



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.03.002

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201303225.pdf>

HPV16 型 E6 蛋白在外阴上皮内非瘤样病变和外阴鳞癌中的表达

周静¹, 肖松舒², 邓新粮², 崔超美¹

(1. 湖南省妇幼保健院综合治疗科, 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅三医院妇科, 长沙 410013)

[摘要]目的: 检测人乳头状瘤病毒(HPV)16-E6 蛋白在外阴上皮内非瘤样病变(NNEDV)、外阴鳞癌(VSCC)中的表达, 探讨 HPV16-E6 蛋白是否为 NNEDV 病因及与 VSCC 的相关性。方法: 采用免疫组织化学 SP 法检测 HPV16-E6 在 15 例正常外阴组织, 40 例 NNEDV 及 45 例 VSCC 中的蛋白表达情况。结果: HPV16-E6 蛋白在正常外阴皮肤组无表达, 在 NNEDV 及 VSCC 中阳性表达率分别为 30% 和 66.67%, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在 NNEDV 组中, HPV16-E6 蛋白在鳞状上皮增生(SH)型及硬化性苔藓(LS)型阳性率分别为 35% 和 25%, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 但均较正常外阴皮肤组升高($P < 0.05$), 较 VSCC 组降低($P < 0.05$)。HPV16-E6 在 VSCC 的表达阳性率为 66.67%, 阳性率随临床分期的增高而增高, I 期和 II 期, I 期和 III 期比较差异均有统计学意义($P < 0.017$), 但 II 期和 III 期比较差异无统计学意义($P > 0.017$)。随着肿瘤分化程度的增高, 阳性率逐渐降低, 高分化和低分化, 中分化和低分化比较差异均有统计学意义($P < 0.017$), 但高分化和中分化比较差异无统计学意义($P > 0.017$)。有淋巴结转移者 HPV16-E6 阳性表达率高于无淋巴结转移者($P < 0.05$)。结论: HPV 感染可能是 NNEDV 的病因之一。HPV16-E6 蛋白表达升高可能与 VSCC 发生、发展相关。

[关键词] 人乳头瘤病毒 16 型 E6 蛋白; 外阴上皮内非瘤样病变; 外阴鳞癌

Expression of HPV16 E6 protein in nonneoplastic epithelial disorder of the vulva and squamous cell carcinoma of the vulva

ZHOU Jing¹, XIAO Songshu², DENG Xinliang², CUI Chaomei¹

(1. Department of Comprehensive Treatment, Maternity and Child Care Hospital of Hunan Province, Changsha 410008;
2. Department of Gynecology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the expression of high risk human papilloma virus (HPV) 16-E6 protein in non-neoplastic epithelial disorders of the vulva (NNEDV) and squamous cell carcinoma of the vulva (VSCC), and to explore whether HPV16-E6 protein is the etiological factor in NNEDV and its correlation with squamous cell carcinoma of the vulvae.

收稿日期 (Date of reception): 2012-08-07

作者简介 (Biography): 周静, 硕士, 医师, 主要从事外阴及宫颈病变的研究; 肖松舒为并列第一作者。

通信作者 (Corresponding author): 邓新粮, Email: 643260152@qq.com

基金项目 (Foundation item): 湖南省自然科学基金(11JJ5055)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of Hunan Province, P. R. China (11JJ5055).

Methods: We detected HPV16-E6 protein expression in 15 normal vulvae cases, 40 NNEDV cases and 45 VSCC cases by immunohistochemistry SP method.

Results: The positive rate of HPV16-E6 in different vulva tissues: was 0% in the normal vulva, 30% in NNEDV and 66.67% in VSCC, respectively. The overall positive rate and two two comparison had statistical significance. In the NNEDV group, the positive rate of squamous hyperplasia type and lichen sclerosis type was 35% and 25%, respectively, with no statistical significance ($P>0.05$), but higher than that in the normal vulva skin group ($P<0.05$) and lower than that in the VSCC group ($P<0.05$). The positive rate of HPV16-E6 in VSCC was 66.67%. The positive rate increased with the clinical stage. The positive rate between Phase I and Phase II, and that between Phase I and Phase III had statistical significance ($P<0.017$), but that between Phase II and Phase III had no statistical significance ($P>0.017$). The positive rate gradually decreased with the tumor differentiation. The difference in well-differentiated and poorly differentiated, moderately and poorly differentiated had statistical significance ($P<0.017$), but that of well-differentiated and moderately differentiated had no statistical significance ($P>0.017$). The positive rate of lymph node metastasis VSCC was significantly higher than that of non-lymph node metastasis VSCC ($P<0.05$).

