

叶酸与 HPV16 E6/E7 mRNA 表达 在宫颈癌变中的交互作用

南晶 丁玲 刘学智 李娟 吴婷婷 陈霄 王金桃

030001 太原, 山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室

通信作者: 王金桃, Email: wangjt59@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.06.022

【摘要】 目的 探讨叶酸与人乳头瘤病毒 16 型(HPV16)E6/E7 mRNA 表达在宫颈癌变中的交互作用。方法 选取经病理学确诊的宫颈鳞状细胞癌(SCC)患者 64 例、低度宫颈上皮内瘤样变(CIN1)患者 55 例、高度宫颈上皮内瘤样变(CIN2+)患者 55 例和正常宫颈(NC)者 80 例作为研究对象。采用微生物法测定血清叶酸和红细胞叶酸水平,应用 real-time PCR 法检测 HPV16 E6/E7 mRNA 表达水平。利用 SPSS 16.0 软件进行相关资料的 χ^2 检验、方差分析、Welch 检验、Kruskal-Wallis H 检验、有序 logistic 回归和 Spearman 秩相关分析,应用相加模型进行交互作用分析。结果 随着宫颈癌变的进展,血清叶酸和红细胞叶酸水平均呈逐渐降低趋势($\chi^2=32.71, P<0.001$; $\chi^2=16.32, P<0.001$),且血清叶酸和红细胞叶酸含量呈正相关($r=0.41, P<0.001$);HPV16 E6/E7 mRNA 表达水平随着宫颈癌变的进展呈逐渐升高趋势($\chi^2=30.11, P<0.001$; $\chi^2=38.99, P<0.001$);红细胞叶酸含量与 HPV16 E6/E7 mRNA 表达量呈负相关(E6: $r=-0.14, P=0.009$; E7: $r=-0.21, P=0.001$),红细胞叶酸缺乏与 HPV16 E6/E7 mRNA 高表达在 CIN1、CIN2+ 和 SCC 组均存在正相加交互作用。结论 叶酸缺乏和 HPV16 E6/E7 mRNA 高表达均可增加宫颈癌及癌前病变发生的风险,两者在宫颈癌变进展中存在协同作用。

【关键词】 宫颈癌变; 叶酸; 人乳头瘤病毒 16 型 E6/E7 mRNA

基金项目: 国家自然科学基金(30872166, 81273157, 81473060); 山西省自然科学基金(2008011075-1)

Interaction between folate and the expression of human papillomavirus 16 E6/E7 mRNA in the progression of cervix carcinogenesis Nan Jing, Ding Ling, Liu Xuezhi, Li Juan, Wu Tingting, Chen Xiao, Wang Jintao

Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Wang Jintao, Email: wangjt59@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the interaction between folate and the expression of HPV16 E6/E7 mRNA in the progression of cervix carcinogenesis. **Methods** Subjects were selected from the participants who were diagnosed pathologically, including 64 patients with cervical squamous cell carcinoma (SCC), 55 patients with low-grade cervical intraepithelial neoplasm (CIN1), 55 patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasm (CIN2+) and 80 with normal cervix (NC). The levels of serum folate and RBC folate were detected by microbiological assay, and the expression levels of HPV16 E6/E7 mRNA were measured, using the real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). Data was analyzed by methods as chi-square test, analysis of variance (ANOVA), Welch test, Kruskal-Wallis H test and ordinal logistic regression. Spearman correlation was tested using the SPSS statistical software (version 16.0) while the interaction effects were evaluated by additive model. **Results** There was a positive correlation seen between the serum folate and RBC folate ($r=0.41, P<0.001$). The levels of serum folate and RBC folate decreased gradually along with the severity of cervical lesions ($\chi^2=32.71, P<0.001$; $\chi^2=16.32, P<0.001$). The expression levels of HPV16 E6/E7 mRNA increased gradually with the severity of cervical lesions ($\chi^2=30.11, P<0.001$; $\chi^2=38.99, P<0.001$). There was a negative correlation between the levels of RBC folate, expression levels of HPV16 E6 (E6: $r=-0.14, P=0.009$) and HPV16 E7 mRNA (E7: $r=-0.21, P=0.001$), respectively. Both RBC folate deficiency and HPV16 E6/E7 mRNA high expression showed additive interaction in CIN1, CIN2+ and SCC. **Conclusion** Folate deficiency and high expression of HPV16

E6/E7 mRNA might increase the risk of cervical cancer and cervix precancerous lesions, and having a synergistic action in the progression of cervix carcinogenesis.

