

## P16<sup>INK4a</sup>与人乳头瘤病毒感染及宫颈上皮内瘤变进展的相关性

陈霞慧, 马向薇, 郝冬梅, 于月新

(中国人民解放军北部战区总医院生殖医学科, 沈阳 110003)

**摘要** 目的 探讨P16<sup>INK4a</sup>与人乳头瘤病毒(HPV)感染及宫颈上皮内瘤变(CIN)的相关性。方法 选取2020年2月至2023年5月在我院就诊的CIN患者197例(CIN组),其中CIN1患者62例,CIN2患者89例,CIN3患者46例;同时选取接受子宫全切除术且术后病理证实宫颈组织正常患者50例作为对照组;检测2组P16<sup>INK4a</sup>表达及HPV感染情况。结果 对照组P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率和HPV感染率(10.00%和0.00%)显著低于CIN组(72.08%和45.69%, $P < 0.05$ );CIN2和CIN3患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率(80.90%和91.30%)显著高于CIN1患者(45.16%, $P < 0.05$ )。CIN3患者HPV感染率(63.04%)高于CIN1、CIN2患者(33.87%和44.94%, $P < 0.05$ )。有HPV感染的CIN患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率(93.33%)显著高于无HPV感染的CIN患者(54.21%, $P < 0.05$ );HPV16/18感染患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率(100.00%)显著高于HPV31/33/53感染患者(85.00%, $P < 0.05$ );不同年龄、体重指数CIN患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 CIN患者P16<sup>INK4a</sup>表达率明显升高,且与病变程度相关,P16<sup>INK4a</sup>表达与HPV感染有关。

**关键词** P16<sup>INK4a</sup>; 人乳头瘤病毒; 宫颈上皮内瘤变; 相关性

中图分类号 R711.74 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)09-0777-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240909.1728.026>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.09.002

### Correlation among P16<sup>INK4a</sup> expression, human papilloma virus infection, and cervical intraepithelial neoplasia progression

CHEN Xiaohui, MA Xiangwei, HAO Dongmei, YU Yuexin

(Department of Reproductive Medicine, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110003, China)

**Abstract** **Objective** To explore the correlation among P16<sup>INK4a</sup> expression, human papilloma virus (HPV) infection, and cervical intraepithelial neoplasia (CIN). **Methods** A total of 197 patients with CIN who visited our hospital between February 2020 and May 2023 were selected, including 62 with CIN1, 89 with CIN2, and 46 with CIN3. At the same time, 50 patients who underwent total hysterectomy and had normal cervical tissue confirmed by postoperative pathology were selected as the control group. P16<sup>INK4a</sup> expression and HPV infection were detected in each patient. **Results** The positive P16<sup>INK4a</sup> expression and HPV infection rates of the control group were 10.00% and 0.00%, respectively, significantly lower than those of patients with CIN (72.08% and 45.69%, respectively) ( $P < 0.05$ ). The positive P16<sup>INK4a</sup> expression rates of patients with CIN2 and CIN3 were 80.90% and 91.30%, respectively, significantly higher than that of patients with CIN1 (45.16%) ( $P < 0.05$ ). The HPV infection rate among patients with CIN3 was 63.04%, significantly higher than those of patients with CIN1 (33.87%) and CIN2 (44.94%) ( $P < 0.05$ ). The positive P16<sup>INK4a</sup> expression rate of patients with CIN and HPV infection was 93.33%, significantly higher than that of patients with CIN but without HPV infection (54.21%) ( $P < 0.05$ ). The positive P16<sup>INK4a</sup> expression rate of patients with HPV16/18 infection was 100.00%, significantly higher than that of patients with HPV31/33/53 infection (85.00%) ( $P < 0.05$ ). There was no statistically significant difference in the positive P16<sup>INK4a</sup> expression rate among patients with CIN by clinical characteristics such as age and body mass index ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The P16<sup>INK4a</sup> expression rate among patients with CIN is significantly increased and correlated with lesion degree and HPV infection status.