Conclusion: HPV infection may be an etiological factor for NNEDV. The rise of HPV16-E6 positive rate may be related to the occurrence and development of vulvar squamous cell carcinoma.

KEY WORDS

HPV16-E6; non-neoplastic epithelial disorders of the vulva; squamous cell carcinoma of the vulva

女性外阴皮肤病变种类繁多, 包括感染性疾病、增生性疾病、囊肿性病变、瘤样病变、良性肿瘤、恶性肿瘤、混合病变, 发病率呈逐年上升趋势。其中增生性疾病以外阴上皮内非瘤样病变(non-neoplastic epithelial disorders of vulva, NNEDV)为主, 恶性肿瘤中以外阴鳞癌(squamous cell carcinoma of vulva, VSCC)为主。NNEDV是指女性外阴皮肤和黏膜组织发生变性及其色素改变的一组慢性疾病, 包括外阴鳞状上皮细胞增生(squamous hyperplasia, SH)、外阴硬化性苔藓(lichen sclerosis, LS)及其他外阴皮肤病^[1]。常常引起剧烈的、难以忍受的外阴奇痒而严重影响患者生活质量, 给广大患者带来极大痛苦。它以皮肤变化为特征, 因其确切病因不明, 治疗困难, 临床上许多治疗方法虽能暂时控制其症状, 但复发率高。研究^[2]发现NNEDV与细胞增殖异常相关。本实验采用免疫组织化学法检测HPV16-E6蛋白在NNEDV及VSCC病变组织中的表达水平, 探讨HPV16-E6蛋白是否为NNEDV的病因及与VSCC的相关性, 为发现外阴组织的潜在恶变提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

全部标本取自中南大学湘雅三医院及湖南省

肿瘤医院2000年1月至2010年10月病理科存档的手术及活检标本的组织石蜡块。抗HPV16-E6兔抗人多克隆抗体(工作浓度为1:100)、免疫组织化学SP试剂盒及DAB显色试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 分组及临床资料

将收集的 组织石蜡块分为正常外阴组、NNEDV组和VSCC组, 其中正常外阴组为15例患功血、子宫肌瘤、子宫腺肌症疾病而外阴皮肤正常的女性外阴皮肤组织, 排除恶性疾病, 无外阴瘙痒史, 白带正常; NNEDV组为40例同期临床、病理资料完整的NNEDV外阴皮肤组织, 根据1987年国际外阴疾病研究协会与国际妇科病理学家协会共同制定的新分类法^[3]分为: SH 20例, LS 20例; VSCC组为45例同期临床、病理资料完整的VSCC外阴皮肤组织, 所有病例取材前均未进行放射治疗及化学药物治疗, 临床分期: I期13例, II期14例, III期18例; 分化程度: 高分化12例, 中分化14例, 低分化19例; 所有病例均行手术治疗, 术后病理证实, 有淋巴结转移者18例, 无淋巴结转移者27例; 均按2000年国际妇科联盟(FIGO)的诊断标准进行临床分期, 病理诊断符合《妇产科病理学》的外阴癌分级诊断标准。本研究符合人体试验伦理学标准, 并得到伦理委员会的批准, 受

试者在受试前获口头同意。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 SP 法

采用链霉素抗生物素蛋白过氧化物酶联结免疫组织化学SP法观察HPV16-E6蛋白在以上各组标本中的表达部位及表达水平。操作按SP免疫组织化学试剂盒说明书进行, 采用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3.2 结果判定标准

HPV16-E6蛋白阳性细胞以在光学显微镜下, 突出于背景的境界清晰的棕黄色或棕褐色颗粒, 细胞核内出现棕黄色或棕褐色颗粒为主, 部分出现在胞浆中。无着色或与背景颜色一致为阴性细胞。用OLYMPUS照相显微镜计算阳性细胞数。每例高倍镜($\times 400$)下随机取10个视野, 根据平均阳性细胞数的计数结果分为4级^[4]。1级: 平均阳性细胞数 $<25\%$; 2级: 平均阳性细胞数 $<50\%$; 3级: 平均阳性细胞数 $<75\%$; 4级: 平均阳性细胞数 $\geq 75\%$ 。以平均阳性细胞数 $<25\%$ 为阴性表达, 以平均阳性细胞数 $\geq 25\%$ 但 $<50\%$ 为弱阳性表达(+), 以平均阳性细胞数 $\geq 50\%$ 但 $<75\%$ 为阳性表达(++), 以平均阳性细胞数 $\geq 75\%$ 为强阳性表达(+++)。

