维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0846 - 03

宫颈癌前病变中 ΔNP63 与 HPV16 E7 表达的研究

贾 英,吴 瑾,唐良萼

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究宫颈上皮内瘤变中 ΔNP63 和 HPV16 E7 mRNA 的表达情况,寻找用于临床评估 CIN 病变进展趋势的生物学标志物。方法:收集临床 71 例薄层液基细胞标本,采用 SP 免疫组化法检测细胞中 ΔNP63 的蛋白表达,RT - PCR 法检测残留标本中 HPV16 E7 的 mRNA 转录情况。结果:1. ΔNP63 定位于异常鳞状上皮细胞和腺细胞,在 CIN 中表达高于炎症组($P < 0.05$);2. HPV16 E7 在 CIN 中表达明显高于炎症组($P < 0.05$);3. CIN 中 ΔNP63 与 HPV16 E7 的检测结果具有较好的一致性。结论:ΔNP63 可作为 CIN 的生物学标志物辅助细胞学筛查;ΔNP63 可间接反映 HPV16 E7 的转录情况,有利于临床评估高危型病毒 HPV16 的致瘤能力。

【关键词】CIN;ΔNP63;HPV16 E7

【中国图书分类法分类号】R737.3 【文献标识码】A 【收稿时间】2005 - 06 - 20

Study on Expression of ΔNP63 and HPV16 E7 in Cervical Intraepithelial Neoplasia

JIA Ying, et al

(*Department of Obstetric and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】objective: To examine the potential of ΔNP63 and HPV16 E7 as one of biomarkers for cervical premalignant lesions in ThinPrep smears, and to search for the identification of specific biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) as a new examining method to evaluate evolution of CIN. Method: Streptavidin peroxidase (SP) method was used. Immunocytochemical analysis of ΔNP63 expression was performed in 71 ThinPrep smears. RT - PCR was used to detect the mRNA of HPV16 E7 in 71 ThinPrep liquid - based smears specimens. Result: Positive expression rate of ΔNP63 in CIN was higher than that in inflammation ($P < 0.01$). The positive expression rate of HPV16 E7 in CIN was higher than that in inflammation ($P < 0.01$). Conclusion: Overexpression of ΔNP63 can be a useful marker to reduce false - negative cytology interpretation. ΔNP63 should show indirectly the activation of HPV16 E7, which should be beneficial to evaluate the tumorigensis of HPV 16.

【Keywords】cervical intraepithelial neoplasia;ΔNP63;HPV16 E7

研究宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia,CIN)的特异性生物标志物,协助细胞学检查,对于提高宫颈疾病的筛查水平,指导临床对 CIN 的进展趋势判断有重要的意义。本研究利用 SP 免疫组化法检测 ΔNP63 在各级 CIN 中的表达情况,并利用 RT - PCR 法检测薄层液基细胞学(ThinPrep Cell Test,TCT)残留标本中 16 型人乳头状瘤病毒致瘤蛋白 E7(HPV16 E7) mRNA 的表达水平,探讨 ΔNP63 与 HPV16 E7 作为 CIN 生物标志物的可行性,以及两者对 CIN 临床筛查的意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

随机选取 2004 年 8 月 ~ 2004 年 11 月在重庆医科大学附属第一医院临床疑诊为 CIN 行 TCT 检查的 71 例患者,年龄 21 ~ 63 岁,平均 36.8 岁,所有患者在取样前均未接受任何妇科相关疾病的治疗,每个 TCT 标本均制作 2 张涂片,并收集 TCT 残留标本的细胞沉渣备用。所有患者均行阴道镜下活组织检查,其中,炎症 21 例,CIN Ⅰ 19 例,CIN Ⅱ 10 例,CIN Ⅲ 21 例。

1.2 实验方法

1.2.1 SP 免疫组化法(检测 ΔNP63)

作者介绍:贾 英(1971 -),女,硕士,
主要研究方向:宫颈癌诊断、治疗及预防。

维普资讯 http://www.cqvip.com

采用链霉卵白素－过氧化物酶(streptavidin peroxidase, SP)免疫组织化学法,用△NP63 单克隆抗体对 TCT 宫颈脱落细胞进行免疫组织学染色,实验步骤按试剂盒说明书进行。设宫颈 Hela 细胞为阳性对照,PBS 代替一抗为阴性对照。每张涂片记数任意十个不同的高倍视野,计算阳性细胞所占比例,<10% 为阴性,≥10% 且 <50% 为阳性,≥50% 为强阳性。