**Keywords** P16<sup>INK4a</sup>; human papilloma virus; cervical intraepithelial neoplasia; relativity

宫颈癌是导致女性死亡的主要癌症之一<sup>[1-3]</sup>。调查显示,每年约有5万名妇女因宫颈癌死亡,其

中近90%发生在发展中国家<sup>[4-5]</sup>。宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是宫颈癌的癌前病变,其发生、发展与人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染密切相关<sup>[6]</sup>。大多数HPV感染在短期内可被免疫系统清除,但仍有部分高危亚型会发生免疫逃逸,导致慢性感染,引起宫颈上皮的不典型增生,进而发展成CIN,最终可能演化成宫颈

基金项目:军队计生专项科研课题(21JSZ11)

作者简介:陈霞慧(1988-),女,主管技师,硕士。

通信作者:于月新, E-mail: yuyuexinpingan@163.com

收稿日期:2023-10-19

网络出版时间:2024-09-10 15:15:05

癌<sup>[7]</sup>。因此,寻找更精确的生物标志物,以预测CIN的发生和进展以及与CIN相关的宫颈癌风险,具有至关重要的意义。P16<sup>INK4a</sup>是一个关键的细胞周期调控蛋白,其异常表达与多种肿瘤的发生和发展密切相关<sup>[8-9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>发现,P16<sup>INK4a</sup>的过度表达是CIN的一个标志,可能与宫颈癌的发生有关。目前关于P16<sup>INK4a</sup>与HPV相关性的研究报道有限,因此,本研究拟探讨P16<sup>INK4a</sup>与HPV感染及CIN的相关性,以期防治宫颈癌提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

选取2020年2月至2023年5月在我院就诊的CIN患者197例作为CIN组,其中CIN1 62例,CIN2 89例,CIN3 46例。纳入标准:经术后病理确诊为CIN;术前未接受激素、免疫治疗等;临床资料保存完整。排除标准:有HPV疫苗接种史;合并心、肝、肺等重要脏器疾病;患其他恶性肿瘤;既往有子宫手术史。同时选取接受子宫全切除术且术后病理证实宫颈组织正常的患者50例作为对照组。本研究获得我院医学伦理委员会批准[k(2020)201]。所有患者知情同意。

### 1.2 研究方法

取CIN患者的宫颈组织,用EDTA抗原进行微波修复后,置于3%过氧化氢甲醇溶液中孵育;10%正常山羊血清封闭;加入一抗鼠抗人P16<sup>INK4a</sup>单抗(美

国Santa Cruz公司),4℃孵育12 h后滴加增强剂,37℃下孵育20 min;滴加二抗(南京凯基生物科技有限公司),37℃孵育30 min;DAB显色;光学显微镜下观察。使用阳性组织切片作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。根据P16<sup>INK4a</sup>在细胞中的反应强度判断表达情况:强阳性(+++),细胞弥漫黄褐色着色;阳性(++),较弥漫或大片状棕黄色着色;弱阳性(+),小片状或灶性反应;阴性(-),组织细胞无着色。计算阳性表达率,阳性表达率(%)=非阴性患者数/该组患者总数×100。

观察各组P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率和HPV感染率,比较CIN各组有和无HPV感染患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率,以及不同临床特征CIN患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率、HPV感染率差异。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0软件行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析比较组间差异;计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确概率法比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组一般资料比较

各组患者一般资料比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。见表1。

### 2.2 各组P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率比较

表1 各组患者临床一般资料比较

Tab.1 Comparison of general clinical data of patients in each group

Group	<i>n</i>	Age (year)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
CIN 1	62	48.28 ± 9.71	22.34 ± 2.04
CIN 2	89	47.45 ± 9.00	22.12 ± 1.92
CIN 3	46	49.21 ± 8.85	21.95 ± 2.11
Control	50	48.50 ± 9.11	22.05 ± 2.00
<i>F</i>		0.403	0.378
<i>P</i>		0.751	0.769

BMI, body mass index.

对照组P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率和HPV感染率明显低于CIN组患者( $P < 0.05$ );CIN2与CIN3患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率明显高于CIN1患者( $P < 0.05$ );CIN3患者HPV感染率高于CIN1与CIN2患者( $P < 0.05$ );CIN1与CIN2患者HPV感染率比较差异无统计学意义( $P >$

0.05)。见表2。

### 2.3 CIN患者HPV感染与P16<sup>INK4a</sup>阳性表达的关系

有HPV感染的CIN患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率为93.33% (84/90),明显高于无HPV感染的CIN患者[54.21% (58/107)],差异有统计学意义( $\chi^2=37.189$ ,

$P < 0.05$ ); CIN1、CIN2、CIN3伴HPV感染患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率均明显高于不伴HPV感染患者( $P < 0.05$ ); CIN1、CIN2、CIN3伴HPV感染患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表3。

