

## 组织 microRNA-124 表达及 HPV18 病毒载量与宫颈癌发病的相关性

俞玲芳, 王利明, 赵瑞珩

吴江区第一人民医院 妇产科, 江苏苏州 215200

**摘要:** **目的** 探讨组织中高危型 HPV 病毒的载量和 microRNA-124 表达水平与宫颈癌发病的相关性, 为宫颈癌的临床监测以及诊断提供依据。**方法** 选取在 2013 年 9 月 - 2016 年 9 月在我院行宫颈活检的宫颈癌变患者 205 例, 其中正常或炎症 56 例, 宫颈上皮内瘤变 I 级 (cervical intraepithelial neoplasia grade I, CIN I) 32 例, 宫颈上皮内瘤变 II 级 (CIN II) 37 例, 宫颈上皮内瘤变 III 级 (CIN III) 31 例, 宫颈癌 49 例 (宫颈鳞癌 38 例, 宫颈腺癌 11 例)。对宫颈组织或细胞采用逆转录-荧光定量 PCR 检测 microRNA-124 的相对表达, 采用第二代杂交捕获技术 (HC II) 检测 HPV18 病毒的载量, 病毒载量 1 pg/ml 为阴性组, 1 ~ 50 pg/ml 为低级载量组, 51 ~ 500 pg/ml 为中级载量组, 501 ~ 1 000 pg/ml 则为高级载量组, 1 001 pg/ml 及以上为极高病毒载量组。Spearman 相关性分析病毒载量与宫颈组织病变程度的相关性。**结果** 宫颈癌组 HPV18 病毒载量及 microRNA-124 表达水平显著高于其他组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 而正常或炎症组高危型 HPV 病毒载量及 microRNA-124 的表达水平最低 ( $P=0.001$ ), 并且随着宫颈癌病变加重, HPV 病毒载量及 microRNA-124 的表达水平也随之升高; Spearman 相关分析显示, 高危型 HPV 病毒载量与宫颈病变程度呈正相关 ( $R=0.975$ ,  $P=0.000$ ); 随着宫颈癌病变加重, microRNA-124 表达水平呈线性升高 ( $R=0.889$ ,  $P=0.012$ )。**结论** 宫颈组织中 microRNA-124 表达水平及高危型 HPV 病毒载量与宫颈癌的发生密切相关。

**关键词:** 微小 RNA-124; HPV18 病毒; 宫颈癌

**中图分类号:** R 373 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2018)07-0598-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2018.07.013

**网络出版时间:** 2018-06-20 15:36 **网络出版地址:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20180620.1536.004.html>

### Correlation of microRNA-124 expression and high risk HPV18 viral load in cervical cancer

YU Lingfang, WANG Liming, ZHAO Ruiheng

Department of Obstetrics and Gynecology, Wujiang First People's Hospital, Suzhou 215200, Jiangsu Province, China

The first author: YU Lingfang. Email: 254267829@qq.com

**Abstract: Objective** To explore the correlation of microRNA-124 expression and high risk HPV viral load with cervical cancer so as to provide evidence for clinical monitoring and diagnosis. **Methods** A total of 205 patients who suffered from cervical lesions and received cervical biopsies in our hospital from September 2013 to September 2016 were included in the study. Fifty-six patients were healthy or with inflammation, 32 patients with cervical intraepithelial neoplasia grade I (CIN I), 37 patients with grade II (CIN II) and 31 patients with grade III (CIN III). Forty-nine patients had cervical cancer (38 cases of squamous and 11 cases of adenocarcinoma). Reverse transcription-fluorescence quantitative PCR and hybrid capture II (HC II) were used to detect the relative expression of microRNA-124 and HPV18 virus load. According to the virus load, we categorized the patients into negative group ( $\leq 1$  pg/ml), low-load group (1-50 pg/ml), medium-load group (51-500 pg/ml) and high-load group (501-1 000 pg/ml). The relationship between high risk of HPV viral load and degree of cervical tissue lesion was analyzed by Spearman analysis. **Results** The HPV18 virus load and level of microRNA-124 in cervical cancer patients were significantly higher than those in other groups (all  $P < 0.05$ ), while they were the lowest in the healthy and inflammation group ( $P=0.001$ ). The HPV virus load and expression level of microRNA-124 increased with the aggravation of cervical cancer. The high-risk HPV virus load was positively correlated with occurrence of cervical cancer ( $R=0.974$ ,  $P=0.000$ ). The expression of microRNA-124 linearly increased with grading of cervical lesions ( $R=0.889$ ,  $P=0.012$ ). **Conclusion** The expression level of microRNA-124 in tissues and high risk HPV virus load are closely related to cervical cancer.

