

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.007

文章编号: 1005-8982 (2019) 11-0036-05

HPV 感染对宫颈 COX-2 表达 及血 PGE₂ 表达水平的影响 *

黄晶¹, 潘宜云², 周小娟³, 余英¹, 程细云¹, 刘联斌³, 申昌梅¹, 罗德平¹

(赣州市肿瘤医院 1. 妇科, 2. 化疗科, 3. 检验科, 江西 赣州 341000)

摘要:目的 探讨人乳头状瘤病毒(HPV)感染对宫颈组织环氧合酶-2(COX-2)及血前列腺素 E₂(PGE₂)表达水平的影响及其相互关系。**方法** 采用杂交捕获 II 代技术检测 HPV, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测宫颈组织 COX-2 mRNA 表达情况, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血 PGE₂ 含量。**结果** HPV DNA 载量及 COX-2 表达均与宫颈病变程度呈正相关($P < 0.05$)。与 HPV 阴性患者比较, HPV 阳性患者血 PGE₂ 含量升高($P < 0.05$), 随着 HPV 病毒载量升高, 血 PGE₂ 含量随之升高, 呈正相关($r_s = 0.257, P = 0.003$)。宫颈癌患者 COX-2 表达与 PGE₂ 含量呈正相关($r_s = 0.684, P = 0.000$)。**结论** 在 HPV 感染的宫颈癌患者中, 宫颈组织 COX-2 高表达, 血 PGE₂ 含量升高, 其相互作用可能在宫颈癌的增殖、凋亡耐受、侵袭及转移过程中占据重要位置, 为临床治疗宫颈癌提供了新的思路。

关键词: 宫颈肿瘤; 乳头状瘤病毒感染; 环氧合酶-2; 前列腺素

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Effect of HPV infection on expression of cervix COX-2 serum PGE₂ *

Jing Huang¹, Yi-yun Pan², Xiao-juan Zhou³, Ying Yu¹, Xi-yun Cheng¹,
Lian-bin Liu³, Chang-mei Shen¹, De-ping Luo¹

(1. Department of Gynecology, 2. Department of Chemotherapy, 3. Department of Laboratory Medicine,
Ganzhou Cancer Hospital, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of by human papilloma virus (HPV) infection on cyclooxygenase cyclooxygenase 2 (COX-2) and prostaglandin E₂ (PGE₂) expression. **Methods** Hybrid capture 2 testing method was applied for HPV detection. Real-time PCR and ELISA was performed for detection of COX-2 in cervical tissue and serum PGE₂. **Results** Load of HPV DNA and expression of COX-2 were positively correlated with the degree of cervical lesions ($P < 0.05$). Compared with HPV negative patients, the serum levels of PGE₂ was increased significantly along with increase of HPV DNA load ($P < 0.05$). The expression of COX-2 was positively correlated with the content of PGE₂ in patients with cervical cancer ($r = 0.684, P = 0.000$). **Conclusions** High expression of COX-2 and PGE₂ may be involved in development and progression of cervical cancer, which could provide a novel point for drug development.

Keywords: cervical carcinoma; papillomavirus infection; cyclooxygenase 2; prostaglandin

人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染可导致慢性炎症, 炎症相关基因环氧合酶-2

收稿日期: 2018-11-31

* 基金项目: 江西省卫生和计划生育委员会科技计划项目 (No: 20143290)

(cyclooxygenase, COX-2) 及前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 在慢性炎症启动致癌信号通路过程中均具有重要作用, 且可以相互作用, 共同促进肿瘤的增殖、凋亡及转移过程^[1-3]。本研究初步探讨 HPV 感染对慢性宫颈炎组织、宫颈上皮瘤 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 和宫颈癌组织中的 COX-2 表达水平及血 PGE₂ 含量的影响; 研究从宫颈炎病变至宫颈癌转化的不同阶段, HPV 感染的状态及程度与 COX-2 和 PGE₂ 表达的相关性, 揭示 HPV 感染与炎症反应在宫颈病变进展及评估宫颈早期病变的重要性。可望为进一步阐明宫颈癌发生、发展的分子生物学机制, 为相关疾病的临床诊断、治疗、预后提供理论与实验依据, 为宫颈癌的三级预防提供新的视角。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2014 年 1 月—2015 年 12 月赣州市肿瘤医院符合纳入标准的初诊为宫颈癌患者 40 例作为宫颈癌组。年龄 28 ~ 69 岁, 中位年龄 45 岁; 腺癌 5 例 (12.5%), 鳞癌 35 例 (87.5%)。按照国际妇产联盟 (Figo) 宫颈癌分期, I 期 16 例 (40.0%), II 期 10 例 (25.0%), III 期 14 例 (35%), 取标本前均未接受放、化疗。选取同期因妇科疾病治疗或门诊治疗的慢性宫颈炎患者 20 例 (宫颈炎组) 及 CIN 患者 20 例 (CIN 组)。

