

## · 短篇论著 ·

低氧诱导因子-1 $\alpha$ 介导的 Toll 样受体 4 在人类乳突病毒感染相关的宫颈病变中的作用

诸葛静 程艳香

**【摘要】 目的** 探讨 Toll 样受体 4 (TLR4) 在宫颈病变发展过程中的作用及其和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 的相关性。**方法** 采用 RT-PCR 法检测 TLR4、HIF-1 $\alpha$ 、HPV16 E7 在 80 例人类乳突病毒 (HPV) 阳性的宫颈病变标本中的表达 (包括正常宫颈、宫颈炎、宫颈上皮内瘤样变和宫颈癌各 20 例)。**结果** 随着宫颈病变程度的加重, TLR4 和 HIF-1 $\alpha$  基因含量逐渐上升, 差异有统计学意义 ( $F/P$  值分别为: 16.23/0.0041 和 15.42/0.0072); HPV16 E7 的表达也有上升趋势, 但差异无统计学意义 ( $F = 2.13, P = 0.0526$ )。且在宫颈癌中, TLR4 的含量和 HPV16 E7 的含量无明显相关性 ( $r = 0.121, P = 0.0612$ ), HIF-1 $\alpha$  的表达也与 HPV 16 E7 不相关 ( $r = 0.207, P = 0.0563$ ); 而 TLR4 的含量和 HIF-1 $\alpha$  的含量呈正相关 ( $r = 0.491, P < 0.05$ )。**结论** TLR4 和 HIF-1 $\alpha$  参与了宫颈癌的发生发展, 但其在宫颈癌中的表达与 HPV16 型高危病毒感染无关; 这说明可能其他病原体感染宫颈后通过 TLR4 途径来促进高危型 HPV 病毒对宫颈上皮细胞的致癌作用, 而 HIF-1 $\alpha$  可能介导了这种作用。

**【关键词】** Toll 样受体 4; 缺氧诱导因子 1,  $\alpha$  亚基; 宫颈疾病; 人类乳突病毒

Toll 样受体 4 (toll-like receptor, TLR4) 是脂多糖 (LPS) 的天然受体, 在调节急性炎症反应、细胞信号转导和细胞凋亡中起重要作用, 是天然免疫调节因子。在各种炎症性疾病中都可以检测到 TLR4 的表达<sup>[1-2]</sup>, 提示 TLR4 介导的天然免疫反应是炎症性疾病发生的起点。TLR4 不但识别外源的病原体, 还可识别内源性物质及其降解产物<sup>[3]</sup>, 其可激活 MAPK 途径, 活化 NF- $\kappa$ B 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 信号<sup>[4]</sup>, 而 HIF-1 $\alpha$  与宫颈癌发生发展密切相关。本研究通过研究人类乳突病毒 (HPV) 感染导致的宫颈疾病中 TLR4 的表达, 研究其与 HPV 感染相关疾病间的关系, 并初步探索 HIF-1 $\alpha$  与 TLR4 的相互作用关系。

### 一、材料与方法

1. 标本: 研究对象选自妇科门诊及普查中采用 TCT 发现可疑者, 再行阴道镜行宫颈多点活检病理检查, 诊断为宫颈炎合并 HPV 感染、CIN 和宫颈癌的患者。阴道镜检查同时, 取宫颈脱落细胞进行荧光定量 PCR 检测确定高危型 HPV16 感染才纳入观察对象, 所有患者均取新发患者, 且从未接受过激素或放疗及宫颈局部治疗。每亚组选择 20 例, 同时使用健康的宫颈组织 (如因子宫肌瘤、功能失调性子宫出血等切除子宫, 无 HPV 感染和宫颈病变) 20 例作为对照, 共分为对照组、HPV 感染宫颈炎组、CIN 组、宫颈癌组。所有患者年龄 16 ~ 64 岁, 平均年龄 (32.7  $\pm$  6.3) 岁, 各组间年龄无统计学差异。

