

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.34.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 34-0023-04

## 宫颈鳞癌组织中 c-fos 蛋白表达 与 HPV 感染的相关性 \*

张玉芳, 任春丽, 梁爽, 张金环, 郭艳巍, 侯敬

(承德医学院附属医院 妇产科, 河北 承德 067020)

**摘要:** **目的** 探讨宫颈鳞癌及宫颈病变组织中原癌基因 c-fos 蛋白和人乳头状瘤病毒 (HPV) 表达及其与宫颈鳞癌发生、发展的关系。**方法** 选取承德医学院附属医院妇科门诊及病房经病理确诊为宫颈鳞癌和宫颈病变组织患者共 148 例。依据病理学诊断结果分为慢性宫颈炎组 (31 例)、低级别鳞状上皮内病变 (LSIL) 组 (35 例)、高级别鳞状上皮内病变 (HSIL) 组 (33 例) 及宫颈鳞状细胞癌组 (49 例)。分别采用 PCR-反向点杂交技术及免疫组织化学 PV 二步法检测各组织中 HPV-DNA 和 c-fos 蛋白表达。**结果** 宫颈鳞癌组织中 HPV 感染和 c-fos 蛋白表达高于慢性宫颈炎组、LSIL 组及 HSIL 组 ( $P < 0.05$ ); 宫颈鳞癌组 c-fos 蛋白表达与肿瘤的分化程度、TNM 分期、有无淋巴结转移密切相关 ( $P < 0.05$ ); HPV 阳性宫颈鳞癌患者 c-fos 蛋白表达率高于 HPV 阴性患者 ( $P < 0.05$ )。**结论** c-fos 蛋白在宫颈鳞癌及宫颈病变组织均有一定程度表达, 随宫颈病变程度的加重 c-fos 蛋白表达逐渐升高, 宫颈鳞癌组织中 c-fos 表达与 HPV 感染密切相关。

**关键词:** 宫颈肿瘤; c-fos; 人乳头状瘤病毒; 原癌基因

**中图分类号:** R737

**文献标识码:** A

## Expression of c-fos in cervical squamous cell carcinoma and its correlation with HPV infection\*

Yu-fang Zhang, Chun-li Ren, Shuang Liang, Jin-huan Zhang, Yan-wei Guo, Jing Hou

(Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067020, China)

**Abstract: Objective** To explore the relationships of the expression of c-fos protein and Human Papillomavirus (HPV) in cervical squamous cell carcinoma and cervical lesions with the occurrence and development of cervical squamous cell carcinoma. **Methods** The study involved 148 patients who were diagnosed pathologically with cervical lesions or cervical squamous cell carcinomas in the Department of Gynecology of Affiliated Hospital at Chengde Medical College. They were divided into a chronic cervicitis group (31 cases), a low-grade squamous intraepithelial lesion group (35 cases), a high-grade squamous intraepithelial lesion group (33 cases) and a cervical squamous cell carcinoma group (49 cases). PCR-reverse dot blot hybridization was used to detect HPV-DNA. Immunohistochemical PV method was adopted to detect the expression of c-fos in cervical tissues. **Results** The expressions of HPV and c-fos protein in the cervical squamous cell carcinoma group were significantly higher than those in the chronic cervicitis group, the low-grade squamous intraepithelial lesion group and the high-grade squamous intraepithelial lesion group ( $P < 0.05$ ). The expression rate of c-fos protein in the cervical squamous cell carcinoma group was closely related to the differential degree of tumor, TNM stage and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The c-fos protein expression rate in the HPV-positive patients with cervical squamous carcinoma was

收稿日期: 2018-02-24

\* 基金项目: 河北省承德市科技支撑计划项目 (No: 201606A047)

[通信作者] 任春丽, E-mail: 724749149@qq.com

higher than that in the HPV-negative patients ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** There is a certain degree of c-fos protein expression in cervical squamous cell carcinoma and cervical lesions. With the progress of cervical lesions, the expression rate of c-fos protein increases. The expression of c-fos protein has a close relationship with HPV infection in cervical squamous cell carcinoma tissues.

