四川大学学报(医学版)
J Sichuan Univ (Med Sci Edi) 2019, 50(5):666 - 671

人乳头瘤病毒16型*E5*基因在宫颈癌发生进程中的动态研究*

李茂圆[1], 简 洁[1,2], 梁开如[3], 喻景瑞[3], 李 明[3], 唐凤祝[1], 李婉宜[1△]

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 微生物学教研室(成都 610041); 2. 贵阳市疾病预防控制中心(贵阳 550003);
3. 四川省妇幼保健院 宫颈癌防治中心(成都 610031)

【摘要】 目的 观察人乳头瘤病毒(HPV)16型*E5*基因在宫颈癌发生发展过程中的动态变化情况,探讨*E5* mRNA在宫颈癌早期筛查中的临床意义。**方法** 收集2015年9月至2017年12月在四川省妇幼保健院宫颈门诊就诊或行宫颈癌机会性筛查人群的宫颈病变组织石蜡标本49例(HPV阳性),按照FIGO标准将收集的宫颈病变标本进行分期:宫颈炎13例,宫颈上皮内瘤样病变(CIN)Ⅰ 5例,CIN Ⅱ 18例,CIN Ⅲ 5例,宫颈癌8例。利用实时荧光定量PCR检测不同病理分级宫颈组织中*E5*基因的完整度及*E5*、*E6*、*E7* mRNA的表达水平。**结果** 在49例HPV16阳性感染患者中,CINⅠ宫颈病变组织中*E5*基因的完整度比宫颈炎、CINⅡ及宫颈癌组织更高($P<0.05$);CINⅠ宫颈病变组织中*E5*基因完整度虽高于CINⅢ组织,但差异无统计学意义。不同病理级别标本中*E5*、*E6*、*E7* mRNA的表达水平均在CINⅢ组织最高。与*E6*、*E7* mRNA相比,*E5* mRNA在宫颈病变的全过程中均呈现出优势表达状态($P<0.05$),而*E6*、*E7* mRNA的表达水平只在病变后期(CINⅢ和宫颈癌)有升高趋势。**结论** 在HPV16阳性感染患者的病变组织中,*E5*基因的完整度可能与宫颈疾病的发生、发展有关。*E5*基因有望成为宫颈癌早期筛查的靶基因。

【关键词】 人乳头瘤病毒16 宫颈病变 *E5*基因 实时荧光定量PCR

Study on Dynamic Changes of Human Papillomavirus 16 *E5* Gene in the Occurrence of Cervical Cancer *LI Mao-yuan*[1], *JIAN Jie*[1,2], *LIANG Kai-ru*[3], *YU Jing-rui*[3], *LI Ming*[3], *TANG Feng-zhu*[1], *LI Wan-yi*[1△]. 1. *Department of Microbiology, West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University*, Chengdu 610041, China; 2. *Guiyang Center for Disease Control and Prevention*, Guiyang 550003, China; 3. *The Center of Cervical Cancer Prevention and Treatment, Sichuan Provincial Hospital for Women and Children*, Chengdu 610031, China

△ Corresponding author, E-mail: hxliwanyi@126.com

【Abstract】 Objective To explore the dynamic changes of human papillomavirus (HPV) type 16 *E5* gene in the development of cervical cancer and the significance of *E5* mRNA in early screening of cervical cancer. **Methods** Paraffin specimens of cervical lesions were collected from 49 cases (HPV positive) during September 2015 to December 2017 According to the standard of FIGO, all cervical lesions were diagnosed as: 13 cases of cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia disorders (CIN) Ⅰ in 5 cases, CIN Ⅱ in 18 cases, CIN Ⅲ in 5 cases, 8 cases of cervical cancer. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the integrity of *E5* gene and the mRNA expression levels of *E5*, *E6* and *E7* in cervical tissues. **Results** All the 49 cases showed positive HPV16 infection. *E5* genetic integrity in CIN Ⅰ was higher than that in cervical inflammation, CIN Ⅱ and cervical cancer ($P<0.05$), which was also higher than that in CIN Ⅲ, but without statistically significance ($P>0.05$). The mRNA levels of *E5*, *E6*, *E7* were the highest in CIN Ⅲ. Compared with *E6* and *E7*, *E5* presented superior expression in all types of cervical lesions ($P<0.05$), while *E6* and *E7* mRNA expressions only increased in CIN Ⅲ and cervical cancer. **Conclusion** In the patients with HPV16 infection, the integrity of *E5* gene in cervical tissues may be related to the occurrence and development of cervical diseases. *E5* gene is expected to be the target gene for early screening of cervical cancer.