宫颈癌患者纳入标准: ①初诊宫颈癌病理诊断明确患者; ② Karhovsky 评分 >70 分; ③ 2 周内未服用消炎痛、阿司匹林等影响前列腺素代谢类药, 3 d 内未做阴道冲洗或使用阴道内药物, 24 h 内无性生活; ④最小年龄 18 岁, 最大年龄 70 岁; ⑤患者自愿并签署同意书。

慢性宫颈炎、CIN 患者纳入标准: ①慢性宫颈炎、CIN 诊断明确; ② 2 周内未服用消炎痛、阿司匹林等影响前列腺素代谢类药, 3 d 内未做阴道冲洗或使用阴道内药物, 24 h 内未进行性生活; ③最小年龄 18 岁, 最大年龄 70 岁; ④患者自愿并签署同意书。排除标准: ①合并其他恶性肿瘤患者; ②盆腔有放疗史; ③合并有其他严重心、肺、肝、肾疾病患者; ④近期服用 COX 抑制剂如: 阿司匹林、消炎痛等。研究经本院医学伦理委员会批准, 所有患者知情并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 HPV 病毒检测标本的采集 HC II 配套采样器采集保存宫颈细胞标本 1 份, 受检者取膀胱截石位,

窥阴器暴露宫颈后, 采用专用宫颈细胞采集刷按顺时针/逆时针旋转 3 ~ 5 圈, 收集细胞后固定, 标本上标注姓名、年龄及病案号相关信息。按照美国 Digene 公司 HC II HPV DNA 检测试剂盒说明书步骤, 通过杂交捕获 II 代技术检测 HPV (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68 型), DML 2000 微孔板判读器测量样本的相对光单位 (relative light unit, RLU), 宫颈癌组的 RLU/ 标准阳性对照的 RLU 比值 ≥ 1.0 诊断为 HPV 阳性, 若比值 <1.0, 则判定为阴性。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 COX-2 mRNA 术中取新鲜手术切除宫颈病变标本, 立即放入液氮中保存备用。Trizol 提取组织总 RNA, 根据 Promega (北京) 生物技术有限公司 M-MLV 操作说明书逆转录合成 cDNA。qRT-PCR 检测组织 COX-2 及内参基因 GAPDH 的表达。引物序列: COX-2 正向引物为 5'-CTCCTGTGCCTGATGATTGC-3', 反向引物为 5'-CAGCCCCGTTGGTGAAAGC-3'; GAPDH 正向引物为 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 反向引物为 5'-CACCTGTGCTGTAGCCAAA-3'。采用 20.0 μ l 反应体系: SYBR Taq 10.0 μ l, 正反向引物 (2.5 μ mol/L) 各 0.5 μ l, cDNA 1.0 μ l, RNase-Free H₂O 8.0 μ l, 反向引物 (2.5 μ mol/L) 0.5 μ l。逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 总计 45 个循环。

1.2.3 ELISA 检测血 PGE₂ 含量 分别采集 CIN 组及宫颈癌组患者空腹静脉血 5 ml, 5% EDTA 防凝, 采血后 2 000 r/min 离心 5 min, 分离血浆, 置入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻保存待测。ELISA 检测血清 PGE₂ 的水平, PGE₂ 检测试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组比较采用 *t* 检验或秩和检验, 相关分析采用 Spearman 法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV 病毒载量及 COX-2 在不同宫颈组织中的表达