1.2.2 RT－PCR 法(检测 HPV16 E7 mRNA 的表达)

TCT 残留标本的总 RNA 提取参照 Trizol 试剂盒操作程序进行。逆转录采用 TaKaRa 公司的 AMV RT 酶,方法按说明书进行。HPV16 E7 基因引物设计参照文献[1]。上游引物:5′－ AGCTCAGAGGAGGAGGATGA －3′,下游引物:5′－GGTTTCTGAGAACAGATGGG －3′,预计扩增片段长度为 203bp。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5min;94℃ 45s,58℃ 45s,72℃ 45s,共 30 个循环;72℃ 再延伸,10min。取 PCR 产物 5μl,在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,紫外灯下观察摄像。

1.2.3 统计学处理

分析病理学分级中,各组 ΔNP63 的蛋白表达以及 HPV16 E7 mRNA 的阳性表达情况,用 SAS8.0 系统进行统计学处理,采用 χ^2 检验、确切概率 χ^2 检验、kappa 检验,$P < 0.05$时认为差异有显著性。

2 结 果

2.1 病理学诊断结果(见表 1)

表 1 71 例患者的病理学诊断

诊断结果	病理学诊断			
	炎症	CIN Ⅰ	CIN Ⅱ	CIN Ⅲ
例数	21	19	10	21
比例(%)	29.58	26.76	14.08	29.58

2.2 ΔNP63 免疫组化检测情况

ΔNP63 定位于异常的鳞状上皮细胞中和部分异常腺细胞中,以胞浆为主,部分异常细胞核也有着色,为粗细不等的棕黄色颗粒,正常鳞状细胞中无着色。△NP63 免疫组化染色的阳性表达率随病理分级的增高而增加,着色强度逐级增加(见图 1～4)。炎症组△NP63 阳性表达率为 4.76%(1/21),CIN Ⅰ为 84.21%(16/19),CIN Ⅱ为 100%(10/10),CIN Ⅲ为 100%(21/21)。各组宫颈上皮瘤变组(CIN Ⅰ、CIN Ⅱ、CIN Ⅲ)的阳性表达率明显高于炎症组,差异有极显著性($P < 0.001$),CIN Ⅰ的阳性表达率低于 CIN Ⅱ、CIN Ⅲ组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 HPV16 E7 RT－PCR 检测结果与病理学关系(见表 2、图 5)

TCT 残留标本中 HPV16 E7 的阳性表达率,随 CIN 病理分级呈现逐级上升的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);但各级 CIN 组的阳性率均高于炎症组,差异有显著性意义($P < 0.005$)。

表 2 病理学诊断与 HPV16 E7 RT－PCR 检测结果

病理学诊断	例数	HPV16 E7		阳性率(%)	P
		－	＋		
炎症	21	21	0	0	<0.005*
CIN Ⅰ	19	13	6	31.58	>0.05**
CIN Ⅱ	10	4	6	60.00	<0.001***
CIN Ⅲ	21	8	13	61.90	

注:* 炎症 vs CIN Ⅰ;** CIN Ⅰ vs CIN Ⅱ,CIN Ⅰ vs CIN Ⅲ与 CIN Ⅱ vs CIN Ⅲ;*** 炎症 vs CIN Ⅱ以及炎症 vs CIN Ⅲ

2.4 ΔNP63 与 HPV16 E7 的相关关系

71 例标本的 ΔNP63 与 HPV16 E7 检测结果关系如(表 3)所示。ΔNP63 与 HPV16 E7 在 CIN 中均呈高表达,经 Kappa 检验,两者在宫颈上皮细胞中的表达具有较好的一致性。

表 3 ΔNP63 与 HPV16 E7 表达的相关性

生物学标志物		HPV16 E7		合计	κ	P
		阴性	阳性			
ΔNP63	阴性	23	0	23	0.4132	<0.001
	阳性	23	25	48		
合计		46	25	71		

3 讨 论

目前研究认为,宫颈癌前病变(CIN)的发生、发展是一个多基因参与的复杂变化过程,多种生物分子的调节异常,导致宫颈上皮细胞异常增生和异常细胞永生化,最终导致恶变。研究这些分子水平的变化有利于探讨 CIN 的相关标志物,寻找有价值的 CIN 筛查指标,指导阻止宫颈癌的发生。

凋亡相关基因 P63 是新近发现的一种 P53 家族转录因子,编码基因定位于 3q27～29,其序列和功能与 P53 有很高的同源性[2]。它可以通过不同的启动子进行转录表达,从而产生多种不同功能的 P63 异构体。ΔNP63 是一种缺乏转录激活 TA(transcription activation)区域的 P63 异构体,它通过显性抑制的方式阻断 P63 其它异构体、P73 异构体以及 P53 的转录活性的能力,发挥抗凋亡的作用[3]。P63 的异构体在人体各组织中存在的广泛表达,P63 在调节上皮细胞增殖和分化过程中发挥着重要作用[4]。Crook T 等[5]研究发现,在头颈部鳞状细胞癌、