【Key words】 Cervix carcinogenesis; Folate; Human papillomavirus 16 E6/E7 mRNA

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (30872166, 81273157, 81473060); Natural Science Foundation of Shanxi Province (2008011075-1)

宫颈癌是女性生殖器官最常见的恶性肿瘤。叶酸具有维持DNA甲基化状态,抑制肿瘤细胞中癌基因表达,从而阻断癌症发生和发展的功能。本研究前期对叶酸与宫颈癌关系进行的Meta分析结果表明,低叶酸水平可能增加宫颈癌的发病风险^[1]。感染高危型人乳头瘤病毒16型(HPV16)是宫颈癌发生的主要病因^[2], HPV E6和E7是致癌蛋白编码基因,其编码的蛋白可分别通过抑制抑癌基因p53和视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)使被感染的细胞无限增殖并发生恶性转变。有研究表明 HPV16 E6/E7 mRNA高表达与宫颈癌的发生有关^[3]。叶酸缺乏可增加 HPV整合于宿主DNA的风险^[4],且叶酸具有维持DNA甲基化状态从而抑制肿瘤细胞中癌基因表达的作用,进而推测叶酸可能通过影响 HPV16 E6/E7 mRNA的表达对宫颈癌变产生影响,但目前未见相关报道。本次对不同宫颈病变患者进行研究,探讨叶酸和 HPV16 E6/E7 mRNA表达与宫颈癌变的关系及两者在宫颈癌变中的交互作用,为宫颈癌病因和发病机制的研究提供科学依据。

对象与方法

1. 研究对象:选取2009年9月至2010年12月在山西省肿瘤医院、山西医科大学第二医院、太原市妇幼保健院以及介休市妇幼保健院经病理学确诊的宫颈鳞状细胞癌(SCC)患者64例、低度宫颈上皮内瘤样变(CIN1)患者55例、高度宫颈上皮内瘤样变(CIN2+)患者55例以及正常宫颈(NC)者80例作为研究对象。所有研究对象均排除营养性巨幼细胞性贫血、溶血性疾病、消化系统疾病、其他肿瘤患者以及近3个月内B族维生素使用者,并获得知情同意。采用面对面方式收集研究对象的人口学特征、生活习惯和生殖情况等资料,同时采集全部研究对象入院后、系统治疗前清晨空腹静脉血(抗凝血和非抗凝血)5 ml,并在手术或阴道镜检查中采集宫颈组织。所采集的生物样品均置于-80℃贮存待检。

2. 实验方法:

(1)检测 HPV16的感染状态:采用酚-氯仿-蛋白酶K法在宫颈组织中提取总DNA,参照本研究前期建立的PCR扩增方法^[5]进行 HPV16 DNA的扩增,

确定 HPV16的感染状态,以 E2或E6任一片段阳性均可判定为 HPV16阳性。

(2)测定血清叶酸和红细胞叶酸水平:用1%抗坏血酸溶液处理血清和全血样本,离心取上清,-20℃保存。将干酪乳酸杆菌 L-casei(ATCC7469)接种于装有乳酸杆菌肉汤培养基的试管中,增菌纯化后用5 ml生理盐水悬浮,制成菌悬液。参照本研究前期建立的方法^[6]检测血清叶酸和红细胞叶酸的浓度。

(3)检测 HPV16 E6/E7 mRNA的表达水平:取50 mg冻存宫颈组织剪碎后采用 Trizol 法提取宫颈组织中的总RNA。参照本研究前期建立的 real-time PCR^[7]检测 HPV16 E6/E7 mRNA的表达水平。HPV16 E6引物:上游5'-GCG ACC CAG AAA GTT ACC ACA-3',下游5'-GCA TAA ATC CCG AAA AGC AAA G-3'(120 bp); HPV16 E7引物:上游5'-CAG AGG AGG AGG ATG AAA TAG ATG-3',下游5'-CAC AAC CGA AGC GTA GAG TC-3'(97 bp); β -actin引物:上游5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3',下游5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'(186 bp)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值($\Delta\Delta Ct: [(Ct_{目的基因}-Ct_{\beta-actin})_{实验组}-(Ct_{目的基因}-Ct_{\beta-actin})_{NC组}]$)计算每个样本中 HPV16 E6/E7 mRNA的相对表达量。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值越大,表示 mRNA 表达水平越高。

