

· 人乳头瘤病毒感染/子宫颈癌 ·

# 人乳头瘤病毒 16 E2、E6 癌基因在子宫颈癌中的表达及 E2 缺失分析

王金桃 丁玲 高尔生 程玉英

**【摘要】** 目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)16 型 E2、E6 癌基因的表达及含量变化在子宫颈癌发生中的作用,以及 E2 基因的缺失与子宫颈病变的关系。方法 收集山西省肿瘤医院经病理学确诊的 141 例子宫颈癌新发病例作为病例组,同时选择在同一医院住院、经组织病理学确诊的 137 例子子宫肌瘤患者为良性肿瘤对照组,从社区妇科体检的 1582 名妇女中随机抽取 129 名妇女为健康对照组。利用多重 PCR 对从子宫颈组织和脱落细胞中提取的 DNA 进行 HPV16 E2、E6 基因扩增,在 VILBER 凝胶成像仪上利用 Bio-1D++ 软件分析 E2、E6 基因的相对含量。结果 HPV16 E6 阳性率在子宫颈癌组、子宫肌瘤组和健康对照组分别为 46.8%、24.1% 和 2.3%, HPV16 E2 阳性率分别为 36.2%、19.0% 和 0.0%, 差异均有统计学意义。子宫颈癌组和子宫肌瘤组中 E2 缺失率分别为 22.73% 和 21.21%, 健康对照组未检出 E2 阳性者。HPV16 E6 和 E2 含量均为病例组高于对照组,在子宫颈癌组内 E6 含量明显高于 E2 ( $t = 2.70, P = 0.009$ ), 两者的比值为 1.24。结论 子宫颈癌患者 HPV16 E2、E6 癌基因的阳性表达率和表达量均高于子宫肌瘤患者和健康妇女, E6 癌基因的高表达在子宫颈癌发生中起重要作用, 而 E2 基因的缺失在子宫颈癌变过程中可能发挥着不可忽视的作用。

**【关键词】** 宫颈肿瘤; 人乳头瘤病毒; HPV16 E2/E6 癌基因; E2 基因缺失

**Analysis on the expression of human papillomavirus type 16 E2 and E6 oncogenes and disruption of E2 in cervical cancer** WANG Jin-tao\*, DING Ling, GAO Er-sheng, CHENG Yu-ying. \*Department of Epidemiology, Public Health College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the roles of expression and early protein E2 and E6 load of human papillomavirus type 16 (HPV16) on cervical cancer in order to explore the relation between disruption of E2 and development of cervical cancer. **Methods** A case-control study was conducted, including 141 cervical cancer patients as cases who had been diagnosed by cytological approaches and histological approaches in Shanxi province Tumor Hospital, China. Two type of controls including 137 hospital controls with hysteromyoma by cytology or histology and eligible 129 controls from 1582 healthy women in the community who took part in community-organized physical examination with neither CIN2-3 nor invasive cancer, nor other gynecologic diseases were recruited. HPV16 E2 and E6 oncogenes were detected by multiple polymerase chain reaction (multi-PCR). The levels of E2 and E6 were analyzed used Bio-1D++ software provided by VILBER pattern formatter. **Results** The positive rates of HPV16 E6 in cancer cases (46.8%) were significantly higher than that in hysteromyoma group (24.1%) or healthy control group (2.3%) and accounted for 2.77 of OR (95% CI: 1.66-4.63) and 36.96 of OR (95% CI: 11.22-121.71) respectively. The expressions and loads of HPV16 E6 and E2 in cases were significantly higher than that in two control groups. Meanwhile, the expression or level of E6 was higher than that of E2 in each group. Disruption rate of E2 was 22.73% and the ratio of E6 to E2 was 1.24 in cervical cancer group. **Conclusion** The positive rates and levels of HPV16 E6 or E2 found in cervical cancer were higher than that in hysteromyoma and healthy women. High expression of E6 and disruption of E2 might play an important role in the development of HPV-induced cervical cancer.

**【Key words】** Cervical cancer; Human papillomavirus (HPV); HPV16 E2/E6 oncogenes; E2 gene disruption

基金项目:山西省科技攻关资金资助项目(021080)

作者单位:030001 太原,山西医科大学流行病学教研室(王金桃、丁玲);上海市计划生育科研所(高尔生);山西省肿瘤医院(程玉英)

