

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.17.020

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210720.1302.004.html\(2021-07-20\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210720.1302.004.html(2021-07-20))

HPV 感染与 CIN 及宫颈组织 PAK1、Spred1 表达关系的病理研究*

刘 岑,王 芬,马 兰[△],张红霞

(鄂东医疗集团黄石市妇幼保健院/湖北理工学院附属妇幼保健院产科,湖北黄石 435003)

[摘要] **目的** 分析高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染与宫颈上皮内瘤变(CIN)相关性,并探讨宫颈组织 P21 活化激酶(PAK1)、Spred1 的病理特征及表达关系。**方法** 观察正常宫颈组织、CIN 组织 PAK1、Spred1 的表达水平及病理特征,对高危型 HPV 感染与 CIN 相关性进行分析。**结果** 正常宫颈组织、CIN I 期、CIN II 期、III 期 PAK1 蛋白阳性表达率逐渐升高,Spred1 蛋白阳性表达率逐渐降低。CIN 组织的 PAK1 表达水平与其病理分级、淋巴转移有关,Spred1 的表达水平与病理分级有关,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高危型 HPV 感染与 PAK1、Spred1 表达水平均有相关性,且 PAK1 与 Spred1 表达呈负相关($P < 0.05$)。**结论** CIN 组织 PAK1 与 Spred1 表达呈负相关,高危型 HPV 感染和 PAK1 表达是 CIN 发生、发展的重要因素。

[关键词] 宫颈上皮内瘤变;人乳头瘤病毒;P21 活化激酶;Spred1 基因;鳞状细胞癌;免疫组织化学

[中图分类号] R711

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2021)17-2968-04

Pathological study of the relationship between HPV infection and CIN, the expression of PAK1 and Spred1 in cervical tissues*

LIU Cen, WANG Fen, MA Lan[△], ZHANG Hongxia

(Department of Obstetrics, Huangshi Maternity & Children's Health Hospital, Edong

Healthcare Group/Women's & Children's Hospital Affiliated to Hubei

Polytechnic University, Huangshi, Hubei 435003, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the relationship between high-risk human papillomavirus (HPV) infection and cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and investigate the relationship between the pathological features and expression of cervical tissue P21 activates the kinase (PAK1) and Spred1. **Methods** Observed the expression levels and pathological characteristics of PAK1 and Spred1 in normal cervical tissues and CIN cervical tissues, and analyzed the correlation between high-risk HPV infection and CIN. **Results** The positive expression rate of PAK1 protein in normal cervical tissue, CIN stage I, II and III gradually increased, while the positive expression rate of Spred1 protein gradually decreased. The expression level of PAK1 in CIN was related to its pathological grade and lymphatic metastasis, while the expression level of Spred1 was related to pathological grade ($P < 0.05$). High-risk HPV infection was correlated with the expression levels of PAK1 and Spred1, and the expression of PAK1 and Spred1 was negatively correlated ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of PAK1 and Spred1 in CIN tissue is negatively correlated. High-risk HPV infection and PAK1 expression are the important factors for the occurrence and development of CIN.

[Key words] cervical intraepithelial neoplasia; human papilloma virus; P21 activates the kinase; Spred1 gene; squamous cell carcinoma; immunohistochemistry

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,运用宫颈液基薄层细胞学进行宫颈癌的监控预测具有重要的临床意义^[1]。人类乳头状瘤病毒(HPV)感染可影响宫颈组织多种信号通路的传导^[2],是宫颈上皮内瘤变(CIN)的高危因素,CIN 及宫颈癌均和感染高危型

HPV 具有密切相关性^[3]。CIN 不同病变的宫颈组织中 P21 活化激酶(PAK1)和 Spred1 的表达 PAK1/Spred/MAPK 信号通路在 CIN 发生、发展中发挥重要的作用。PAK1 参与在细胞增殖、细胞转化、细胞骨架系统重排、细胞凋亡过程^[4],Ras-MAPK 途径在

* 基金项目:湖北省卫生健康委员会 2019—2020 年度科研项目(WJ2019M084)。 作者简介:刘岑(1974—),副主任医师,本科,主要从事生殖系统肿瘤的早期诊治研究。 [△] 通信作者,E-mail:1770185641@qq.com。

