

HIV 阳性女性患者 P16^{INK4a} 蛋白表达与 HPV 感染相关性分析

罗丽丽¹, 陈淑慧², 熊艳², 蔡红兵²

(1. 平顶山市新华区人民医院, 河南 平顶山 467000; 2. 武汉大学中南医院, 湖北省肿瘤医学临床研究中心, 肿瘤生物行为湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430071)

摘要: [目的] 了解 HIV 阳性感染者宫颈脱落细胞 P16^{INK4a} 蛋白表达与 HPV 感染的相关性。[方法] 采用通用引物 PCR 和反向点杂交技术建立的检测方法, 对 182 例 HIV 阳性感染者和 300 例 HIV 阴性感染者检测 23 种 HPV 亚型, 包括 18 种高危型和 5 种低危型。同时采用免疫组织化学技术 (S-P 染色法) 检测宫颈脱落细胞中 P16^{INK4a} 蛋白表达情况。[结果] HIV 阳性女性 HPV 感染率 (36.8%) 及 P16^{INK4a} 蛋白阳性表达率 (18.7%) 较 HIV 阴性者 (19.3%、4.3%) 高 (P 均为 0.000)。HIV 阳性患者中, HPV 感染阳性者宫颈脱落细胞 P16^{INK4a} 蛋白表达率为 43.3%, HPV 阴性者 4.3% ($P=0.000$); HPV 多型感染者宫颈脱落细胞 P16^{INK4a} 蛋白表达率 (60.9%) 较 HPV 单型感染者高 (34.1%) ($P=0.042$); 高危型 HPV 感染者宫颈脱落细胞 P16^{INK4a} 蛋白表达率 (80.6%) 较低危型 HPV 感染者高 (0) ($P=0.000$)。HIV 阴性患者中, HPV 感染阳性者 P16^{INK4a} 蛋白阳性表达率 (5.2%) 较 HPV 阴性者 (1.3%) 高 ($P=0.721$); 所检 HPV 阴性患者均为单一 HPV 感染; 高危型 HPV 感染患者 P16^{INK4a} 蛋白阳性表达率 (40.0%) 较低危型 (1.9%) 明显增高 ($P=0.018$)。[结论] HIV 阳性女性中 HPV 感染阳性、多型 HPV 感染及高危型 HPV 感染宫颈细胞 P16^{INK4a} 蛋白的表达率更高。

关键词: 人类免疫缺陷病毒; 人乳头瘤病毒; P16^{INK4a} 蛋白

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)08-0600-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2013.08.B004

The Relationship Between Expression of P16^{INK4a} Protein and HPV Infection in HIV-positive Women

LUO Li-li¹, CHEN Shu-hui², XIONG Yan², et al.

(1. Xinhua District People's Hospital of Pingdingshan City, Pingdingshan 467000, China;

2. Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei Cancer Clinical Study Center, Hubei Key Laboratory of Tumor Biological Behaviors, Wuhan 430071, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the relationship between the P16^{INK4a} protein expression in cervical exfoliated cells of HIV-positive women and the HPV infection. [Methods] Twenty-three HPV subtypes, including 18 high-risk types and 5 low-risk types were detected by the methods of universal primer PCR and reverse dot blot technique in 182 HIV-positive women and 300 HIV-negative women. The P16^{INK4a} protein of the cervical exfoliated cells was detected by immunohistochemistry (S-P staining). [Results] In HIV-positive women, the infection rate of HPV (36.8%) and P16^{INK4a} protein expression (18.7%) were higher than those in HIV-negative women (19.3%, 4.3%) ($P=0.000$). In HIV-positive women, the P16^{INK4a} protein expression of the cervical exfoliated cells with HPV infection was significantly higher (43.3%) than that in the women with negative HPV infection (4.3%) ($P=0.000$). In the women with multiple HPV infection, the P16^{INK4a} protein expression was higher (60.9%) than that in women with single HPV infection (34.1%) ($P=0.042$). In women with high-risk HPV infection, the P16^{INK4a} protein expression was higher (80.6%) than that in women with low-risk HPV infection (0) ($P=0.000$). In HIV-negative group, the expression of P16^{INK4a} protein was higher than that in the HPV-infected women (5.2%) ($P=0.721$). All of the HIV-negative women were single infected by HPV. In the high-risk HPV infection (40.0%), the P16^{INK4a} protein expression was higher than that in the low-risk infected women (1.9%) ($P=0.018$). [Conclusion] In cervical exfoliated cells of HIV-positive women, the P16^{INK4a} protein expression in the group with positive HPV infection, multiple HPV infection and high-risk HPV infection are significantly higher.

