

P₅₃突变、表达及人乳头状瘤病毒感染与宫颈癌*

李惠芳** 常艳丽 李娜

(长治医学院中心实验室, 长治 046000)

杨苏敏 贾宗智

(长治医学院病理教研室, 长治 046000)

摘要 利用免疫组化、聚合酶链反应 (PCR)、单链构象多态性 (SSCP) 分析等方法, 对 49 例同一标本宫颈癌组织中 p53 蛋白、P₅₃外显子 7~8 变异、HPV6、11、16、18-DNA 进行检测, 以探讨它们在宫颈癌形成中的作用、相互关系和临床意义。结果表明: a. P₅₃基因外显子 7~8 突变率 14.29%、p53 蛋白阳性率 48.98%、HPV-DNA 阳性率 87.76%。b. P₅₃基因突变不一定伴有 p53 蛋白阳性, 但 P₅₃基因突变而 p53 蛋白阴性的标本必是 HPV-DNA 阳性; 91.67% 的 p53 蛋白阳性标本具有 HPV-DNA 阳性。c. HPV16-DNA 阳性率显著高于 HPV6、11、18-DNA 阳性率。证明: 宫颈癌的发生主要与 HPV16 感染有关, 其次是 P₅₃基因突变所致; p53 蛋白阳性由 HPV 感染和/或 P₅₃基因突变所致。

关键词 宫颈肿瘤, 基因突变, P₅₃, 人乳头状瘤病毒, 免疫组化, PCR, 单链构象多态性

学科分类号 Q753 R737.33

宫颈癌的发生与人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 16、18 型感染有关, 也与 P₅₃基因突变或高表达有关。据报道, 宫颈癌组织中 P₅₃基因突变率较低 3%~20%^[1~3], 最多见的突变位点是外显子 7~8, p53 蛋白阳性率较高 49%^[4~6]。关于宫颈癌组织中 HPV 感染、P₅₃基因突变及高表达三者之间的相互关系未曾见有报道。本研究采用免疫组化、聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 分析等方法, 对 49 例同一标本宫颈癌组织中 p53 蛋白、P₅₃基因外显子 7~8 的变异及 HPV6、11、16、18-DNA 进行检测与分析, 旨在探讨三者在宫颈癌发生中的作用及相互关系、临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本

系长治医学院病理教研室提供, 均为活检或手术切除宫颈癌组织石蜡包埋标本, 每例均作 HE 染色病理诊断。

1.2 免疫组化分析

参见文献 [4]。

1.3 引物

北京医科大学分子病理学实验室合成, HPV 引物选自 L1 区开放阅读框架, P₅₃外显子 7~8 引物选自外显子 7 的 5' 端及外显子 8 的 3' 端, 扩增片

段长度包括外显子 7、8 间的内含子。引物序列、扩增片段长度见表 1。

Table 1 Nucleotide sequence and long (bp) of primers

primer	nucleotide sequence	long/bp
HPV6	a 5'-TAG TGG GCC TAT GGC TCG TG-3'	280
	b 5'-TCC ATT AGC CTC CAC GGG TG-3'	
HPV11	a 5'-GGA ATA CAT GCG CCA TGT GG-3'	360
	b 5'-CGA GCA GAC GTC CGT CCT CG-3'	
HPV16	a 5'-AGC TCA GAG GAG GAG GAT GA-3'	203
	b 5'-GGT TTC TGA GAA CAG AGT GG-3'	
HPV18	a 5'-GAG CCC CAA AAT GAA ATT CG-3'	244
	b 5'-CAA AGG ACA GGG TGT TCA GA-3'	
P ₅₃ exon 7~8	a 5'-TCC GTT GGC TCT GAC TGT ACC AT-3'	605
	b 5'-TTC ACG TGG TGA GGC TCC CCT TT-3'	

1.4 DNA 的提取与检测

参见文献 [7]。

1.5 PCR 扩增与产物检测

参见文献 [7]。判断标准: HPV-DNA 的阳性对照分别为 pHPV6、11、16、18, 阴性对照为正常宫颈组织 DNA。P₅₃外显子 7~8 若缺失则检测不到特异条带, 若不缺失则可见 605 bp DNA 条带。

* 山西省自然科学基金资助项目 (94036)。

** 通讯联系人。

Tel: 0355-3012434, E-mail: Li2-2@263.net

收稿日期: 2000-03-06, 接受日期: 2000-04-14

1.6 SSCP 分析

参见文献 [7]. 判断标准: 与正常宫颈组织比较, DNA 条带增减或位置变异者判断为突变.

1.7 统计方法

X^2 检验和假设检验.