**Keywords:** uterine cervical neoplasms; c-fos; alphapapillomavirus; proto-oncogenes

目前研究者认为宫颈癌的发生与持续的人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染密切相关。特别是高危型 HPV (HPV16、18、31、45 等) 的持续性感染, 是宫颈癌发病的主要原因<sup>[1-2]</sup>。原癌基因 c-fos 是即刻早期基因家族中的一员, 其在肿瘤的侵袭、细胞外基质的降解、异常黏附及转移灶新生血管形成等多个环节中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。本研究通过检测宫颈鳞癌和宫颈病变组织中 c-fos 蛋白表达和 HPV 的感染情况, 探讨 c-fos 是否与 HPV 感染协同参与宫颈鳞癌发生发展过程。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取承德医学院附属医院妇科门诊及病房 2012 ~ 2016 年经病理确诊为宫颈鳞癌和癌前病变的标本共 148 例。患者年龄 25 ~ 64 岁, 平均 48.2 岁, 其中, <45 岁患者 68 例,  $\geq 45$  岁患者 80 例。依据病理学诊断结果为慢性宫颈炎组 (31 例)、低级别鳞状上皮内病变 (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) 组 (35 例)、高级别鳞状上皮内病变 (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) 组 (33 例) 及宫颈鳞状细胞癌组 (49 例)。宫颈鳞癌组中, <45 岁患者 18 例,  $\geq 45$  岁患者 31 例。按肿瘤分化程度: 高分化 16 例, 中低分化 33 例。有淋巴结转移 19 例, 无淋巴结转移 30 例。

### 1.2 方法

**1.2.1 宫颈鳞癌组织 HPV-DNA 含量的检测** 采用 PCR-反向点杂交技术检测宫颈鳞癌组织 HPV DNA 含量, 应用 HPV-DNA 检测试剂盒 (深圳亚能生物技术有限公司) 进行检测, 严格按照试剂盒操作说明书进行 HPV-DNA 提取、PCR 扩增、杂交、洗膜及显色。

**1.2.2 结果判读** 阳性质控品杂交膜条在相应的 HPV 基因型位点及 IC 位点出现显色信号 (蓝色斑点), 其他位点不显色; 阴性质控品杂交膜条除 IC 位点出现显色信号外, 其他位点不显色。按照膜条上探针排列顺序, 依据显色信号的有无判读结果, 依据显色信号的位置判定 HPV 基因型。

### 1.2.3 宫颈鳞癌及宫颈病变组织中 c-fos 蛋白表达的检测

采用免疫组织化学 PV 二步法检测宫颈鳞癌及宫颈病变组织中 c-fos 蛋白表达, 一抗为 c-fos 兔抗多克隆抗体, 稀释浓度为 1 : 100, 以 PBS 代替一抗做为阴性对照, 已知阳性结果做阳性对照。c-fos 抗体和免疫组织化学试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术公司。采用阳性细胞的百分率评分和染色强度评分进行结果判定, 每个标本选取 6 张切片, 每张切片均随机取 3 个视野测量, 取平均值。①阳性细胞百分率评分标准: 无表达或阳性细胞数计分, <5%=0 分, 6% ~ 25%=1 分, 26% ~ 50%=2 分,  $\geq 51%$ =3 分; ②染色强度评分标准: 基本不染色 =0 分, 染色较浅 =1 分, 染色适中 =2 分, 染色较深 =3 分。将阳性细胞百分率评分和染色强度评分得分之和作为最后得分:  $\leq 1$  分为阴性 (-); 2 分为弱阳性 (+), 3 ~ 4 分为阳性 (++) , 5 ~ 6 分为强阳性 (+++)。按抗体说明书标示, c-fos 蛋白主要表达于胞核, 偶尔散在表达于胞质, 单纯胞质表达不视为阳性。

## 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件, 计数资料以率 (%) 表示, 比较采用  $\chi^2$  检验, 等级资料采用秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HPV 感染与宫颈鳞癌临床特征阳性的关系

HPV 在 49 例宫颈鳞癌组织中的表达率为 89.8%, PCR-反向点杂交方法检测结果显示: 膜条上分别于 16、35、58 位点出现显色信号, 即宫颈鳞癌患者 HPV 感染主要为 HPV16 型, 少数为 HPV35 型和 HPV58 型。不同年龄、肿瘤分级及临床分期患者宫颈鳞癌组织中 HPV 感染比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。宫颈鳞癌淋巴结转移组 HPV 感染与无淋巴结转移组比较, 差异也无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1 和表 1。