Subject words: human immunodeficiency virus; human papilloma virus; P16^{INK4a} protein

通讯作者: 蔡红兵, 主任医师, 教授, 博士; 武汉大学中南医院妇科, 湖北省武汉市武昌东湖路 169 号 (430071); E-mail: chb2105@163.com

收稿日期: 2013-02-05; **修回日期:** 2013-05-18

人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)感染是宫颈癌的主要病因,人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)感染者身体处于免疫缺陷状态,导致病毒的持续感染,是宫颈癌的高危人群。研究表明,高危型 HPV(high risk-HPV,hr-HPV)感染与 P16^{INK4a} 蛋白的过表达具有相关性^[1,2],但在 HIV 阳性患者中两者的关系不十分清楚。因此,本实验通过引物 PCR 和反向点杂交技术检测 HIV 阳性患者宫颈脱落细胞 HPV DNA,同时采用免疫组织化学技术(S-P 染色法)检测 P16^{INK4a} 蛋白的表达,以了解 HIV 阳性女性宫颈 HPV 感染特点及其与 P16^{INK4a} 蛋白表达的关系。

1 资料与方法

1.1 资料来源

本组资料来源于湖北省及河南省 HIV 阳性女性及妇科门诊机会性筛查患者,病例收集时间为 2009 年 9 月至 2010 年 6 月,共收集 HIV 阳性 182 例,对照(HIV 阴性)300 例,全部进行妇科检查,采用专用收集器收集宫颈脱落细胞标本。

1.2 研究方法

收集的所有宫颈脱落细胞标本分两部分,一部分进行细胞涂片做 P16^{INK4a} 免疫组织化学染色;另一部分液氮处理后立即保存

于-70℃低温冰箱中进行基因芯片 HPV DNA 分型检测,采用通用引物 PCR 和反向点杂交技术建立的检测方法,同时检测 23 种 HPV 亚型,包括 18 种高危型(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4 型)和 5 种低危型(HPV6、11、42、43、44 型)。

1.3 统计学处理

所有数据储存在 SPSS19.0 软件资料库中。P16^{INK4a} 蛋白表达率及 HPV 感染率比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIV 阳性与 P16^{INK4a} 蛋白表达及 HPV 感染的关系

HIV 阳性女性 HPV 感染率(36.8%)明显高于 HIV 阴性者(19.3%)($P=0.000$),其 P16^{INK4a} 蛋白表达阳性率(18.7%)同样高于 HIV 阴性对照组(4.3%)($P=0.000$) (Table 1)。

182 例 HIV 阳性女性患者中,HPV 感染者 67

Table 1 Relationship among HIV infection, expression of P16^{INK4a} protein and HPV infection

HIV infection	P16 ^{INK4a} expression		HPV infection	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	34	148	67	115
Negative	13	287	58	242
Total	47	435	125	357
<i>P</i>	0.000		0.000	