1.4 统计学处理

采用统计软件SPSS16.0对实验数据进行统计分析。疗效比较采用 χ^2 检验, 以 $\alpha=0.05$ (双侧)作为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。多个实验组间的两两比较, 为保证检验假设中I型错误的 α 概率不变, 改检验水准为 $\alpha'=0.017$ 。

2 结果

2.1 HPV16-E6 蛋白在不同外阴组织中的表达

HPV16-E6蛋白在正常外阴皮肤组无表达, 在NNEDV组及VSCC组中阳性表达率分别为30%和66.67%, 其免疫组织化学阳性反应物主要位于细胞核及部分胞浆。三组间总体阳性率表达差异有统计学意义($\chi^2=24.466$, $P<0.001$)。三组间的两两比较, 调整检验水准 α 为 $\alpha'=0.017$, 差异均有统计学意义($P<0.017$)。在NNEDV组中, HPV16-E6蛋白在鳞状上皮增生型及硬化性苔藓型阳性率分别为35%和25%, 二组间比较差异无统计学意义($P>0.05$), 鳞状上皮增生组及硬化性苔藓组均较正常外阴皮肤组升高($P<0.05$), 较VSCC组降低($P<0.05$; 图1, 表1)。

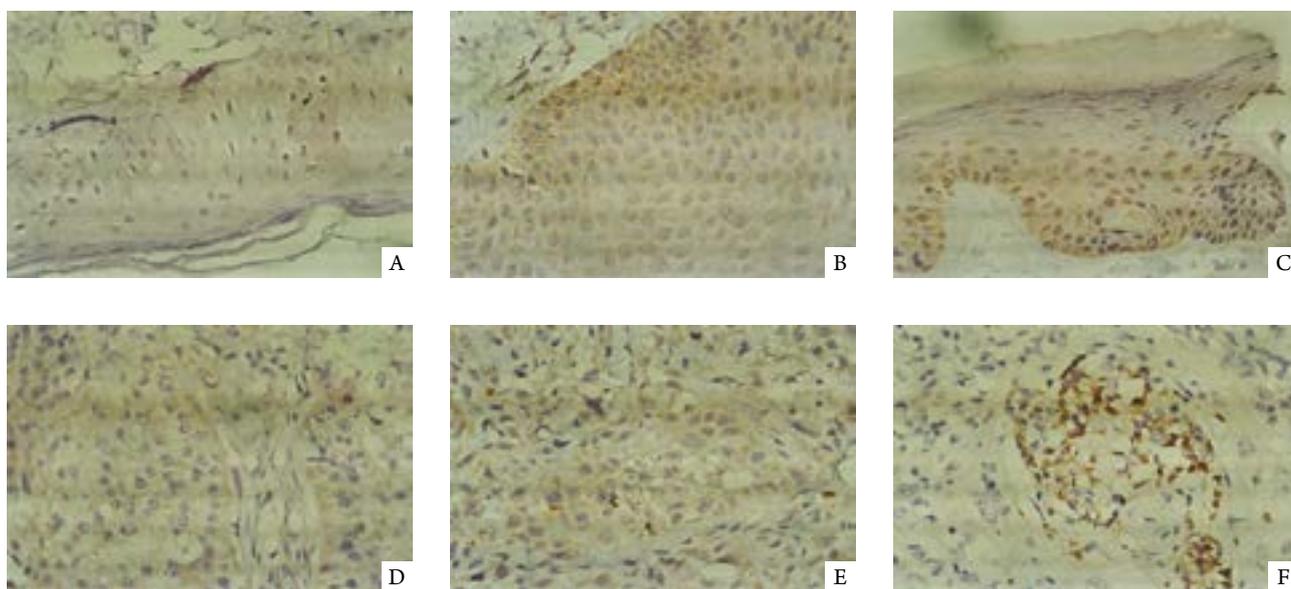


图1 HPV16-E6 在不同外阴组织中的表达(SP, $\times 400$)。A: 正常外阴组织; B: 外阴鳞状上皮增生; C: 外阴硬化性苔藓型; D: 外阴低分化鳞癌; E: 外阴中分化鳞癌; F: 外阴高分化鳞癌。