2 结 果

2.1 p53 蛋白的免疫组化法检测

p53 蛋白的表达主要位于细胞核, 镜下可见癌组织中部分细胞核被染成棕黄色, 细胞浆不被染色. 空白对照及替代对照均为阴性. 49 例宫颈癌组织中 24 例 p53 蛋白阳性 (48.98%), p53 阳性与宫颈癌的分化程度、浸润深度无显著相关性 ($P > 0.05$) (表 2).

Table 2 Detection of p53 proteins by immunohistochemistry

degree	No. cases	No. positive	positive rate/ %
1. carcinoma in situ	6	2	33.33
2. microinvasive carcinoma	3	1	33.33
3. invasive carcinoma	40	21	52.50
(1) squamous epithelioma	39	21	53.85
high differentiation	7	3	42.86
moderate differentiation	28	15	53.57
low differentiation	4	3	75.00
(2) adenocarcinoma	1	0	—

2.2 P₅₃外显子 7~ 8 PCR-SSCP 检测

图 1 是 P₅₃ 外显子 7~ 8 的 PCR 扩增片段 (605 bp) 的代表, 所有扩增片段均未见小片段, 表明无 P₅₃ 外显子 7~ 8 的缺失. 图 2 是 P₅₃ 外显子 7~ 8 的 SSCP 分析结果的代表, 箭头所示的 DNA 条带是与正常宫颈组织相比增加的 DNA 条带, 表明 P₅₃ 外显子 7~ 8 有突变. 49 例宫颈癌可见 7 例有 P₅₃ 外显子 7~ 8 的突变, 突变率为 14.29%.

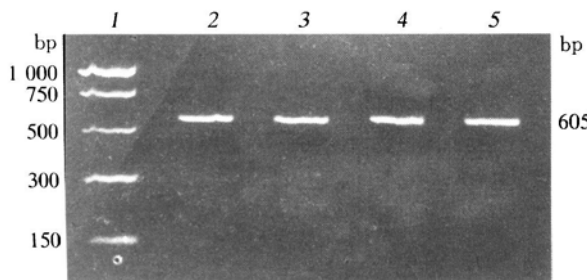


Fig.1 Detection of P₅₃ gene (exon 7~8) by PCR

1: PCR Maker; 2~5: P₅₃ gene (exon 7~8) by PCR.

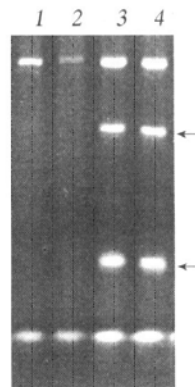


Fig.2 Detection of P₅₃ gene (exon 7~8) by SSCP

1: Normal cervix; 2: P₅₃ unmutation in cervical cancer; 3, 4: P₅₃ mutations in cervical cancer.

2.3 HPV-DNA PCR 检测

图 3 是各型 HPV 的 PCR 扩增片段的代表. 表 3 表明 HPV16-DNA 的检出与宫颈癌有显著相关 ($P < 0.001$), 而其他无明显相关 ($P > 0.05$). 表 4 表明同一宫颈癌标本中可有 HPV6、11、16、18 各型间相互交叉感染.

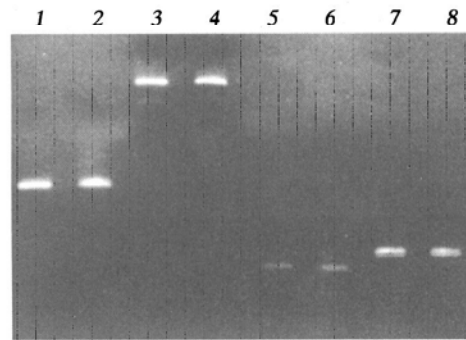


Fig.3 Detection of HPV-DNA by PCR

1, 3, 5, 7: positive control of HPV6, 11, 16, 18-DNA respectively; 2, 4, 6, 8: positive specimen of HPV6, 11, 16, 18-DNA respectively.

Table 3 Detection of HPV-DNA by PCR

types	No. cases	No. positive	positive rate/ %
6	49	13	26.53
11	49	18	36.73
16	49	43	87.76
18	49	19	38.78

Table 4 Overlapping infections of the different HPV

types	No. cases	No. infection	infection rate/ %
16	49	18	36.73
11, 16	49	3	6.12
16, 18	49	7	14.29
6, 11, 16	49	3	6.12
11, 16, 18	49	2	4.08
6, 11, 16, 18	49	10	20.41
total	49	43	87.75

2.4 HPV 感染、P₅₃基因突变及表达的相互关系

表 5 表明同一宫颈癌 P₅₃基因突变不一定伴有 p53 蛋白阳性, 但 P₅₃基因突变而 p53 蛋白阴性的 4 例标本均为 HPV-DNA 阳性; 表 6 表明在 p53 蛋白

阳性的 24 例标本中, HPV-DNA 阳性 22 例 (91.67%) 与阴性 2 例 (8.33%) 相比差异显著 ($P < 0.001$).