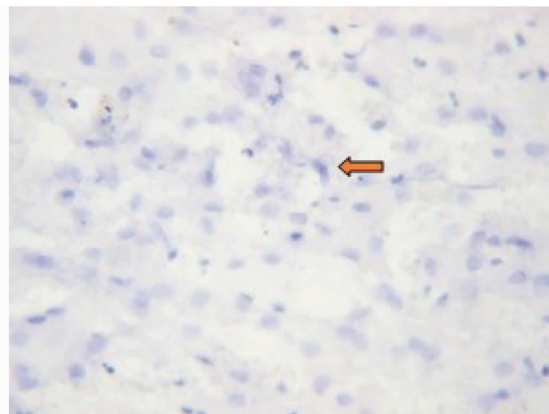
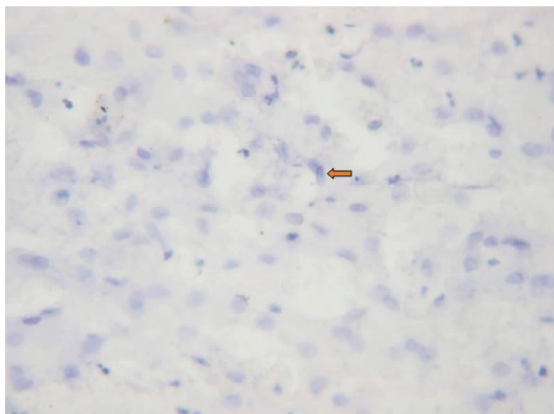


Figure 1 Negative expression of P16^{INK4a} protein in cervical exfoliated cells(SP ×400)

例(67/182),P16^{INK4a} 蛋白表达阳性(Figure 1、2)者 29 例,占 43.3%;HPV 感染阴性者 115 例(115/182),其 P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 5 例(4.3%),两者 P16^{INK4a} 蛋白表达率差异有统计学意义($P=0.000$)。

而 300 例 HIV 阴性患者中,HPV 感染者 58 例(58/300),其中 P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 3 例(5.2%); HPV 感染阴性者 232 例 (232/300),P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 3 例(1.3%),两者 P16^{INK4a} 蛋白表达率无统计学差异($P=0.721$)。

2.2 P16^{INK4a} 蛋白表达与 HPV 感染种类的关系

在 HIV 阳性组,67 例 HPV 感染阳性女性中,高危型 HPV 感染者 36 例(53.7%),其中 P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 29 例(80.6%);低危型 HPV 感染者 31 例(46.3%),其中 P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 0 例。高危

型与低危型 HPV 感染者 P16^{INK4a} 蛋白阳性表达率差异明显($P=0.000$)。单一 HPV 感染的有 44 例(65.7%),其中 P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 15 例(34.1%);存在两种或两种以上多型别 HPV 感染的有 23 例(34.3%),其 P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 14 例 (60.9%), 两者 P16^{INK4a} 蛋白阳性表达率存在差异($P=0.042$)(Table 2)。

HIV 阴性患者中, 高危型 HPV 感染者 5 例(8.6%),其中 P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 2 例(40.0%);低危型 HPV 感染者 53 例 (91.4%),P16^{INK4a} 蛋白表达阳性者 1 例(1.9%),其中 P16^{INK4a} 蛋白表达差异有统计学意义($P=0.018$)。而 HIV 阴性对照组 58 例 HPV 感染阳性女性中,均为单一 HPV 感染(Table 3)。