3. 统计学分析:利用 SPSS 16.0 软件进行相关资料的 χ^2 检验、方差分析、Welch 检验、Kruskal-Wallis H 检验、Spearman 秩相关分析,采用有序多分类 logistics 回归进行 OR 值及调整 OR(aOR)值的计算,应用相加模型和交互作用指标超额相对危险度(RERI)、交互作用归因比(AP)、交互作用指数(SI)及其95%CI进行交互作用定性和定量评估。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. 人口学特征:选取 NC 组(80例)、CIN1 组(55例)、CIN2+组(55例)、SCC 组(64例)共254例为研究对象。各组研究对象在年龄、文化程度、职业、妇科病史、人工流产史、洗澡频率、洗阴频率、性生活后清洗等因素方面的差异均有统计学意义($P<0.05$),见表1。在民族、出生地、居住地、婚姻状

表1 4组研究对象人口学特征及其相关因素

因素	NC组	CIN1组	CIN2+组	SCC组	χ^2 值	P值
年龄组(岁)					25.79	0.002
<35	10(12.4)	5(9.1)	9(16.4)	3(4.7)		
35~	33(41.3)	20(36.4)	24(43.6)	12(18.8)		
45~	33(41.3)	23(41.8)	14(25.5)	34(53.1)		
>55	4(5.0)	7(12.7)	8(14.5)	15(23.4)		
文化程度					21.14	<0.001
初中以下	17(21.3)	19(34.5)	21(38.2)	39(60.9)		
初中及以上	63(78.7)	36(65.5)	34(61.8)	25(39.1)		
职业					17.12	<0.001
农民	48(60.0)	27(49.1)	30(54.5)	53(82.8)		
非农民	32(40.0)	28(50.9)	25(45.5)	11(17.2)		
妇科病史					21.19	<0.001
是	6(7.5)	16(29.1)	19(34.5)	24(37.5)		
否	74(92.5)	39(70.9)	36(65.5)	40(62.5)		
人工流产史					15.81	0.001
是	51(63.8)	23(41.8)	22(40.0)	21(32.8)		
否	29(36.3)	32(58.2)	33(60.0)	43(67.2)		
洗澡频率					14.57	0.024
>1次/周	56(70.0)	27(49.0)	25(45.5)	32(50.0)		
1次/周~1次/月	17(21.3)	14(25.5)	13(23.6)	18(28.1)		
<1次/月	7(8.7)	14(25.5)	17(30.9)	14(21.9)		
洗阴频率					31.79	<0.001
>3次/周	46(57.5)	18(32.7)	26(47.3)	16(25.0)		
3次/周~1次/月	32(40.0)	31(56.4)	16(29.1)	33(51.6)		
<1次/月	2(2.5)	6(10.9)	13(23.6)	15(23.4)		
性生活后清洗					9.11	0.028
是	60(70.5)	37(67.3)	31(56.4)	34(53.1)		
否	20(25.0)	18(32.7)	24(43.6)	30(46.7)		
月经初潮年龄(岁)					20.93	0.001
<14	38(47.5)	17(30.9)	21(38.2)	17(26.6)		
14~	38(47.5)	28(50.9)	34(61.8)	44(68.7)		
>18	4(5.0)	10(18.2)	0(0.0)	3(4.7)		
孕次					15.94	0.014
>4	38(47.5)	27(49.1)	18(32.7)	20(31.3)		
3~4	30(37.5)	17(30.9)	15(27.3)	21(32.8)		
≤2	12(15.0)	11(20.0)	22(40.0)	23(35.9)		
HPV16感染					36.86	<0.001
阳性	14(17.5)	23(41.8)	31(56.4)	41(64.1)		
阴性	66(82.5)	32(58.2)	24(43.6)	23(35.9)		

注:数据有缺失;括号外数据为人数,括号内数据为构成比(%)

况、吸烟、饮酒、肿瘤家族史等方面均衡可比,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2. 叶酸与宫颈癌变的关系:血清叶酸含量和红细胞叶酸含量均为非正态分布,经Kruskal-Wallis H 检验,不同宫颈病变组血清和红细胞叶酸含量的总体分布差异有统计学意义($H=59.08, P<0.001; H=43.68, P<0.001$)。调整检验水准 $\alpha=0.008\ 3$ ($\alpha=0.05$ /比较次数 $=0.05/6$),采用Bonferroni法进行两两比较显示,血清叶酸含量在NC组与CIN2+组和SCC组之间、CIN1组与CIN2+组和SCC组之间的差异均有统计学意义,其余各组间两两比较差异无