Table 5 Mutual relation among P₅₃ mutations and expressions and HPV infections

NO.	NO. case	degree	HPV infection	P ₅₃ (exon7~ 8) mutation	p53 protein
3	7628 ₂	high differentiation invasive carcinoma	16 positive	positive	negative
7	7985 ₁	low differentiation invasive carcinoma	negative	positive	positive
9	5111 ₁	moderate differentiation invasive carcinoma	6, 11, 16, 18 positive	positive	positive
11	6877 ₃	moderate differentiation invasive carcinoma	16 positive	positive	positive
21	7194 ₁	moderate differnetiation invasive carcinoma	6, 11, 16, 18 positive	positive	negative
40	5967 ₁	carcinoma in situ	11, 16 positive	positive	negative
46	4900	moderate differentiation invasive carcinoma	6, 11, 16 positive	positive	negative

Table 6 Relation of HPV infections to p53 proteins positive

p53 protein	HPV-DNA positive							HPV-DNA negative		total								
	HPV16		HPV11, 16		HPV16, 18		HPV6, 11, 16, 18		total									
	No.	rate/ %	No.	rate/ %	No.	rate/ %	No.	rate/ %	No.		rate/ %							
positive	8	16.13	1	2.04	5	10.21	2	4.08	2	4.08	4	8.16	22	44.9	2	4.08	24	48.98
negative	10	20.41	2	4.08	2	4.08	1	2.04	0	0	6	12.24	21	42.86	4	8.16	25	51.02
total	18	36.73	3	6.12	7	14.28	3	6.12	2	4.08	10	20.40	43	87.76	6	12.24	49	-

3 讨 论

3.1 宫颈癌与 HPV 感染的关系

据报道宫颈癌的发生主要与 HPV 16、18 感染有关, 是否有重叠感染报道不一^[2, 3, 6, 8, 9]. 本研究结果表明: 同一宫颈癌组织可同时具有 HPV 6、11、16、18 各型间相互交叉感染, HPV 16 是宫颈癌的最主要感染因子. 这一结果与前述报道不完全一致. 近年来有些研究结果与本研究结果类似^[3, 6], 但由于他们的研究侧重于比较宫颈癌与非宫颈癌组织中 HPV 感染情况, 对于宫颈癌本体中 HPV 各型间的感染关系未加以分析.

3.2 宫颈癌 HPV 感染与 p53 蛋白表达的关系

关于宫颈癌 HPV 感染与 p53 蛋白表达的关系报道较少, 曾有一报道利用原位杂交检测宫颈癌组织中 HPV 16、18-DNA, 利用免疫组化检测 HPV 16、18 型的 E6 蛋白和 p53 蛋白, 结果 HPV 16、18-DNA、E6 蛋白和 p53 蛋白的阳性率分别为 70.5%、72.5%、49.0%; 在 p53 蛋白阳性标本中, 96% 与 E6 呈双阳性^[6]. 早在几年前, 本

研究组曾报道宫颈癌中 p53 蛋白阳性率为 48.72%、48.9%^[4, 5]. 本次研究结果表明: HPV 16-DNA 的阳性率 87.76%, 显著高于 p53 蛋白阳性率 48.98%, 91.67% 的 p53 蛋白阳性标本具有 HPV 16-DNA 阳性. 两个研究组在不同的时间、不同的地点、利用不完全相同的方法得出的结果近乎一致.

3.3 宫颈癌 HPV 感染与 P₅₃突变及表达的关系

宫颈癌组织中 P₅₃抑癌基因突变率较低 3%~20%, 突变位点主要发生在 5、6、7、8, 尤其外显子 7、8 多见, 约为突变总数的 40%~100%^[1-3]. 本研究结果表明: a. P₅₃ 外显子 7~8 突变率 14.29% (7/49), 未见有 P₅₃外显子 7~8 的缺失; b. P₅₃基因突变显著低于 p53 蛋白阳性、HPV 感染; c. P₅₃基因突变不一定伴有 p53 蛋白阳性, 但 P₅₃基因突变而 p53 蛋白阴性的标本必有 HPV 感染. 根据这些结果, 作者认为: a. 大多数宫颈癌是由于 HPV 16 单独或伴有其他类型 HPV 感染后, 通过 E6/p53 蛋白复合物的形成使 p53 蛋白失活所致; 少数宫颈癌是由于 P₅₃基因突变, p53 蛋白异