### 2.2 宫颈鳞癌及宫颈病变组织中 c-fos 蛋白表达情况

c-fos 蛋白在慢性宫颈炎、LSIL、HSIL 及宫颈

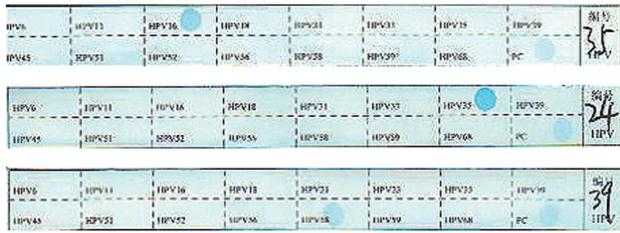


图 1 宫颈鳞癌组织中 HPV 分型检测结果

表 1 宫颈鳞癌组织中 HPV 感染与临床病理特征的关系

| 病理特征参数        | n  | HPV (+) 例 (%) | $\chi^2$ 值 | P 值   |
|---------------|----|---------------|------------|-------|
| <b>年龄</b>     |    |               |            |       |
| ≤ 45 岁        | 18 | 16 (88.9)     | 0.026      | 0.873 |
| >45 岁         | 31 | 28 (90.3)     |            |       |
| <b>淋巴结转移</b>  |    |               |            |       |
| 无             | 30 | 26 (86.7)     | 0.181      | 0.671 |
| 有             | 19 | 18 (94.7)     |            |       |
| <b>TNM 分期</b> |    |               |            |       |
| I、II          | 23 | 19 (82.6)     | 1.189      | 0.276 |
| III、IV        | 26 | 25 (96.1)     |            |       |
| <b>肿瘤分级</b>   |    |               |            |       |
| 高分化           | 16 | 14 (87.5)     | 0.137      | 0.934 |
| 中分化           | 22 | 20 (90.9)     |            |       |
| 低分化           | 11 | 10 (90.9)     |            |       |

鳞状细胞癌组织中均有表达。c-fos 蛋白表达随宫颈病变的程度逐渐增加, 经 Spearman 等级相关性分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 2。

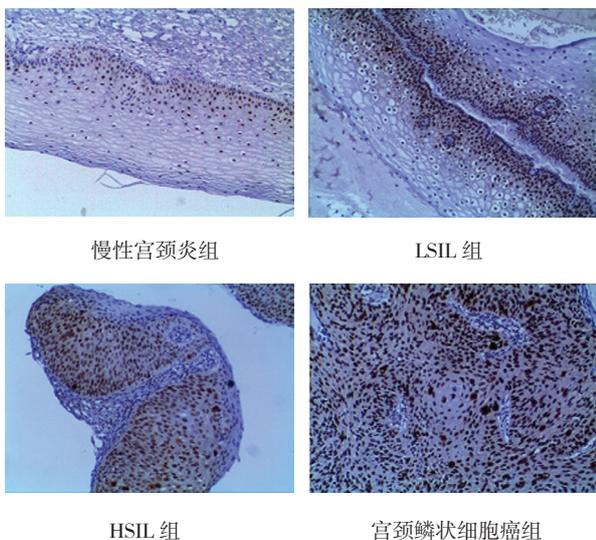


图 2 各组宫颈病变组织中 c-fos 蛋白表达情况 (原位杂交 × 100)

表 2 各组宫颈病变组织中 c-fos 蛋白表达情况

| 组别     | n  | c-fos 表达 |   |    |     | r <sub>s</sub> 值 | P 值   |
|--------|----|----------|---|----|-----|------------------|-------|
|        |    | -        | + | ++ | +++ |                  |       |
| 慢性宫颈炎组 | 31 | 30       | 1 | 0  | 0   | 0.555            | 0.000 |
| LSIL 组 | 35 | 23       | 8 | 4  | 0   |                  |       |
| HSIL 组 | 33 | 16       | 4 | 6  | 7   |                  |       |
| 宫颈癌组   | 49 | 14       | 3 | 13 | 19  |                  |       |