统计学意义,CIN2+组和SCC组的血清叶酸含量低于NC组和CIN1组;红细胞叶酸含量在NC组与CIN2+组和SCC组、CIN1组与SCC组之间的差异有统计学意义,其余各组两两比较间差异无统计学意义,SCC组的红细胞叶酸含量低于其他各组(表2)。进一步以NC组血清叶酸含量的50%点值(5.96 ng/ml)和红细胞叶酸含量的50%点值(275.42 ng/ml)为低叶酸水平的界值进行定性分析,显示随着宫颈癌变的进展,血清和红细胞叶酸水平均呈逐渐降低趋势($\chi^2=32.71, P<0.001; \chi^2=16.32, P<0.001$),利用有序多分类logistics回归以NC组为参照进行OR值和aOR值及其95%CI的计算(表3)。经Spearman秩相关分析,血清叶酸和红细胞叶酸含量呈正相关($r=0.41, P<0.001$)。

3. HPV16 E6/E7 mRNA表达与宫颈癌变的关系:HPV16 E6/E7 mRNA表达量均方差不齐,经Welch检验,HPV16 E6/E7 mRNA表达水平的总体分布在不同宫颈病变组差异有统计学意义($F=8.72, P<0.001; F=13.53, P<0.001$)。采用LSD- t 检验进行两两比较后显示,HPV16 E6/E7 mRNA表达量除在CIN1组与CIN2+组之间差异无统计学意义外,其余各组间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),且SCC组HPV16 E6/E7 mRNA表达量明显高于其他各组(表4)。进一步以NC组HPV16 E6 mRNA表达量的均值(2.00)和HPV16 E7 mRNA表达量的均值(1.49)为高表达的界值进行分析,结果显示,HPV16 E6/E7 mRNA的表达水平随着宫颈癌变的进展均呈逐渐升高趋势($\chi^2=30.11, P<0.001; \chi^2=38.99, P<0.001$),采用有序多分类logistics回归以NC组为参照进行OR值和aOR值及其95%CI的计算结果见表5。

表2 4组研究对象血清叶酸和红细胞叶酸含量 (ng/ml, $M\pm Q_n$) 的比较

组别	例数	血清叶酸	红细胞叶酸
NC	80	5.96 $\pm$ 3.93 ^a	275.42 $\pm$ 54.64 ^a
CIN1	55	5.08 $\pm$ 3.43 ^a	259.36 $\pm$ 43.67 ^{a,d}
CIN2+	55	3.92 $\pm$ 2.59 ^b	249.23 $\pm$ 34.59 ^{b,d}
SCC	64	3.18 $\pm$ 2.71 ^b	226.04 $\pm$ 54.69 ^{b,c}
趋势检验		$H=59.08, P<0.001$	$H=43.68, P<0.001$

注: $M\pm Q_n$ 为中位数 $\pm$ 四分位数间距;^{a,b,c,d}组间比较时相同字母表示差异无统计学意义,不同字母表示差异有统计学意义

表3 4组研究对象血清叶酸和红细胞叶酸水平与宫颈病变的关系

组别	例数	血清叶酸			红细胞叶酸		
		低水平 ^a	OR值(95%CI)	aOR值(95%CI) ^b	低水平 ^a	OR值(95%CI)	aOR值(95%CI) ^b
NC	80	41(51.3)	1.00	1.00	40(50.0)	1.00	1.00
CIN1	55	33(60.0)	1.43(0.71 ~ 2.86)	1.44(0.63 ~ 3.31)	34(61.8)	1.62(0.81 ~ 3.26)	1.74(0.78 ~ 3.89)
CIN2+	55	44(80.0)	3.81(1.72 ~ 8.41)	5.09(1.84 ~ 14.08)	39(70.9)	2.44(1.18 ~ 5.05)	2.82(1.12 ~ 7.08)
SCC	64	59(92.2)	11.22(4.08 ~ 30.90)	32.72(8.02 ~ 133.45)	52(81.2)	4.33(2.02 ~ 9.32)	9.22(3.06 ~ 27.78)
趋势检验		$\chi^2=32.71, P<0.001$			$\chi^2=16.32, P<0.001$		

注：^a括号外数据为人数，括号内数据为构成比(%)；^b调整因素为年龄、文化程度、职业、妇科病史、人工流产史、洗澡频率、洗阴频率、性生活后清洗、月经初潮年龄、孕次、HPV16感染

表4 4组研究对象HPV16 E6/E7 mRNA表达量(̄x±s)的比较

组别	例数	HPV16 E6 mRNA	HPV16 E7 mRNA
NC	80	2.00±3.95 ^a	1.49±2.92 ^a
CIN1	55	3.85±5.75 ^{b,c}	3.32±5.56 ^{b,c}
CIN2+	55	3.97±5.56 ^c	3.71±5.80 ^c
SCC	64	6.37±6.04 ^d	6.36±5.83 ^d
趋势检验		$F=8.72, P<0.001$	$F=13.53, P<0.001$