人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌发生最主要的病因,在目前已分离出的 120 多种 HPV 型别中,以高危型 HPV16、18 感染与宫颈癌的发生最为密切<sup>[1,2]</sup>。体外与动物实验研究揭示,与 HPV 致癌密切相关的基因为 DNA 分子上的 E2、E6、E7 基因<sup>[3-5]</sup>。E6、E7 是病毒癌基因,它们不仅可直接转化细胞,还与细胞周期调控蛋白相互作用,干扰正常的细胞周期调控,从而导致细胞无限制生长,引起癌变,特别是 E6 基因与癌变发生的关系更加紧密。E2 基因是一种特异性 DNA 束缚蛋白,它可以调节病毒 mRNA 的转录及 DNA 的复制,E6 的转化作用亦受 E2 的调控。HPV DNA 与宿主细胞 DNA 的整合往往引起病毒 E2 片段的缺失,导致 E6 癌基因表达失控,引起细胞的转化或癌变<sup>[6,7]</sup>。然而,HPV 早期癌基因的变化对宫颈癌发生作用的人群研究目前报道甚少,本研究旨在探讨 HPV16 E2、E6 癌基因的表达及含量变化在宫颈癌发生中的作用,进一步分析 E2 基因缺失与宫颈病变的关系。

### 材料与方法

1. 研究对象:选择山西省肿瘤医院住院且经病理学确诊的 141 例宫颈癌新发病例作为病例组。同时选择两组对照:对照组 1 为在同一医院住院、经组织病理学确诊的 137 例子宫肌瘤患者;对照组 2 来自社区妇科体检的 1582 名妇女,从中随机抽取了 129 名非良、恶性肿瘤患者、无妇科现病史、宫颈细胞巴士涂片 II 级以下者组成健康对照组。所有对象均在知情同意下进入研究。

2. 标本来源:全部研究对象于入院后、系统治疗前采集宫颈脱落细胞,置 PBS(pH 值 7.0)液中,离心、富集细胞, -80℃ 贮存待检;同时收集宫颈癌和子宫肌瘤患者的术后宫颈组织标本,置液氮中贮存待检。

3. 实验方法:对采集的手术组织标本和宫颈脱落细胞分别采用蛋白酶 K-酚-氯仿和异硫氰酸胍-酚-氯仿提取法提取 DNA。选择 HPV16 E2 和 E6 基因的特异性引物序列,进行 E2、E6 基因的多重 PCR 扩增,其中,HPV16 E2 引物为 AAG GGC GTA ACC GAA ATC GGT 和 CAT ATA CCT CAC GTC GCA G,扩增片段 351 bp; HPV16 E6 引物为 CTT GGG CAC CGA AGA AAC AC 和 TTG GTC ACG TTG CCA TTC AC,扩增片段 208 bp。引物由上海生物工程公司合成。将总体积 50  $\mu$ l 的 PCR 扩增体

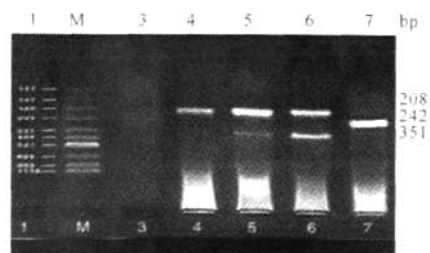
系(含 10 $\times$  buffer 5  $\mu$ l, 25 mmol/L MgCl 24  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, 25 pmol/L P1、P2 各 1  $\mu$ l, 模板 DNA 100 ng),置 PTC-100 PCR 扩增仪上采用热启动 PCR 法进行扩增。反应条件:95℃ 预变性 5 min $\rightarrow$ 加 Taq 酶 0.3  $\mu$ l $\rightarrow$ 95℃ 变性 60 s $\rightarrow$ 55℃ 退火 60 s $\rightarrow$ 72℃ 延伸 60 s $\rightarrow$ 30 次循环 $\rightarrow$ 72℃ 总延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 10  $\mu$ l,经 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB)电泳,在 VILBER CV-A50C 凝胶成像仪上扫描并保存图片。

4. 统计学分析:采用 SPSS 12.0 软件,进行各組间观察指标的 *t* 检验、 $\chi^2$  检验、关联性分析(OR 值及其 95% CI)、一致性检验。利用 Bio-1D+ 分析软件对 HPV16 E2 和 E6 阳性者进行癌基因含量的分析。

### 结 果

1. 病例组与对照组的均衡性分析:宫颈癌患者 141 例,平均年龄 49.00 岁 $\pm$ 9.80 岁(25~75 岁);子宫肌瘤对照组 137 例,平均年龄 48.34 岁 $\pm$ 10.16 岁(29~77 岁);健康对照组 129 名,平均年龄 50.50 岁 $\pm$ 11.31 岁(24~78 岁)。病例组与两对照组的年龄差异无统计学意义(*t* 值分别为 0.55 和 1.16,  $P > 0.20$ ),且各组在出生地、种族、居住地(城乡)、婚姻状况等人口学特征的分布方面也基本一致,差异均无统计学意义。

2. HPV16 E2 和 E6 癌基因定性检测:应用多重 PCR 法在同一反应体系中进行 HPV16 E2 和 E6 扩增,分别在 351 bp 和 208 bp 处获得目的基因条带(图 1)。结果显示,病例组 E2 和 E6 的阳性率均明显高于两对照组,差异有统计学意义,而在各组内均为 E6 的阳性率较 E2 高(表 1)。