**Keywords:** microRNA-124; HPV18 virus; cervical cancer

宫颈癌是妇科恶性肿瘤, 死亡率较高, 每年全球新发病例 45 万之多, 80% 发生于发展中国家<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2018-01-08

基金项目: 苏州市科技计划 (SYSD2014044); 苏州市吴江区科技计划 (WWK201408)

Supported by the Science and Technology Program of Suzhou (SYSD2014 044); the Science and Technology Program of Wujiang District of Suzhou (WWK201408)

作者简介: 俞玲芳, 女, 硕士, 医师。研究方向: 妇科肿瘤。Email: 254267829@qq.com

我国宫颈癌的发病数和死亡数占全世界的 30%, 近些年研究发现子宫颈癌发病人群逐渐趋于年轻化<sup>[2]</sup>。因此提早诊断宫颈癌, 及时采取治疗措施, 是降低宫颈癌死亡率以及改善宫颈癌患者生活质量的关键<sup>[2-3]</sup>。HPV 感染是导致宫颈癌发生的危险因素<sup>[3]</sup>, 其是一类双链环装的 DNA 病毒, 迄今为止已发现有 100 多种亚型, 其中约有 40 多种能够直接感染人类<sup>[4]</sup>。由于各 HPV 亚型感染人体导致

组织病变的能力不同,因此临床上又将 HPV 分为高危型、中危型和低危型<sup>[4-5]</sup>。高危型 HPV 病毒主要包括 HPV16 病毒和 HPV18 病毒,其持续感染能引起人类 70% 的宫颈癌发生,同时在宫颈癌患者的相关组织中,有 90% 以上的 HPV 基因组 DNA 能被检测到<sup>[6-8]</sup>。微小 RNAs(microRNA, miRNA)是一类广泛存在于真核生物中小分子非编码 RNA,通过与相关靶基因结合调控基因的表达,参与生物体发育的各个阶段,如细胞的增殖、分化与凋亡等<sup>[9]</sup>。有研究表明,miRNA-124 在肿瘤细胞株中高表达,提示 miRNA-124 可能参与癌症的发生与发展过程<sup>[10-11]</sup>。本研究拟通过检测宫颈癌前病变组织中 HPV18 病毒载量以及 miRNA-124 的表达水平,探讨这两者在宫颈癌发病过程中的临床意义。

### 资料和方法

**1 资料和标本来源** 收集 2013 年 9 月 - 2016 年 9 月来我院妇科门诊就诊的 205 例患者的临床资料和宫颈活检组织切片。参与研究的患者均已签署知情同意书,研究获得我院临床研究医学伦理委员会的审批。标本选取标准:1) 年龄 30 ~ 55 岁;2) 未进行过相关的宫颈癌治疗;3) 不存在其他恶性肿瘤或其他感染类疾病。排除标准:1) 服用抗肿瘤药物或进行放疗等治疗;2) 非 HPV 病毒感染的宫颈癌。细胞学 TBS 报告:正常或炎症标本 56 例,宫颈上皮内瘤变 I 级(cervical intraepithelial neoplasia grade I, CIN I)32 例,宫颈上皮内瘤变 II 级(CIN II)37 例,宫颈上皮内瘤变 III 级(CIN III)31 例,宫颈癌 49 例(宫颈鳞癌 38 例,宫颈腺癌 11 例)。

**2 宫颈组织中高危型 HPV 病毒载量检测** 由两名以上病理医师确认 205 例标本细胞病变的级别,然后取出病变的上皮细胞,采用 II 代杂交捕获技术对细胞中 HPV18 病毒进行定量检测。

**3 宫颈组织中 miRNA-124 的提取与定量** 采用组织 miRNA 提取试剂盒(天根生物)对石蜡切片中的 miRNAs 进行提取,所有操作严格按照试剂盒操作说明书进行。提取的 miRNAs 经 Qubit 荧光定量仪(赛默飞世尔)进行浓度的初步定量,以进行下一步的反转录实验;将提取得到的组织 miRNA 进行体外反转录,采用 miScript II RT Kit(Qiagen 公司)反转录试剂盒按照操作说明书进行,使用 20  $\mu$ l 反应体系进行实验,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 进行反转录,95 $^{\circ}$ C 加热 5 min,对反应体系中的酶进行失活处理。