注：^{a, b, c, d}组间比较时相同字母表示差异无统计学意义，不同字母表示差异有统计学意义

4. 叶酸缺乏与HPV16 E6/E7 mRNA高表达在宫颈癌变中的交互作用:本研究结果显示血清叶酸与红细胞叶酸之间存在正相关,鉴于红细胞叶酸用于反映机体叶酸的储存及营养状态较为稳定^[8],故以红细胞叶酸作为衡量机体叶酸水平的指标进行后续分析。采用Spearman秩相关分析显示,宫颈病变患者总体红细胞叶酸含量与HPV16 E6/E7 mRNA表达量均呈负相关(E6: $r=-0.14, P=0.009$; E7: $r=-0.21, P=0.001$),见图1。进一步以NC组红细胞叶酸含量的50%点值(275.42 ng/ml)和HPV16 E6/E7 mRNA表达量的均值(2.00, 1.49)分别作为红细胞叶酸低水平和HPV16 E6/E7 mRNA高表达的界值,应用相加交互效应模型进行分析。结果显示,红细胞叶酸缺乏与HPV16 E6/E7 mRNA高表达在CIN1、CIN2+和SCC组均呈现正相加交互作用(SI值分别为1.68、4.48、6.24和1.09、2.68、6.85),且随着病变程度的加重其交互作用越强(表6, 7)。

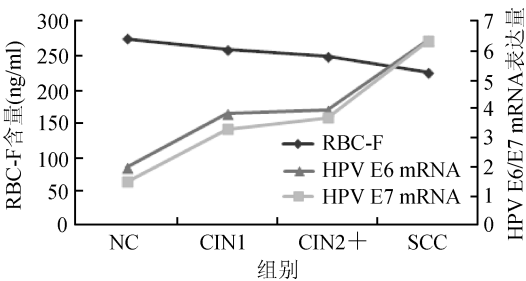


图1 4组病例红细胞叶酸(RBC-F)平均水平与HPV16 E6/E7 mRNA平均表达量的关系

讨 论

HPV16为迄今为止发现的致宫颈癌最常见的HPV高危亚型。HPV E6和E7基因为该病毒主要致癌基因,E6蛋白可与p53结合而阻断细胞凋亡,E7蛋白可与Rb结合使细胞无限增殖而癌变,因此HPV16 E6和E7高表达是p53和Rb失活的主要机制^[9]。对宫颈癌细胞系及宫颈癌组织样本的研究表明,E6/E7基因持续性表达是宫颈上皮细胞发生恶性转化以及发展为宫颈癌的必要条件^[10-11]。HPV16 E6/E7 mRNA作为病毒癌基因表达的中间产物,表达异常升高可导致宿主细胞发生恶性转化^[12]。有研究显示,HPV E6/E7 mRNA在宫颈组织中表现癌基因活性^[13],且表达水平与病变的严重程度相关^[14-15]。本研究检测不同程度宫颈病变患者的HPV16 E6/E7 mRNA表达水平,显示随着宫颈病变程度的加重 HPV16 E6/E7 mRNA表达水平逐渐升

表5 4组研究对象HPV16 E6/E7 mRNA表达与宫颈病变的关系

组别	例数	HPV16 E6 mRNA			HPV16 E7 mRNA		
		高表达 ^a	OR值(95%CI)	aOR值(95%CI) ^b	高表达 ^a	OR值(95%CI)	aOR值(95%CI) ^b
NC	80	29(36.3)	1.00	1.00	27(33.8)	1.00	1.00
CIN1	55	30(54.5)	2.11(1.00 ~ 54.25)	1.85(0.83 ~ 4.12)	30(54.5)	2.36(1.16 ~ 4.77)	1.64(0.73 ~ 3.70)
CIN2+	55	35(63.6)	3.08(1.51 ~ 6.28)	3.78(1.54 ~ 9.28)	39(70.9)	4.79(2.27 ~ 10.07)	5.08(2.02 ~ 12.81)
SCC	64	52(81.3)	7.62(3.51 ~ 16.55)	9.88(3.35 ~ 29.18)	53(82.8)	9.46(4.26 ~ 21.00)	8.65(2.96 ~ 25.27)
趋势检验		$\chi^2=30.11, P<0.001$			$\chi^2=38.99, P<0.001$		

注：^a括号外数据为人数，括号内数据为构成比(%)；^b调整因素为年龄、文化程度、职业、妇科病史、人工流产史、洗澡频率、洗阴频率、性生活后清洗、月经、初潮年龄、孕次、HPV16感染