2. 方法: HPV16 感染的检测步骤: 对宫颈脱落细胞样本 DNA 的提取: 取样本 0.5 ml 13 000  $\times$  g 离心 15 min 弃上清。用 QIAmin 试剂盒 (QIAGEN) 萃取 DNA 后行 PCR 扩增后在低密度基因芯片上进行导流杂交, 杂交探针有 6, 11, 42, 43, 44, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, CP8304 等 21 种, 再

进行酶标显色。肉眼观察后进行结果判断, 阳性呈蓝紫色圆点, 对应基因芯片上 HPV 亚型判定。

RT-PCR 检测目的基因: 将新鲜组织放在液氮中保存, 实验前研磨成粉末后, 取 0.5 g 匀浆研碎组织裂解后提取总 RNA, 纯度 A260/A280 在 1.8 ~ 2.2, 逆转录后再 PCR 扩增, 产物凝胶电泳后置凝胶成像系统分析。因内对照  $\beta$ -actin 的 mRNA 分别与 TLR4、HIF-1 $\alpha$ 、HPV16 E7 的 mRNA 在同一体系共同扩增, 以降低干扰因素对实验结果的影响, 凝胶在图像系统上分析出所有 mRNA 的密度后, 将  $\beta$ -actin 的密度作为内对照, 目的基因与内对照的密度之比为目的基因表达的相对值。每组实验重复三次, 取平均值。TLR4 上游引物 5'-AATCTAGAGCACTTGGACCTTTCC-3', 下游引物 5'-GGGTTCAGGGACAGGTCTAAAGA-3'; HIF-1 $\alpha$  上游引物 5'-TCAAAGTCGGACAGCCTCA-3', 下游引物 5'-CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT-3'; E7 上游引物 5'-ATGAGCAAT-TACCCGACAGC-3', 下游引物 5'-AGCCCATTAACAGCTCTTGC-3';  $\beta$ -actin 上游引物 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3', 下游引物 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'。

3. 统计学分析: 所有的数据都输入 SPSS 13.0 软件, 组间比较采用方差分析, 同时采用了线性相关分析法。

### 二、结果

1. TLR4 的 RNA 含量的变化: RT-PCR 结果显示, 从正常宫颈组织, 到感染 HPV16 的宫颈炎症性组织, 再到 CIN 组织, 最后到宫颈癌组织, TLR4 的表达逐渐增加, 对照组显著减少 (图 1)。各组的 TLR4 相对表达值分别如表 1 所示, 差异有统计学意义 ( $P = 0.0041$ )。

2. HIF-1 $\alpha$  的 RNA 含量的变化: HIF-1 $\alpha$  在各组中 RNA 的含量与 TLR4 相似, 各组的 HIF-1 $\alpha$  表达值经统计分析差异有统计学意义 ( $P = 0.0072$ ) (表 1, 图 2)。

3. HPV16 E7 的 RNA 含量的变化: HPV16 E7 在各组中 RNA 的含量经灰度值分析, 从正常宫颈到宫颈炎症性组织再到宫颈癌, HPV16 E7 的表达有上升趋势, 但差异无统计学意义 (表 1, 图 3)。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.17.122

作者单位: 433000 湖北省, 仙桃市第一人民医院妇产科 (诸葛静); 武汉大学人民医院妇产科 (程艳香)