### 2.3 c-fos 蛋白表达与宫颈鳞癌临床病理特征的关系

I、II 期宫颈癌组织中 c-fos 蛋白表达阳性率与 III、IV 期癌组织比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), I、II 期低于 III、IV 期; c-fos 蛋白在高、中、低分化肿瘤组织中出现异常表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 有淋巴结转移组 c-fos 蛋白表达与无淋巴结转移组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组; c-fos 蛋白表达与患者年龄无相关 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

### 2.4 HPV 感染与 c-fos 蛋白表达的相关性

在宫颈鳞癌组织中 (49 例), HPV 阳性患者 (44 例) c-fos 蛋白阳性表达 34 例, 阳性表达率为 77.3% (34/44), HPV 阴性患者 (5 例) c-fos 蛋白阳性表达 1 例, 阳性表达率为 20.0% (1/5), 两者比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.680, P = 0.003$ )。

表 3 宫颈鳞癌组织中 c-fos 蛋白表达与临床病理特征的关系

| 病患特征          | n  | c-fos (+) 例 (%) | $\chi^2$ 值 | P 值   |
|---------------|----|-----------------|------------|-------|
| <b>年龄</b>     |    |                 |            |       |
| ≤ 45 岁        | 18 | 12 (66.7)       | 0.316      | 0.574 |
| >45 岁         | 31 | 23 (74.2)       |            |       |
| <b>淋巴结转移</b>  |    |                 |            |       |
| 无             | 30 | 18 (60.0)       | 4.952      | 0.026 |
| 有             | 19 | 17 (89.5)       |            |       |
| <b>TNM 分期</b> |    |                 |            |       |
| I、II          | 23 | 13 (56.5)       | 4.720      | 0.030 |
| III、IV        | 26 | 22 (84.6)       |            |       |
| <b>肿瘤分级</b>   |    |                 |            |       |
| 高分化           | 16 | 7 (43.75)       | 9.215      | 0.011 |
| 中分化           | 22 | 18 (81.8)       |            |       |
| 低分化           | 11 | 10 (90.9)       |            |       |

### 3 讨论

宫颈癌是一种可以通过早期筛查、早期干预有效降低发病率及病死率的一种疾病<sup>[4]</sup>。而在我国对于宫颈病变的筛查重视程度不足,加上受到地区、技术条件、费用等方面的限制,造成宫颈病变的筛查并不规范,这使得宫颈病变发生进展,进而向癌变的方向转化,因此导致我国宫颈癌的病死率仍居高不下,并且逐渐呈现年轻化的趋势,严重影响了女性的健康。

*c-fos* 是 *fos* 家族中研究最多的基因之一,其可作为调控细胞增殖、分化、凋亡的重要基因。当细胞受到外界刺激使核内 *c-fos* 激活时,其转录的 mRNA 由胞核进入胞浆,转录出蛋白质后返回胞核与 *c-jun* 蛋白形成转录激活蛋白 1 (activator protein-1, AP-1), AP-1 通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路在与基因启动子和增强子相互作用的诱导下,导致下游靶基因的过表达,促进细胞增殖及恶性转化,促使肿瘤的形成进展<sup>[5]</sup>。目前研究表明,*c-fos* 过表达或异常表达与卵巢癌、食管癌、胃癌、甲状腺癌、大肠癌等多种肿瘤的发生、发展相关<sup>[6-7]</sup>。本研究通过免疫组织化学法检测 *c-fos* 蛋白在宫颈鳞癌及宫颈病变黏膜组织中的表达,发现 *c-fos* 蛋白阳性表达率随着宫颈病变程度的加重而逐渐增加。说明 *c-fos* 基因的过度激活在宫颈鳞癌的发生发展过程中发挥了重要的作用。在宫颈鳞癌组织中,*c-fos* 蛋白表达与癌组织的分级、临床分期及有无淋巴结转移密切相关,*c-fos* 参与了宫颈鳞癌的分化、转移过程。*c-fos* 表达越明显,宫颈鳞癌的恶化、转移的潜在可能性也越强。因此,*c-fos* 可能为预测宫颈鳞癌恶化、转移提供新的靶点。

