

• 论著 •

宫颈病变中 HPV16 感染状况、微卫星不稳定性及错配修复基因表达的研究

苏燕燕 王惠兰 米鑫

【摘要】 目的 通过检测 HPV16、微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 和错配修复基因 (hMLH1、hMSH2) 的表达, 探讨三者在宫颈病变进展中的作用及意义。方法 将宫颈病变组织分为宫颈炎、宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) CIN1、CIN2~CIN3、宫颈癌 4 组。用 PCR 方法检测 HPV16 感染状况, 用聚合酶链-单链构象多态性分析方法检测宫颈组织中 MSI 的表达, 采用免疫组织化学 SP 法来检测宫颈组织中的 hMLH1 和 hMSH2 的表达, 并分析三者的相关性。结果 CIN1 20 例中 25.0% (5/20) 检测到 HPV16, CIN2~CIN3 31 例中 54.8% (17/31) 检测到 HPV16, 二者比较 $\chi^2=4.413$, $P=0.034$; 宫颈癌中各期 HPV16 感染比较, 差异均无统计学意义。选取的三个微卫星位点 D3S2832E、RH91127 和 SHGC-56838 均在宫颈炎中未检测到 MSI, 在 CIN 和宫颈癌中均检测到 MSI 的存在。但总体的表达率较低, 最高只有 46.7%。错配修复基因的低表达检测结果和 MSI 的检测结果一致, 唯一不同的是前者的总体表达率较高, 最高的低表达率为 80%; 宫颈病变中 MSI 与错配修复基因 (本文即 hMLH1、hMSH2) 蛋白低表达及 HPV16 为正相关。结论 HPV16 的感染导致错配修复基因的低表达, 进一步引起微卫星不稳定性, 可能是宫颈癌发生、发展的重要机制, HPV16、微卫星不稳定性 and 错配修复基因有望作为宫颈癌高危人群的检测指标。

【关键词】 RASSF1A 基因; CIN; hMLH1; hMSH2; 宫颈癌; MSI; HPV16

The study of HPV16 infection, microsatellite instability and mismatch repair gene expression in cervical lesion pathological changes

SU Yanyan, WANG Huilan, MI Xin.

(The second Medical college of Hebei University, shijiazhuang 050000, China)

【Abstract】 Objective Our objective was to explore the importance of human papilloma virus 16 (HPV16) in the etiology of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) by analyzing the expression of human mut-l homologue1, human mut-s homologue2 and microsatellite instability (MI) in patients suffering from cervical lesion. **Methods** Patients were divided into 4 groups according to the pathologic diagnosis: cervicitis, CIN1, CIN2~CIN3 and cervical cancer groups. MI was determined by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP). Immunohistochemical staining with SP were performed to analyse the gene expression of human mut-l homologue1 and human mut-s homologue2 (hMLH1 and hMSH2), also PCR was performed to detect human papilloma virus 16. **Results** 5 patients were HPV16 positive in CIN1 group (5/20, 25.0%), which was significant lower than that in CIN2~CIN3 group (17/31, 54.8%; $\chi^2=4.413$, $P=0.034$). The selected three MSI loci D3S2832E, RH91127 and SHGC-56838 were not detected in cervicitis group while detected in both CIN and cervical cancer group, but the general expression rate was low (46.7%). And the expression of hMLH1 and hMSH2 had the same trend with MSI and were positive correlated with HPV16 infection. **Conclusions** HPV16 infection can decrease the expression of hMLH1 and hMSH2 and thus cause MSI which may be an important mechanism of the development of cervical cancer. HPV16 infection, hMLH1 and hMSH2 MSI is expected to be makers of high-risk of cervical carcinoma.