通讯作者: 程艳香, Email: chengmin.jjjj@yahoo.com.cn

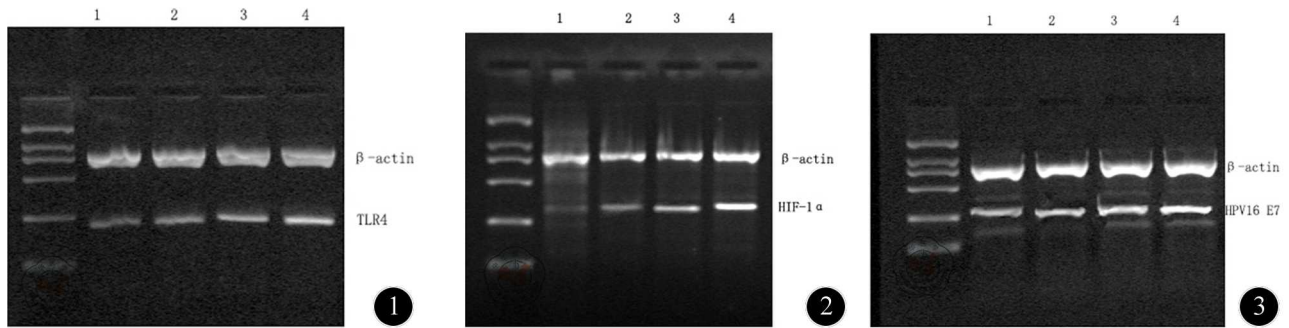


图1 RT-PCR凝胶电泳成像检测TLR4基因在各组宫颈组织中的表达(1:正常宫颈泳道;2:感染HPV16的宫颈炎泳道;3:CIN泳道;4:宫颈癌泳道) 图2 RT-PCR凝胶电泳成像检测HIF-1 $\alpha$ 基因在各组宫颈组织中的表达(1:正常宫颈泳道;2:感染HPV16的宫颈炎泳道;3:CIN泳道;4:宫颈癌泳道) 图3 RT-PCR凝胶电泳成像检测HPV16 E7基因在各组宫颈组织中的表达(1:正常宫颈泳道;2:感染HPV16的宫颈炎泳道;3:CIN泳道;4:宫颈癌泳道)

4. 宫颈癌组织中 TLR4 和 HIF-1 $\alpha$  表达含量的相关性分析:对宫颈癌组织中的 TLR4 和 HIF-1 $\alpha$  的基因含量进行双因素线性相关分析,结果为  $r=0.491$ ,呈正相关,经对相关系数的假设检验,  $P<0.05$ 。

表1 TLR4 和 HPV16 E7 的基因在宫颈各组组织中的表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | TLR4            | HIF-1 $\alpha$  | HPV16 E7        |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 正常宫颈       | 0.32 $\pm$ 0.02 | 0.19 $\pm$ 0.03 | 0.27 $\pm$ 0.01 |
| 宫颈炎        | 0.48 $\pm$ 0.03 | 0.37 $\pm$ 0.05 | 0.36 $\pm$ 0.02 |
| CIN        | 0.65 $\pm$ 0.04 | 0.59 $\pm$ 0.04 | 0.43 $\pm$ 0.06 |
| 宫颈癌        | 0.83 $\pm$ 0.12 | 0.75 $\pm$ 0.12 | 0.51 $\pm$ 0.08 |
| <i>F</i> 值 | 16.23           | 15.42           | 2.13            |
| <i>P</i> 值 | 0.0041          | 0.0072          | 0.0526          |

5. TLR4 和 HPV16 E7 表达含量的相关性分析:对宫颈癌组织中的 TLR4 和 HPV16 E7 的基因含量进行双因素线性相关分析,结果为  $r=0.121$ ,经对相关系数的假设检验,  $P=0.0612$ 。

6. HIF-1 $\alpha$  和 HPV16 E7 表达含量的相关性分析:对宫颈癌组织中的 HIF-1 $\alpha$  和 HPV16 E7 的基因含量进行双因素线性相关分析,结果为  $r=0.207$ ,经对相关系数的假设检验,  $P=0.0563$ 。

### 三、讨论

宫颈癌是迄今人类所有癌症中惟一明确病因的癌症。几乎所有宫颈癌患者的宫颈组织中,均可以找到高危型 HPV 存在。流行病学调查和实验室研究数据均显示,HPV 感染是子宫颈癌的主要流行因素,特别是 HPV16 型高危病毒<sup>[5-6]</sup>。人体感染 HPV 后,病毒基因 E7 或 E6 可整合到宫颈的上皮细胞内,可能发生两种转归:对于机体免疫功能正常的人群来讲,感染的期限比较短暂,通常在 8~10 个月左右会通过自身免疫系统会将病毒清除掉,也就是“一过性感染”。而当机体免疫系统无力将其清除,致使感染持续存在,进而引起宫颈细胞的增生、异型性变,最终发生癌变<sup>[7]</sup>。即 HPV16 感染宫颈致病的主要原因在于局部免疫调节失衡。