Figure 1 HPV16-E6 expression in different vulvar tissues (SP, $\times 400$). A: Normal vulvar tissues; B: Squamous hyperlasia; C: Lichen sclerosus; D: Poorly differentiated squamous cell carcinoma of vulva; E: Moderately differentiated squamous cell carcinoma of vulva; F: Well-differentiated squamous cell carcinoma of vulva.

表1 HPV16-E6蛋白在不同外阴组织中的表达

Table 1 HPV16-E6 expression in different vulvar tissues

组别	例数	阳性例数	+	++	+++	HPV16-E6 阳性率 /%	P
正常外阴组	15	0	0	0	0	0	0.024*, <0.001 [†]
NNEDV 组	40	12	4	5	3	30.00	0.001 [†]
鳞状上皮增生组	20	7	2	3	2	35.00	0.012 [△] , 0.490 [▲] , 0.017 [‡]
硬化性苔藓组	20	5	2	2	1	25.00	0.048 [△] , 0.002 [‡]
VSCC 组	45	30	8	13	9	66.67	

*与NNEDV组比较; †与VSCC组比较; △与正常外阴组比较; ▲与硬化性苔藓组比较。

2.2 HPV16-E6 蛋白的表达与外阴癌临床病理参数之间的关系

HPV16-E6在VSCC中的表达阳性率为66.67%,随着临床分期期别逐渐增高,阳性率表达逐渐增高;随着肿瘤分化程度的逐渐增高,阳性率表达逐渐降低;VSCC中有淋巴结转移者HPV16-E6阳性表达率高于无淋巴结转移者($P<0.05$,表2)。

VSCC组中不同病理分级两两比较时,高分化和低分化比较,中分化和低分化比较差异均有统计学意义($P<0.017$),但高分化和中分化比较差异无统计学意义($P>0.017$)。

VSCC组中临床分期两两比较时,I期和II期比较,I期和III期比较差异均有统计学意义($P<0.017$),但II期和III期比较差异无统计学意义($P>0.017$)。

表2 HPV16-E6在VSCC组织中与临床病理参数的关系

Table 2 Relationship between the HPV16-E6 expression and clinical pathological features in squamous cell carcinoma of vulva

分组	例数	阳性例数	阴性例数	阳性率 /%	P
分期					0.005
I 期	13	3	10	23.1	
II 期	14	10	4	71.4	
III 期	18	13	5	72.2	
分化程度					0.004
高	12	4	8	33.3	
中	14	5	9	35.7	
低	19	16	3	84.2	
淋巴结转移					0.031
有	18	15	3	83.3	
无	27	14	13	51.9	

3 讨论

Sageman等^[5]早在1996年就发现人乳头瘤病毒16/18型与某些外阴营养不良的发病有关。通过比

较细胞增殖通路上的P53, P21, Ki-67, PCNA, MDM-2蛋白^[6-8],在正常外阴皮肤和NNEDV组织中的不同表达,发现细胞异常增殖是NNEDV的一个病因^[2]。

杨树君等^[9]对38例老年妇女NNEDV中HPV表达情况检测,发现HPV在NNEDV组织中表达率为55.3%,正常外阴皮肤无阳性表达;与沈柱等^[10]研究结果一致。张莉等^[11]通过免疫组织化学和电镜技术检测NNEDV中HPV的表达,光镜下病理分型,28例患者中11例为鳞状上皮细胞增生型,HPV阳性表达100%;3例为硬化苔藓型,HPV阳性表达减弱。

HPV16-E6蛋白作为调节细胞周期和细胞凋亡的作用已被证实,以往学者们研究的是HPV16型与NNEDV的相关性,而没有从高危型HPV中的E6蛋白途径进行深入研究。本研究发现:HPV16-E6蛋白在NNEDV组织中的阳性表达率为30%,其中鳞状上皮增生型及硬化性苔藓型阳性率分别为35%和25%,二组间比较无统计学差异($P>0.05$),提示HPV感染可能是NNEDV的一个病因,但与病理类型关系不大。