#### 2.4 不同亚型HPV感染患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率比较

Fisher精确概率法分析结果显示,HPV16/18感

染患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率(50/50, 100%)明显高于HPV31/33/53(34/40, 85%)感染患者,差异有统计学意义( $P = 0.006$ )。

#### 2.5 不同临床特征CIN患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率、HPV感染率比较

不同年龄、体重指数、是否绝经及高血压、糖尿病、吸烟、饮酒CIN患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率、HPV感染率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表4。

表2 各组P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率及HPV感染率比较 [n(%)]

Tab.2 Comparison of P16<sup>INK4a</sup> positive expression rate and HPV infection rate among the groups [n(%)]

Group	n	P16 <sup>INK4a</sup> positive expression rate	HPV infection rate
CIN1	62	28 (45.16) <sup>1)</sup>	21 (33.87) <sup>1)</sup>
CIN2	89	72 (80.90) <sup>1),2)</sup>	40 (44.94) <sup>1)</sup>
CIN3	46	42 (91.30) <sup>1),2)</sup>	29 (63.04) <sup>1),2),3)</sup>
Control	50	5 (10.00)	0 (0)
$\chi^2$		92.362	45.842
P		<0.001	0.001

1)  $P < 0.05$  vs. control group; 2)  $P < 0.05$  vs. CIN1 group; 3)  $P < 0.05$  vs. CIN2 group.

表3 CIN患者中HPV感染与P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率关系

Tab.3 Relationship between HPV infection and P16<sup>INK4a</sup> positive expression rate in CIN patients

Group	HPV infection	n	P16 <sup>INK4a</sup> positive expression rate [n (%)]	$\chi^2$	P
CIN1 (n = 62)				8.847	0.003
	Yes	21	15 (71.43)		
	No	41	13 (31.71)		
CIN2 (n = 89)				17.154	<0.001
	Yes	40	40 (100.00)		
	No	49	32 (65.31)		
CIN3 (n = 46)				4.804	0.028
	Yes	29	29 (100.00)		
	No	17	13 (76.47)		

### 3 讨论

宫颈上皮HPV感染可引起CIN,甚至发展为宫颈癌<sup>[11]</sup>。HPV感染与CIN的具体发病机制目前尚未完全明确。HPV是一种DNA病毒,某些高危亚型HPV感染后,可进入宫颈上皮细胞,并将自身DNA整合至宿主细胞DNA中,从而在细胞内进行病毒复制。HPV DNA的整合会导致宫颈上皮细胞中基因突变,从而破坏细胞正常的调控机制,致使细胞发

生不受控制的分裂和增殖<sup>[12-13]</sup>。此外,HPV感染还可引起宫颈上皮细胞转化,失去正常细胞特征,发生CIN。若不及时干预,可能发展为宫颈癌<sup>[14]</sup>。为进一步探究HPV感染患者CIN进展的相关机制,本研究对比了不同CIN分级患者P16<sup>INK4a</sup>表达及HPV感染情况,分析P16<sup>INK4a</sup>与HPV感染以及CIN进展之间的关联,以期为预防和治疗宫颈癌提供科学依据。

P16<sup>INK4a</sup>是一种抑制细胞增殖的蛋白,其主要功能是调控细胞周期,通过抑制细胞周期依赖性激

酶的活性,诱导细胞从G<sub>1</sub>期进入S期停滞,从而控制细胞的增殖<sup>[15-16]</sup>。而在CIN中,由于宫颈上皮受到损害,细胞可能过度表达P16<sup>INK4a</sup>作为一种自我保护反应,以抑制异常细胞生长。CIN分级越高,宫颈上皮受损程度越重,细胞周期可能受到的扰乱也越严重,负反馈导致P16<sup>INK4a</sup>过度表达,以抑制异常细胞

增殖。

本研究结果显示,对照组P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率明显低于CIN1、CIN2和CIN3患者;CIN2和CIN3患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率明显高于CIN1患者。说明CIN患者P16<sup>INK4a</sup>表达率升高,且与病变程度相关。这与戈文舜等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。

表4 不同临床特征CIN患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率及HPV感染率比较

Tab.4 Comparison of P16<sup>INK4a</sup> positive expression rate and HPV infection rate in CIN patients with different clinical characteristics