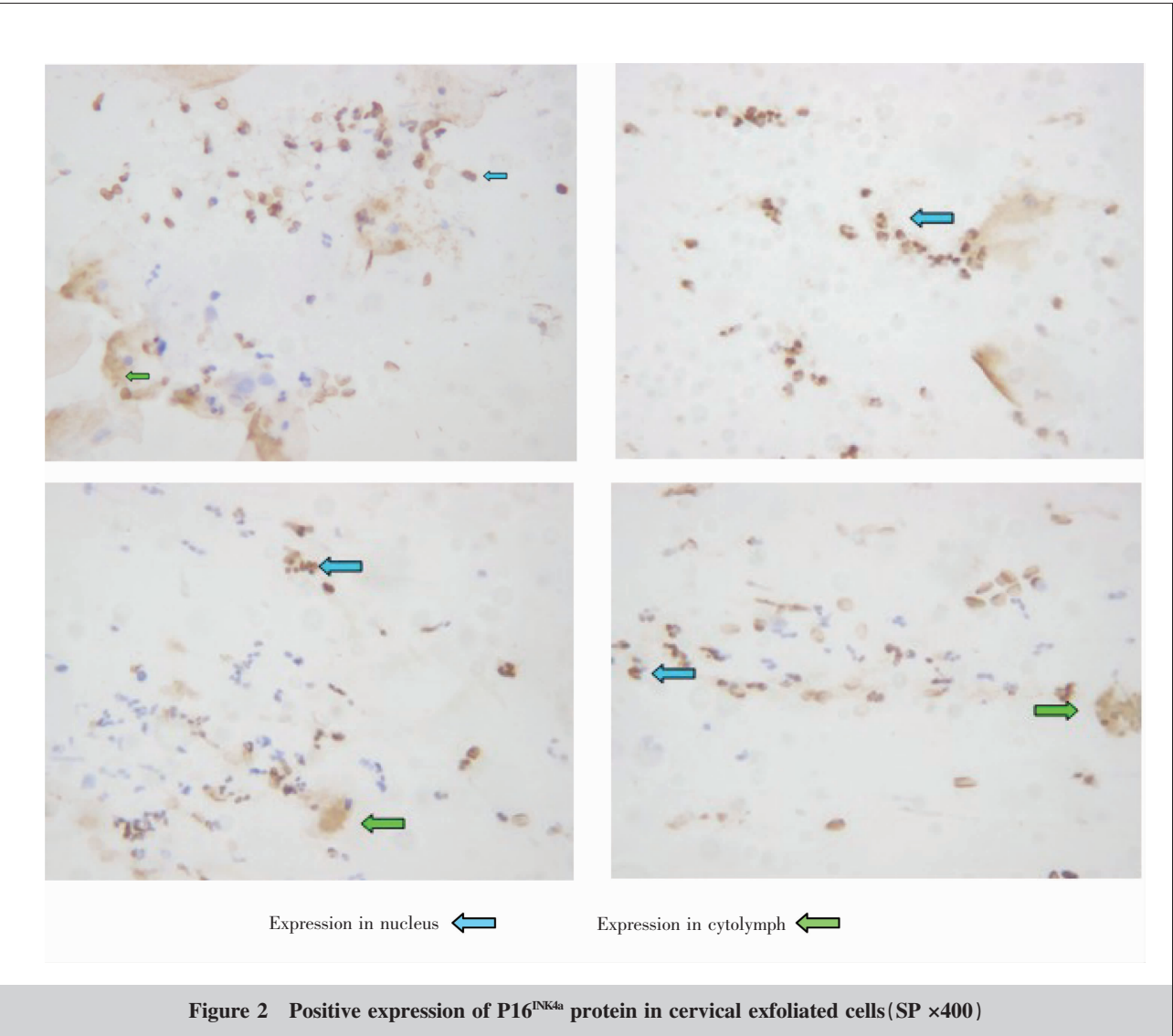


Table 2 Relationship between expression of P16^{INK4a} protein and variety of HPV infection in HIV-positive women

P16 ^{INK4a} expression	HPV-positive				HPV-negative
	Type		Subtype		
	Single infection	Multiple infection	High-risk infection	Low-risk infection	
Positive	15	14	29	0	5
Negative	29	9	7	31	110
Total	44	23	36	31	115
<i>P</i>	0.042		0.000		

Table 3 Relationship between expression of P16^{INK4a} protein and variety of HPV infection in HIV-negative women