高,且 SCC 组明显高于其他各组。提示 HPV16 E6/E7 mRNA 高表达可增加宫颈癌及癌前病变发生的风险,是宫颈癌及癌前病变发生的危险因素,可作为宫颈病变的重要生物标志。HPV16 E6/E7mRNA 作为代表 HPV16 基因功能状态的指标,在宫颈癌变的早期即可发生,因此 HPV16 E6/E7 mRNA 的高表达可作为宫颈癌的早期诊断标志并为预测病情提供依据。

叶酸是机体重要的微量营养元素,不能由机体自身合成,只能从膳食中摄取,故易产生缺乏。目前对于叶酸缺乏与宫颈癌关系的研究结论不尽一致,多数研究认为叶酸缺乏可增加宫颈癌发生的风险^[16],然而也有研究并未发现两者间的关联性^[17-18]。本研究前期发现,血清叶酸低水平与宫颈癌的发生有明显的关联^[19],对体外宫颈癌细胞施加叶酸,均可提高细胞的增殖抑制率和凋亡率,可有效抑制宫颈癌细胞的生长^[20]。本研究显示,随着宫颈癌变的进展,血清叶酸和红细胞叶酸水平均逐渐降低,且 CIN2+组和 SCC 组的血清叶酸含量明显低于 NC 组和 CIN1

组,SCC 组的红细胞叶酸含量明显低于其他各组,再次提示血清叶酸和红细胞叶酸缺乏均可增加宫颈癌及癌前病变发生的风险,补充叶酸对预防宫颈病变具有重要的意义。本研究分析不同宫颈病变患者叶酸水平发现,机体叶酸缺乏出现在宫颈癌变的中后期,提示检测宫颈病变患者叶酸水平,可为预测和评估病变进展提供重要参考。

HPV 与宿主细胞 DNA 整合是致癌过程的必要环节^[21],而叶酸缺乏可增加这种整合的概率^[4]。叶酸可通过 DNA 甲基化维持基因组的稳定,从而调节基因的表达、抑制肿瘤细胞中癌基因的活化。有研究表明叶酸缺乏与 HPV 感染在宫颈癌变过程中存在协同作用^[6],E6 和 E7 作为 HPV 的致癌蛋白编码基因,提示叶酸缺乏可能诱导 HPV E6 和 E7 表达上调而增加宫颈癌的发生风险,但目前未见相关报道。本组前期的体外细胞学研究显示,随着叶酸干预浓度的增加宫颈癌细胞中 HPV16 E6/E7 mRNA 的表达量均呈降低趋势,尤其 HPV16 E7 mRNA 表达量下降明显^[22]。本研究从人群研究的角度对红细

表 6 不同宫颈病变组红细胞叶酸(RBC-F)水平与 HPV16 E6 mRNA 表达的交互作用

组 别	RBC-F (ng/ml)	HPV16 E6 mRNA	OR 值(95%CI)	aOR 值(95%CI)	RERI 值 (95%CI)	AP 值 (95%CI)	SI 值 (95%CI)
CIN1	>275.42	>2.00	1.00	1.00			
	>275.42	≤2.00	1.89(0.69 ~ 5.16)	1.33(0.30 ~ 4.69)	0.88	0.28	1.68
	≤275.42	>2.00	2.44(0.82 ~ 7.21)	1.96(0.53 ~ 5.87)	(-3.14 ~ 5.76)	(-0.30 ~ 1.51)	(0.78 ~ 6.52)
	≤275.42	≤2.00	3.92(1.34 ~ 11.52)	3.17(0.55 ~ 8.66)			
CIN2+	>275.42	>2.00	1.00	1.00			
	>275.42	≤2.00	8.00(1.70 ~ 38.08)	5.08(0.61 ~ 42.66)	23.76	0.75	4.48
	≤275.42	>2.00	4.50(10.81 ~ 25.15)	3.74(3.06 ~ 12.90)	(-5.62 ~ 59.30)	(0.49 ~ 1.38)	(1.96 ~ 7.43)
	≤275.42	≤2.00	26.77(5.49 ~ 130.43)	31.58(4.61 ~ 274.94)			
SCC	>275.42	>2.00	1.00	1.00			
	>275.42	≤2.00	1.78(14.77 ~ 469.93)	1.57(10.18 ~ 394.09)	22.60	0.81	6.24
	≤275.42	>2.00	3.00(1.84 ~ 45.88)	4.74(0.95 ~ 89.53)	(0.89 ~ 52.43)	(0.44 ~ 2.10)	(6.83 ~ 33.67)
	≤275.42	≤2.00	20.31(59.29 ~ 3280.25)	27.91(63.49 ~ 3968.14)			