M: pUC Mix Marker; 1: 空白对照; 3: 阴性对照; 4: HPV16 E2 阳性 E2 阴性; 5、6: 阳性标本; 7: HPV6 阳性对照

图1 HPV16 E2、E6 基因多重 PCR 扩增产物

为了防止宫颈组织与脱落细胞样本来源不同带来的偏性,随机抽取了 24 例宫颈癌病例和 22 例子

表1 病例组与两对照组 HPV16 E6、E2 表达状况

分组	例数	阳性		$\chi^2$ 值	P 值	OR 值(95% CI)
		例数	率(%)			
E6 病例组	141	66	46.8			
对照组 1	137	33	24.1	15.64	0.000	2.77(1.66~4.63)
对照组 2	129	3	2.3	70.07	0.000	36.96(11.22~121.71)
E2 病例组	141	51	36.2			
对照组 1	137	26	19.0	10.26	0.001	2.42(1.40~4.19)
对照组 2	129	0	0.0	58.08*	0.000	147.39(40.81~532.31)

注：\* 为校正  $\chi^2$  值

子宫肌瘤对照,进行了不同标本检测结果的一致性评价,显示 HPV16 E6 和 E2 的一致性分别为 89.13% 和 93.48%, Kappa 值分别为 0.75 和 0.82, 均有统计学意义(表 2)。

表2 手术切除组织与宫颈脱落细胞 HPV16 E6、E2 检测一致性分析

组织	细胞	HPV16 E6		HPV16 E2	
		例数	率(%)	例数	率(%)
+	+	14	41.7	10	29.2
+	-	4	8.3	2	4.2
-	+	1	4.2	1	4.2
-	-	27	45.8	33	62.4
合计		46	100.0	46	100.0
一致性(%)		89.13		93.48	
Kappa 值		0.75		0.82	
P 值		0.000		0.000	

3. HPV16 E2 缺失情况:对 HPV16 E6 阳性者中 E2 的分布情况分析显示,E2 和 E6 均阳性者在宫颈癌组和子宫肌瘤组分别占各组 HPV16 E6 阳性的 77.27% 和 78.79%, E2 缺失各为 15 例和 7 例,两组的缺失率的差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.029, P > 0.05$ ),健康对照组 E6 阳性 3 例,未检出 E2 阳性者(表 3)。

表3 病例组与两对照组 HPV16 E2 缺失比较

E6(+)	病例组	对照组 1	对照组 2
E2(+)	51(77.27)	26(78.79)	0(0.00)
E2(-)	15(22.73)	7(21.21)	3(100.00)

注:括号外数据为例数;括号内数据为构成比(%)

4. HPV16 E2 和 E6 癌基因相对含量测定:在同一标准状态下,对每一个 PCR 阳性标本的目的条带进行峰值和面积的转化,利用 Bio-1D++ 分析软件获得 HPV16 E2 和 E6 癌基因的相对含量。结果表明,宫颈癌组 HPV16 E2 和 E6 水平均显著高于子宫肌瘤组( $t'$  值分别为 3.61 和 3.92,  $P < 0.001$ );与健康对照组比较,病例组 HPV16 E6 水平也明显较高( $t' = 8.59, P < 0.001$ ),见表 4。在病例组 E6 水平明显高于 E2,其比值为 1.24,两者的差值有统计

学意义( $t = 2.70, P = 0.009$ ),但在子宫肌瘤组内差异无统计学意义。

### 讨 论

HPV 是一种微小双链环状 DNA 病毒,病毒基因约 8 kbp,由早期(E)区、晚期(L)区和长控制区(LCR)3 个部分组成<sup>[8]</sup>。E 区主要含有 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7 六个基因,具有维持病毒复制、编码病毒蛋白及维持细胞内病毒高拷贝的功能,特别是 E6 为主要致癌基因,而 E2 基因编码的蛋白可结合 LCR 特异的 DNA 序列,调节其他癌基因的转录<sup>[6-8]</sup>。HPV 感染宿主细胞后,往往造成 E2 开放读码框的断裂而导致 E2 基因的丢失或失活,从而引起对 E6 癌基因的失控,导致 E6 编码蛋白的持续或过度表达,增加 HPV 感染细胞的增殖与恶变<sup>[5,8]</sup>。