【Key words】 Human papillomavirus 16 Cervical lesions *E5* gene Real-time fluorescence quantitative PCR

* 四川省科技厅应用基础研究项目(No.2012JY0017)资助

△ 通信作者, E-mail: hxliwanyi@126.com

宫颈癌是女性常见恶性肿瘤，国际癌症研究机构(IARC)统计结果显示[1]，2018 年全球宫颈癌新发病例约 57 万，死亡病例 31.1 万，其发病率和死亡率在女性恶性肿瘤中均位列第四。在人类发展指数低的国家，其发病率和死亡率位列女性恶性肿瘤的第二位，仅次于乳腺癌，严重威胁着女性的生命健康。

早在 20 世纪 80 年代，德国科学家 ZUR HAUSEN 就已证实人乳头瘤病毒(human papillomavirus，HPV)持续感染是引起宫颈癌的必要因素[2]，有资料显示，宫颈癌患者中 HPV 检出率为 99.7%，以 HPV16 型检出率最高、致癌性最强[3-4]。既往主要对 HPV16 阳性宫颈癌患者 *E6*、*E7* 基因进行研究，*E5* 基因的相关研究较少，且 *E5* 基因相对于 *E6*、*E7* 基因在宫颈癌发生发展中的相互关系也未见深入报道。故本研究通过检测不同病理分级的 HPV16 阳性感染宫颈病变组织中 *E5* 基因完整性及 *E5*、*E6*、*E7* mRNA 表达水平，分析 *E5* 基因在宫颈癌发生发展过程中的动态变化情况，探讨其在宫颈癌早期筛查及诊治中的意义。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　样本收集　收集 2015 年 9 月至 2017 年 12 月在四川省妇幼保健院宫颈门诊就诊或行宫颈癌机会性筛查人群的宫颈病变组织石蜡标本(所有患者均知情同意)，HPV16 阳性共 49 例，年龄 20～76 岁，中位年龄 34 岁，取标本前未进行放、化疗。根据宫颈病理组织学检查结果，按照 FIGO 标准将收集的宫颈病变标本进行分期，以此分为 5 组：宫颈炎组 13 例，宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia，CIN)Ⅰ组 5 例，CIN Ⅱ组 18 例，CIN Ⅲ组 5 例，宫颈癌组 8 例。

1.1.2　主要试剂和仪器　FFPE DNA Kit(D3399-01)、FFPE RNA Kit (R6954-01)均购于美国 Omega Bio-Tek；Prime Script™ RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq Ⅱ购于宝生物生物工程有限公司；内参基因 β-actin 引物由宝生物生物工程有限公司合成，其他引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成，序列详见表 1；实时荧光定量 PCR 仪(CFX96)购于美国 Bio-Rad。

1.2　实验方法

1.2.1　组织 DNA/mRNA 提取　石蜡标本进行切片，每个标本切取 8 片，厚度均为 8 μm，按照 DNA/RNA 提取试剂盒的要求，二甲苯溶解石蜡，OB Protease使组织裂解后提取组织中的DNA(检测 *E5* 基因完整度)和总 mRNA(检测 *E5*、*E6*、*E7* mRNA 表达水平)。提取完成后，采用分光光度计分别检测 DNA、总 mRNA 的吸光度 A_{260}/A_{280} 比值，比值为 1.8～2.0 则表明提取的 DNA、mRNA 符合标准，可进行后续实验，DNA 标本于－20 ℃保存备用，RNA 标本于－80 ℃保存备用。全程冰上操作，采用低温离心机进行离心。