反转录完成后,将反应液至于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱,以备定量 PCR 实验;以 U6 位内参,荧光定量 PCR(采用北京全式金生物 SYBR Green TOP Green mixture kit)检测组织中 miRNA-124 的表达,PCR 反应体系采用 20  $\mu$ l 反应体系,在 LC480(罗氏 LC480 荧光定量 PCR)上进行反应,反应条件-预变性:95 $^{\circ}$ C 30 s,扩增(40 个循环):94 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、70 $^{\circ}$ C 30 s。通过溶解曲线以及凝胶电泳来判断扩增产物的特异性,每个反应做 3 个复孔。其中以 U6 的表达量为内参, $\Delta$  CT 代指 miRNA124 相对 U6 的表达量,即  $\Delta$  CT = CT<sub>miRNA124</sub> - CT<sub>U6</sub>, $\Delta$  CT 绝对值越大,表明 miRNA124 相对 U6 的表达量就越高。各引物序列信息见表 1。

**4 统计学分析** 所有数据采用 SPSS21.0 统计软件进行分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,事后检验采用 Tukey 法;计数资料以例数(或百分比)表示,采用  $\chi^2$  检验;变量间的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 各引物序列信息  
Tab. 1 Sequence of primers

	Primer	Sequence (5'-3')
microRNA-124	Forward	AACACCAGTCGATGGG
	Reverse	GCTTATCAGACTGATG
U6	Forward	TCGCTTCGGCAGCACA
	Reverse	CTTCACGAATTTGCGT

### 结果

**1 各标本组患者一般资料比较** 各组患者年龄、体质量指数(body mass index, BMI)均无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 2。

**2 各组高危 HPV 病毒载量比较** 正常或炎症组宫颈标本中 HPV 病毒载量为  $(0.89 \pm 0.28)$  pg/ml;宫颈上皮内瘤变 I 级,HPV 病毒平均载量为  $(398.71 \pm 21.31)$  pg/ml;宫颈上皮内瘤变 II 级,HPV 病毒平均载量为  $(851.36 \pm 27.43)$  pg/ml;宫颈上皮内瘤变 III 级,HPV 病毒平均载量为  $(996.82 \pm 19.87)$  pg/ml;而宫颈癌标本中 HPV 病毒载量最高,为  $(1\ 412.07 \pm 25.11)$  pg/ml。高危 HPV 病毒在不同组间的载量差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )(图 1)。Spearman 相关分析显示 HPV 病毒载量与宫颈组织病变程度有较强的相关性( $r=0.975$ ,  $P < 0.05$ )。见表 3。

**3 各组 miRNA-124 表达量的比较** 正常或炎症组宫颈组织中 miRNA-124 的相对表达量为  $0.27 \pm 0.19$ ;宫颈上皮内瘤变 I 级为  $0.97 \pm 0.31$ ;

表 2 患者年龄以及体质指数比较

Tab. 2 Comparisons of patients' age and BMI

	Healthy (n=56)	CIN I (n=32)	CIN II (n=37)	CIN III (n=31)	Cervical cancer (n=49)	F	P
Age	38.3 ± 7.7	39.7 ± 7.1	40.1 ± 6.8	38.9 ± 7.8	41.3 ± 7.3	1.198	0.313
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.1 ± 4.1	21.7 ± 3.2	22.4 ± 2.9	21.8 ± 3.7	21.1 ± 4.3	2.043	0.089

表 3 各组中 HPV18 病毒载量高低分布

Tab. 3 Distribution of HPV18 virus among different groups

HPV load	Healthy (n=56)	CIN I (n=32)	CIN II (n=37)	CIN III (n=31)	Cervical cancer (n=49)	r	P
Negative	54	0	0	0	0		
Low	2	0	0	0	0		
Medium	0	28	0	0	0	0.975	0.000
High	0	4	37	27	0		
Very high	0	0	0	4	49		