常而失活所致。b. HPV 感染后, 与野生型 p53 蛋白结合致 p53 蛋白降解失活时, 若 p53 单抗的抗原决定簇肽段未降解, 即可被免疫组化检出。c. HPV 16-DNA 与 p53 蛋白的联合检测对宫颈癌的早期预测、早期诊断有重要意义。

参 考 文 献

- Greenblatt M S, Bennett W P, Hollstein M, *et al.* Mutations in the P₅₃ tumor suppressor gene. *Cancer Res*, 1994, **54** (18): 4855~ 4878
- 赵温利, 温培娥, 崔树龄, 等. 人乳头状瘤病毒感染、P₅₃基因突变与宫颈癌的相关性研究. *山东医科大学学报*, 1998, **36** (1): 1~ 4
Zhao W L, Wen P E, Cui S L, *et al.* *Acta academiæ medicinæ Shandong*, 1998, **36** (1): 1~ 4
- 赵蔚明, 司静懿, 李 昆, 等. 子宫颈癌 P₅₃抑癌基因突变与病毒感染的研究. *中华妇产科杂志*, 1995, **30** (11): 654~ 657
Zhao W M, Si J Y, Li K, *et al.* *Chin J Obstet Gynecol*, 1995, **30** (11): 654~ 657
- 李惠芳, 杨予石, 连为民, 等. p53 蛋白在子宫颈癌中的高表达. *长治医学院学报*, 1994, **8** (4): 286~ 288
Li H F, Yang Y S, Lian W M, *et al.* *J Changzhi medical college*, 1994, **8** (4) 286~ 288
- 李惠芳, 贾宗智, 杨予石, 等. p53 蛋白异常表达与宫颈癌发生及病理关系. *山西医药杂志*, 1996, **25** (3): 167~ 168
Li H F, Jia Z Z, Yang Y S, *et al.* *Sanxi Medical J*, 1996, **25** (3): 167~ 168
- 任占平, 石 喆, 陈蔚麟, 等. 子宫颈癌人乳头状瘤病毒 16 及 18 型感染与多癌基因产物表达的关系. *中华妇产科杂志*, 1998, **33** (3): 173~ 174
Ren Z P, Shi Z, Chen W L, *et al.* *Chin J Obstet Gynecol*, 1998, **33** (3): 173~ 174
- 李惠芳, 常艳丽. 抑癌基因 P₅₃突变与宫颈不典型增生的相关性研究. *长治医学院学报*, 1999, **13** (4): 248~ 250
Li H F, Chang Y L. *J Changzhi Medical College*, 1999, **13** (4): 248~ 250
- Howley P M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res*, 1991, **51** (18suppl): 5019s~ 5022s
- Nuovo G J, Darfler M M, Imprim C C, *et al.* Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. *Am J Pathol*, 1991, **138** (1): 53~ 58

Study of HPV Infection, P₅₃ Gene Mutation and Expression in Cervical Carcinoma*

LI Hui Fang**, CHANG Yan-Li, LI Na

(Central Laboratory, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

YANG Su-Min, JIA Zong-Zhi

(Department of Pathology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

Abstract P₅₃ gene (exon7~ 8) mutations and p53 proteins and HPV 6, 11, 16, 18-DNA were examined in 49 cervical carcinoma by immunohistochemistry, polymerase chain reaction (PCR) and single strand conformation polymorphism (SSCP) in order to investigate their role and mutual relation and clinical significance in the oncogenesis of cervical carcinoma. The results showed that first, p53 proteins positive rate was 48.98%, and not outstandingly related to the differentiation and the invasive degree of cervical carcinoma ($P > 0.05$); the defects of P₅₃ gene (exon7~ 8) were not found but P₅₃ (exon7~ 8) mutations were detected in 7 of 49 (14.29%) cervical carcinoma; then, HPV16-DNA positive rate was much higher than HPV6, 11, 18-DNA positive rate respectively ($P < 0.001$), and the different HPV-DNA was simultaneously tested in one cervical carcinoma; last, not all cases of P₅₃ mutations had p53 proteins positive, but the cases of P₅₃ mutations and p53 proteins negative certainly had HPV infections, and HPV positive cases were much more than its negative one in the cases of p53 proteins positive ($P < 0.001$). These results proved that the oncogenesis of cervical carcinoma is mainly associated with HPV16 infections, and second related to P₅₃ (exon7~ 8) mutations. p53 proteins positive results from P₅₃ mutations or/and HPV infections in cervical carcinoma.

Key words cervical carcinoma, gene mutation, P₅₃, human papillomavirus, immunohistochemistry, PCR, SSCP

* This work was supported by Aided Financially Shanxi Provincial Natural Science Fund (94036)

** Corresponding author. Tel: 86-355-3012434, E-mail: Li2-2@263.net

Received: March 6, 2000 Accepted: April 14, 2000