细胞的生长、分裂、增殖和分化过程中起重要协同作用,Spred 可抑制细胞分化,对多种生长因子诱导的 Ras-ERK 途径均有抑制作用。P21 活化激酶在正常宫颈组织一般情况不表达,宫颈前驱病变均为高危型 HPV 感染所致,随着 CIN 级别增高,血清 PAK1 蛋白阳性表达量亦随之升高,赵健等^[5]研究证实慢性宫颈炎 P21 蛋白表达阳性率及高危型 HPV 病毒呈正相关。P21 活化激酶受内分泌激素的调节成为与宫颈组织相关的特殊分化组织 P16、18,作为细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂,HPV 癌基因 E6、E7 的持续表达造成 CIN 中 P16 的过度表达,使 P16 的负反馈抑制解除,致使 P16 表达异常,是高危型 HPV 感染并引致宿主细胞变异的客观表现,在宫颈病变的早期诊断中发挥作用^[6]。对 HPV 感染的流行病学和分子生物学研究,有助于宫颈癌的早期诊断和联合治疗,使患者预后得到明显改善^[7]。本文对 CIN 中 PAK1、Spred1 的表达水平及病理特征进行分析,并就 CIN 与高危型 HPV 感染的相关性进行研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2018 年 1—12 月临床检验中心手术后送检的 200 例宫颈组织标本,获得 CIN 组织标本 76 份。CIN 采用 2009 年国际妇产科联合会 (FIGO) 临床分期标准进行分期,CIN 标本中 CIN I 期 31 例、II 期 27 例、III 期 18 例;低分化 29 例,中分化 28 例,高分化 19 例;有淋巴结转移 27 例,无淋巴结转移 49 例。选取同期因其他疾病行全子宫切除的 58 例患者的正常宫颈组织作为对照,患者年龄 37~68 岁,平均(51.50±6.20)岁。所有患者术前 3 个月均未接受药物治疗、放疗、新辅助化疗或中药治疗,且临床病理资料完整、病例信息完整。本研究通过医院伦理委员会审查备案,征得患者或配偶知情同意,保护其隐私和匿名权,所有资料仅用于研究。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法

兔抗人 PAK1 多克隆抗体 bs-17685R、DAB 显色试剂(北京中山试剂公司提供)1:50 倍稀释、兔抗人 Spred1 多克隆抗体 1:75 倍稀释;采用免疫组织化学法检测,按照要求步骤进行操作。PAK1 及 Spred1 采用双盲法按着色强度和阳性细胞数进行分级,低倍镜视野计数取各视野中阳性数的平均值作为阳性细胞数量,以两者相乘的结果作为最终评分,≤3 分为阴性,>3 分为阳性^[8]。

1.2.2 宫颈组织病变病理检查

取宫颈组织标本于固定液内固定 12 h 以上,脱水 2 h 进行透明处理,浸蜡 3 h 石蜡包埋切片(厚度 3 μm),脱蜡 10 min 后水化,采用苏木素-伊红(HE)染色封片,标本低倍镜观察不同宫颈组织病变各期 CIN 病理特征和高危型 HPV 感染与宫颈组织病变病理。

1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件进行数据分析,计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法,相关性采用 Spearman 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同病理组织 PAK1 和 Spred1 蛋白阳性表达比较

正常宫颈组织、CIN I、II、III 期 PAK1 蛋白阳性表达率逐渐升高,Spred1 蛋白阳性表达率逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同病理组织 PAK1 和 Spred1 蛋白阳性表达率比较[n(%)]

组别	n	PAK1 阳性表达率	Spred1 阳性表达率
正常宫颈组织	58	7(12.07)	52(89.65)
CIN I 期	31	11(37.93)	20(64.52)
CIN II 期	27	16(59.26)	11(40.74)
CIN III 期	18	13(72.22)	5(27.78)
F		1.640	-1.812
P		0.021	0.016

2.2 高危型 HPV 感染后不同宫颈组织病变病理特征

CIN 宫颈组织标本见图 1~3。少量宫颈及外阴组织活检病理结果为外阴鳞状上皮内瘤变 III 期伴 HPV 感染(HPV16/18+、HPV31/33-),CIN II 期伴 HPV16 和 HPV18 感染,见图 4。