宫颈癌发生过程中经历了炎性反应过程,这种过程由天然免疫防御 TLRs 通路介导,一方面其尽可能识别感染的 HPV 病毒并将其清除,另一方面,参与反应的许多炎症趋化因子又可以促进宫颈上皮不典型增生,最终甚至癌变<sup>[8]</sup>。研究表明 TLR4 在

许多皮肤黏膜表面表达,通过识别病原微生物激活天然免疫防御反应,调控致炎因子的释放,在皮肤及黏膜的免疫反应中发挥重要的作用<sup>[9]</sup>。同时,其介导的炎症反应是许多重要疾病的公共通路。

丝裂原活化的蛋白激酶(P44/42MAPK)途径的活化广泛地受增殖和炎症信号调控<sup>[10-11]</sup>;在单核细胞和巨噬细胞中,细菌的 LPS 通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)诱导 P44/42 的活化,激活 NF- $\kappa$ B,调控机体的炎症信号通路,其中包括 HIF-1 $\alpha$  信号通路,后者参与了宫颈癌的发生发展<sup>[12]</sup>。而识别细菌 LPS 的模式识别受体 TLR4 在很多疾病中都有高表达,其调控的信号通路不仅可以激发机体的先天免疫<sup>[13]</sup>,同时对后续的继发免疫反应发生发展具有一定的作用。

我们的研究发现,TLR4 在 HPV 感染后的宫颈病变中随着病变严重程度增加,表达上升,差异有显著性( $F=16.23$ ,  $P=0.0041$ ),说明 TLR4 在宫颈中的表达与宫颈癌的发生发展有关。而 HPV16 E7 在宫颈病变中的表达虽随病变严重程度有升高趋势,但差异无显著性( $F=2.13$ ,  $P=0.0526$ ),说明 HPV16 触动了宫颈病变的发生,但宫颈病变的严重程度与 HPV 的负荷量不一定相关(当然,实验只检测了 HPV16 而未全面检测 HPV 负荷量,也可能导致结果出现一定的偏倚)。相关分析的结果表明,TLR4 在宫颈癌中的表达与 HPV16 E7 无关( $r=0.121$ ,  $P=0.0612$ ),这暗示 TLR4 信号通路可能未直接参与清除 HPV 过程,而其介导其他病原体感染产生的细胞因子可能间接介导了 HPV 的持续感染并致癌的过程;即其他病原体感染通过 TLR4 途径发生的免疫调节反应协同了 HPV 的致病作用。同样研究也发现 HIF-1 $\alpha$  与宫颈癌发展密切相关( $F=15.42$ ,  $P=0.0072$ ),而其在宫颈癌中的强表达和 TLR4 的表达存在很强的正相关( $r=0.491$ ,  $P<0.05$ ),而与 HPV16 E7 的表达无关( $r=0.207$ ,  $P=0.0563$ ),这表明 HIF-1 $\alpha$  在宫颈癌发生发展中的作用与 TLR4 介导的免疫反应有关。

TLRs 是感知外源性微生物刺激的“哨兵”,TLRs 广泛存在于天然免疫细胞膜上,与其配体结合在微生物感染或组织损伤引起的天然免疫和适应性免疫应答中起决定性作用。TLRs 在正常情况下绝大部分表达在抗原提呈细胞表面,如吞噬细胞(包括巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞)表面高表达 TLRs。TLR 家族中至少有 13 种成员,其中 TLR4 则主要识别入侵机体的细菌<sup>[14]</sup>。

