

# 宫颈病变中人乳头瘤病毒来源的 E7 蛋白表达与临床意义

赵健, 贺丹、王晓、韩蕊、马德勇、冯慧、董颖\*

**摘要:** **目的** 探讨人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 导致的宫颈上皮内病变组织中的 E7 癌蛋白, 以及 E7 蛋白表达与临床诊断病理级别的相关性。**方法** 选取北京大学第一医院近两年诊治的宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 及宫颈鳞状细胞癌 133 例, 正常宫颈组织 34 例为阴性对照。采用免疫组化染色技术检测 E7 癌蛋白的细胞表达情况, 并与宫颈癌高危 HPV 感染替代性标志物 p16 蛋白做比较。**结果** E7 蛋白表达在低度鳞状上皮内病变 (low-grade squamous intraepithelial lesion, LISL) 即 CIN I 中阳性率 63.64% (14/22), 而在高度鳞状上皮病变 (high-grade squamous intraepithelial lesion, HISL) 即 CIN II、III 病例中阳性率达 91.84% 和 98.18% (45/49, 54/55), 宫颈癌中阳性率 100% (7/7)。相比较, p16 蛋白的阳性率在 CIN I 中为 59.09% (13/22), CIN II、III 中分别为 93.88% 和 96.36% (46/49, 53/55); 两者检测结果有显著的一致性 ( $P < 0.05$ )。随着宫颈病变程度的增加, E7 和 p16 蛋白的阳性率均显著升高。但 E7 蛋白表达为片灶状阳性, 表达特点与 p16 的弥漫阳性不同, 同时 HPV E7 蛋白表达水平随 CIN 级别提升也显著增强。在 HSIL 及宫颈鳞状细胞癌中, E7 蛋白阳性强度明显高于 LSIL。随着患者年龄增高, E7 蛋白的阳性率也呈升高趋势, 并且其染色强度也增强。**结论** E7 癌蛋白的阳性率及其表达强度与宫颈病变程度密切相关, 并与年龄有关, E7 蛋白检测技术有望作为宫颈病变 CIN 诊断与分级的重要参考指标。

**关键词:** HPV E7 蛋白; 宫颈病变; p16 蛋白; 蛋白表达

## Analysis of the HPV-derived E7 protein in cervical lesions and evaluation of its clinical significance

**Abstract: Objective** To detect the expression of human papillomavirus (HPV)-derived E7 protein in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and squamous carcinoma of the cervix (SCC), so as to analyze the significance in clinical evaluation of pathological grades of cervical lesions. **Methods** A total of 133 tissue slides of CIN or SCC were prepared from FFPE (formalin fixed and paraffin embedded) tissue blocks, and 34 cases of normal cervical tissue were also included in the study as negative controls. The expression of E7 protein in tissue specimens detected by immunohistochemistry IHC. The expression profiles compared with the surrogate marker p16 protein. **Result** Positive expression of E7 protein was found 63.64% (14/22) in CIN I, and 91.84%,

作者单位: 北京大学第一医院

通讯作者: 董颖, 电子信箱: dongying\_999@163.com

98.18% (45/49, 54/55) in CIN II and CIN III, and 100% (7/7) in SCC, respectively. Whereas, the positive rates of p16 expression in CIN I, CIN II, CIN III and SCC were 59.09% (13/22), 93.88% (46/49), 96.36% (53/55) and 100% (7/7). With the increased severity of cervical lesions, the intensities of E7 and p16 protein expression were significantly increased. Interestingly, the patterns of E7 protein expression revealed generally as focal lesions in the epithelial layers of the CIN lesions, whereas the p16 expression often showed more diffused pattern. The level of E7 protein expression significantly increased with severity of CIN grades. In HSIL and SCC, the intensity of E7 protein expression was significantly higher than that of LSIL. Analysis of E7 protein expression against different age groups also revealed a correlation of increased E7 protein expression in the older patient group. **Conclusion** HPV-derived E7 protein expressed in SCC, or in pre-cancerous CIN lesions exhibited close correlation with the pathological degrees in cervical cancer. This study shed some lights on using E7 protein as a tumor biomarker for the clinical utility of diagnosis and grading cervical cancer SCC and its precursor CIN lesions.