Characteristics	n	P16 <sup>INK4a</sup> positive expression rate [n (%)]	χ <sup>2</sup>	P	HPV infection rate [n (%)]	χ <sup>2</sup>	P
Age			0.472	0.492		0.921	0.337
<50 years	89	62 (69.66)			44 (49.44)		
≥50 years	108	80 (74.07)			46 (42.59)		
BMI			0.181	0.671		0.045	0.832
<24 kg/m <sup>2</sup>	121	88 (72.73)			56 (46.28)		
≥24 kg/m <sup>2</sup>	76	54 (71.05)			34 (44.74)		
Menopause			0.827	0.363		0.098	0.754
Yes	114	85 (74.56)			51 (44.74)		
No	83	57 (68.67)			39 (46.99)		
Hypertension			0.056	0.813		0.166	0.683
Yes	62	44 (70.97)			27 (43.55)		
No	135	98 (72.59)			63 (46.67)		
Diabetes			0.269	0.604		0.127	0.721
Yes	48	36 (75.00)			23 (47.92)		
No	149	106 (71.14)			67 (44.97)		
Smoking status			1.379	0.240		0.052	0.819
Former or current	51	40 (78.43)			24 (47.06)		
Never	146	102 (69.86)			66 (45.21)		
Alcohol consumption			0.079	0.778		0.172	0.678
Former or current	42	31 (73.81)			18 (42.86)		
Never	155	111 (71.61)			72 (46.45)		

RB蛋白是肿瘤抑制蛋白,在细胞周期调控中起着关键作用<sup>[18]</sup>。当RB蛋白处于活跃状态时,可结合并抑制E2F转录因子,阻止E2F引导细胞进入S期,从而控制细胞的增殖<sup>[19]</sup>。HPV病毒中具有编码HPVE7蛋白的基因,HPVE7蛋白的一个重要功能是与RB蛋白相互作用并使其失活。这种作用导致RB蛋白的解离,使E2F转录因子释放,允许细胞进入S期并进行DNA复制<sup>[20]</sup>。这是HPVE7蛋白在HPV阳性宫颈癌发展中的关键作用之一。HPVE7蛋白表达导致RB蛋白失活后,细胞为了对抗异常细胞增殖和癌症发展,通常会过度表达P16<sup>INK4a</sup>,以应对RB蛋白

失活导致的细胞异常增殖。因此,合并HPV感染会进一步促进P16<sup>INK4a</sup>的表达。本研究结果显示,有HPV感染的CIN患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率明显高于无HPV感染的CIN患者;CIN1、CIN2和CIN3伴HPV感染患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率明显高于不伴HPV感染患者。说明P16<sup>INK4a</sup>表达与HPV感染有显著关系。

本研究还发现,HPV16/18感染患者P16<sup>INK4a</sup>阳性表达率明显高于HPV31/33/53感染患者。兰晓卉等<sup>[21]</sup>的研究表明P16<sup>INK4a</sup>免疫细胞化学染色在不同HPV亚型中的表达率不同,且对HPV阳性患者具有较好的分流效能。宋艳等<sup>[22]</sup>的研究也表明P16<sup>INK4a</sup>蛋白

在不同HPV亚型表达存在差异,在HPV16中表达显著升高。本研究结果中,P16<sup>INK4a</sup>在不同的HPV亚型中表达不同,可能与不同类型HPV感染导致RB磷酸化的方式不同有关,其具体机制仍需进一步研究证实。

HPV是一种常见的性传播病毒,性传播是其最主要的感染途径,且大部分CIN患者均可检测出HPV阳性。本研究结果显示,不同年龄、体重指数以及是否绝经、高血压、糖尿病、吸烟及饮酒对CIN患者HPV感染率无显著影响。但是,HPV感染导致CIN的发生是一个长期慢性的过程,本研究未充分考虑患者的HPV感染时间,可能对研究结果有一定影响。

综上所述,本研究发现,CIN患者P16<sup>INK4a</sup>表达率明显升高,且与病变程度相关,同时,P16<sup>INK4a</sup>表达与HPV感染有显著关系。