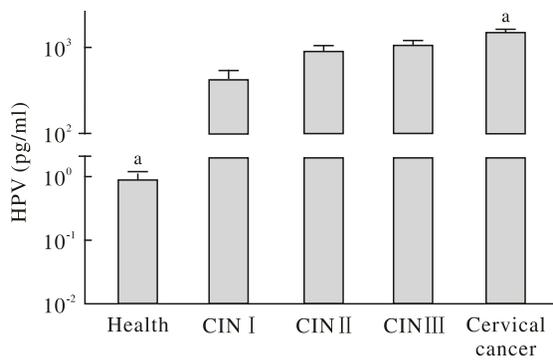


图 1 不同病变的宫颈组织中细胞的病毒载量比较 (\*P &lt; 0.05, vs 其他组)

Fig.1 Comparisons of HPV load among different cervical lesion tissues (\*P &lt; 0.05, vs other groups)

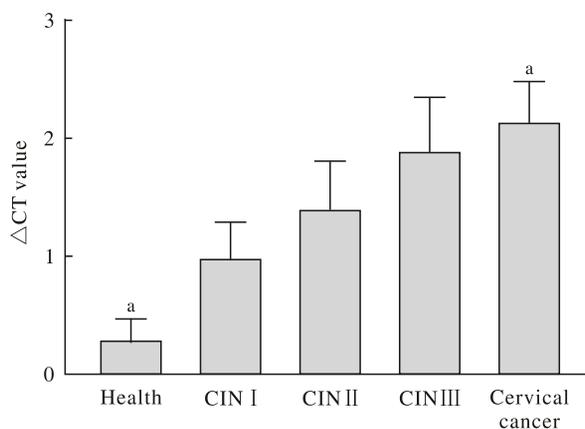


图 2 宫颈组织中 miR-124 的表达 (\*P &lt; 0.05, vs 其他组)

Fig.2 Expression of miR-124 in cervical lesion tissues (\*P &lt; 0.05, vs other groups)

宫颈上皮内瘤变 II 级为  $1.39 \pm 0.41$ ；宫颈上皮内瘤变 III 级为  $1.88 \pm 0.47$ ；而宫颈癌 microRNA-124 为  $2.13 \pm 0.35$ ；组间差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )，随着宫颈组织癌前病变的进展，microRNA-124 的相对表达量显著升高 (图 2)。Spearman 相关分析显示，microRNA-124 相对表达量的变化与宫颈组织病变程度有较强的相关性 ( $r=0.889$ ,  $P < 0.05$ )。

## 讨论

HPV 病毒的感染与宫颈癌的发生关系密切，根据其感染诱发宫颈癌的风险高低，可将 HPV 病毒分成高危型、中危型以及低危型<sup>[12-14]</sup>。高危型 HPV 病毒主要包括 HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45 等；中危型 HPV 病毒主要包括 HPV26、HPV53、HPV66 等；而低危型 HPV 主要是指 HPV6、HPV11、HPV40、HPV42、HPV43 等<sup>[15]</sup>。有研究发现，高危型 HPV 病毒 HPV16 和 HPV18 的两个编码基因是导致宫颈细胞病变的主要危险因素，伴随着组织病变的程度加深，HPV16 和 HPV18 两种高危 HPV 病毒的阳性率也显著升高<sup>[16-18]</sup>，本研究通过 II 代杂交捕获技术对 HPV18 进行定量检测。至于其导致细胞病变的机制，有学者认为 HPV 病毒可能通过与宿主的染色体结合，干预细胞周期而参与宫颈癌的发生<sup>[19]</sup>。辛婧等<sup>[20]</sup>曾对宫颈癌细胞中 miRNA-124 的表达进行研究，发现 miRNA-124 的高表达能促进细胞增殖，还可通过参与细胞的凋亡过程，抑制宫颈癌细胞的程序性死亡，因此其高水平的表达与宫颈细胞的病变以及癌症的发生呈正相关。

本研究发现，宫颈癌组织中，HPV18 病毒载量为  $(1\ 412.07 \pm 165.11)$  pg/ml，而正常或炎症患者中宫颈细胞的高危型 HPV 病毒载量仅为  $(0.89 \pm 0.28)$  pg/ml，Spearman 相关分析显示，宫颈上皮的瘤变风险与高危型 HPV 病毒载量呈正相关，提示宫颈细胞的瘤变过程与高危型 HPV 病毒的感染密切相关。同时我们检测了不同宫颈组织 miRNA-124 的表达，发现在宫颈癌组织中 miRNA-124 的相对表达水平最高，其  $\Delta CT$  为  $2.13 \pm 0.35$ ，而在正常或炎症患者组，miRNA-124 的相对表达水平