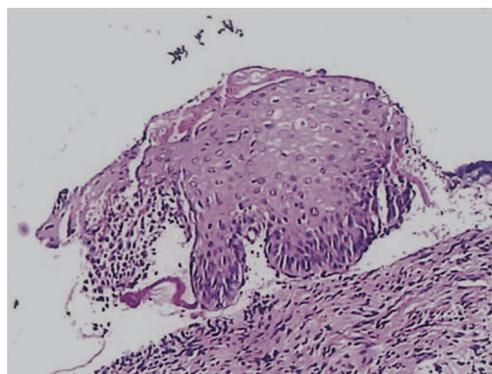


图 1 宫颈组织 CIN I 期病理图片(HE,×100)

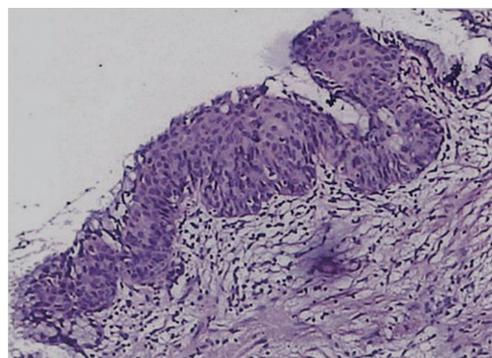


图 2 宫颈组织 CIN II 期病理图片(HE,×100)

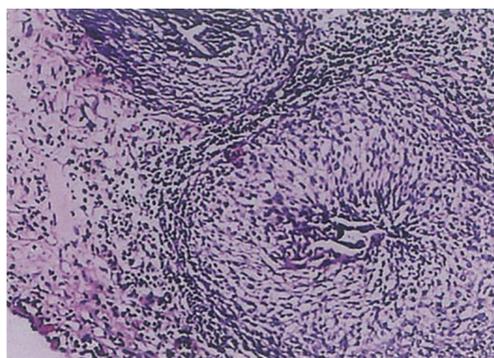


图 3 宫颈组织 CIN III 期病理图片(HE, ×100)

($P < 0.05$), 见表 2。

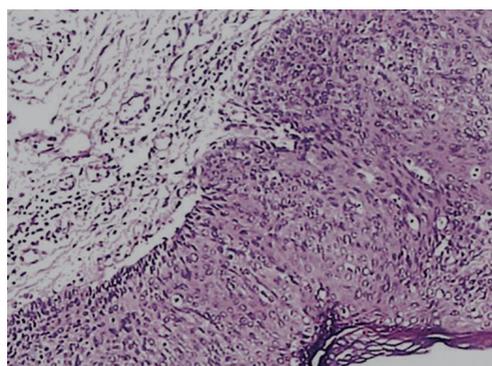


图 4 宫颈组织 CIN II 期伴 HPV16、18 感染病理图片(HE, ×100)

2.3 不同病理特征 PAK1 和 Spred1 阳性表达比较

PAK1 阳性表达与病理分级和淋巴转移有关, 而 Spred1 阳性表达与病理分级有关, 差异有统计学意义

表 2 不同病理特征 PAK1 和 Spred1 阳性表达比较[n(%)]

项目	n	PAK1			Spred1		
		阳性表达率	χ^2/F	P	阳性表达率	χ^2/F	P
年龄			0.644	0.962		1.498	0.474
<55 岁	29	23(79.31)			6(20.69)		
≥55 岁	47	41(87.23)			9(19.14)		
病理分级			4.507	0.001		-4.830	0.001
低分化	29	17(58.62)			7(24.14)		
中分化	28	20(71.43)			4(14.28)		
高分化	19	16(84.21)			1(5.26)		
临床分期			0.872	0.504		1.271	0.584
I 期	31	27(87.09)			9(29.03)		
II~III 期	45	41(91.11)			10(22.22)		
淋巴转移			4.960	0.001		1.942	0.076
无	49	24(48.97)			11(22.45)		
有	27	22(81.48)			5(18.52)		

2.4 高危型 HPV 感染与 PAK1、Spred1 表达的相关性

高危型 HPV 感染与 PAK1、Spred1 均有相关性 ($P < 0.05$), 且 PAK1 与 Spred1 表达呈负相关 ($r = -0.504, P < 0.001$), 见表 3。

表 3 高危型 HPV 感染与 PAK1、Spred1 表达的相关性(n)