**Keywords:** HPV E7 protein; Cervical lesion; p16 protein; Protein expression

尽管有了筛查与疫苗等有效的防控手段,世界范围内宫颈癌仍是女性最常见的恶性肿瘤之一,在我国每年仍有近 13 万女性被诊断为宫颈癌。高危型人乳头瘤病毒 (HPV) 是引起宫颈癌发生的重要因素,而来源于高危型 HPV 的致癌基因 E6、E7,其编码序列只有在整合到人体基因组之后才得以表达功能蛋白 E7。E7 蛋白在细胞质中的功能在驱动宫颈癌的发生发展中起重要作用<sup>[1]</sup>。整合态的 HPV E7 基因序列可以利用人体细胞机制表达制造出 E7 蛋白,它可以通过结合并降解视网膜母细胞瘤蛋白 (pRb),与激活蛋白 1 (AP-1) 转录因子家族结合等途径<sup>[2]</sup>,最终导致细胞变异、驱动宫颈癌的发生发展。但目前 E7 蛋白在宫颈癌前病变中的表达特点鲜有研究,本研究首次在大宗 CIN 病例中分析肿瘤标志物 E7 癌蛋白表达特点,并与已知的宫颈癌替代性标志物 (surrogate marker) p16 蛋白进行对比,探讨 E7 癌蛋白免疫组化检测的临床实用意义。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料所有用于该研究的病理组织样本 FFPE 蜡块及病例信息的使用都经过本院伦理委员会批准。选择近两年因液基细胞学检测异常或 HPV 感染就诊于我院的患者,均行阴道镜检查,对于可疑宫颈存在病变的部位取活检。入选的患者年龄为 28~66 岁。入选患者分为观察组和阴性对照组,其中观察组 133 例,包括 CIN I 患者 22 例、CIN II 患者 49 例、CIN III 患者 55 例以及宫颈鳞状细胞癌患者 7 例;选择同期 34 例宫颈组织病理结果正常的

患者作为阴性对照组。

1.2 免疫组织化学染色所有样本采用抗 E7 兔单克隆抗体试剂 (CDx-IHC 试剂盒, 艾托金生物医药有限公司) 及抗 p16 (E6H4) 鼠单克隆抗体 (罗氏诊断产品 (上海) 有限公司) 进行检测。具体操作步骤按试剂说明书进行, 抗原修复均采用 pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲液高压锅修复, 二抗和显色系统均使用丹麦 Dako 公司的 K5007 试剂盒, 苏木素复染, 中性树胶封片。每批染色均设置质控片。

1.3 判读标准 ①HPV E7 结果判读: 细胞内 E7 蛋白的染色模式为细胞浆染色。阳性染色表现为宫颈鳞状上皮基层细胞开始的弥漫性颗粒状胞浆染色。且阳性比例达到 25% 以上。阴性结果是指组织切片内无特异性棕黄色胞浆染色。②p16 结果判读: p16 过度表达表现为宫颈鳞状上皮的基层和基底旁细胞的弥漫性连续性染色, 且至少达到上皮厚度的 1/3, 伴有或不伴有浅表细胞层细胞染色。这种弥漫性连续性染色模式为阳性。局灶性染色表现为分散细胞或小细胞簇的非连续性染色, 尤其是不见基底或基底旁细胞染色。这种局灶性染色为 p16 阴性表达。

1.4 统计学方法所有资料使用 SPSS 17.0 分析, 计数资料比较用  $\chi^2$  检验, 不同宫颈病变分组 p16 和 E7 蛋白检测阳性率比较采用  $\chi^2$  检验, 组间计量资料采用  $t$  检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 宫颈病变构成与年龄 本组病例包括 CIN I 22 例 (16.54%)、CIN II 49 例 (36.84%) 和 CIN III 55 例 (41.35%), 宫颈鳞状细胞癌 7 例 (5.26%)。126 例 CIN 患者年龄分布 28~66 (40.51±8.72) 岁 (95%CI: 37.95~43.07), 7 例宫颈鳞状细胞癌患者年龄分布 38~62 (50.28±9.05) 岁 (95%CI: 41.92~58.66)。宫颈鳞状细胞癌与 CIN 的整体年龄分布明显不同, 差异有统计学意义 ( $t=2.13$ ,  $P<0.05$ )。

2.2 E7 蛋白及 p16 表达比较 本研究纳入所有病例中 E7 蛋白阳性率为 77.24% (129/167); p16 阳性率为 74.85% (125/167)。HPV E7 蛋白在 CIN I、CIN II、CIN III 和宫颈鳞状细胞癌中的阳性率分别为 63.64% (14/22)、91.84% (54/55)、98.18% (54/55) 和 100.00% (7/7), p16 蛋白阳性率与 E7 蛋白类似, CIN I、CIN II、CIN III 和宫颈鳞状细胞癌中分别为 59.09% (12/22)、93.88% (46/49)、96.36% (53/55) 和 100.00% (7/7)。(见表 1)。CIN 与宫颈鳞状细胞癌中两者表达显著高于阴性对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。HSIL 及宫颈鳞状细胞癌中两者表达显著高于 LSIL, 差异亦有统计学意义 ( $P<0.05$ )。CIN II 与 III 及宫颈鳞状细胞癌之间相比, 虽然 E7 和 p16 阳性表达逐渐提升, 但差异微弱, 无统计学意义。