【Key words】 RASSF1A gene; CIN; hMLH1; hMSH2; cervical carcinoma; MSI; HPV16

Chin J Clin Obstet Gynecol, 2012, 13: 18-21

doi: 10.3969/j.issn.1672-1861.2012.01.006

作者单位: 050000 石家庄 河北医科大学第二医院妇产科 [苏燕燕 (现在北京市顺义区妇幼保健院妇产科)、王惠兰]; 北京市顺义区妇幼保健院 (米鑫)
通信作者: 王惠兰 Email: wanghuilan20002000@yahoo.com.cn

微卫星不稳定性 (microsatellite instability) 是导致抑癌基因 RASSF1A 基因 (ras association domain family 1A, RASSF1A) 失活的主要机制, 本研究选择 RASSF1A 基因内的三个微卫星多态标记对 119 例宫颈组织进行微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 的检测, 同时检测错配修复系统 MMR (mismatch repair enzyme) 中最重要的两个基因 hMLH1 (human mut-L homologue1) 和 hMSH2 (human muts homologue2), 如果这些错配修复基因发生功能缺陷或活性降低, 复制过程中出现的错误不能及时被纠正, 会使基因突变率增高, 从而促进肿瘤的发生发展。并且通过检测人乳头瘤病毒 16 (human papillomavirus 16, HPV16) 的感染状况, 分析其与 RASSF1A 基因 MSI 及错配修复基因之间的关系, 旨在探讨三者之间在宫颈病变发生、发展过程中的作用, 为揭示宫颈癌的发生机制提供理论依据。

资料与方法

一、研究对象

收集 2006 年 2 月至 2007 年 10 月河北医科大学第二医院妇产科手术切除或阴道镜室活检的宫颈标本共 119 例。所有病例经病理检查证实, 分别为慢性宫颈炎 16 例、CIN1 20 例、CIN2~CIN3 31 例、高中度分化宫颈鳞状细胞癌 36 例、低度分化鳞状细胞癌 16 例, 其中包括按 FIGO 分期宫颈癌 0 期原位癌归入 CIN2~CIN3 中, I~II 期 37 例、III~IV 期 15 例。所有标本均为手术切除或活检新鲜标本, 分为三部分, 一部分送病理; 一部分约 1 cm×1 cm×1 cm 投入-160℃液氮或-80℃冰箱保存 PCR 方法用; 另一部分约 1 cm×1 cm×1 cm 放入 4% 的甲醛溶液中固定等免疫组化时用。自身对照的标本在离病变部位约 1.5 cm 的位置, 如怀疑癌时则取标本的周缘组织。所有患者均经过患者本人及家属同意, 且术前均未接受任何抗肿瘤治疗, 术后经病理证实。

二、方法

1. DNA 的提取: 按北京赛百盛基因有限公司提供的基因组 DNA 纯化试剂盒说明书提取 DNA。RASSF1A 基因的三个位点 D3S2832E、RH91127 和 SHGC-56838, 及 HPV16 序列检索自 NCBI-Nucleotide 基因库, 采用 Primer 5.0 软件设计, 由北京赛百盛基因有限公司合成。

2. PCR 反应体系: 基因组 DNA 模板 3 μ l, 10×buffer 2 μ l, dNTPs 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 1.5 μ l, 上下游引物各 0.3 μ l, 加三蒸水至体积 20 μ l。扩增循环参数如下: 94℃预变性 5 min, 94℃预变性 45 s, 55℃ 60 s, 72℃ 45 min。30 次循环后 72℃延伸 10 min。PCR 产物于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像分析系统观察并照相。宫颈病变组织与 HPV 阳性标本对比, 在对应位置处出现相同的条带, 记为 HPV 阳性。对比同时上样的宫颈病变组织与正常宫颈组织, 如果肿瘤组织出现泳动条带的数量改变, 位置或浓度改变 (肉眼观察), 即判断为 MSI (阳性病例均重复实验 2 次)^[1]。

3. 免疫组化染色 SP 法常规检测 hMLH1 及 hMSH2 蛋白的表达, hMLH1、hMSH2 定位于细胞核或浆内, 正常细胞为细胞浆和 (或) 核呈棕黄色着染阳性表达呈棕褐色颗粒。计数 1 000 个细胞, 按染色强度打分: 0 分为无色, 1 分为淡黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色; 再将阳性细胞所占的百分比打分: 阴性为 0 分, 0% < 阳性细胞 ≤ 10% 为 1 分, 10% < 阳性细胞 ≤ 50% 为 2 分, 50% < 阳性细胞 ≤ 75% 为 3 分, 75% < 阳性细胞 ≤ 100% 为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比相乘, 乘积 ≤ 3 分者免疫反应 (-)^[2]。hMLH1、hMSH2 结果均用阴性率表示, 也称表达缺失率。

