

TGF- β_1 的表达、HPV16 E7 基因多态性与 宫颈癌的相关性

罗丽丽¹ 程欣² 蔡红兵²

¹河南省平顶山市新华区人民医院妇产科 河南 平顶山 467000

²武汉大学中南医院妇瘤科/湖北省肿瘤医学临床研究中心/
肿瘤生物行为湖北省重点实验室 湖北 武汉 430071

摘要 目的:探讨宫颈病变中 TGF- β_1 的表达、HPV16 E7 型内变异与宫颈癌的关系。方法:对宫颈组织标本 [39 例宫颈鳞癌,34 例宫颈上皮内瘤变(CIN)Ⅱ-Ⅲ级与 64 例 CIN I 级宫颈组织] 进行免疫组化法观察 TGF- β_1 蛋白表达,同时多重 HPV16 E7 引物进行巢式 PCR 扩增,并选择阳性扩增的基因片段 DNA 进行纯化、测序,检测基因变异。结果:TGF- β_1 的阳性率在 CIN I 组、CIN Ⅱ-Ⅲ组、浸润癌组中分别为:14.06%,41.18%,82.05%,其表达与宫颈病变的进展程度呈正相关($P < 0.001$, $r = 0.556$)。在宫颈鳞癌临床分期各组别中,TGF- β_1 的阳性率在 I a、I b、Ⅱ a、Ⅱ b 组中依次增高($P = 0.024$)。检测到 HPV16 E7 阳性样本共 55 例(CIN I 组 9 例、CIN Ⅱ-Ⅲ组 14 例和浸润癌组 32 例),其中原型 15 例。HPV16 E7 基因突变株最常见的为 T846C 变异株,该变异株在 CIN I、CIN Ⅱ-Ⅲ和鳞癌组中突变频率分别为 66.67%、78.57%、81.25%,总检出率为 78.18%。TGF- β_1 的表达在 HPV16 E7 原型组和 HPV16 E7 A647G 突变株组中无统计学差异($P = 0.456$)。结论:TGF- β_1 的表达与宫颈鳞癌的发生发展呈正相关,TGF- β_1 可能成为宫颈癌早期防治检测指标之一。HPV16 E7 A647G 突变株较原型未通过改变 TGF- β_1 介导的信号途径影响其致癌性。

关键词 宫颈癌;宫颈上皮内瘤变;转化生长因子- β_1 ;HPV16 E7;基因多态性

中图分类号 R737.33 **文献标识码** A **文章编号** 1671-8852(2014)04-0507-04

TGF-Beta 1 Expression and HPV16 E7 Polymorphism in Relation to Cervical Cancer

LUO Lili¹, CHENG Xin², CAI Hongbing²

¹Dept. of Gynecology and Obstetrics, Xinhua District People's Hospital of Pingdingshan,
Pingdingshan 441021, Henan, China;

²Dept. of Gynecologic Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract

Objective: To investigate the prevalence of HPV16 E7 polymorphism and the expression of transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1) in cervical cancer and precursor lesions. **Methods:** A total of 39 patients with cervical squamous-cell carcinoma (SCC) and 34 patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) Ⅱ-Ⅲ and 64 patients with CIN I were obtained from women undergoing biopsy or surgery. TGF- β_1 expression was examined by immunocytochemical staining.

作者简介:罗丽丽,女,1971-,主治医师,主要从事妇科肿瘤方面研究

通讯作者:蔡红兵,女,1961-,医学博士,主任医师,教授,主要从事妇科肿瘤方面研究

HPV16 E7 was assayed by polymerase chain reaction (PCR) and PCR-directed sequencing method, and the variations of the HPV16 E7 gene were investigated. **Results:** The prevalence of TGF- β_1 was 14.06% in the CIN I group and 41.18% in the CIN II-III group and 82.05% in the SCC group. The level of TGF- β_1 expression steadily increased by the damaged degree of cervical epithelium ($P < 0.001$, $r = 0.556$). In the groups classified by FIGO clinical stage, the positive expression rate of TGF- β_1 was increasing from stage I a to II b ($P = 0.024$). Fifty-five (CIN I, $n = 9$; CIN II-III, $n = 14$; SCC, $n = 32$) of the 137 samples contained HPV16 E7 DNA. The most frequently found variation was T846C (78.18%). No significant difference was found in the frequencies of TGF- β_1 expression between A647G variation group and prototype sequences group ($P = 0.456$). **Conclusion:** There was positive correlation between TGF- β_1 expression and squamous carcinoma of the cervix. TGF- β_1 possibly becomes a screening indicator for cervical cancer. It was not found that HPV16 E7 A647G variation plays a role in cervical carcinogenesis through TGF- β_1 connected pathway.

