

本文引用:田明振,崔静,李航,等. 宫颈鳞状细胞癌组织中锌指蛋白 84 和人乳头瘤病毒 16 E6 的表达及关系 [J]. 新乡医学院学报,2015,32(8):710-712,717.

【基础研究】

# 宫颈鳞状细胞癌组织中锌指蛋白 84 和人乳头瘤病毒 16 E6 的表达及关系

田明振<sup>1,2</sup>, 崔 静<sup>1</sup>, 李 航<sup>1</sup>, 冯思佳<sup>1</sup>, 杨 璐<sup>1</sup>, 赵二趁<sup>1</sup>, 千新来<sup>1</sup>, 原志庆<sup>1</sup>

(1. 新乡医学院基础医学院病理学教研室,河南 新乡 453003;2. 开封市回民医院消化内科,河南 开封 475000)

**摘要:** **目的** 探讨锌指蛋白 84(ZNF84)在人乳头瘤病毒 16(HPV16)E6 阳性和阴性宫颈癌细胞和鳞状细胞癌组织中的表达及关系。**方法** 以 HPV16 E6 阳性和阴性的宫颈癌细胞系及宫颈鳞状细胞癌组织(211 例)为研究对象,分别采用 Western blotting 和免疫组织化学(IHC)方法检测 HPV16 E6 和 ZNF84 的表达,并分析二者之间的关系。**结果** Western blotting 结果显示:C33-A 细胞不表达 HPV16 E6,SiHa 细胞表达 HPV16 E6;C33-A 细胞中 ZNF84 的表达显著低于 SiHa 细胞( $P < 0.01$ )。IHC 结果显示:HPV16 E6 表达阳性的宫颈鳞状细胞癌组织中 ZNF84 的阳性表达率显著高于 HPV16 E6 表达阴性的宫颈鳞状细胞癌组织( $P < 0.01$ ),HPV16 E6 和 ZNF84 在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达呈正相关( $P < 0.01$ )。**结论** ZNF84 表达上调可能参与了 HPV16 E6 诱导宫颈癌发生发展的过程,ZNF84 可能在 HPV16 相关宫颈癌发生过程中有一定作用。

**关键词:** 宫颈鳞状细胞癌;人乳头瘤病毒;锌指蛋白 84

**中图分类号:** R73-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2015)08-0710-04

## Relationship between the expression of zinc finger protein 84 and human papillomavirus 16 E6 in cervical squamous cell carcinoma

TIAN Ming-zhen<sup>1,2</sup>, CUI Jing<sup>1</sup>, LI Hang<sup>1</sup>, FENG Si-jia<sup>1</sup>, YANG Lu<sup>1</sup>, ZHAO Er-chen<sup>1</sup>, QIAN Xin-lai<sup>1</sup>, YUAN Zhi-qing<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Digestive System Diseases, Kaifeng Hui People's Hospital, Kaifeng 475000, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the relationship between the expression of zinc finger protein 84(ZNF84) and human papillomavirus 16(HPV16) E6-positive or negative cervical carcinoma cell lines and squamous cell carcinoma tissues. **Methods** The HPV16 E6-positive or negative cervical cancer cell lines and cervical squamous cell carcinoma tissues(211 cases) were selected as the research subjects. The expression of HPV16 E6 and ZNF84 was detected by Western blotting and immunohistochemistry(IHC). Then the relationship between the expressions of HPV16 E6 and ZNF84 was analyzed. **Results** The results of Western blotting showed that HPV16 E6 was expressed in SiHa cells, but not in C33-A cells; the expression of ZNF84 in C33-A cells was significantly lower than that in SiHa cells( $P < 0.01$ ). The results of IHC showed that the positive rate of ZNF84 in HPV16 E6-positive cervical squamous cell carcinoma tissues was significantly higher than that in HPV16 E6-negative cervical squamous carcinoma tissues( $P < 0.01$ ); the expression of ZNF84 in cervical squamous cell carcinoma tissues was positively correlated with HPV16 E6( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The increasing expression of ZNF84 may be involved in the occurrence and development of cervical squamous cell carcinoma induced by HPV16 E6. ZNF84 can play a certain role in the development of HPV16-related cervical cancer.