最低, 为  $0.27 \pm 0.19$ , 提示宫颈细胞的病变恶性程度与内源 miRNA-124 的表达水平密切相关。

综上所述, 在宫颈组织中 miRNA-124 的相对表达水平以及高危型 HPV 病毒的感染与其组织的病变过程, 甚至癌症的发生密切相关, 其中内源过表达的 miRNA-124 可能通过与靶基因结合, 干扰相关基因的表达, 从而引发宫颈癌细胞的病变直至癌症的发生, 而外源 HPV 病毒 DNA 可能通过整合入患者基因组 DNA 中, 干扰基因组稳定性引发细胞周期的紊乱, 从而参与其组织病变以及癌症发生的过程。本研究通过以上两个方面对患者进行研究, 为宫颈癌发病前的早期诊断, 也为进一步在宫颈癌中研究小分子 miRNA-124 以及外源高危型 HPV 病毒感染, 提供了一定的实验基础。

#### 参考文献

- 1 宋晶淼, 卢战凯, 张晶. 高危型 HPV 病毒载量与宫颈病变的关系 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2014, 35 (24): 3657-3658.
- 2 吕倩灵, 张玲, 林伟平. 高危型人乳头状瘤病毒及病毒载量对宫颈癌前病变的相关性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24 (4): 804-805.
- 3 郎景和. 精确筛查 风险分层 HPV 与子宫颈癌防治 [J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49 (10): 746-748.
- 4 Jin L, Xu ZX. Recent advances in the study of HPV-associated carcinogenesis [J]. *Virology*, 2015, 30 (2): 101-106.
- 5 Smelov V, Elfström KM, Johansson ALV, et al. Long-term HPV type-specific risks of high-grade cervical intraepithelial lesions: a 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136 (5): 1171-1180.
- 6 刘冬, 叶敏娟, 杨越波. HPV 基因型与宫颈病变的关系探讨 [J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40 (24): 1531-1534.
- 7 Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91 (3): 412-420.
- 8 冷秀梅, 范雪梅, 耿建祥, 等. 宫颈鳞癌及腺癌组织中 HPV 感染基因型分布的比较研究 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29 (10): 1594-1596.
- 9 陈军莹, 姚德生, 贺婵娟, 等. 宫颈鳞癌 MicroRNA 差异表达的研究 [J]. 实用医学杂志, 2014, 30 (1): 83-87.
- 10 曾康康, 莫祥兰, 刘斐, 等. 宫颈癌及癌前病变组织中 microRNAs 的差异表达 [J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41 (7): 789-793.
- 11 Quek SC, Lim BK, Domingo E, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical intraepithelial neoplasia across 5 countries in Asia [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23 (1): 148-156.
- 12 王颖, 刘植华. 阴道乳酸杆菌与 HPV 感染、宫颈癌及癌前病变的相关性研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2013, 19 (8): 610-615.
- 13 Bhogireddy V, Roston A, Chor J, et al. Cervical intraepithelial neoplasia and cancer in women 35 years and older [J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2014, 18 (1): 41-45.
- 14 马莉, 丛笑, 卞美璐, 等. 高危型 HPV 分型检测作为子宫颈癌及其癌前病变初筛手段的探讨 [J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50 (4): 246-252.
- 15 张宗峰, 杜娟. 人乳头瘤病毒与微小 RNA 表达的相关性 [J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42 (11): 1152-1155.
- 16 梁洁琼, 赵敏. 高危型人乳头瘤病毒整合态与宫颈上皮内瘤变及宫颈癌关系的探讨 [J]. 中国药物与临床, 2014, 14 (4): 431-433.
- 17 Kang L, Zhao F, Chen F, et al. Value of high risk human papillomavirus viral load in predicting cervical lesions and triaging for high risk (HR)-HPV-positive women [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2014, 36 (4): 316-320.
- 18 Koukos G, Polytaichou C, Kaplan JL, et al. MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2013, 145 (4): 842-852.
- 19 苗小艳, 孔繁斗, 石敏, 等. HPV16/18 感染导致宫颈癌的分子机制研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27 (10): 1152-1155.
- 20 辛婧, 徐银胜, 张芳, 等. MicroRNA-124 对子宫颈癌的抑制作用及机制研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35 (10): 13-19.