表 7 不同宫颈病变组红细胞叶酸(RBC-F)水平与 HPV16 E7 mRNA 表达的交互作用

组 别	RBC-F (ng/ml)	HPV16 E7 mRNA	OR 值(95%CI)	aOR 值(95%CI)	RERI 值 (95%CI)	AP 值 (95%CI)	SI 值 (95%CI)
CIN1	>275.42	>1.49	1.00	1.00			
	>275.42	≤1.49	3.29(1.13 ~ 9.53)	2.40(0.71 ~ 8.49)	0.41	0.07	1.09
	≤275.42	>1.49	5.19(1.64 ~ 16.47)	4.36(0.73 ~ 11.87)	(-3.12 ~ 8.79)	(0.03 ~ 1.21)	(0.79 ~ 2.44)
	≤275.42	≤1.49	4.82(1.53 ~ 15.17)	6.17(3.51 ~ 19.66)			
CIN2+	>275.42	>1.49	1.00	1.00			
	>275.42	≤1.49	8.00(1.50 ~ 35.18)	6.16(0.61 ~ 29.25)	16.68	0.60	2.68
	≤275.42	>1.49	6.23(1.10 ~ 35.20)	5.74(0.56 ~ 32.70)	(-12.52 ~ 59.33)	(0.31 ~ 1.56)	(1.96 ~ 7.43)
	≤275.42	≤1.49	31.82(6.64 ~ 152.44)	27.58(4.66 ~ 114.38)			
SCC	>275.42	>1.49	1.00	1.00			
	>275.42	≤1.49	1.78(0.66 ~ 11.60)	1.57(1.63 ~ 13.59)	26.39	0.83	6.85
	≤275.42	>1.49	6.23(1.44 ~ 26.93)	4.94(0.82 ~ 24.73)	(0.11 ~ 59.63)	(0.59 ~ 2.64)	(4.30 ~ 23.87)
	≤275.42	≤1.49	28.29(7.43 ~ 107.61)	31.90(9.49 ~ 168.34)			

胞叶酸水平与HPV16 E6/E7 mRNA表达在宫颈癌变中的交互作用进行探讨,显示不同级别的宫颈癌变患者红细胞叶酸水平与HPV16 E6/E7 mRNA表达量均呈负相关,在CIN1、CIN2+和SCC组红细胞叶酸缺乏与HPV16 E6/E7 mRNA高表达均存在正相加交互作用。经交互作用定量分析显示,在CIN1、CIN2+和SCC组中由红细胞叶酸缺乏与HPV16 E6 mRNA高表达交互作用所引起的病例分别占28%、75%和81%,而由红细胞叶酸缺乏与HPV16 E7 mRNA高表达交互作用引起的病例分别占7%、60%和83%。提示机体红细胞叶酸缺乏与HPV16 E6/E7 mRNA高表达同时存在时,可增加宫颈癌及癌前病变发生的风险,尤其在宫颈癌变进展的后期更为明显,但其详细机制有待深入研究。