Key Words Cervix Neoplasms; CIN; TGF- β_1 ; HPV16 E7; Polymorphism

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一。93%的宫颈癌组织样本中可以检出人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV),其中 HPV16 型感染率超过 50%,是世界范围内宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌中最常见的亚型。HPV16 E7 蛋白通过与细胞内抑癌蛋白 pRB 的作用,抑制 p53 的功能,E7 持续表达会引起细胞恶性转化。某些 HPV16 E7 基因序列突变可能引起病毒致癌性改变。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1) 是一种多功能的细胞因子,它的作用包括调节细胞的增殖和分化、转移、黏附、血管形成细胞外基质形成、免疫功能^[1]。TGF- β_1 表达的改变是与 HPV 相关的宫颈癌的重要形成机制,在宫颈鳞癌中 TGF- β_1 的表达以及 HPV E7 对 TGF- β_1 的调节作用尚存在争议^[2],本研究通过免疫组化法观察 TGF- β_1 蛋白表达和 HPV16 E7 基因测序,探讨宫颈病变中 TGF- β_1 的表达、HPV16 E7 型内变异与宫颈癌发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料和器材

1.1.1 研究对象 收集武汉大学中南医院妇瘤科 2007 年 5 月-2010 年 1 月间住院手术病人的新鲜宫颈组织标本 137 例,包括 39 例宫颈鳞癌(squamous-cell cervical carcinoma, SCC),34 例 CIN II-III 及 64 例 CIN I。所有样本均经病理诊断确诊,于术后将标本置液氮处理后立即保存于 -70℃ 低温冰箱中。

1.1.2 主要试剂 DNA 2×Taq PCR Mix 及 DNA maker DL500 均购自 QIAGEN(北京天根)公

司,PCR 引物由 Sangon Bioengineering Co. Ltd. (上海生工)合成。兔源性 TGF- β_1 多克隆抗体及免疫组化 SP 试剂盒均购自武汉芸萃生物技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 组织 DNA 的提取 用常规蛋白酶 K-苯酚抽提法分离纯化样品组织 DNA,产物溶于 TE 缓冲液,置 -20℃ 冰箱中备用。提取的基因组经过 β -globin 球蛋白引物(β -globinF, β -globinB)PCR 扩增,验证所提取 DNA 质量。

1.2.2 免疫组化 SP 法检测 TGF- β_1 选择典型病理区域作石蜡包埋切片,采用免疫组化 SP 染色,试验步骤按试剂盒说明进行,用磷酸盐缓冲液 PBS 代替一抗作阴性对照。封片后于显微镜下观察。参照 Comerci^[3]的方法进行半定量分析 TGF- β_1 在 CIN I、CIN II-III 上皮细胞的表达,分级如下:阴性为上皮细胞无染色,+ 为 1/3 上皮层染色,++ 为 2/3 上皮层染色,+++ 为全部上皮层染色。由于浸润性鳞癌无明确的层次,故按以下分级:阴性为 $\leq 5\%$ 癌细胞染色,+ 为 6%-30% 癌细胞染色,++ 为 31%-70% 癌细胞染色,+++ 为 71%-100% 癌细胞染色。

1.2.3 引物的设计和合成 参照 HPV16 E7 基因序列及引物设计原则,采用引物设计软件自行设计 HPV16 E7 巢式 PCR 引物(表 1),引物由上海生工公司合成。

表 1 HPV16 E7 基因引物序列和 PCR 产物长度

名称	序列(5'-3')	长度(bp)
Outside F	CATAATATAAGGGGTCGGTGGA	682
Outside R	CTGCATCTCTATGTTGTTTG	
Inside F	GCAGATCATCAAGAACACG	487
Inside R	CAAATCTTCACCTGTATCACTG	

1.2.4 HPV16 E7 检测并测序 扩增 HPV16 E7

的 PCR 反应总体系为 50 μl, 其中 DNA 样本 3 μl, 上游引物和下游引物各 1 μl, 2×Taq PCR Mix 25 μl, 去离子双蒸水 20 μl。HPV16 质粒为阳性对照。扩增 HPV16 E7 引物的反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 54 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 进行 32 个循环, 72 ℃ 最后延伸 300 s, 挑选出 682 bp 处出现 DNA 带者分别用 HPV16 E7 内侧引物进行第 2 次 PCR 扩增。