表 1 不同宫颈组织中 E7 和 p16 蛋白表达的阳性率比较

组别	例数	占比 (%)	E7		p16		
			例数	阳性率(%)	例数	阳性率(%)	
阴性对照	34	-	9	26.47	4	11.76	
观察组	CIN I 组	22	16.54	14	63.64	13	59.09
	CIN II 组	49	36.84	45	91.84	46	93.88
	CIN III 组	55	41.35	54	98.18	53	96.36
	宫颈鳞状 细胞癌组	7	5.26	7	100.00	7	100.00
合计	167	100	129	77.24	125	74.85	

2.3 E7 蛋白表达定位 E7 蛋白表达为片灶状阳性，表达特点与 p16 的弥漫阳性不同，并且其染色模式为细胞浆染色（见图 1）。p16 阳性表达为棕黄色颗粒分布于细胞浆或细胞核内，其染色强度较高，多为弥漫阳性（见图 2）。

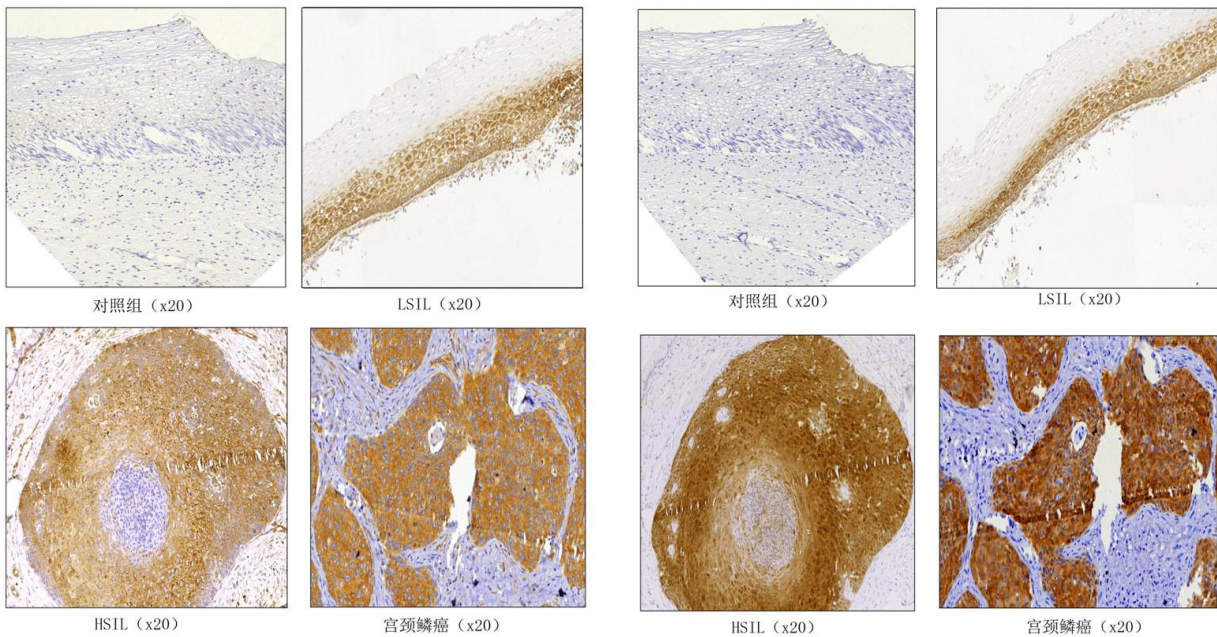


图 1 E7 在不同宫颈病变组织中表达及定位

图 2 p16 在不同宫颈病变组织中的表达及定位

2.4 E7 蛋白表达强度比较 随着宫颈病变程度的增加，E7 蛋白表达水平在 CIN I、CIN II、CIN III 和宫颈鳞状细胞癌组织中明显增加（见图 3）。在阴性对照组及 LSIL 中，主要为阴性或弱阳性，HSIL 和宫颈鳞状细胞癌中 E7 主要呈阳性和强阳性表达。由此可见，E7 蛋白的