HPV16-E6蛋白与人类恶性肿瘤发生、细胞恶性转化及抑制凋亡关系密切,在大量的人类肿瘤细胞中,HPV16-E6蛋白表现出活性及异常高表达,可引起宫颈上皮内瘤样病变和宫颈鳞癌的观点已被广泛认同^[12]。临床检验发现HPV病毒在多种与上皮细胞组织相关的癌症样本中检出,包括直肠癌、结肠癌、口腔癌、食管癌、咽癌、皮肤癌等^[13]。Zannoni等^[14]通过免疫组织化学从细胞周期角度对CDK(细胞周期蛋白依赖激酶)抑制剂P27蛋白和氧化DNA损害的研究中发现,NNEDV与外阴癌相关,此病的癌变率为4%~12%^[15],近年来外阴癌在年轻妇女中呈上升的趋势^[14]。

Smith等^[16]研究发现:外阴多种病变与HPV感染有关,高危型HPV感染则是引起VSCC的重要原因之一。约40.4%的外阴癌患者可检测出HPV-

DNA, 以HPV16, 33, 18型多见^[17], 该实验中HPV16-E6蛋白在正常外阴组无表达, 在NNEDV组、VSCC组中阳性表达率逐渐升高, 在VSCC中随着肿瘤分期越晚及分化程度越低, HPV16-E6表达越高, 提示HPV16-E6蛋白的高表达与VSCC的恶性程度及转移相关。在I期就已有表达, 可能提示是一个恶变早期事件, 与其在宫颈鳞癌、皮肤鳞癌等中的研究趋势一致。综上所述, HPV感染可能是NNEDV的病因之一, HPV16-E6蛋白阳性率升高可能与VSCC发生、发展相关。

但其中高分化和中分化相比, II期和III期相比, 虽然阳性率升高, 但差异无明显统计学意义($P>0.05$), 分析原因可能有两方面: 1)高分化和中分化, II期和III期两者病因、病变程度及预后等方面差别不大, 因此病例中的HPV16-E6表达差异尚无统计学意义; 2)样本量少, 免疫组织化学方法实验误差等原因。

本研究结果初步表明: HPV16-E6蛋白在NNEDV组织中高表达, 说明其与外阴上皮内非瘤样病变的病因可能相关。在VSCC组织中高表达, 且与临床分期、肿瘤分化程度、有无淋巴结转移密切相关, 说明HPV16-E6蛋白在VSCC的肿瘤细胞增殖分化、侵袭转移和临床进展中起重要的调节作用, 提示肿瘤生物学行为不良, 更易发生浸润和转移, 因此, HPV16-E6出现与否可作为VSCC早期诊断、判断肿瘤恶性程度、预测生物学行为、指导治疗的参考指标。但一些学者^[17-18]认为NNEDV非HPV途径而致VSCC, 本实验与之不相符, 因此以下两点值得思考: 1)由于样本量较小, 实验方法简单、条件有限, 对于实验结果的准确性及代表性仍需通过进一步大样本及基因水平实验验证。在对NNEDV发生恶变的研究过程中, 应加强对HPV病毒基因整合到宿主基因组后, 何种基因表达增加导致VSCC的产生方面的研究, 以及相关的基因敲除对外阴癌的机制作用方面的探讨; 2)HPV感染的NNEDV是否导致其他类型的外阴癌, 如外阴基底细胞癌和外阴疣状癌等, 这有待于更深入的研究。