三、统计学分析

采用 SPSS 14.0 软件进行统计分析, 计数资料行乘列表 χ^2 检验和 Fishers 确切概率法及 spearman rank correlation 相关性检验。

结 果

一、HPV16 在各级宫颈病变的感染状况

HPV16 感染状况在慢性宫颈炎与 CIN 比较, $\chi^2 = 7.351$, $P = 0.005$; CIN1 与 CIN2~CIN3 比较, $\chi^2 = 4.413$, $P = 0.034$; 高、中分化鳞状细胞癌与低分化鳞状细胞癌比较, $\chi^2 = 1.148$, $P = 0.233 > 0.05$; I~II 期与 III~IV 期宫颈癌比较, $\chi^2 = 0.804$, $P = 0.294$ 。

二、RASSF1A 基因的三个位点在各级宫颈病变中检出 MSI 的情况

RASSF1A 基因的三个位点 D3S2832E、RH91127、SHGC-56838 三个位点均在慢性宫颈炎中没检出 MSI, 而 CIN1 与 CIN2~CIN3、宫颈高中分化鳞

状细胞癌与低分化鳞状细胞癌、I~II 期宫颈癌与 III~IV 期宫颈癌对照, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。三个位点最高的表达率为 46.7% (表 1)。

表 1 三个位点的微卫星不稳定性
在宫颈病变中的表达情况

病变状况	D3S2832E			RH91127		SHGC-56838	
	总例数	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
宫颈病变							
宫颈炎	16	0	0***	0	0***	0	0***
宫颈上皮内瘤变	51	7	13.7**	6	11.7**	6	11.8**
宫颈癌	52	12	23.1**	11	21.2**	11	21.2**
宫颈上皮内瘤变							
宫颈上皮内瘤变Ⅰ级	20	0	0	0	0	0	0
宫颈上皮内瘤变Ⅱ～Ⅲ级	31	7	22.6*	6	19.4*	6	19.4*
宫颈癌组织学分期							
高、中分化宫颈鳞癌	36	5	13.9	4	11.1	4	11.1
低分化宫颈鳞癌	16	7	43.8*	7	43.8*	7	43.8*
宫颈癌 FIGO 分期							
Ⅰ～Ⅱ期宫颈癌	37	5	13.5	5	13.5	4	10.8
Ⅲ～Ⅳ期宫颈癌	15	7	46.7*	6	40.0*	7	46.7*

注: n: 检出数; * 与上一组对比, $P<0.05$; ** 与上一组对比, $P>0.05$; *** 与宫颈癌组对比, $P<0.05$ 。

三、hMLH1 和 hMSH2 两种错配修复酶在各级宫颈病变中的表达情况

hMLH1 在宫颈炎、CIN 和宫颈癌, CIN1 与 CIN2~CIN3, 宫颈高、中分化鳞癌、低分化鳞癌, 宫颈癌 I~II 期、III~IV 期低表达率分别为 18.8%、32.3%、53.8%, 20%、48.4%, 44.4%、75.0%, 43.2%、80.0%; 而 hMSH2 分别为 12.5%、29.4%、38.5%, 10%、41.9%, 27.8%、62.5%, 29.7%、60.0%。两种错配修复酶的低表达情况与三个微卫星位点的检测结果一致即 CIN1 与 CIN2~CIN3、宫颈高中分化鳞状细胞癌与低分化鳞状细胞癌、I~II 期宫颈癌与 III~IV 期宫颈癌对照, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

四、宫颈病变组织中 MSI、错配修复基因蛋白低表达和 HPV16 感染状况的相关性

宫颈病变组织中 MSI、hMLH1、hMSH2 低表达和 HPV16 感染状况的相关系数均为 $r_s=+1$, 为两两呈正相关。错配修复基因低表达, RASSF1A 基因的微卫星不稳定性在宫颈组织中表达有随着宫颈病变加重而升高的趋势。