维普资讯 http://www.cqvip.com

未分化鼻咽癌及膀胱癌中主要表达 ΔNP63 异构体，提示 ΔNP63 异构体是一个很好的抑制野生型 P53 功能的基因，ΔNP63 的高表达可能是肿瘤中 P53 灭活的一个新机制。本研究结果表明，ΔNP63 在宫颈异常鳞状上皮细胞和异常腺细胞中高表达，CIN 中的 ΔNP63 阳性率明显高于炎症组，ΔNP63 可望成为一种 CIN 的生物学标志物。通过免疫组化检测 TCT 涂片中 ΔNP63 表达，有利于区分 TCT 片中异常细胞，辅助细胞学检测，降低筛查漏诊率。且在 CIN 中，随着病变级别的升高，ΔNP63 的阳性强度逐渐增高，推测 ΔNP63 的高表达可作为 CIN 预后的监测指标。宫颈癌是一种感染性疾病，已得到共识，其病因主要是人乳头状病毒感染引起。其中高危型人乳头状瘤病毒(HR - HPV)是引起宫颈癌及癌前病变的主要始动因素，国外已开始利用 HR - HPV DNA 进行宫颈癌筛查。HR - HPV 为维持自身的生存和复制，能合成一系列蛋白质，包括自身结构蛋白质(衣壳蛋白)和致瘤蛋白(E2、E6、E7 等转录因子)。这些致瘤蛋白干扰正常细胞的调控，导致组织细胞异常增生、遗传变异和转化，从而病毒的持续存在引发宫颈上皮瘤变，最终引起癌变。其中，最常见的 HR - HPV 是 HPV16 型，HPV16 包括八个病毒基因编码区编码六个非结构蛋白和两个结构蛋白，三个非结构蛋白，E5、E6、E7 因其在体外实验中能诱导细胞转化而被称为致瘤蛋白，且 E6、E7 蛋白能在体内诱导肿瘤的发生[6]，E6、E7 基因是 HPV 最主要的导致细胞永生化的病毒癌基因，E6、E7 的持续表达是引起和维持宫颈癌瘤变亚型细胞所必须的。本研究中，HPV16 E7 在 CIN 中为高表达，炎症中无表达。作者认为，检测 HR - HPV16 E7 可直接反映 HPV 的复制和转录的活化状态，可作为另一个宫颈瘤变的生物标志物。

本研究发现，ΔNP63 与 HPV16 E7 的表达在 CIN 中有较好的一致性，提示 ΔNP63 可间接反映 HPV16 E7 的表达情况。但是，由于 CIN 的发生机制是复杂的，目前对于 ΔNP63 在 CIN 中高表达的相关机制还不十分清楚，ΔNP63 与 HR - HPV 致癌基因转录活化的关系，尚有待于将来不断的深入研究来逐渐明确。

综上所述，本研究认为 ΔNP63 可作为 CIN 的生物学标志物，有较高的特异性和灵敏性，可望成为一种新的 CIN 筛查辅助方法，而 ΔNP63 与 HPV16 E7 相结合有利于从分子生物学水平对 CIN 患者的进行评估，尤其是对于早期宫颈瘤变的患者，二者均可用作评判患者体内 HPV 的活化状态的生物学指标，可望为临床提供一个评价 CIN 进展危险性的检测手段。而这两个生物学标志物的临床运用可行性还需进一步研究讨论。

参 考 文 献

[1] Li Tao, Lu Zheming, Chen Keneng, et al. Human papillomavirus type 16 is an important infectious factor in the high incidence of esophageal cancer in Anyang area of China [J]. Carcinogenesis, 2001;22(6): 929 - 934.

[2] Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. p63, a p53 homolog at 3q27 - 29, encodes multiple products with transactivating, death - inducing, and dominant - negative activities [J]. Mol Cell. 1998;2(3):305 - 316.

[3] Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues [J]. Clin Cancer Res, 2002;8(2):494 - 501.

[4] Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development [J]. Nature, 1999;398(6729): 714 - 718.

[5] Crook T, Nicholls JM, Brooks L, et al. High level expression of deltaN - 63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncogene, 2000;19(13):3439 - 3444.

[6] Stoppler H, Hart Mann DP, Sherman L, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere lengh [J]. J Biol Chem, 1997;272:13332.