本次研究结果显示,在宫颈癌组 HPV16 E2 和 E6 的阳性表达率和表达量均明显高于子宫肌瘤组和健康对照组,且在各组内 E6 阳性率和含量均高于 E2,特别是在病例组两者平均含量的差别有统计学意义。在宫颈癌组和子宫肌瘤组,E2 的缺失率分别为 22.73% 和 21.21%,健康对照组未检出 E2 阳性。提示 HPV16 E2 和 E6 癌基因的阳性表达率和表达量从健康宫颈、子宫肌瘤到宫颈癌呈逐渐上升趋势,而无论在宫颈癌组还是子宫肌瘤组中,E6 基因的表达较 E2 旺盛,随着病程的发展,伴随有 E2 基因的缺失。美国和墨西哥学者也报道,HPV DNA 载量在宫颈癌和 CIN2/3 较正常宫颈组织和 CIN1 高<sup>[9,10]</sup>。英国学者 Stevenson 等<sup>[5]</sup>对 HPV16 E2 基因的表达与 CIN 的进展过程研究中发现,E2 基因在 CIN1 的表达最高,随着 CIN 等级的上升其含量呈现逐渐减少趋势;Graham 和 Herrington<sup>[6]</sup>的研究也显示,E2 基因断裂的比例在宫颈癌(8/14)较 CIN3(1/11)明显为高( $P = 0.03$ );意大利 Badaracco 等<sup>[11]</sup>的研究发现,79 例宫颈癌患者中,有 19 例 HPV16 E2 缺失(24.05%),而对 E2 和 E6 均阳性的 51 例患者 E2/E6 含量比值的分析显示,比值  $> 1.53$  者占 56.9%, $< 1.53$  者为 43.1%。

不少研究提示,癌基因的高表达在宫颈癌发生中起重要作用,而 E2 基因的缺失在宫颈癌变过程中可能发挥着关键作用,这不仅与该基因调节 HPV 的转录和复制有关,而且可能与 E2 基因能够诱发

表4 病例组与两对照组 HPV16 E2、E6 含量( $\mu\text{g/ml}$ )比较

HPV16	病例组		对照组 1		对照组 2	
	阳性例数	含量( $\mu\text{g/ml}$ )( $\bar{x} \pm s$ )	阳性例数	含量( $\mu\text{g/ml}$ )( $\bar{x} \pm s$ )	阳性例数	含量( $\mu\text{g/ml}$ )( $\bar{x} \pm s$ )
E2	51	14.15 $\pm$ 9.19	26	8.98 $\pm$ 4.51	0	-
E6	66	17.59 $\pm$ 9.13	33	10.72 $\pm$ 5.99	3	6.03 $\pm$ 1.28

HPV 转染和未转染细胞系中细胞的凋亡有关<sup>[7]</sup>, 这种凋亡的减少和在 HPV 感染后宫颈细胞分裂的增加也可能是导致宫颈细胞过度增殖以致癌变的又一原因<sup>[4,12]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Konidaris S, Kouskouni EE, Panoskaltis T, et al. Human papillomavirus infection in malignant and benign gynaecological conditions: a study in greek women. *Health Care Women Int*, 2007, 28:182-191.
- [2] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 2003, 88: 63-73.
- [3] Choi BS, Kim SS, Yun H. Distinctive distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S intratypic Asian variants in Korean commercial sex workers. *J Med Virol*, 2007, 79:426-430.
- [4] DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, et al. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol*, 2003, 77:1551-1563.
- [5] Stevenson M, Lucy C, Julie E, et al. Inverse relationship between the expression of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 and virus DNA copy number during the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Gene Virol*, 2000, 81: 1825-1832.
- [6] Graham DA, Herrington CS. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2000, 53:201-206.
- [7] Webster K, Parish J, Pandya M, et al. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem*, 2000, 275:87-94.
- [8] Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003, 31: 3-13.
- [9] Giuliano AR, Papenfuss M, De Galaz EM, et al. Risk factors for squamous intraepithelial lesions (SIL) of the cervix among women residing at the US-Mexico border. *Int J Cancer*, 2004, 109:112-118.
- [10] Hernandez-Hernandez DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jimenez M, et al. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol*, 2003, 90:310-317.
- [11] Badaracco G, Venuti A, Sedati A, et al. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral intergration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol*, 2002, 67: 574-582.
- [12] Butz K, Denk C, Ullmann A, et al. Induction of apoptosis in human papillomavirus- positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:6693-6697.

(收稿日期:2007-07-05)

(本文编辑:张林东)

## · 读者·作者·编者·

## 本刊对统计学方法的要求

(1)研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。(2)资料的表达与描述:用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料,用  $M(Q_R)$  表达呈偏态分布的定量资料,用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。(3)统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。(4)统计结果的解释和表达:当  $P < 0.05$  (或  $P < 0.01$ ) 时,应说对比组之间的差异具有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等),统计量的具体值(如: $t = 3.45$ ,  $\chi^2 = 4.68$ ,  $F = 6.79$  等);在用不等式表示  $P$  值的情况下,一般情况下选用  $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  三种表达方式即可满足需要,无须再细分为  $P < 0.001$  或  $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。

本刊编辑部