讨 论

宫颈癌是全世界妇女中仅次于乳腺癌导致妇女

死亡的第二大恶性肿瘤^[3]。宫颈癌的病因确定有三个主要因素, 其中两个因素与乳头状瘤病毒 (HPV) 感染有关, 即病毒 E6、E7 蛋白的作用和病毒 DNA 整合到细胞基因组中, 第三个因素是细胞基因损害的积累^[4]。现有研究表明, 在宫颈癌与前列腺癌中, RASSF1A 失活与 HPV 感染呈负相关关系^[5-6]。细胞内 RASSF1A 与 E6/E7 病毒蛋白之间的这种相互作用在肿瘤转化和宫颈上皮细胞的无限增殖中起着非常重要的作用^[7-8]。在宫颈癌中, 经常发生 3p21 区域的微卫星不稳定性, 而 RASSF1A 基因定位于 3p21.3, 因此它与宫颈癌的发生发展有关^[1]。Yu 等^[9]研究发现宫颈癌 RASSF1A 微卫星位点不稳定性与杂合性缺失发生很频繁, 有作者报道 RASSF1A 基因的 MSI 的发生率在 CIN 中呈递增趋势, 并与宫颈癌组织的淋巴结转移有关^[10]。赵富玺等^[1]研究得出宫颈癌与 CIN 的 LOH 和 MSI 的发生率无统计学差异。LOH 发生率在宫颈癌组织 I~II 期与 III~IV 期及高中分化与低分化之间有统计学差异; 高级别 CIN (CIN2/3) 患者的 LOH 和 MSI 发生率高于低级别 CIN (CIN I) 患者^[1]。hMLH1 和 hMSH2 具有修复 DNA 碱基错配, 增强 DNA 复制忠实性, 维持基因组稳定及降低自发性突变的功能。有学者认为, 如果 hMLH1 和 hMSH2 的功能发生缺陷或活性降低, 复制过程中出现的错误不能及时被纠正, 就会使整个基因组不稳定, 随机突变率增高, 而主要通过 MSI 途径, 导致细胞微卫星 (micro satellit, MS) 序列发生改变而出现不稳定导致肿瘤发生^[11]。

本研究中 RASSF1A 基因的三个位点微卫星不稳定性的检测: 可能是癌前病变双向转归作用 (即 CIN1 有转为正常宫颈组织或慢性宫颈炎的可能, CIN2~CIN3 中有发展为宫颈癌的可能), 而使总体 CIN 分别与慢性宫颈炎和宫颈癌比较, 差异均无统计学意义。因此做了进一步 CIN 分组, 统计发现 CIN1 与 CIN2~CIN3 进行比较, 差异有统计学意义, 另外对宫颈癌也做了进一步分期、分级统计显示: 宫颈高中分化鳞状细胞癌与低分化鳞状细胞癌、I~II 期宫颈癌与 III~IV 期宫颈癌对照有差异。说明微卫星改变在 CIN2~CIN3 和宫颈鳞状细胞癌中表达频繁, 提示 MSI 是宫颈癌发生发展过程中的频发事件。同时, 本研究中 MSI 在宫颈高度病变的高检出率也提示所选用的三个微卫星位点 D3S2832E、RH91127、SHGC-56838 可能是宫颈

癌 MSI 检测的敏感位点, 三个位点均定位于 3p21.3, RASFF1A 基因即定位于此。这对临床 MSI 检测指标的选用有一定参考价值。本试验结果与文献^[3]报道的结果相一致。值得提出 RASSF1A 基因的微卫星变异总体的检出率很低, 几乎均在宫颈癌中的检出率刚达到 30%~40% 左右, 推断 RASSF1A 基因的微卫星变异是宫颈癌发生过程中的较晚期事件, 对于宫颈癌诊断及判断预后可能具有临床实用价值。通过宫颈病变组织 HPV16 感染状况的研究发现 HPV16 的感染率随着宫颈病变级别的升高而增高, 宫颈癌组与 CIN 组 HPV 感染阳性率明显高于慢性宫颈炎组。随着临床分期和组织学分级的增加, HPV 的感染率也逐渐增加, 但差异无统计学意义, 表明 HPV 感染与宫颈癌的临床分期和组织学分级均无相关性。但 CIN1 与 CIN2~CIN3 比较有差异, 表明 HPV16 在宫颈病变的进展中具有很大意义。车耀润等^[8]研究发现 HPV 感染、hMLH1 及 hMSH2 阳性表达率与分化程度、临床分期及淋巴结转移无显著相关, HPV 感染细胞 hMSH2 与 hMLH1 蛋白表达上调的现象表明 HPV16 感染增加子宫颈上皮细胞 DNA 复制时的碱基错配。因此, 这可能是 HPV16 的致癌机制之一。文献报道曾证实宫颈癌等肿瘤中, 普遍存在错配修复酶 hMLH1 和 hMSH2 的表达缺失^[12], 进一步证实了 MMR 保证 DNA 复制忠实性的重要作用。提示宫颈病变组织中 hMLH1 和 hMSH2 低表达可能是导致宫颈癌发生的重要原因。本研究中 hMLH1 和 hMSH2 低表达率与微卫星不稳定性的检测结果一致, 均随着宫颈病变级别的升高而增高, 其中 hMLH1 的低表达率比 hMSH2 的低表达率高, 说明 hMLH1 的低表达率在宫颈各级病变中更加显著, 但两者之间经统计学比较并无差异, 可能与样本小有关。提示宫颈病变的进展及宫颈癌的发生与 DNA 错配修复系统 (mismatch repair enzyme, MMR) 功能缺陷有关。Elhamidi 等^[13]的基因微卫星变异分析可预示 22%~47% 治疗后仍持续或进展的 CIN。MMR 基因不表达或表达出错误截短的错配修复蛋白, 使该细胞 DNA 的复制错配率增加, 基因组发生 MSI 而使肿瘤发生。进一步证实了本研究结果。