总之,本研究揭示了叶酸缺乏和HPV16 E6/E7 mRNA高表达均可增加宫颈癌及癌前病变发生的风险,当两者同时存在时表现为正相加交互作用,为深入了解宫颈癌进展的病因和发病机制提供了新线索,也可为宫颈癌诊断和预防提供重要理论依据。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] 马景丽,王金桃,丁玲.血清叶酸与宫颈癌发病关系的Meta分析[J].现代预防医学,2008,35(21):4121-4124. DOI:10.3969/j.issn.1003-8507.2008.21.005.
Ma JL, Wang JT, Ding L. Meta-analysis of the relationship between serum folic acid status and the risk of cervical cancer [J]. Mod Prev Med, 2008, 35(21): 4121-4124. DOI: 10.3969/j.issn.1003-8507.2008.21.005.
- [2] Guan P, Howell-Jones R, Li N, et al. Human papillomavirus types in 115, 789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer [J]. Int J Cancer, 2012, 131(10): 2349-2359. DOI: 10.1002/ijc.27485.
- [3] Fiks AG, Grundmeier RW, Mayne S, et al. Effectiveness of decision support for families, clinicians, or both on HPV vaccine receipt [J]. Pediatrics, 2013, 131(6): 1114-1124. DOI: 10.1542/peds.2012-3122.
- [4] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(7): 3290-3295. DOI: 10.1073/pnas.94.7.3290.
- [5] 王金桃,高尔生,程玉英,等.内源性雌、孕激素与人乳头瘤病毒在宫颈癌发生中的协同作用研究[J].中华流行病学杂志,2005,26(5):370-373. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2005.05.017.
Wang JT, Gao ES, Cheng YY, et al. Analysis on synergistic action between estrogen, progesterone and human papillomaviruses in cervical cancer [J]. Chin J Epidemiol, 2005, 26(5): 370-373. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2005.05.017.
- [6] 孙雪松,丁玲,陈芳,等.叶酸缺乏及其与HPV16感染的交互效应对宫颈癌变的影响[J].中华流行病学杂志,2014,35(4):437-441. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.04.021.
Sun XS, Ding L, Chen F, et al. Effects of folate deficiency with HPV16 infection on cervix cancerization [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(4): 437-441. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.04.021.
- [7] 吴婷婷.叶酸与抑癌基因P16、FHIT的表达在宫颈癌变中的关系[D].太原:山西医科大学,2013.
Wu TT. Relationship of folate and P16, FHIT expression in cervical carcinogenesis [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2013.
- [8] 周媛.红细胞叶酸的微生物检测法[J].中国生育健康杂志,2012,23(2):155-158. DOI: 10.3969/j.issn.1671-878X.2012.02.034.
Zhou Y. Microbiological assay of RBC concentration of folic acid [J]. Chin J Reproduct Health, 2012, 23(2): 155-158. DOI: 10.3969/j.issn.1671-878X.2012.02.034.
- [9] Leonard SM, Wei WB, Collins SI, et al. Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(7): 1286-1293. DOI: 10.1093/carcin/bgs157.
- [10] zur Hausen H. Papillomaviruses infections: a major cause of human cancers [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1288(2): F55-78.
- [11] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5): 342-350. DOI: 10.1038/nrc798.
- [12] Rampias T, Boutati E, Pectasides E, et al. Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells [J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(3): 433-443. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0345.
- [13] Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2008, 8(4): 405-415. DOI: 10.1586/14737159.8.4.405.
- [14] Ho CM, Lee BH, Chang SF, et al. Type-specific human papillomavirus oncogene messenger RNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia [J]. Int J Cancer, 2010, 127(3): 622-632. DOI: 10.1002/ijc.25078.
- [15] Kottaridi C, Tsiodras S, Spathis A, et al. Clinical performance of human papillomavirus E6, E7 mRNA flow cytometric assay compared to human papillomavirus DNA typing [J]. Anal Quant Cytol Histol, 2011, 33(6): 305-310.
- [16] Tomaszewski JJ, Cummings JL, Parwani AV, et al. Increased cancer cell proliferation in prostate cancer patients with high levels of serum folate [J]. Prostate, 2011, 71(12): 1287-1293. DOI: 10.1002/pros.21346.
- [17] Alberg AJ, Selhub J, Shah KV, et al. The risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B12, and homocysteine [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000, 9(7): 761-764.
- [18] Ragasudha PN, Thulaseedharan JV, Wesley R, et al. A case-control nutrigenomic study on the synergistic activity of folate and vitamin B12 in cervical cancer progression [J]. Nutr Cancer, 2012, 64(4): 550-558. DOI: 10.1080/01635581.2012.675618.
- [19] Wang JT, Ding L, Jiang SW, et al. Folate deficiency and aberrant expression of DNA methyltransferase 1 were associated with cervical cancerization [J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(11): 1639-1646. DOI: 10.2174/13816128113199990543.
- [20] 陈霄,王金桃,白丽霞,等.宫颈癌变中叶酸缺乏与脆性组氨酸三联体基因表达异常的相互作用[J].中华流行病学杂志,2015,36(4):387-392. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.04.020.
Chen X, Wang JT, Bai LX, et al. Interaction between folate deficiency and aberrant expression related to fragile histidine triad gene in the progression of cervical cancerization [J]. Chin J Epidemiol, 2015, 36(4): 387-392. DOI: 10.3760/cma.j.issn. 0254-6450.2015.04.020.
- [21] Lu X, Parvathaneni S, Hara T, et al. Replication stress induces specific enrichment of RECQ1 at common fragile sites FRA3B and FRA16D [J]. Mol Cancer, 2013, 12: 29. DOI: 10.1186/1476-4598-12-29.
- [22] 白兰.叶酸与DNKMT1对FHIT基因在宫颈癌细胞中表达的影响[D].太原:山西医科大学,2012.
Bai L. Influence of folate and DNKMT1 to FHIT expression in cervical cancer cells [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2012.

(收稿日期:2015-10-28)

(本文编辑:张林东)