因此,结合我们的研究发现 TLR4 在 HPV 相关宫颈病变中

高表达,但这种表达与HPV16无关,而与HIF-1 $\alpha$ 有关。说明,可能有其他病原体感染如细菌等触动TLR4途径的免疫调节反应,而这种反应间接促进了HPV16促发的宫颈病变过程,HIF-1 $\alpha$ 与TLR4在宫颈癌发展过程中的作用有关。即HPV16虽然是触动宫颈病变发生发展的主因,宫颈癌的发生可能还有其他病原体感染的参与。这些病原体激活了TLR4信号通路,触发了炎症反应信号系统,导致局部的免疫环境紊乱,这加重了宫颈病变过程。

### 参 考 文 献

- [1] Abdul-Careem MF, Firoz Mian M, Gillgrass AE, et al. FimH, a TLR4 ligand, induces innate antiviral responses in the lung leading to protection against lethal influenza infection in mice. *Antiviral Res*, 2011, 92: 346-355.
- [2] Raicevic G, Najar M, Pieters K, et al. Inflammation and TLR ligation differentially affect the osteogenic potential of human mesenchymal stromal cells (MSC) depending on their tissue origin. *Tissue Eng Part A*, 2012.
- [3] Challa S, Woelfel M, Guildford M, et al. Viral cell death inhibitor MC159 enhances innate immunity against vaccinia virus infection. *Virology*, 2010, 84: 10467-10476.
- [4] Ramanathan M, Luo W, Csóka B, et al. Differential regulation of HIF-1 $\alpha$  isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A (2A) receptor agonists. *Leukoc Biol*, 2009, 86: 681-689.
- [5] Lu CB, Yang MJ, Luo L, et al. Detection and typing of human papillomavirus by a GeXP based multiplex PCR assay. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2011, 25: 69-72.
- [6] Dunne EF, Sternberg M, Markowitz LE, et al. Human papillomavirus (HPV) 6, 11, 16, and 18 prevalence among females in the United States--National Health And Nutrition Examination Survey, 2003-

2006: opportunity to measure HPV vaccine impact? *Infect Dis*, 2011, 15, 204: 562-565.

- [7] Bowser BS, Alam S, Meyers C. Treatment of a human papillomavirus type 31b-positive cell line with benzo[ a ]pyrene increases viral titer through activation of the Erk1/2 signaling pathway. *Virology*, 2011, 85: 4982-4992.
- [8] 鲁选文,肖长义,叶红. 细胞因子与人类乳头瘤病毒及宫颈癌相关性的研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5: 4163-4166.
- [9] ChausséAM, Grépinet O, Bottreau E, et al. Expression of Toll-like receptor 4 and downstream effectors in selected cecal cell subpopulations of chicks resistant or susceptible to Salmonella carrier state. *Infect Immun*, 2011, 79: 3445-3454.
- [10] Bosmann M, Patel VR, Russkamp NF, et al. MyD88-dependent production of IL-17F is modulated by the anaphylatoxin C5a via the Akt signaling pathway. *FASEB J*, 2011, 25: 4222-4232.
- [11] De Boer MG, Jolink H, Halkes CJ, et al. Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. *PLoS One*, 2011, 6: e18403.
- [12] Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, et al. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1 $\alpha$  by human papillomaviruses. *Virology*, 2009, 387: 442-448.
- [13] Kleveta G, Borzucka K, Zdioruk M, et al. LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility. *Cell Biochem*, 2012, 113: 80-92.
- [14] Hu J, Lou D, Carow B, et al. LPS regulates SOCS2 transcription in a type I interferon dependent autocrine-paracrine loop. *J PLoS One*, 2012, 7: e30166.

(收稿日期: 2012-05-16)

(本文编辑: 戚红丹)

诸葛静,程艳香. 低氧诱导因子-1 $\alpha$ 介导的Toll样受体4在人类乳头瘤病毒感染相关的宫颈病变中的作用[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(17): 5320-5322.

中华医学会