P16 ^{INK4a} expression	HPV-positive				HPV-negative
	Type		Subtype		
	Single infection	Multiple infection	High-risk infection	Low-risk infection	
Positive	3	0	2	1	10
Negative	55	0	3	52	232
Total	58	0	5	53	242
<i>P</i>	–		0.018		

3 讨 论

P16^{INK4a} 基因是 1994 年 6 月由美国盐湖城 Kamb 报道的一种新型抑癌基因,定位于人染色体 9p21,由 3 个外显子和 2 个内含子组成,编码含 148 个氨基酸的核结合蛋白,分子量为 15kD。P16^{INK4a} 由肿瘤抑制基因 INK4a 编码,是人们发现的第一个直接参与细胞周期调控的抑癌基因,其产物 P16^{INK4a} 蛋白参与细胞周期的调节,它可与细胞周期素 cyclinD1 竞争性结合 CDK4 和 CDK6,并特异性地抑制 CDK4 的活性、阻止细胞进入 S 期和 DNA 合成的启动。另外,它通过抑制 CDK4 和 CDK6 激酶的活性,而使视网膜母细胞瘤蛋白 pRb 不能磷酸化,使未磷酸化的 pRb 增多而抑制细胞增殖,同时高磷酸化的 pRb 可诱导 P16^{INK4a} 基因的表达,P16^{INK4a} 的表达增加可通过与 CDK4/6 结合抑制 CDK4/6 的活性而最终使 pRb 的磷酸程度减弱^[3]。因而 P16^{INK4a} 在 CyclinD-CDK4/6-pRb-E2F 细胞周期调节途径中起着负反馈的作用,一旦 P16^{INK4a} 基因发生变异,上述环路无限制进行下去,最终导致肿瘤的发生。

研究显示,宫颈癌的发生发展过程中 P16^{INK4a} 的过表达与 HPV 持续感染密切相关,提示 P16^{INK4a} 可以作为宫颈鳞状细胞癌变程序启动的标志物^[4]。Sano 等^[5]和 Nakao 等^[6]研究发现在 HPV 感染阳性的宫颈鳞癌中,P16^{INK4a} 蛋白有很高的阳性表达率。HPV 尤其是高危型 HPV 感染可诱导 P16^{INK4a} 蛋白的

过表达。其机制有文献报道^[1],HPV 能产生的两种病毒癌基因蛋白(E6 和 E7),这两种癌基因蛋白能与多种细胞周期调节蛋白相互作用,其中 E7 能特异性地与视网膜母细胞瘤基因蛋白(pRb)结合并使其失活,从而使 P16^{INK4a} 与 pRb 之间的负反馈调节作用丧失,导致 P16^{INK4a} 在宫颈癌中过表达^[7]。但也有研究显示^[8-10],宫颈病变中 P16^{INK4a} 蛋白过表达与 hr-HPV 感染无显著相关性。

HPV 持续感染,尤其是 hr-HPV 的持续感染是引起宫颈上皮癌变的主要病毒致病因子,因此通过检测 HPV 感染及时发现和早期治疗 CIN,能够有效终止其向宫颈癌的发展。目前 hr-HPV 检测已应用于宫颈癌的筛查中。能否找到一种和 HPV 感染相关性好、又可用简单易行的方法检测的标志物,是实际工作中迫切需要解决的问题。

P16^{INK4a} 在 HIV 阳性女性这一特殊群体中的检测情况的报道较局限^[11,12]。而在 HIV 阳性女性中,其宫颈脱落细胞中 P16^{INK4a} 蛋白表达与 HPV 感染的关系,多重感染、感染型别的关系尚未见相关报道,而本实验研究显示,对于 HIV 阳性女性这一特殊群体,其宫颈细胞中存在 HPV 感染者 P16^{INK4a} 蛋白的表达明显高于 HPV 未感染者 P16^{INK4a} 蛋白的表达。同时,在存在 HPV 感染者中,多型感染的 P16^{INK4a} 蛋白表达明显高于单型感染者。此外,高危型与低危型 HPV 感染两组中,前一组的 P16^{INK4a} 蛋白的表达明显高于后一组。显示出 HIV 阳性女性中,P16^{INK4a} 蛋白的