1.2.5 核酸序列检测 将 PCR 扩增的阳性 DNA 片段产物送南京思特进测序部纯化并双向测序。测序结果使用 DNAMAN version 5.2.2 软件分析, 以 GenBank 的德国标准株 (AF534061) 作为 HPV16 E7 原型进行比对分析 HPV16 E7 基因区的核苷酸序列和氨基酸序列的改变。

1.3 统计方法 所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析。资料中组间率的比较用卡方检验, 相关性检验采用 Spearman 等级相关分析。以 α=0.05 为检验标准, 当 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV16 E7 与宫颈鳞癌及其癌前病变的关系 HPV16 E7 在 CIN I 组、CIN II-III 组和浸润癌组中的检出率分别为: 14.06%, 41.18% 和 82.05%, 各组 HPV16 E7 的阳性率有显著差异 (P<0.001)。HPV16 E7 的阳性率与宫颈病变的进展程度呈负相关 (P<0.001, r=-0.574)。经基因测序, 比对测序结果显示共 15 例与标准株序列相同, 40 例 HPV16 E7 有型内变异, 检出结果如下: ①最常见的突变位点是 T846C, 总检出率为 78.18%, 其编码 E7 蛋白第 95 位氨基酸的同义突变 (丝氨酸) (S95S)。其突变率在宫颈病变各阶段没有统计学差异, 与宫颈病变进展程度负相关 (P=0.645, r=-0.108)。

② HPV16 E7 的 A647G 突变导致其 29 位氨基酸由天冬氨酸变为丝氨酸 (N29S), 总突变率为 65.45%, 在 CIN I 组、CIN II-III 组、宫颈鳞癌组中的突变率分别为 55.56%、64.29%、68.75%。A647G (N29S) 突变与原型相比较, 其突变率在宫颈病变各阶段没有统计学差异, 与宫颈病变进展程度负相关 (P=0.759, r=-0.094) (表 2、表 3)。

表 2 HPV16 E7 氨基酸序列原型和变异株在宫颈病变中的分布

分组	HPV16	HPV16	HPV16
	E7 阳性(例)	E7 原型(例)	E7 突变株(例)
CIN I	9	3	6
CIN II-III	14	4	10
宫颈鳞癌	32	8	24
合计	55	15	40

表 3 HPV16 E7 氨基酸序列变异株中突变位在宫颈病变的分布

分组	突变位点(个)	
	A647G*	T846C*
CIN I	5	6
CIN II-III	9	11
宫颈鳞癌	22	26
合计	36	43

* 同一检测样本中可能同时存在多个突变位点

2.2 TGF-β₁ 在宫颈病变及宫颈癌组织中的表达 CIN I、CIN II-III 及浸润癌组间比较中 TGF-β₁ 的阳性率逐渐增高, 分别为 14.06%、41.18% 及 82.05%, 其表达与宫颈病变的进展程度呈正相关 (P<0.001, r=0.556)。TGF-β₁ 的阳性率在 Ia、Ib、IIa、IIb 组中依次增高 (P=0.019)。HPV16 E7 原型株阳性的宫颈标本中 TGF-β₁ 阳性率为 78.57%, 在 HPV16 E7 (N29S) 突变株组宫颈样本中的 TGF-β₁ 阳性率 64.71%, 两者突变率差别不明显 (P=0.456)。由于样本量限制, 未比较 HPV16 E7 各突变株与原型在宫颈病变不同阶段的检出率 (表 4)。

表 4 TGF-β₁ 在各组别中的免疫组化检测结果

TGF-β ₁ 检测结果	组别(例)			分期(例)				HPV16 E7(例)	
	CIN I	CIN II-III	浸润癌	Ia	Ib	IIa	IIb	原型	变异株
-	55	20	8	4	3	1	0	3	6
+	9	8	11	2	3	5	1	3	5
++	0	4	13	1	4	6	2	8	3
+++	0	2	7	0	1	1	5	0	3
阳性率(%)	14.06	41.18	82.05	42.86	72.73	92.31	100	78.57	64.71

3 讨论

TGF-β₁ 信号通路的异常与肿瘤的发生及转移

密切相关^[4], 多项研究显示^[5]: 肺癌、前列腺癌、胃癌、胆管癌等均有 TGF-β₁ 的高表达。TGF-β₁ 在宫颈癌的形成过程中具有双重作用, TGF-β₁ 介导的信号转导通路对早期肿瘤呈抑制作用, 但对进展型及