表达强度与宫颈病变程度密切相关。差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

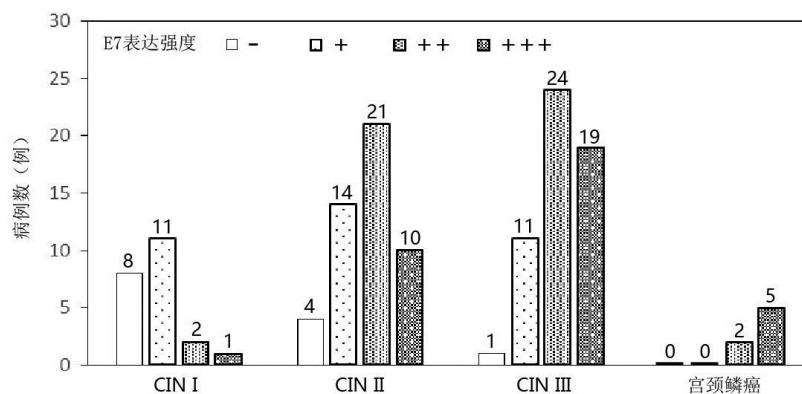


图 3 不同宫颈病变组织中 E7 蛋白表达强度比较

表 2 不同宫颈组织中 E7 蛋白表达强度比较

组别	E7 蛋白表达强度				合计
	-	+	++	+++	
阴性对照	25	8	1	0	34
LSIL 组	8	11	2	1	22
HSIL 组	5	25	45	29	104
宫颈鳞状 细胞癌组	0	0	2	5	7
合计	38	44	50	35	167

2.5 各年龄组宫颈病变患者 E7 蛋白表达比较 不同年龄患者的 E7 蛋白阳性率统计结果显示  $\leq 35$  岁组 E7 的阳性率显著低于 35 ~ 55 岁组 ( $P < 0.05$ ) 和  $\geq 55$  岁组 ( $P < 0.05$ ) (见表 3)。 $\geq 55$  岁组 12 例宫颈病变患者 E7 蛋白都呈阳性, 阳性率略高于 35 ~ 55 岁组 (95.00%), 但差异无统计学意义。不同年龄患者的 E7 蛋白表达强度统计结果显示随着年龄的增加 E7 蛋白逐渐由阴性和弱阳性表达转为阳性和强阳性表达。(见表 4)

表 3 E7 蛋白在不同年龄组的宫颈病变患者中阳性率比较

组别	例数	E7 蛋白	
		例数	阳性率
≤35 岁	41	32	78.05
35 ~ 55 岁	80	76	95.00
≥55 岁	12	12	100.00
合计	133	120	90.22

表 4 E7 蛋白在不同年龄组的宫颈病变患者中表达强度比较

组别	例数	E7 蛋白表达强度				(E7-/E7+) : (E7++/E7+++)
		-	+	++	+++	
≤35 岁	41	9	12	16	4	21 : 20
35 < n ≤ 45 岁	52	3	16	19	14	19 : 33
45 < n ≤ 55 岁	28	1	7	12	8	8 : 20
55 < n ≤ 65 岁	10	0	1	2	7	1 : 9
> 65 岁	2	0	0	0	2	0 : 2
合计	133	13	36	49	35	49 : 84

### 3 讨论

大量研究数据表明, 来源于高危型 HPV 基因的 E6、E7 蛋白是导致宫颈癌发生和发展的主要驱动因子 (causative factor)。E6、E7 蛋白通过干扰 p53 和 pRb 途径, 诱导细胞过度增殖, 导致宫颈上皮内瘤变, 并最终进展为宫颈癌<sup>[3-4]</sup>。研究显示, E6+/E7+转基因鼠会有宫颈癌及其高级别癌前病变结局, 而 E6+/E7-转基因鼠则多有宫颈癌及其高级别病变逆转, 表明 E7 蛋白表达是维持宫颈癌及其高级别癌前病变发展所必须的<sup>[5]</sup>。细胞过度增生过程中, 细胞周期抑制子 p16 反馈性升高。因而在病理诊断中应用替代性标志物 p16 的免疫组化染色可以间接证明癌蛋白 E6、E7 的存在<sup>[6]</sup>。但在其他女性生殖道高级别恶性肿瘤中也有 p16 高表达 (如 II 型子宫内膜癌), 而其他部位肿瘤, 如在头颈部肿瘤、乳腺癌、食管癌、膀胱癌、肺癌中则发现 p16 蛋白表达水平降低。因此直接检测细胞表达 E7 蛋白, 不仅在宫颈癌病理诊断中有很好的辅助作用, 对于 HPV 相关肿瘤与非 HPV 相关性肿瘤的鉴别也将很有帮助。