参考文献

1. 丰有吉, 沈铿. 妇产科学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 306.
FENG Youji, SHEN Keng. Obstetrics and gynaecology[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010: 306.
2. 郑益志, 朱金土, 邓丹, 等. P21蛋白在慢性外阴营养不良组织中的表达[J]. 浙江中西医结合杂志, 2008, 18(12): 748-750.
ZHENG Yizhi, ZHU Jintu, DENG Dan, et al. P21 protein expression in chronic vulvar dystrophy organization[J]. Zhejiang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Magazines, 2008, 18(12): 748-750.
3. Ridley CM, Frankman O, Jones IS, et al. New nomenclature for vulvar disease: international society for vulvar disease[J]. Hum Pathol, 1989, 20(6): 495-496.
4. 刘东屏, 王春梅, 谢莹, 等. 不同级别胃黏膜上皮瘤变组织TLR4表达与HP感染的相关性研究[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(7): 1337-1339.
LIU Dongping, WANG Chunmei, XIE Ying, et al. The study of different levels of gastric epithelial neoplasia of TLR4 expression associated with HP infection[J]. Modern Oncology, 2010, 18(7): 1337-1339.
5. Sageman PM, Choi YJ, Hu Y, et al. Human papilloma virus, vulvar dystrophy, and vulvar carcinoma differential expression of human papillomavirus and vulvar dystrophy in the presence and absence of squamous cell carcinoma of the vulvar[J]. Gynecol Oncol, 1996, 61(3): 328-332.
6. Sadalla JC, Lourenço SV, Sotto MN, et al. Claudin and p53 expression in vulvar lichen sclerosus and squamous-cell carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(10): 853-857.
7. Gincheva D, Tomov C, Gorchev G, et al. [The expression of p16(INK4a) and Ki-67 in atrophic-hyperplastic and dysdysplastic lesions of the vulva][J]. Akush Ginekol (Sofia), 2009, 48(2): 16-20.
8. Murphy R. Lichen sclerosus[J]. Dermatol Clin, 2010, 28(4): 707-715.
9. 杨树君, 徐增祥, 陈涌芬. 老年妇女外阴癌及外阴营养不良与P53突变及人乳头瘤病毒感染的相关性[J]. 中华老年医学杂志, 2002, 21(2): 116-118.
YANG Shujun, XU Zengxiang, CHEN Yongfen. Older women of vulvar cancer and vulvar dystrophy and correlation with P53 mutation and human papillomavirus infection[J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2002, 21(2): 116-118.
10. 沈柱, 余春艳, 崔大祥. 外阴白斑组织中人乳头瘤病毒的快速检测与基因分型[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(24): 2269-2273.
SHEN Zhu, YU Chunyan, CUI Daxiang. Rapid detection and genotyping of the leukoplakia organization of human papillomavirus[J]. Journal of Fourth Military Medical University, 2001, 22(24): 2269-2273.
11. 张莉, 金晓明, 迟月明, 等. 人乳头状瘤病毒感染与外阴营养不良相关性的研究[J]. 电子显微学报, 2003, 22(4): 267-270.
ZHANG Li, JING Xiaoming, CHI Yueming, et al. The study of the human papilloma virus infection associated with vulvar dystrophy[J]. Journal of Electron Microscopy, 2003, 22(4): 267-270.
12. Vijayaraghavan A, Efrusy MB, Goodman KA, et al. Cost-effectiveness of using human papillomavirus 16/18 genotype triage in cervical cancer

- screening[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 119(2): 237-242.
13. Conley L, Bush T, Darragh TM, et al. Study to understand the natural history of HIV and AIDS in the era of effective therapy (SUN Study) investigators, factors associated with prevalent abnormal anal cytology in a large cohort of HIV-infected adults in the United States[J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(10): 1567-1576.
 14. Zannoni GF, Faraglia B, Tarquini E, et al. Expression of the CDK inhibitor p27kip1 and oxidativeDNA damage in non-neoplastic and neoplastic vulvar epithelial lesions[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(4): 504-513.
 15. Gincheva D, Nikolova M, Tomov S, et al. Vulvar dystrophy morphological, clinical and therapeutical aspects[J]. *Akush Ginekol*, 2009, 48(3): 39-43.
 16. Smith JS, Backes DM, Hoots BE, et al. Human papillomavirus type distribution in vulvar and vaginal cancers and their associated precursors[J]. *Obstet Gynecol*, 2009, 113(4): 917-924.
 17. van de Nieuwenhof HP, van Kempen LC, de Hullu JA, et al. The etiologic role of HPV in vulvar squamous cell carcinoma fine tuned[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(7): 2061-2067.
 18. Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, et al. Two distinct pathways to development of squamous cell carcinoma of the vulva[J]. *J Skin Cancer*, 2011, 2011: 951250 - 951257.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 周静, 肖松舒, 邓新粮, 崔超美. HPV16 型 E6 蛋白在外阴上皮内非瘤样病变和外阴鳞癌中的表达 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(3): 225-230. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.03.002

Cite this article as: ZHOU Jing, XIAO Songshu, DENG Xinliang, CUI Chaomei. Expression of HPV16 E6 protein in nonneoplastic epithelial disorder of the vulva and squamous cell carcinoma of the vulva[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2013, 38(3): 225-230. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.03.002