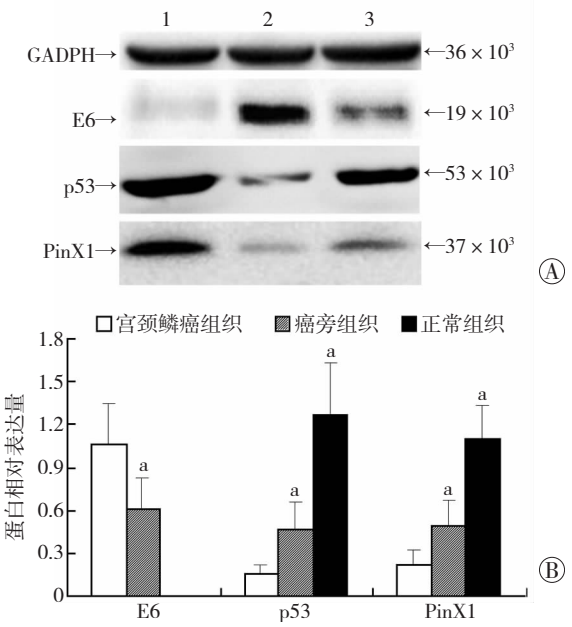


图1 免疫组织化学检测HPV E6、p53和PinX1在3种组织中的表达和分布 (S-P ×400)



A：Western blot 结果　1：正常组织；2：宫颈癌组织；3：癌旁组织；B：半定量分析　a：$P<0.01$，与宫颈鳞癌组织比较

图 2　Western blot 检测宫颈鳞癌组织、癌旁组织和正常组织中 E6、p53 和 PinX1 的蛋白表达

2.3　HPV E6、p53、PinX1 表达的相关性分析

Spearman 相关分析结果显示：宫颈鳞癌组织中 p53 与 E6 的表达水平呈负相关（$R=-0.605$，$P<0.01$），PinX1 与 E6 的表达水平呈负相关（$R=-0.496$，$P<0.05$），p53 与 PinX1 的表达水平呈正相关（$R=0.824$，$P<0.01$）。

3　讨论

99% 宫颈癌患者合并 HPV 感染，大多数女性在感染高致病 HPV 后机体能自动清除感染，少数（1% ~ 3%）的患者存在持续的 HPV 感染[9]。研究已证实高致病的 HPV E6 蛋白是宫颈癌发生和维持恶性肿瘤表达必不可少的肿瘤蛋白[3]。本研究亦发现高危型 HPV E6 在宫颈鳞癌组织中表达上调，而 HPV E6 在正常宫颈组织中几乎不表达，或因炎症刺激所致微量表达，进一步证实高危型 HPV E6 可能在宫颈鳞癌发病机制中发挥着重要作用。

P53 是肿瘤相关重要因子，分为野生型和突变型，野生型 p53 是重要的信号调节因子，称为基因组守护者[10]。研究发现，大约有一半的人类肿瘤中 p53 基因发生了突变，突变型 p53 使损伤的 DNA 以及发生突变的细胞进行复制，p53 从抑癌基因转变成了癌基因。但在宫颈癌的相关研究中，p53 很少发生突变，研究发现野生型 p53 的失活对宫颈癌发生起着重要作用[11]。近期研究表明，在 HPV 感染的宫颈癌细胞中，E6 蛋白可下调野生型 p53，其主要机制有：① 通过与野生型 p53 蛋白相互作用，并招募 E6 相关蛋白（E6 associated protein，E6AP），从而形成“E6-p53-E6AP”三聚体，进而通过 E6AP 的泛素连接酶作用，启动对野生型 p53 的泛素化蛋白酶体降解过程[12]，致使野生型 p53 水平下降；② 通过抑制野生型 p53 的表达而下调野生型 p53 水平。此外，近年研究还证实，野生型 p53 蛋白是一种重要的转录因子，调节多个基因的表达调控[13]。高致病 HPV E6 通过与野生型 p53 的核心区域绑定从而对野生型 p53 表达水平进行下调[14]，通过抑制野生型 p53 的活性进而导致促进细胞凋亡的能力明显降低，在其他因素的诱导下，进展为宫颈癌。本研究中，我们从基因及蛋白水平均发现宫颈鳞癌组织中 HPV E6 表达水平上调，而野生型 p53 表达水平下降，结合文献报道，我们推测野生型 p53 表达水平下降可能与 HPV E6 表达水平上调有关。