高危型 HPV 感染	PAK1				Spred1			
	阳性	阴性	χ^2	P	阳性	阴性	χ^2	P
阳性	54	22	3.250	0.001	53	23	-2.924	0.001
阴性	23	53			22	54		

3 讨论

CIN 已经成为造成女性肿瘤患者死亡的重要原因, 该病多以遗传、慢性妇科炎症等因素而引起^[9], 而高危型 HPV 已成为 CIN 的重要致病因素。秦丽等^[10] meta 分析结果证实, 阴道菌群以非乳酸杆菌为

优势的女性更可能与 HPV 感染, 发生宫颈病变或宫颈癌相关。近年来随着分子靶向药物的临床应用治疗多种肿瘤, 取得了比较理想的治疗效果, 因此, 对靶向治疗敏感的分子信号通路的研究, 是肿瘤治疗领域内的热点问题^[11]。PAK1 是苏氨酸蛋白、丝氨酸蛋白激酶, 作为 Rho 下游的靶蛋白和 MAPK 上游的调节蛋白^[12], PAK1 主要通过结合 CDC42 或 Rac1 被激活, 调节平滑肌细胞活力和形态, 在瘤体的生成及转移过程与肿瘤血管中起相互作用, 肿瘤细胞生长所需营养物质通过肿瘤血管供给瘤体生长, 有报道 PAK1 的表达与人鳞状细胞癌的分期和分级相关^[13]。刘畅等^[14]研究发现 P21 活化激酶能够抑制 MAPK 信号通路的活化, 因此, PAK1 与 CIN 的发病、发展存在潜在关系。

PAK1 过度表达是 CIN 过程中的一个早期事件, 可能与肿瘤的发生、发展、浸润、转移及演进过程有密

切的关系^[15]。Spred1 在 RhoA 介导的细胞运行及信号的转导中起作用,Notch 基因的细胞表面受体影响细胞形态发生、发展的多个过程,影响母细胞的分化、细胞增殖及细胞凋亡过程,Notch1 的作用在不同细胞中运行机制不同,基因位点突变引起的表型改变,表明 Notch 信号作用的多样性,在机体细胞组织肿瘤的发生、发展中,通过与活化的 RhoA 结合来抑制其诱导的 Rho 激酶的激活,抑制肿瘤细胞的凋亡诱导细胞增殖,调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)广泛分布于多种恶性肿瘤间质中,它的聚集程度与肿瘤的不良预后密切相关,可以认为 CIN I 期可向正常组织转化。在 Spred1、PAK1、MAPK 信号通路中,Spred1 为抑癌基因,PAK1 为促癌基因,通过上调 Spred1 为靶向蛋白,达到抑制 PAK1 的活化^[16],提示 PAK1 与 Spred1 的相互作用在高危型 HPV 持续感染情况下,HPV 通过感染、整合、癌变 3 个阶段,导致宫颈癌前病变的发生、发展,引起阴道上皮细胞成熟障碍,形成阴道上皮细胞的不典型增生。Spred1 可能具有一种抑癌基因的潜能,在肿瘤的发生、发展过程中发挥抑制作用,当 Spred1 基因突变使抑制功能下调,对 PAK 的负调控作用引起 PAK1 表达水平的上调,下游蛋白 MAPK 作用上调导致 CIN 的发生、发展。

肿瘤转移是恶性肿瘤的重要生物学特征,有约 10% 的患者术后较快出现复发和淋巴结转移,可能与癌细胞微转移有关^[17],Spred1 基因诱导肿瘤靶细胞的破坏,来降低恶性肿瘤的发生率,宫颈癌患者血清中检测其水平表达,可以评估宫颈组织皮肤上皮细胞癌变的发生、发展,HPV-16 持续感染是影响患者复发的独立危险因素^[18]。Spred1 基因是人类肿瘤中广泛存在的肿瘤抑制基因,PAK1 表达异常是 HPV 感染并引致宿主细胞变异的客观表现,在宫颈病变的早期诊断中发挥重要作用^[19]。本研究结果显示,76 例宫颈组织中 PAK1 阳性 54 例,阴性 22 例;Spred1 阳性 53 例,阴性 23 例,经 Spearman 相关性分析:PAK1 和 Spred1 表达呈负相关($r = -0.504, P < 0.001$)。病理检测结果 PAK1 和 Spred1 的表达与高危型 HPV 感染的相关性($P < 0.05$),PAK1 蛋白和 Spred 因子在宫颈组织中的表达与肿瘤的临床分期及组织学分级相关,阳性表达率比较组织学分级越高,PAK1 蛋白的阳性表达率越高,而 Spred1 因子阳性表达率则越低。Spred1 因子水平阳性表达率随着 CIN 程度的加重反而降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