表 1　PCR 引物序列

Table 1　The primer sequence

Gene		Sequence of primer	Length of products
E5-A	Forward	5′-GACAAATCTTGATACTGCATCCACA-3′	183 bp
	Reverse	5′-CCAATAAAACACCTAAACGCAGAG-3′	
E5-B	Forward	5′-TACTATTGTGGATAACAGCAGCCTC-3′	261 bp
	Reverse	5′-CGTTTGTGTCGCATTGTTAAGTG-3′	
E5	Forward	5′-GACAAATCTTGATACTGCATCCACA-3′	183 bp
	Reverse	5′-CCAATAAAACACCTAAACGCAGAG-3′	
E6	Forward	5′-GAGCGACCCAGAAAGTTACCAC-3′	116 bp
	Reverse	5′-AAGTCATATACCTCACGTCGCAGT-3′	
E7[5]	Forward	5′-TGCAACCAGAGACAACTGAT-3′	183 bp
	Reverse	5′-TGTCTACGTGTGTGCTTTGT-3′	
β-actin	Forward	5′- CCACGAAACTACCTTCAACTAA -3′	132 bp
	Reverse	5′- GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT -3′	

1.2.2　组织 mRNA 反转录　①基因组去除反应：反应体系包括 5×gDNA Eraser Buffer 2 μL、gDNA Eraser 1 μL、总 mRNA 1～2 μL，最后用 RNase Free H_2O 将反应体系补充至 10 μL。混匀，于42 ℃反应 2 min，收集反应液；②反转录反应：反应体系总体积 10 μL，包括 5×Primescript Buffer2 4 μL、Primescript RT Enzyme Mix Ⅰ 1 μL、RT Primer Mix 1 μL、RNase Free H_2O 4 μL。将反转录反应混合液配好后加入已收集的基因组去除反应混合液

中,混匀,置入 PCR 仪 37 ℃放置 15 min,再 85 ℃反应 5 s。反应完成后,将产物 cDNA 于−80 ℃保存备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)扩增 ①HPV16 *E*5-A 片段的扩增:反应体系总体积 10 μL,包括 SYBR Ⅱ 5.0 μL、上下游引物 0.4 μL、ddH_2O 3.6 μL、样本 DNA 1.0 μL,同时设置阴性对照。扩增条件按照 95.0 ℃预变性 30 s、95.0 ℃变性 5 s、61.4 ℃退火 30 s 设置,扩增 40 个循环。②HPV16 *E*5-B 片段的扩增:反应体系总体积 10 μL,包括 SYBR Ⅱ 5.0 μL、上下游引物 0.3 μL、ddH_2O 3.7 μL、样本 DNA 1.0 μL,同时设置阴性对照。扩增条件按照 95.0 ℃预变性 30 s、95.0 ℃变性 5 s、64 ℃退火 30 s 设置,扩增 40 个循环。③HPV16 *E*5 cDNA 的扩增:反应体系(样本 DNA 为 1.2.2 反转录的 cDNA)和扩增条件同 HPV16 *E*5-A 片段的扩增。④HPV16 *E*6 cDNA 的扩增:反应体系同 HPV16 *E*5-B 片段的扩增(样本 DNA 为 1.2.2 反转录的 cDNA)。扩增条件按照 95.0 ℃预变性 30 s、95.0 ℃变性 5 s、62 ℃退火 30 s 设置,扩增 40 个循环。⑤HPV16 *E*7 cDNA:反应体系同 HPV16 *E*5-B 片段的扩增(样本 DNA 为 1.2.2 反转录的 cDNA)。扩增条件按照 95.0 ℃预变性 30 s、95.0 ℃变性 10 s、57 ℃退火20 s、72 ℃延伸 20 s 设置,扩增 40 个循环。⑥β-actin 作为 PCR 内参,反应体系同 HPV16 *E*5-A 片段的扩增(样本 DNA 为 1.2.2 反转录的 cDNA)。扩增条件为 95.0 ℃预变性 30 s、95.0 ℃变性 5 s、60.0 ℃退火 30 s,扩增 40 个循环。

PCR 扩增完成后,计算 Ct(*E*5-A)/Ct(*E*5-B)比值,比值越接近 1,提示该样本 DNA *E*5 基因完整度越高。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 *E*5、*E*6 和 *E*7 mRNA 进行相对定量(以宫颈炎组 mRNA 的相对表达量为 1)。

1.3 统计学方法

采用单因素方差分析和 *t* 检验进行组间比较,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV16 *E*5 基因的完整度

琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示,所有样本均扩增出 *E*5-A 基因片段,而仅有 25 例样本扩增出 *E*5-B 基因片段。提示 49 例 HPV16 阳性样本中只有 25 例样本 *E*5 基因是完整的。

2.2 HPV16 *E*5 基因完整度与宫颈疾病的关系

CIN Ⅰ组 Ct(*E*5-A)/Ct(*E*5-B)比值最高,高于宫颈炎组、CIN Ⅱ和宫颈癌组,差异均有统计学意义($P<0.05$),而 CIN Ⅲ组比值与 CIN Ⅰ组比值较为接近,差异无统计学意义。见图 2。

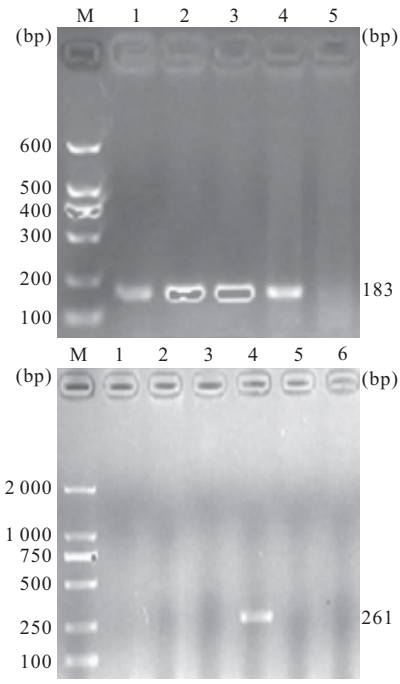


图 1 *E*5 DNA PCR 产物凝胶电泳

Fig 1 Agarose gelelectrophoresis of *E*5 DNA RT-qPCR production

A: Agarose gelelectrophoresis of *E*5-A production (M: DNA marker; 1-4: Sample DNA; 5: Negative control); B: Agarose gelelectrophoresis of *E*5-B production (M: DNA marker; 1: Negative control; 2-6: Sample DNA)

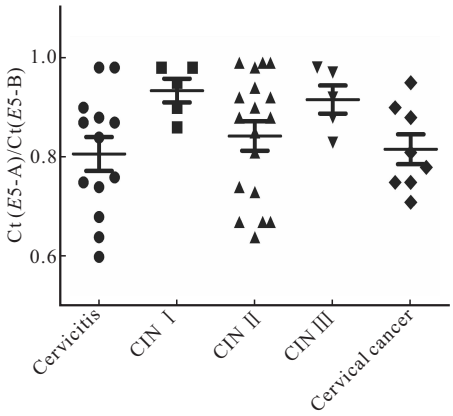


图 2 各级宫颈病变组织中 HPV16 *E*5 基因的完整度

Fig 2 The integrity of HPV16 *E*5 gene in cervical lesions at all levels

Data presented in the form of $\bar{x}\pm s$

2.3 mRNA 样本的质量检测及基因引物的特异性检测

从 49 例 HPV16 阳性标本中提取到 41 例质量合格的 mRNA 样本，反转录成 cDNA 后对 β-actin 进行实时荧光定量 PCR 扩增，产物电泳显示，41 例样本 cDNA 质量均合格，出现单一清晰目的条带，见 图3A，均可进行后续实验。随后对*E*5、*E*6、*E*7 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 扩增，产物电泳后均可见单一清晰条带，见图 3B～3D。电泳结果结合熔解曲线（图 4）分析可知，β-actin、*E*5、*E*6、*E*7 基因的引物特异性较好，非特异性产物的影响小。