人体正常细胞中，端粒酶抑制因子 PinX1 的过度表达会抑制端粒酶的活性，诱导细胞凋亡。PinX1 的主要功能包括：① 通过抑制 hTERT 的活性而使细胞增殖处于可控的正常过程[15]；② 维持细胞在有丝分裂过程中端粒的完整性[16]，并增强染色体的稳定性。体外实验和体内裸鼠成瘤实验发现，PinX1 的过表达有显著的抑瘤效果，而 PinX1 的缺失则有显著促瘤作用[17]。在前列腺癌、胃癌、成神经管细胞瘤、卵巢癌中证实了 PinX1 在保持染色体的稳定性起着重要作用[6]，PinX1 表达下调的机制对相关肿瘤的治疗有很重要的意义，但在宫颈癌组织中其表达情况目前尚不清楚。本研究从基因及蛋白水平检测了宫颈鳞癌组织中 PinX1 的表达情况，结果显示宫颈鳞癌组织中 PinX1 表达显著低于正常对照组，提示其表达水平降低可能导致端粒酶活性增强是诱发宫颈癌发生、发展的重要机制之一。文献[6]报道 PinX1 与野生型 p53 有特异结合位点，当野生型 p53 受到 HPV E6 调节而表达降低时，野生型 p53 特异结合位点作用减弱，PinX1 的转录因此减弱。本研究亦发现宫颈鳞癌组织中野生型 p53 表达水平显著下降，我们认为野生型 p53 的表达水平与 PinX1 存在正相关性，宫颈鳞癌中野生型 p53 表达的降低极可能是导致 PinX1 的表达水平下降的重要因素之一，但 Pinx1 是否受野生型 p53 以外其他基因的调控，在宫颈鳞癌中端粒酶的活性和长度的变化是否与 HPV E6、野生型 p53、Pinx1 表达存在相关性，还需更多深入的研究。

本研究从基因及蛋白水平证实:宫颈鳞癌组织中HPV E6表达水平明显高于癌旁组织,与野生型p53以及Pinx1表达量呈负相关。PinX1在癌组织中表达水平明显低于癌旁以及正常组织,并且与野生型p53的表达量呈正相关的关系。该结果为文献[7]中宫颈癌细胞系的研究结果提供了佐证。本研究进一步证实了宫颈鳞癌的发生可能与HPV E6表达显著上调相关,表达上调的HPV E6可能通过抑制组织中野生型p53、PinX1表达,使得端粒酶的活性增强,该途径可能是导致宫颈鳞癌的发生、发展的重要发病机制之一。本研究结果为深入研究宫颈鳞癌的发生、发展提供理论基础,有望为将来宫颈鳞癌临床诊治提供新的新靶点。

参考文献:

[1] Woodman C B, Collins S I, Young L S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(1): 11-22.

[2] Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, *et al*. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses [J]. Virus Genes, 2010, 40(1): 1-13.

[3] Jiang P, Yue Y. Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review) [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(1): 3-7.

[4] Jiang J, Zhao L J, Zhao C, *et al*. Hypomethylated CpG around the transcription start site enables TERT expression and HPV16 E6 regulates TERT methylation in cervical cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2012, 124(3): 534-541.

[5] Yoo J E, Park Y N, Oh B K. PinX1, a telomere repeat-binding factor 1 (TRF1)-interacting protein, maintains telomere integrity by modulating TRF1 homeostasis, the process in which human telomerase reverse Transcriptase (hTERT) plays dual roles [J]. J Biol Chem, 2014, 289(10): 6886-6898.

[6] Lai X F, Shen C X, Wen Z, *et al*. PinX1 regulation of telomerase activity and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31: 12.

[7] Wu G, Liu D, Jiang K, *et al*. PinX1, a novel target gene of p53, is suppressed by HPV16 E6 in cervical cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839(2): 88-96.

[8] Kjaer S K, Munk C, Junge J, *et al*. Carcinogenic HPV prevalence and age-specific type distribution in 40, 382 women with normal cervical cytology, ASCUS/LSIL, HSIL, or cervical cancer: what is the potential for prevention? [J]. Cancer Causes Control, 2014, 25(2): 179-189.

[9] Meijer C J, Snijders P J. Cervical cancer in 2013: Screening comes of age and treatment progress continues[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2014, 11(2): 77-78.

[10] Smeenk L, van-Heeringen S J, Koeppel M, *et al*. Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17574.

[11] Denk C, Butz K, Schneider A, *et al*. p53 mutations are rare events in recurrent cervical cancer [J]. J Mol Med (Berl), 2001, 79(5/6): 283-288.

[12] Massimi P, Shai A, Lambert P, *et al*. HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background [J]. Oncogene, 2008, 27(12): 1800-1804.

[13] Li M, He Y, Feng X, *et al*. Genome-wide studies of the transcriptional regulation by p53 [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(7): 684-687.

[14] Shi M, Du L, Liu D, *et al*. Glucocorticoid regulation of a novel HPV-E6-p53-miR-145 pathway modulates invasion and therapy resistance of cervical cancer cells [J]. J Pathol, 2012, 228(2): 148-157.

[15] Soohoo C Y, Shi R, Lee T H, *et al*. Telomerase inhibitor PinX1 provides a link between TRF1 and telomerase to prevent telomere elongation [J]. J Biol Chem, 2011, 286(5): 3894-3906.

[16] Yonekawa T, Yang S, Counter C M. PinX1 localizes to telomeres and stabilizes TRF1 at mitosis [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(8): 1387-1395.

[17] Zhou X Z, Huang P, Shi R, *et al*. The telomerase inhibitor PinX1 is a major haploinsufficient tumor suppressor essential for chromosome stability in mice [J]. J Clin Invest, 2011, 121(4): 1266-1282.

(**收稿**:2014-11-05;**修回**:2014-12-11)

(编辑　吴培红)