晚期肿瘤呈促进作用,并能增强其侵袭力和恶性程度。TGF- β_1 蛋白表达缺失是 HPV 相关的癌前病变的早期事件,TGF- β_1 缺失将解除 TGF- β_1 对 HPV E6、E7 早期病毒基因的抑制效应^[6]。大多数研究表明:TGF- β_1 在宫颈癌中呈现过度表达。本研究结果显示:TGF- β_1 的表达在 CIN I、CIN II-III、浸润性鳞癌组中依次显著增高,提示 TGF- β_1 的高表达与宫颈癌密切相关。提示机体对 TGF- β_1 的抑制产生耐受后不仅不能抑制癌细胞生长,反而促进其生长,并增加恶性程度,促进细胞的侵袭和转移。可见 TGF- β_1 的过度表达导致了信号传导通路的紊乱,使 TGF- β_1 的抑瘤作用基本丧失。高水平的 TGF- β_1 在肿瘤局部“微环境”里积聚,转通过某种机制促进肿瘤生长,或癌细胞对高水平 TGF- β_1 的生长抑制效应产生耐受,敏感性降低。癌细胞自身分泌 TGF- β_1 又增加了局部免疫抑制作用,使肿瘤细胞逃避免疫监控。

目前认为 HPV E7 与细胞癌基因和抑癌基因的相互作用是 HPV 的致癌机制的中心环节之一^[7]。高危型 HPV 16 E6 和 E7 蛋白,通过与细胞蛋白结合而发挥作用。Rorke 等^[8]将 HPV 16 永生化宫颈上皮细胞株 ECE16-1 暴露于 TGF- β_1 ,发现在 TGF- β_1 作用下,Rb 由磷酸化状态转变为低磷酸化,HPV E7 基因 mRNA 水平下降。TGF- β 在这一过程中起重要的调节作用。有研究表明 TGF- β 的改变是与 HPV 相关的宫颈癌的重要形成机制^[9]。本研究显示:HPV16 E7 的阳性率与宫颈病变的进展程度呈正相关,HPV16 E7 基因常见的突变位点 N29S,其 E7 N29S 突变的宫颈癌患者中的 TGF- β_1 阳性率为 64.71%,低于 E7 原型株(78.57%),提示 HPV16 E7 多态性可能与 TGF- β_1 的促进癌细胞的生长及侵袭有关。尽管 HPV16 E7 基因多态性及 TGF- β_1 与宫颈鳞癌的机理不甚明确,相信通过对其关系的进一步研究,将为宫颈鳞癌的分子机制和基因治疗提供实验室依据。

参考文献

- [1] Zehbe I, Mytilineos J, Wikström I, et al. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women[J]. Hum Immunol, 2003, 64(5): 538-542.
- [2] 栾笑天,戴淑真. HPV16 E7、TGF β_1 和 MT1-MMP 在宫颈病变中的表达及其意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2008, 23(3): 207-209.
- [3] Comerci JT, Runowicz CD, Flanders KC, et al. Altered expression of transforming growth factor β_1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix[J]. Cancer, 1996, 77(6): 1 107-1 114.
- [4] Chun HK, Jung KU, Choi YL, et al. Low Expression of transforming growth factor beta-1 in cancer tissue predicts a poor prognosis for patients with stage III rectal cancers[J]. Oncology, 2014, 86(3): 159-169.
- [5] 何欣蓉,刘馨,王琼. TGF- β_1 和 ERK2 在肺癌组织中的表达及意义[J]. 山东医药, 2012, 52(3): 53-55.
- [6] Münzer K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus induced oncogenesis[J]. J Virol, 2004, 78(21): 11 451-11 460.
- [7] 王珊珊,王伟,于莹莹,等. 人乳头瘤病毒癌基因诱导细胞永生化的研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(10): 1 179-1 183.
- [8] Rorke EA, Zhang D, Choo CK, et al. TGF-beta mediated cell cycle arrest of HPV 16-immortalized ectocervical cells correlates with decreased E6/ E7mRNA and increased p53 and p 21 (WAF-1) expression[J]. Exp Cell Res, 2000, 259(1): 149-157.
- [9] 王慧艳,蔡红兵,陈长春,等. 宫颈鳞癌与转化生长因子 β_1 的表达及人类乳头瘤病毒 16 E6 基因多态性的关系[J]. 吉林大学学报:医学版, 2012, 38(4): 750-754.

(2013-08-21 收稿)

编辑 沈建国