随着宫颈病变进展, HPV 病毒载量也增多, 其中

宫颈炎组 (3.6 ± 0.6)、CIN 组 (6.5 ± 1.5)、宫颈癌组 (10.4 ± 2.9)，CIN 组及宫颈癌组与宫颈炎组比较，差异有统计学意义 ($F=66.950, P=0.000$) (见图 1A)；qRT-PCR 检测结果可见不同宫颈组织中 COX-2 mRNA 均有一定程度表达，与宫颈炎组 (4.1 ± 0.9) 比较，CIN 组 (7.6 ± 1.3) 中 COX-2 表达升高，差异有统计学意义 ($t=9.884, P=0.001$)；宫颈癌组 (10.5 ± 1.1) 中 COX-2 mRNA 表达与 CIN 组比较，差异有统计学意义 ($t=-9.052, P=0.000$)，宫颈癌组中 COX-2 mRNA 表达升高。由此可知，COX-2 表达与宫颈癌进展有关 (见图 1B)。

2.2 宫颈组织中 HPV 感染与 COX-2、PGE₂ mRNA 表达的相关性

根据 HPV 感染状态而分的 HPV 阴性组和 HPV 阳性组的 COX-2 mRNA 表达水平分别为 (4.7 ± 1.2) 和 (10.2 ± 1.6)，HPV 感染阳性宫颈组织中 COX-2

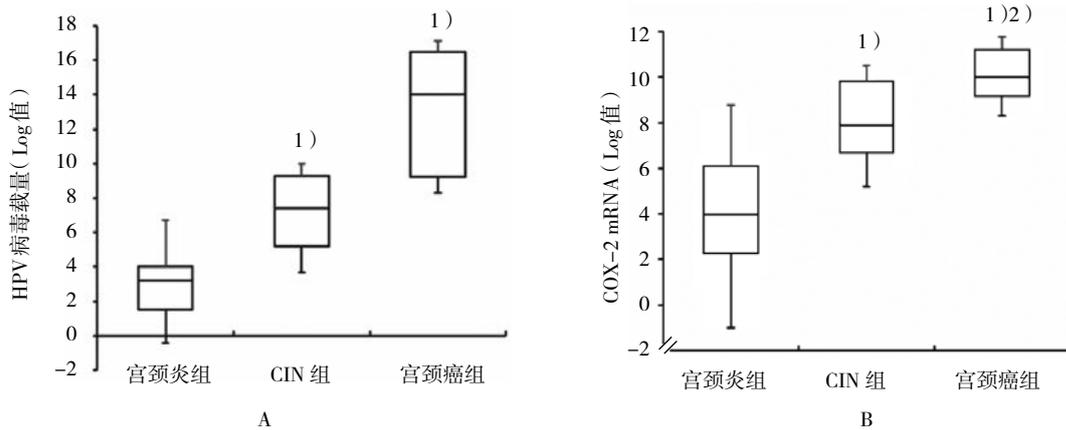
mRNA 表达水平高于阴性宫颈组织 ($t=15.062, P=0.000$) (见图 2A)；血清 PGE₂ mRNA 表达水平分别为 (7.0 ± 1.9) 和 (10.5 ± 2.3)，HPV 感染阳性宫颈组织中 PGE₂ mRNA 表达与阴性宫颈组织比较，差异有统计学意义 ($t=6.426, P=0.000$) 阳性宫颈组织中 PGF₂ mRNA 表达升高 (见图 2B)。

2.3 宫颈癌患者血清 PGE₂ 与 HPV 病毒载量的相关性

宫颈癌患者 HPV 感染阳性与血清 PGE₂ 含量相关，进一步分析得出患者 HPV 感染后，随 HPV 病毒载量升高，血清 PGE₂ 含量亦随之升高，宫颈癌患者血清 PGE₂ 与 HPV DNA 载量呈正相关 ($r_s=0.257, P=0.003$)。见图 3。