表达与宫颈 HPV 感染良好的一致性。

而在 HIV 阴性女性中, HPV 感染率与 P16^{INK4a} 蛋白的阳性表达率均明显高于 HIV 阴性女性。其 HPV 阳性者 P16^{INK4a} 蛋白阳性表达率较 HPV 阴性者高; 且所检测 HPV 阳性患者均为单一 HPV 感染, 其高危型感染中 P16^{INK4a} 蛋白阳性表达率明显高于低危型感染, 提示 P16^{INK4a} 蛋白的表达与宫颈 HPV 感染在 HIV 阴性女性中也存在一定的相关性。

HIV 阳性女性中, 存在宫颈 HPV 感染者较无 HPV 感染者宫颈 P16^{INK4a} 蛋白表达率更高, 且多型感染及高危型感染者宫颈细胞 P16^{INK4a} 蛋白的表达率更高。而 HIV 阴性女性中, 宫颈 HPV 感染与 P16^{INK4a} 蛋白表达也存在一定的一致性。由此提示, 我们可考虑将宫颈 P16^{INK4a} 蛋白表达结合 HPV 的检测作为宫颈癌的筛查手段。

参考文献:

- [1] Murphy N, Ring M, Killalea AG, et al. p16^{INK4a} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears[J]. J Clin Pathol, 2003, 56(1):56-63.
- [2] Kanao H, Enomoto T, Ueda Y, et al. Correlation between p14(ARF) /p16 (INK4a) expression and HPV infection in uterine cervical cancer[J]. Cancer Lett, 2004, 213(1):31-37.
- [3] Lee JJ, Ko E, Cho J, et al. Methylation and Immunorepression of p16^{INK4a} tumor suppressor gene in primary breast cancer tissue and their quantitative p16^{INK4a} hypermethylation in plasma by Real-time PCR[J]. Korean J Pathol, 2012, 46(6):554-561.
- [4] Denton KJ, Bergeron C, Klement P, et al. The sensitivity and specificity of p16 (INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 134(1): 12-21.
- [5] Sano T, Oyama T, Kshiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesion[J]. Am J Pathol, 1998, 153 (6) :1741-1748.
- [6] Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, et al. Induction of p16 during immortalization by HPV16 and 18 and not during malignant transformation[J]. Br J Cancer, 1997, 75 (10): 1410-1416.
- [7] McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Munger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(5): 2130-2135.
- [8] Li JG, Li L, Guo JX, et al. Expression of p16^{INK4a} protein and its relationship with HPV in cervical cancer and precancerous lesions[J]. Journal of Third Military Medical University, 2008, 30(10):928-931. [李军果, 李力, 郭建新, 等. p16^{INK4a} 蛋白在宫颈疾病中的表达特点及其与 HPV 感染的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10):928-931.]
- [9] Hashi A, Xu JY, Kondo T, et al. p16^{INK4a} overexpression independent of human papillomavirus infection in lobular endocervical glandular hyperplasia[J]. Int J Gynecol Pathol, 2006, 25 (2): 187-194.
- [10] Galmiche L, Coste-Burel M, Lopes P, et al. The expression of p16 is not correlated with HPV status in CIN I [J]. Histopathology, 2006, 48(6):767.
- [11] Kreuter A, Jesse M, Potthoff A, et al. Expression of proliferative biomarkers in anal intraepithelial neoplasia of HIV-positive men[J]. J Am Acad Dermatol, 2010, 63(3): 490-498.
- [12] Nicol AF, Golub JE, e Silva JR, et al. An evaluation of p16^{INK4a} expression in cervical intraepithelial neoplasia specimens, including women with HIV-1[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2012, 107(5):571-577.