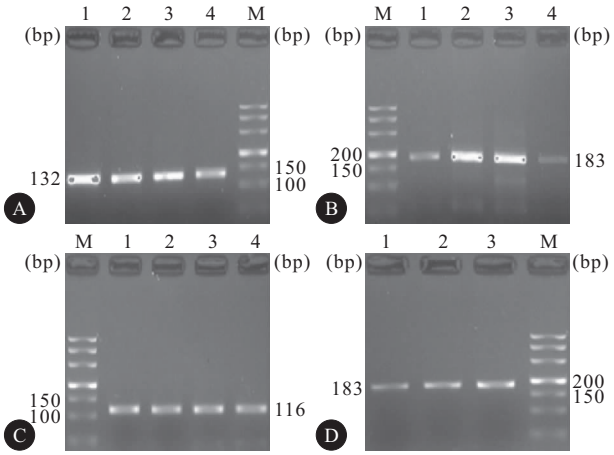


图 3　cDNA 实时荧光定量 PCR 产物凝胶电泳

Fig 3　Agarose gelelectrophoresis of cDNA RT-qPCR production

A：β-actin；B：*E*5；C：*E*6；D：*E*7；M：DNA marker；1-4：Sample cDNA

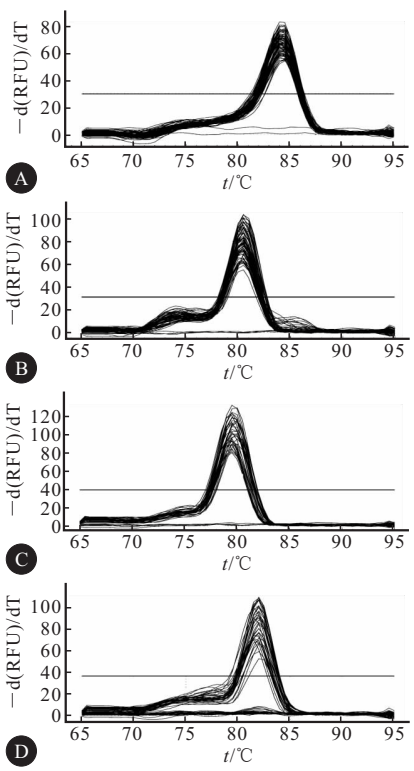


图 4　β-actin(A)、*E*5(B)、*E*6(C)、*E*7(D)cDNA 实时荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig 4　Melt curves of β-actin (A), *E*5 (B), *E*6 (C) and *E*7 (D)cDNA in RT-qPCR

2.4　HPV16 *E*5、*E*6、*E*7 mRNA 在各级宫颈病变组织中的表达情况

宫颈各病变阶段 *E*5、*E*6 和 *E*7 mRNA 的相对表达量见图 5。结果显示，CIN Ⅲ组宫颈病变组织中 *E*5、*E*6 和 *E*7 mRNA 的相对表达量均最高，与其他各组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$），但 CIN Ⅲ组的 *E*6 mRNA 与宫颈癌组的差异无统计学意义。

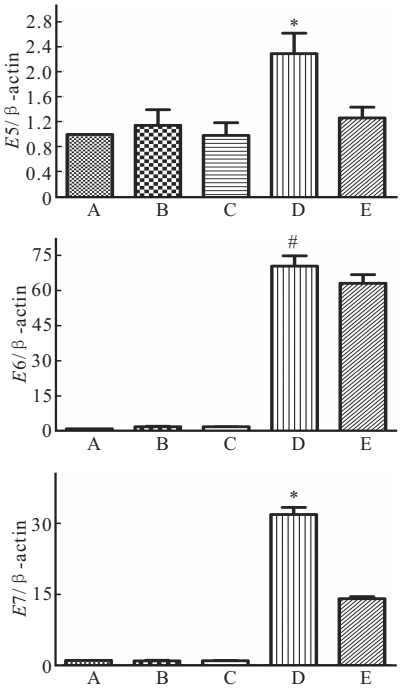


图 5　*E*5、*E*6、*E*7 mRNA 相对表达水平

Fig 5　*E*5, *E*6, *E*7 mRNA relative expression levels

A：Cervicitis；B：CIN Ⅰ；C：CIN Ⅱ；D：CIN Ⅲ；E：Cervical cancer. * $P<0.05$, vs. other cervical lesions；# $P<0.05$, vs. cervicitis, CIN Ⅰ and CIN Ⅱ

进一步对 *E*5、*E*6 和 *E*7 mRNA 表达水平进行比较（将 *E*5 mRNA 的相对表达量作为 1），结果见图 6。与 *E*6、*E*7 mRNA 相比，*E*5 mRNA 在宫颈病变的全过程中均呈现出优势表达状态，而 *E*6、*E*7 mRNA 的表达水平只在病变后期（CIN Ⅲ和宫颈癌）有升高趋势。在宫颈炎、CIN Ⅰ～Ⅲ及宫颈癌 5 个组中，*E*5 mRNA 表达水平均高于 *E*6 及 *E*7 mRNA，差异有统计学意义（$P<0.05$）；*E*6 与 *E*7 mRNA 的表达水平差异在 CIN Ⅱ、CIN Ⅲ及宫颈癌组中有统计学意义（$P<0.05$），在宫颈炎组与 CIN Ⅰ组中表达差异无统计学意义。