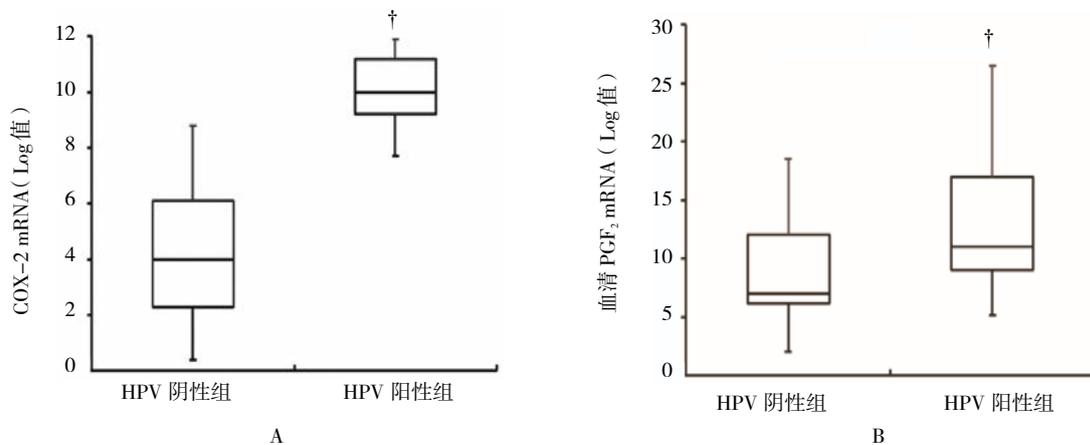
2.4 宫颈癌组织 COX-2 mRNA 与血清 PGE₂ mRNA 表达的相关性

高表达 COX-2 mRNA 与血清 PGE₂ mRNA 表达增



A: 不同宫颈组织 HPV 病毒载量；B: 不同宫颈组织 COX-2 mRNA 表达；1) 与宫颈炎组比较, $P<0.05$ ；2) 与 CIN 组比较, $P<0.05$

图 1 HPV 病毒载量与 COX-2 在不同宫颈组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)



A: HPV 感染与 COX-2 mRNA 表达的相关性；B: HPV 感染与血清 PGE₂ mRNA 表达的相关性；† 与 HPV 阴性组比较, $P<0.05$

图 2 宫颈组织 HPV 感染与 COX-2、PGE₂ mRNA 表达的相关性 ($\bar{x} \pm s$)

加相关, 本研究结果进一步提示宫颈组织癌中 COX-2 mRNA 表达与血清 PGE₂ mRNA 表达相关, COX-2、PGE₂ mRNA 表达经正态性检验 ($P < 0.05$) 不服从正态分布, 采用 Spearman 相关性检验分析 COX-2、PGE₂ mRNA 表达之间的相关性, 结果显示两者呈正相关 ($r_s = 0.684, P = 0.000$)。见图 4。

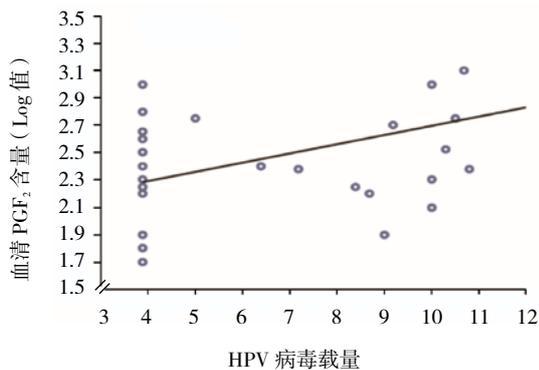


图 3 血清 PGE₂ 与 HPV 病毒载量的相关性

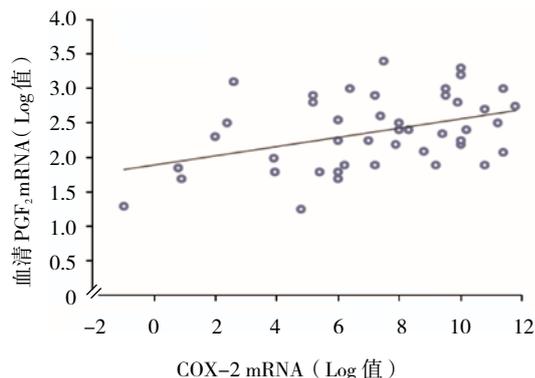


图 4 宫颈癌组织 COX-2 mRNA 表达与血清 PGE₂ mRNA 表达的相关性

3 讨论

宫颈癌是女性第二大常见恶性肿瘤, 全球每年的新发例数约为 53 万, 占有女性肿瘤的 12%, 死亡数达 27.5 万例^[4]。我国是宫颈癌的高发区, 占全世界新发例数的 1/5 ~ 1/4, 每年 2 万 ~ 3 万妇女死于宫颈癌, 严重威胁女性健康^[5]。2004 年 IRAC 指出, HPV 感染是 CIN 及宫颈癌发生的必要因素, 尤其是 HPV 16 的持续感染。早期宫颈癌的治愈率在 90% 以上, 早发现早治疗是提高宫颈癌治愈率的关键。HC II 是目前宫颈癌筛查最常见方法之一, 应用于 HPV 感染的筛查, 具有高度敏感性、客观性及可重复性。许多研究指出 CIN 的病变程度与 HPV 病毒载量相关, HPV