#### 参考文献:

- [1] 苏有博,魏恒. 宫颈癌治疗前后人乳头状瘤病毒感染的变化和临床特征及其与预后的关系 [J]. 中国医科大学学报, 2022, 51 (4): 344-347. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2022.04.010.
- [2] OKUNADE KS. Human papillomavirus and cervical cancer [J]. J Obstet Gynaecol, 2020, 40 (5): 602-608. DOI: 10.1080/01443615.2019.1634030.
- [3] BUSKWOFFIE A, DAVID-WEST G, CLARE CA. A review of cervical cancer: incidence and disparities [J]. J Natl Med Assoc, 2020, 112 (2): 229-232. DOI: 10.1016/j.jnma.2020.03.002.
- [4] PIMPLE SA, MISHRA GA. Global strategies for cervical cancer prevention and screening [J]. Minerva Ginecol, 2019, 71 (4): 313-320. DOI: 10.23736/S0026-4784.19.04397-1.
- [5] ARBYN M, WEIDERPASS E, BRUNI L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis [J]. Lancet Glob Health, 2020, 8 (2): e191-e203. DOI: 10.1016/S2214-109X (19) 30482-6.
- [6] KYRGIU M, MOSCICKI AB. Vaginal microbiome and cervical cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86 (Pt 3): 189-198. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.03.005.
- [7] ZHANG JY, CHENG KY, WANG ZL. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia in China: a meta-analysis [J]. Arch Gynecol Obstet, 2020, 302 (6): 1329-1337. DOI: 10.1007/s00404-020-05787-w.
- [8] SERRA S, CHETTY R. p16 [J]. J Clin Pathol, 2018, 71 (10): 853-858. DOI: 10.1136/jclinpath-2018-205216.
- [9] SAFWAN-ZAITER H, WAGNER N, WAGNER KD. P16INK4A-more than a senescence marker [J]. Life, 2022, 12 (9): 1332. DOI: 10.3390/life12091332.
- [10] VAN ZUMMEREN M, LEEMAN A, KREMER WW, et al. Three-tiered score for Ki-67 and p16ink4a improves accuracy and reproducibility of grading CIN lesions [J]. J Clin Pathol, 2018, 71 (11): 981-988. DOI: 10.1136/jclinpath-2018-205271.
- [11] MA XW, YANG M. The correlation between high-risk HPV infection and precancerous lesions and cervical cancer [J]. Am J Transl Res, 2021, 13 (9): 10830-10836.
- [12] CURTY G, DE CARVALHO PS, SOARES MA. The role of the cervicovaginal microbiome on the genesis and as a biomarker of premalignant cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 21 (1): 222. DOI: 10.3390/ijms21010222.
- [13] WEI W, XIE LZ, XIA Q, et al. The role of vaginal microecology in the cervical cancer [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2022, 48 (9): 2237-2254. DOI: 10.1111/jog.15359.
- [14] KHARAIEVA Z, TRAKHTMAN P, TRAKHTMAN I, et al. Fermented mangosteen (*Garcinia mangostana L.*) supplementation in the prevention of HPV-induced cervical cancer: from mechanisms to clinical outcomes [J]. Cancers, 2022, 14 (19): 4707. DOI: 10.3390/cancers14194707.
- [15] AFTAB A, SHAHZAD S, HUSSAIN HMJ, et al. CDKN2A/P16INK4A variants association with breast cancer and their in-silico analysis [J]. Breast Cancer, 2019, 26 (1): 11-28. DOI: 10.1007/s12282-018-0894-0.
- [16] CHEN YY, LI ZY, FANG QY, et al. CDKN2A (p16INK4A) affects the anti-tumor effect of CDK inhibitor in somatotroph adenomas [J]. Int J Mol Med, 2021, 47 (2): 500-510. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4807.
- [17] 戈文舜,任丽芳,李美平,等. p16INK4a和ki67在宫颈CIN I~II中差异性表达的意义 [J]. 中国妇幼健康研究, 2018, 29 (1): 52-55. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5293.2018.01.013.
- [18] 郑乐. 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子3在宫颈癌中表达及临床意义 [J]. 临床军医杂志, 2021, 49 (3): 264-266. DOI: 10.16680/j.1671-3826.2021.03.07.
- [19] SHAMIR ER, DEVINE WP, PEKMEZCI M, et al. Identification of high-risk human papillomavirus and Rb/E2F pathway genomic alterations in mutually exclusive subsets of colorectal neuroendocrine carcinoma [J]. Mod Pathol, 2019, 32 (2): 290-305. DOI: 10.1038/s41379-018-0131-6.
- [20] 黄紫宇. FOXF2调控RB/E2F1信号通路抑制宫颈癌进展的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2021.
- [21] 兰晓卉,杨琦,邹颖刚,等. p16INK4a免疫细胞化学染色对不同基因型HPV感染者的分流价值 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47 (2): 421-429. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20210223.
- [22] 宋艳. 宫颈病变中p16INK4a蛋白与HPV病毒的关系及其与L1壳蛋白的联合表达意义 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.

(编辑 王又冬)