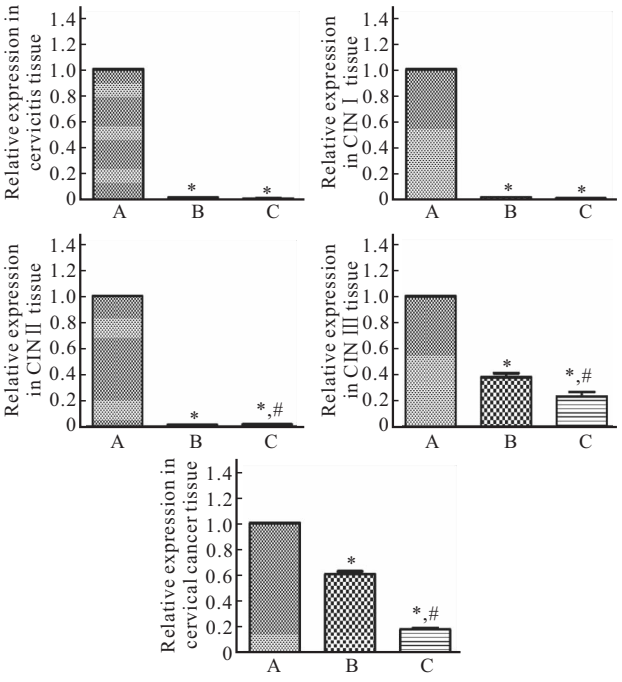


图 6 *E5*、*E6*、*E7* mRNA 在各级宫颈组织中的表达水平差异

Fig 6 *E5*, *E6*, *E7* mRNA relative expressions in cervical tissue

A: *E5* mRNA; B: *E6* mRNA; C: *E7* mRNA. $*P<0.05$, vs. A; $\#P<0.05$, vs. B

3 讨论

HPV 是球形的无包膜病毒,广泛分布于自然界,能特异感染人皮肤和黏膜上皮细胞,引起增生性病变。目前已经证实的 HPV 亚型有 200 多种,根据感染后引起癌症的危险性将 HPV 分为低危型 HPV 和高危型 HPV,高危型 HPV 主要引起宫颈癌等恶性肿瘤。在宫颈癌患者中,HPV16 是最常见的感染亚型[2],IARC 将 HPV16 亚型归类为 1 类致癌物[6]。2015 年《美国宫颈癌筛查过渡期临床指南》推荐 30～65 岁女性每 5 年做一次细胞学与 HPV 联合筛查[7]。在宫颈癌防治工作中,HPV 感染但细胞学阴性的患者的管理是防治工作的一大挑战,所以适龄妇女定期进行 HPV 及细胞学检查非常必要[8]。

目前,国内外对 HPV16 与宫颈癌相关性的研究主要集中在 *E6*、*E7* 基因上,而 *E5* 基因与宫颈癌发生发展关系的研究较少,且 *E5* 基因在癌症发展的过程中常因病毒基因整合至宿主染色体基因组中而缺失,故 *E5* 基因在致癌过程中的作用并不十分清楚。本课题针对 *E5* 基因 A、B 片段分别设计引物,两对引物扩增产物片段互相重叠,涵盖 *E5* 基因全长。49 例 HPV16 阳性宫颈组织 *E5* 基因 A、B 片段实时荧光定量 PCR 后,提示 CIN Ⅰ 阶段 *E5* 基因完整度更高,与 BAKER 等[9]认为随着病变程度的增加,*E5* 基因剔除率越高的研究结果基本相符。而宫颈炎阶段 *E5* 基因完整度低于 CIN Ⅰ 阶段,可能是感染早期,宿主自身免疫反应将感染细胞裂解,使病毒基因组断裂和缺失所致[10],CIN Ⅲ组比值略低于 CIN Ⅰ组比值,差异无统计学意义,这可能与慢性病毒感染时间长,其与机体免疫力相互作用有关,但符合随着病变程度的增加,*E5* 基因剔除率越高的总体趋势。以上提示 *E5* 基因完整度可能与宫颈疾病的发生发展密切相关,在宫颈病变早期,宿主针对 HPV 的自身免疫反应导致 *E5* 基因的断裂和缺失可能是宫颈疾病发生、发展的关键因素,这与 PAOLINI 等[11]认为 *E5* 基因可能是早期发挥致癌作用的关键因子这一结论相符。上述结果均表明,*E5* 基因可作为早期筛查宫颈癌的靶基因,随着病变程度增加,*E5* 基因剔除率越高,要警惕宫颈癌的发生。