病毒载量越高, 宫颈癌发生的风险越高^[6-7], 但也有研究指出 HPV 病毒载量与宫颈病变无相关^[8], 该结论仍存在一定争议。本研究通过 HC II 检测 HPV 分型及病毒载量, 以 HPV 16 感染为主, 统计分析宫颈癌 HPV 病毒载量最高, CIN 次之, 宫颈炎最低。

COX 是前列腺素生物合成过程中的关键限速酶, 可催化花生四烯酸转化成各类前列腺素^[9]。前列腺素合成后, 以自分泌或旁分泌方式释放并结合细胞特异性 G 蛋白偶联受体, 从而参与调控细胞内的生理活动^[10]。COX-2 作为宫颈癌预后的危险因素, 与临床分期、淋巴结转移、肿瘤生长浸润及淋巴结转移均密切相关, 甚至贯穿宫颈癌病变的整个过程^[11-13]。本研究结果显示, COX-2 在宫颈癌及 CIN 组织中表达均高于宫颈炎组织, 这与早期病变时主要以炎症反应为主这一因素相关。HPV 病毒 E6、E7 基因可诱导 COX-2 异常高表达, 这与其 E6、E7 蛋白结合性抑制 p53 及 pRb 蛋白, 进而导致 DNA 损伤修复受损; E6 蛋白转录激活 *C-myc* 基因并与诱导 COX-2 表达相关^[14-15]。本研究中, HPV 感染后可提高 COX-2 基因的表达。

PGE₂ 是花生四烯酸在 COX 作用下的产物之一, 其过表达可促进肿瘤细胞增殖、迁移、肿瘤血管生成, 抑制肿瘤细胞凋亡, 以及弱化宿主免疫功能, 邹余粮等^[16] 研究发现血清及组织 PGE₂ 含量与宫颈病变程度呈正相关, 这与 COX-2 蛋白生成增加或活性增强促进 PGE₂ 表达有关。SALES 等^[17] 证实, COX-2 与 PGE₂ 受体在宫颈癌组织中表达同时上调。本研究发现 COX-2 表达与 PGE₂ 呈正相关。此外, HPV 感染阳性宫颈病变组织血清 PGE₂ 含量高于 HPV 感染阴性, 进一步分析发现 PGE₂ 含量与 HPV-DNA 载量呈正相关, HPV 感染如何促进 PGE₂ 表达还有待进一步研究。DEVA 等^[18] 在白色念珠菌中插入含 HPV16 病毒序列, 感染阴道上皮系统后促进 PGE₂ 合成酶表达, 从而提高 PGE₂ 表达。研究指出 HPV16 E5 蛋白可通过 COX-2 依赖途径促进宫颈癌细胞 PGE₂ 受体 EP4 表达^[19]。

目前 HPV 检测已列入宫颈癌常规筛查中, 但 HPV 定量检测存在争议。EINSTEIN 等研究^[20] 指出在确诊宫颈癌前, HPV 感染且高病毒载量, 进展为宫颈癌概率较低病毒载量者高 30 ~ 60 倍。多种高危型 HPV 病毒载量与宫颈癌前病变有关, 研究表明^[21] HPV16 病毒载量对宫颈癌病变预测最为重要, HPV 16 感染者高病毒载量与 CIN2+ (CIN2 及以上病变) 病变

级别存在相关 ($\hat{OR}=27.2$, 95% CI : 3.5, 213.5)。HPV 定量检测对宫颈癌具有重要预测意义。本研究认为, 在已确定 HPV 感染患者中进行 HPV 定量检测具有必要性, 同时 COX-2 与 PGE₂ 等炎症相关分子水平检测亦有重要临床指示作用。

参 考 文 献:

- [1] ATTFIELD M D, SCHLEIFF P L, LUBIN J H, et al. The diesel exhaust in miners study: a cohort mortality study with emphasis on lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(11): 869-883.
- [2] TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [3] ENGELS E A, WU X, GU J, et al. Systematic evaluation of genetic variants in the inflammation pathway and risk of lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6520-6527.
- [4] PLUMMER M, MARTEL C D, VIGNAT J, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis[J]. *Lancet Global Health*, 2016, 4(9): e609.
- [5] 乔友林, 赵宇倩. 宫颈癌的流行病学现状和预防 [J]. *中华妇幼临床医学杂志: 电子版*, 2015, 11(2): 1-6.
- [6] 刘秀梅. 不同程度宫颈病变与高危型人乳头瘤病毒病毒载量的相关性分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(20): 3390-3392.
- [7] 马晓星, 李亚里, 胡凌云, 等. HR-HPV 载量与宫颈病变的相关性分析 [J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(5): 477-481.
- [8] KANG W D, KIM C H, CHO M K, et al. HPV-18 is a poor prognostic factor, unlike the HPV viral load, in patients with stage IB-II A cervical cancer undergoing radical hysterectomy[J]. *Gynecologic Oncology*, 2011, 121(3): 546-550.
- [9] KIM J, VAISH V, FENG M, et al. Transgenic expression of cyclooxygenase-2 (COX2) causes premature aging phenotypes in mice[J]. *Aging*, 2016, 8(10): 2392-2405.
- [10] RANJBAR M M, ASSADOLAH V, YAZDANI M, et al. Virtual Dual inhibition of COX-2/5-LOX enzymes based on binding properties of alpha-amyrins, the anti-inflammatory compound as a promising anti-cancer drug[J]. *EXCLI Journal*, 2016(15): 238-245.
- [11] ATHAVALE R, CLOONEY K, O'HAGAN J, et al. COX-1 and COX-2 expression in stage I and II invasive cervical carcinoma: relationship to disease relapse and long-term survival[J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2006, 16(3): 1303-1308.
- [12] ZHOU W Q, SHENG Q Y, SHENG Y H, et al. Expressions of survivin, P16 (INK4a), COX-2, and Ki-67 in cervical cancer progression reveal the potential clinical application[J]. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 2015, 36(1): 62.
- [13] WU L, TAO G, CHEN Y, et al. The influence of COX-2 inhibitor on the expression of HPV18-E6 and COX-2 in Hela cells[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2016, 24(24): 3897-3900.
- [14] SUBBARAMAIAH K, ALTORKI N, CHUNG W J, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(16): 10911-10915.
- [15] GHARGHABI M, REZAEI F. Celecoxib treatment alters p53 and MDM2 expression via COX-2 crosstalk in A549 cells[J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research (IJPR)*, 2016, 15(2): 483-489.
- [16] 邹余粮, 张鹏花, 苟文丽, 等. CIN 和宫颈癌患者手术前后血清及病变组织中 PGE₂ 水平变化及意义 [J]. *医学争鸣*, 2009(19): 2008-2010.
- [17] SALES K J, KATZ A A, HOWARD B, et al. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of Cyclooxygenase-2, prostaglandin E receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1[J]. *Cancer Research*, 2002, 62(2): 424.
- [18] DEVA R, SCZEPANSKI M, SAHA S, et al. Calbicans activates cyclooxygenase but not its product prostaglandin E₂ in HPV 16-stabilized cells[J]. *European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology*, 2010, 152(2): 205.
- [19] JUNGMIN O H, JUHNN Y S. Human papillomavirus 16 E5 protein induces expression of prostaglandin E2 receptor EP4 subtype through cyclooxygenase-2 dependent pathway in cervical cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2008(5): 68.
- [20] EINSTEIN M H, SMITH K M, DAVIS T E, et al. Clinical evaluation of the cartridge-based genexpert human papillomavirus assay in women referred for colposcopy[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(6): 2089-2095.
- [21] RABAAN A A, TAYLOR D R, DAWAMNEH M F, et al. Comparison of Xpert (®) HPV and Hybrid Capture (®) 2 DNA test™ for detection of high-risk HPV infection in cervical atypical squamous cells of undetermined significance[J]. *Journal of Infection & Public Health*, 2017, 10(2): 219-223.

(张西倩 编辑)