HPV 持续感染在宫颈上皮内瘤变过程中发挥着重要的作用,而其中 HPV16 和 HPV18 是导致宫颈癌发生的两个重要亚型。宫颈病变细胞内染色体常通过 HPV 基因的整合启动 *E1*、*E2* 基因的表达,而 *E6*、*E7* 癌基因与抑癌基因的结合并使其失活可促进宫颈上皮病变的发生<sup>[8-10]</sup>。有研究发现<sup>[11]</sup>,体内细胞在受到 HPV 感染后,体内 *c-fos* 与 *c-jun* 表达升高,激活 AP-1 信号通路,并通过调控下游靶基因,促进肿瘤细胞的增殖、血管的形成、肿瘤的转移等。本研究通过 PCR-反向点杂交技术检测宫颈鳞癌组织中 HPV-DNA 含量,发现 HPV 在宫颈癌组织中的表达率高达 89.8%,主要为 HPV16 型,少数为 HPV35 型和 HPV58 型,与以往研究结果一致。推测 HPV 感染可能是导致宫颈癌变的重要

因素之一。在宫颈癌组织中,HPV 阳性患者 *c-fos* 蛋白表达率均高于 HPV 阴性患者,提示 *c-fos* 的表达增强进而激活 AP-1 信号通路可能是 HPV 感染后引发宫颈癌重要因素,但确切机制尚有待于进一步研究。因此,联合检测 HPV 与 *c-fos* 蛋白表达有望成为宫颈病变的早期筛查、预后评判及治疗的新手段。

#### 参 考 文 献:

- [1] KOLNIKOVA G, ONDRUSOVA M, REPISKA V, et al. Current possibilities of cervical precancerous lesions screening in Slovakia: prevalence of high risk human papillomavirus in patients with cytological diagnoses of atypical squamous cells of unknown significance[J]. Bratisl Lek Listy, 2014, 115(8): 469-473.
- [2] SKINNER S R, SZAREWSKI A, ROMANOWSKI B, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the human papillomavirus 16/18 AS04-adjuvanted vaccine in women older than 25 years: 4-year interim follow-up of the phase 3, double-blind, randomised controlled VIVIANE study[J]. Lancet, 2014, 384(9961): 2213-2227.
- [3] ROSENBERG E E, GERASHCHENKO G V, HRYSHCHENKO N V, et al. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors[J]. Exp Oncol, 2017, 39(2): 131-137.
- [4] GENG F, XING J Z, CHEN J, et al. Pegylated glucose gold nanoparticles for improved in-vivo bio-distribution and enhanced radiotherapy on cervical cancer[J]. J Biomed Nanotechnol, 2014, 10(7): 1205-1216.
- [5] VERMA G, VISHNOI K, TYAQI A, et al. Characterization of key transcription factors as molecular signatures of HPV-positive and HPV-negative oral cancers[J]. Cancer Med, 2017, 6(3): 591-604.
- [6] DONG C, YE D X, ZHANG W B, et al. Overexpression of *c-fos* promotes cell invasion and migration via CD44 pathway in oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2015, 44(5): 353-360.
- [7] 赵俊玲, 马栋辉, 古丽娜·库尔班, 等. 宫颈鳞状细胞癌 EGFR、C-jun 和 C-fos 表达与临床特征及近期疗效的相关性[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015, 35(2): 217-219.
- [8] KOSKIMAA H M, PAASO A, WELTERA M J, et al. Cell mediated immunity against HPV16 E2, E6 and E7 peptides in women with incident CIN and in constantly HPV-negative women followed-up for 10-years[J]. J Transl Med, 2015, 13(1): 370.
- [9] van BAARS R, GRIFFIN H, WU Z, et al. Investigating diagnostic problems of CIN1 and CIN2 associated with high-risk HPV by combining the novel molecular biomarker PanHPV4 with P16INK4a[J]. Am J Surg Pathol, 2015, 39(11): 1518-1528.
- [10] LING W, ZHIGANG H, TIAN H, et al. HPV 16 infection up-regulates Pwll2, which affects cell proliferation and invasion in cervical cancer by regulating MMP-9 via the MAPK pathway[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2015, 36(6): 647-654.
- [11] 刘平, 张红莉. 宫颈上皮内瘤变组织中 MEKK3、NF- $\kappa$ B 的表达量及其与高危型 HPV 感染的相关性研究[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(19): 2247-2250.

(张西倩 编辑)