本研究 HPV16 感染状况与 hMLH1 和 hMSH2 的低表达及 RASSF1A 基因的三个位点的微卫星不稳定性的检测结果一致, 提示宫颈病变组织

中 HPV16 可能导致 hMLH1 和 hMSH2 的低表达, hMLH1 和 hMSH2 的低表达促使 MSI 的发生, 而三者的共同作用可能是导致宫颈癌发生的重要原因。从而为 CIN 进展为宫颈癌提供理论支持, 并提示 HPV16、微卫星不稳定性及错配修复基因联合检测有望作为宫颈癌高危人群预警的检测指标。

参 考 文 献

- [1] 赵富玺, 燕杰. RASSF1A 基因微卫星变异与宫颈癌发生发展的关系. 肿瘤杂志, 2007, 1: 45-51.
- [2] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断. 中国癌症杂志, 1996, 6: 229-231.
- [3] 燕杰, 赵富玺. 宫颈癌中 RASSF1A 基因高度甲基化及微卫星变异的研究进展. 医学综述, 2006, 22: 1368-1370.
- [4] Kuzmin I, Liu L, Damann R, et al. Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection. Cancer Res, 2003, 63: 1888-1893.
- [5] Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopoy A, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. Cancer Res, 2002, 62: 3498-3502.
- [6] Chow LS, Lo KW, Kwong J, et al. RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer, 2004, 109: 839-847.
- [7] Cohen Y, Singer G, Lavie O, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix. J Clinical cancer research, 2003, 9: 2981-2984.
- [8] 车耀润, 张朝, 吕申, 等. 子宫颈鳞癌 HPV16 感染对错配修复基因表达的影响. 肿瘤防治杂志, 2005, 12: 1767-1770.
- [9] Yu MY, Tong JH, Chan PK, et al. Hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A and frequent concomitant loss of heterozygosity at 3p21 in cervical cancers. Int J Cancer, 2003, 105: 204-209.
- [10] Zhao FX, Yan J, Liu RH, et al. Relationship between Microsatellite Alterations of RASSF1A Gene and Development of Cervical Carcinoma Chinese. Journal of Cancer Research, 2007, 19: 45-51.
- [11] Choi CH, Lee KM, Choi J, et al. Hypermethylation and loss of heterozygosity of tumor suppressor genes on chromosome 3p in cervical cancer. J Cancer letters, 2007, 255: 26-33.
- [12] Ciavattini A, Piccioni M. Immunohistochemical expression of DNA mismatch repair (MMR) system proteins (hMLH1, hMSH2) in cervical preinvasive and invasive lesions. Pathology Research and Practice, 2005, 201: 21-25.
- [13] Elhamidi A, Hamoudi RA, Kocjan G, et al. Cervical intraepithelial neoplasia: prognosis by combined LOH analysis of multiple loci. Gynecol Oncol, 2004, 94: 671-679.

(收稿日期: 2011-09-03)