本研究从 49 例 HPV16 阳性标本中提取到 41 例质量合格的 mRNA 样品,包括 9 例宫颈炎、5 例 CIN Ⅰ、13 例 CIN Ⅱ、5 例 CIN Ⅲ和 9 例宫颈癌,并对不同疾病阶段 HPV16 *E5*、*E6*、*E7* mRNA 的表达情况进行了分析。结果发现,*E5*、*E6*、*E7* mRNA 相对表达水平在 CIN Ⅲ组中均为最高,其次是宫颈癌组,提示 *E5*、*E6*、*E7* mRNA 可能主要在 CIN Ⅲ阶段发生致癌的关键作用。统计分析还发现,在不同级别的宫颈疾病中,*E5* mRNA 的表达水平均高于 *E6* 及 *E7* mRNA 表达水平,始终呈优势表达状态。该结果提示,在 HPV 的致癌过程中,E5 蛋白可能发挥着更为重要的作用。

HPV 持续感染是引起宫颈癌的关键因素,HPV16 作为最常见的感染亚型,一直是全世界的研究热点。机体感染 HPV 之后,因免疫清除能力有限,且对疫苗接种的适应人群的限制,所以宫颈癌的早期诊断及治疗效果监测指标仍是宫颈癌研究的重要内容。本研究提示 HPV16 亚型的 *E5* 基因在宫颈癌的发生、发展中发挥着重要作用,可能成为宫颈癌早期筛查的标志物,其动态变化也为临床宫颈疾病的病程发展及疗效监测提供了有力的实验依据;接下来将进一步研究 *E5* 基因的表达产物在致癌过程中的作用。

参 考 文 献

[1] FREDDIE B, JACQUES F, ISABELLE S, *et al*. Global

cancer statistica 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses in human cancer. Appl Pathol, 1987, 5(1): 19-24.

[3] TOMMASINO M. The human papillomavirus family and its role in carainogenesis. Semin Cancer Biol, 2014, 26: 13-21 [2018-10-08]. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.002.

[4] LEE S J, YANG A, WU T C, *et al*. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. J Gynecol Oncol, 2016, 27(5): e51 [2018-10-08]. https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e51.

[5] MURDIYARSO L S, KARTAWINATA M, JENIE I, *et al*. Single and multiple high-risk and low-risk Human Papillomavirus association with cervical lesions of 11, 224 women in Jalarta. Cancer Causes Control, 2016, 27(11): 1371-1379.

[6] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2007, 90: 1-636.

[7] 2015 年《美国宫颈癌筛查过渡期临床指南》解读. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2015, 34(6): 495-498.

[8] SMALL W, Jr, BACON M A, BAJAJ A, *et al*. Cervical cancer: a global health crisis. Cancer, 2017, 123(13): 2404-2412.

[9] BAKER C C, PHELPS W C, LINDGREN V, *et al*. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. J Virol, 1987, 61(4): 962-971.

[10] BAGARAZZI M L, YAN J, MORROW M P, *et al*. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. Sci Transl Med, 2012, 4(155): 155ra138 [2018-10-08]. https://stm.sciencemag.org/content/4/155/155ra138.long. doi: 10.1126/scitranslmed.3004414.

[11] PAOLINI F, CURZIO G, CORDEIRO M N, *et al*. HPV 16 E5 oncoprotein is expressed in early stage carcinogenesis and can be a target of immunotherapy. Hum Vaccin Immunother, 2017, 13(2): 291-297.

(2019 - 01 - 10 收稿, 2019 - 05 - 03 修回)

编辑　余　琳