本研究显示,CIN 宫颈组织 PAK1 与 Spred1 因子表达呈负相关,提示高危型 HPV 感染与 PAK1、Spred1 密切相关,过表达可能影响抑癌基因的正常表达,进而影响癌细胞的增殖、迁移,增加其浸润、转移风险^[20]。临床 CIN I 期病例很常见,对于该类病例可不采用任何治疗仅观察随访。细胞学为高密度鳞状上皮内病变组织学诊断 CIN II 期时不仅要观察随访,

应行 LEEP 术及时治疗,可以阻止宫颈浸润癌的发生。对术后病理为 CIN III 期的患者需要定期随访,以排除 CIN 持续高危型 HPV 造成 CIN 的持续状态或复发和低级别鳞状上皮内病变的存在,确诊后可以选择宫颈锥切术及外阴单纯切除术^[21]。对患者进行严密观察宫颈细胞学转化,有利于监测宫颈癌的发生、发展及预后,对于临床下一步制订治疗方案具有重要的意义。

综上所述,肿瘤的发生、发展是一个多步骤的过程,往往是在多种致病因素作用同时,通过基因相互协调的结果。对高危型 HPV 感染与 PAK1、Spred1 在 CIN 宫颈组织表达的相关性进行研究,可为宫颈鳞癌的早期诊断与治疗提供理论依据,对评估 CIN 近期预后提供参考,具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] 窦丽. 液基薄层细胞学与巴氏涂片法用于宫颈癌筛查临床价值比较[J]. 中国现代药物应用, 2014,8(18):84-85.
- [2] 张前燕,朱滨,冯家银,等. 一氧化氮中毒后迟发性脑病患者 S100 β 、JNK 通路蛋白及相关细胞因子水平变化及其临床意义[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2018,25(3):127-129.
- [3] 邵春华. TCT 及 HR-HPV 检测在女性宫颈上皮内瘤变中联合检测分析[J]. 现代诊断与治疗, 2020,31(10):1629-1631.
- [4] 李业如,庞祥媚,李敏,等. CX43 对脑胶质瘤 C6 细胞增殖的影响及机制[J]. 中国药理学通报, 2017,33(6):763-764.
- [5] 赵健,林军,周燕,等. 宫颈上皮内瘤变及早期宫颈癌组织中 P16、HPV L-1 壳蛋白的表达分析[J]. 中国现代医生,2020,58(21):236-239.
- [6] 刘明盛,张丹,张勇. 宫颈癌患者复发恐惧感与其生存质量及心理状态的相关性分析[J]. 重庆医学,2019,48(12):2118-2121.
- [7] 孙鑫,魏秀峰,吕珊珊,等. VASH1 在口腔鳞状细胞癌、口腔白斑及口腔扁平苔藓中的表达及意义[J]. 海南医学,2015,26(23):3560-3562.
- [8] 刘俐梅. 薄层液基细胞学和高危型人乳头瘤病毒筛查在宫颈癌诊断中的价值分析[J/CD]. 现代医学与健康研究电子杂志,2020,4(7):74-76.
- [9] 王晓,申倩倩,王炎,等. 宫颈鳞癌组织中 P21 活化激酶 1 和 Sprouty 相关 EVH1 域蛋白 1 表达观察[J]. 山东医药,2019,59(6):56-59.
- [10] 秦丽,朱莉,王瑞雅,等. 宫颈阴道微生物群与 HPV 感染宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的关系:系统评价和网络荟萃分析[J]. 临床医学进展, 2021,11(2):25-28. (下转第 2976 页)

- Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births [J]. *Reprod Health*, 2013, 10(S1):2.
- [8] 孔琳, 陈昭霞, 覃钰芹, 等. 2017—2019 年广西壮族自治区早产发生率及相关因素分析[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(42):3338-3341.
- [9] GLOVER A V, BATTARBEE A N, GYAMFI-BANNERMAN C, et al. Association between features of spontaneous late preterm labor and late preterm birth[J]. *Am J Perinatol*, 2020, 37(4):357-364.
- [10] QIN C, LUO G, LUO X, et al. Analysis of the artificial vaginal microecology in patients after laparoscopic peritoneal vaginoplasty [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):8482.
- [11] PURISCH S E, GYAMFI-BANNERMAN C. Epidemiology of preterm birth[J]. *Semin Perinatol*, 2017, 41(7):387-391.
- [12] MUNOZ-PEREZ V M, ORTIZ M I, CARINO-CORTES R, et al. Preterm birth, inflammation and infection: new alternative strategies for their prevention[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2019, 20(5):354-365.
- [13] CHOI S R, YOON N R, HWANG S O. Is a cause of postpartum hemorrhage of using of tocolytic agents in preterm delivery? [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2017, 30(22):2711-2715.
- [14] TING J Y, KINGDOM J C, SHAH P S. A tenatal glucocorticoids, magnesium sulfate, and mode of birth in preterm fetal small for gestational age[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 218(2S):S818-828.
- [15] Committee on Obstetric Practice. Committee opinion No. 713:antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation[J]. *Obstet Gynecol*, 2017, 130(2):e102-109.
- [16] GARRUD T A C, GIUSSANI D A. Combined antioxidant and glucocorticoid therapy for safer treatment of preterm birth[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2019, 30(4):258-269.
- [17] 赵倩, 高岚. 地塞米松产前应用于近足月早产儿的效果分析[J]. *四川医学*, 2019, 40(12):1254-1257.
- [18] KEMP M W, SAITO M, USUDA H, et al. The efficacy of antenatal steroid therapy is dependent on the duration of low-concentration fetal exposure:evidence from a sheep model of pregnancy[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 219(3):e1-301.
- [19] FOWDEN A L, VALENZUELA O A, VAUGHAN O R, et al. Glucocorticoid programming of intrauterine development[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2016, 56(Suppl):S121-132.

(收稿日期:2020-12-20 修回日期:2021-04-08)

(上接第 2971 页)

- [11] 郑娣, 孙新, 关鑫刚. P21 活化激酶家族的研究进展[J]. *当代医学*, 2017, 23(13):176-179.
- [12] 王占宇. P21 活化激酶 1 在肿瘤中的研究进展[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2016, 36(2):261-263.
- [13] ONG C C, JUBB A M, JAKUBIAK D, et al. P21-activated kinase 1 (PAK) as a therapeutic target in BRAF wild-type melanoma[J]. *J Nail Cancer Inst*, 2018, 105(9):606-607.
- [14] 刘畅, 李坤, 舒丽莎, 等. B7-H4 和 Foxp3+Treg 在宫颈病变组织中的表达及临床意义[J]. *重庆医学*, 2019, 48(17):2960-2963.
- [15] 陈琛. 组蛋白去乙酰酶在宫颈鳞癌组织中的表达及临床意义[J]. *肿瘤基础与临床*, 2016, 24(6):468-470.
- [16] 黄艳艳, 沈琳, 朱爱琴. 宫颈高危型人乳头瘤病毒感染患者的阴道微生态分析[J]. *重庆医学*, 2019, 48(5):886-888.
- [17] 周铁军, 向丽, 龚莉, 等. 血管内皮生长因子-C 及其受体在宫颈癌中的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2010, 39(5):533-535.
- [18] 李花, 马玲, 马永萍, 等. 持续性 HPV-16 感染与高级别宫颈上皮内瘤变复发间的相关性[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(15):2362-2366.
- [19] 杨君, 王彬, 周德平, 等. P16、NP63 在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的表达及相关性研究[J]. *重庆医学*, 2019, 38(24):3060-3063.
- [20] 刘平, 张红莉. 宫颈上皮内瘤变组织中 MEKK3、NF- κ B 的表达量及其高危型 HPV 感染的相关性研究[J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(19):2247-2250.
- [21] 王建六, 古航, 孙秀丽. 临床病例会诊与点评-妇产科分册[M]. 北京:人民军医出版社, 2012, 5:124-142.

(收稿日期:2020-12-08 修回日期:2021-04-22)