本组研究采用 E7-IHC 抗体检测试剂盒,首次在大宗宫颈上皮内瘤变及宫颈鳞状细胞癌组织中以免疫组化技术检测 E7 蛋白表达。我们研究结果显示随 CIN 级别升高, E7 蛋白阳性率显著提升。在 HSIL 和宫颈鳞状细胞癌中, E7 阳性率超过 90%, 显著高于 LSIL 与阴性对照组。LSIL 中虽也有相当比例阳性, 但以弱阳性表达为主。在阳性程度方面 E7 表达特点与 p16 略有不同。各级别 CIN 到宫颈鳞状细胞癌谱系过程中, p16 免疫组化染色强度变化不大, 多为弥漫性染色, 但在 LSIL 中阳性范围小, 不足病变厚度 1/3 时等同于阴性。而 E7 的阳性染色强度在宫颈癌前病变到宫颈鳞状细胞癌谱系中, 从弱到强逐渐提升。我们在研究中也注意到 p16 多为弥漫阳性表达, 而 E7 常常是局限于 CIN 或宫颈鳞状细胞癌的一部分区域, 通常是细胞异型性显著的区域, E7 呈明显的强阳性表达。

在 LSIL 中部分 E7 免疫组化结果显示阳性染色, 而 p16 为阴性染色, 这可能与 E7 致病病源与 p16 蛋白在宫颈癌发病过程功能不同、或蛋白稳定性不同有关。已有研究表明, 将高危型 HPV 的 E7 编码基因片段作用于小鼠的皮肤基底细胞, 原位过表达 E7 蛋白, 结果小鼠均患有了皮肤肿瘤, 由此推测 E7 可能在肿瘤形成早期发挥作用<sup>[7-8]</sup>。E7 蛋白在阴性对照及 LSIL 组中较高的阳性表现可能与此有关。

另外我们注意到 E7 蛋白的阳性率在不同年龄组病人之间,  $\leq 35$  岁、35~55 岁、及  $\geq 55$  岁三个组, 有随年龄而上升的趋势; 低年龄组别的 E7 蛋白阳性率显著低于其他两组。分析可能与 HPV 病毒致癌周期及在宫颈病变发展过程相关的特点相关, 在 CIN I 期, HPV 主要以游离状态存在宿主细胞中, 在疾病进一步发展过程中, HPV 基因会整合到宿主细胞基因组并以整合状态存在<sup>[9]</sup>。低年龄组的患者对于一过性 HPV 的感染有较高的清除率, 同时也会体现相应较低的 E7 蛋白阳性率。而随着时间变化, HPV 病毒的持续感染及病毒基因整合宿主基因组的情况可能增加、癌前病变细胞额积累及发展, 进而表现为高年龄组患者中的 E7 蛋白检测阳性率及表达水平的升高。另外 E7 属于外源性蛋白, 其表达可能与多种因素有关, 年龄大者免疫能力不如年轻者, 故对外源性 E7 监控与清除能力减弱, 可能是 E7 蛋白表达增高的原因之一。

综上, 本研究在组织病理水平以实验数据直接显示了 HPV 来源的 E7 蛋白在 CIN 到宫颈鳞状细胞癌谱系过程中表达特点, 该数据证明 E7 蛋白可作为 CIN 病理诊断的辅助指标。同时也提示了 E7 蛋白免疫组化检测在 HPV 相关肿瘤鉴别的临床诊断中的潜在应用前景。

## 参考文献

- [1] M. Narisawa-Saito, T. Kiyono. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(10): 1505-11.
- [2] M. Fiedler, E. Muller-Holzner, H. P. Viertler, et al. High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies[J]. *FASEB J*, 2004, 18(10): 1120-2.
- [3] A. Kaiser, B. Jenewein, H. Pircher, et al. Analysis of human papillomavirus E7 protein status in C-33A cervical cancer cells[J]. *Virus Genes*, 2015, 50(1): 12-21.
- [4] M. Whitehead, P. Ohlschlager, F. N. Almajhdi, et al. Human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein bodies cause tumour regression in mice[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 367.
- [5] S. F. Jabbar, S. Park, J. Schweizer, et al. Cervical cancers require the continuous expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein even in the presence of the viral E6 oncoprotein[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4008-16.
- [6] A. P. Pinto, M. Degen, L. L. Villa, et al. Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal 'biomolecular Papanicolaou test'[J]. *Acta Cytol*, 2012, 56(2): 109-21.
- [7] N. Jaiswal, R. John, V. Chand, et al. Oncogenic Human Papillomavirus 16E7 modulates SUMOylation of FoxM1b[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 58: 28-36.
- [8] J. M. Bodily, K. P. Mehta, L. A. Laimins. Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3): 1187-95.
- [9] C. B. Woodman, S. I. Collins, L. S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(1): 11-22.