**Key words:** cervical squamous cell carcinoma; human papillomavirus; zinc finger protein 84

DOI:10.7683/xyxyxb.2015.08.005

收稿日期:2015-04-29

**基金项目:**河南省科技攻关项目(编号:112102310213);河南省教育厅自然科学基金项目(编号:2010A310007);河南高校科技创新团队支持项目(编号:2012IRTSTHN015);河南省基础与前沿技术研究计划项目(编号:122300410121);河南省科技创新杰出青年基金项目(编号:094100510007);新乡医学院重点学科开放课题(编号:ZD200955)

**作者简介:**田明振(1975-),男,河南兰考人,学士,硕士研究生在读,主治医师,研究方向:肿瘤病理。

**通信作者:**原志庆(1957-),男,河南滑县人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤病理;E-mail:yuanzhiqing@xxmu.edu.cn。

高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的早期基因 E6 持续表达是宫颈癌重要的致病因素之一<sup>[1]</sup>。锌指蛋白 84(zinc finger protein 84, ZNF84)属于锌指蛋白家族成员,位于人类 12 号染色体 q24-q33 区,ZNF84 具有转录抑制因子的特征和遗传性突变位点,其突变与肿瘤的发生存在密切关系。因此,深入研究 E6 与 ZNF84 的关系,对探索 HPV16 相关肿瘤新的治疗方法具有重要意义。但

HPV16 E6 与 ZNF84 的关系及调控机制尚不清楚。本研究拟以 HPV16 E6 表达阳性和阴性的宫颈癌细胞系、宫颈鳞状细胞癌组织为研究对象,采用 Western blotting 和免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 方法从细胞和组织水平分析 HPV16 E6 和 ZNF84 的表达及关系,试图阐明 ZNF84 在 HPV16 相关宫颈癌发生中的作用,为研究 ZNF84 与 HPV16 E6 之间的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞 HPV16 E6 表达阳性的宫颈癌 SiHa 细胞和表达阴性的宫颈癌 C33-A 细胞购自中科院上海细胞库。培养于含体积分数 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 kU · L<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg · L<sup>-1</sup> 链霉素的高糖达尔伯克氏改良的伊格尔培养基 (Dulbeccos modified Eagle medium, DMEM), 于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中常规培养。

1.2 宫颈鳞状细胞癌组织标本来源 收集新乡医学院第三附属医院和新乡市第一人民医院保存的 HPV16 宫颈鳞状细胞癌组织标本 211 例, 每例标本常规制备石蜡切片 (厚度约 3 μm)。

1.3 试剂和仪器 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 为美国 Promega 公司产品, DMEM 培养基、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulphate, SDS)、二硫苏糖醇 (DL-Dithiothreitol, DTT) 为美国 Invitrogen 公司产品, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、山羊抗 HPV16 E6 多克隆抗体、辣根酶标记的兔抗鼠二抗、辣根酶标记的兔抗山羊二抗、辣根酶标记的山羊抗兔二抗和增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒均为美国 Santa Cruz 公司产品, 兔抗人 ZNF84 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 试剂盒购自北京中杉金桥生物科技有限公司, 核酸蛋白测定仪 (BioPhotometer Plus) 购自德国 eppendorf 公司, 半干转膜仪 (TE-70) 购自美国 Amersham Biosciences 公司。

1.4 Western blotting 方法检测宫颈癌细胞中 HPV16 E6 和 ZNF84 的表达 提取细胞总蛋白并定量, 蛋白变性处理方法为将 1/5 蛋白体积的 DTT 和 4/5 蛋白体积的 2 × SDS 上样缓冲液与蛋白样品充分混匀后放入沸水中煮 5 min, -20 ℃ 保存备用。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转膜后进行 Western blotting 检测 E6 和 ZNF84 的表达。以 β-actin 为内参照, 蛋白上样量均为 100 μg, 鼠抗人 β-actin 单克

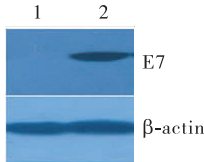
隆抗体稀释倍数为 1 : 1 000, 山羊抗 HPV16 E6 多克隆抗体稀释倍数为 1 : 200, 兔抗人 ZNF84 多克隆抗体稀释倍数为 1 : 300, 辣根酶标记的兔抗鼠二抗、辣根酶标记的兔抗山羊二抗和辣根酶标记的山羊抗兔二抗稀释倍数均为 1 : 5 000。通过 Bandscan 5.0 软件分析 Western blotting 目的条带与内参照条带的灰度比值。实验重复 3 次。

1.5 IHC 方法检测宫颈鳞状细胞癌组织中 HPV16 E6 及 ZNF84 的表达 二甲苯脱蜡、乙醇水化后, 在枸橼酸盐抗原修复液中进行微波修复; 体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液室温孵育 20 min, 正常山羊血清室温孵育 20 min; 加稀释好的一抗工作液 (HPV16 E6 和 ZNF84 稀释倍数均为 1 : 75, 以磷酸盐缓冲溶液代替一抗作为阴性对照); 加通用型 IgG 抗体-辣根过氧化物酶多聚体, 室温孵育 1 h; 显色、复染、脱水、透明, 中性树胶封片, 镜检。E6 和 ZNF84 均主要定位于细胞核, 阳性部位呈棕黄色, 随机选取 5 个高倍镜视野, 观察阳性细胞数占同类细胞总数的百分比和阳性细胞着色程度<sup>[2]</sup>。阳性细胞数占同类细胞数的百分比计分: < 25% 计 1 分, 25% ~ 75% 计 2 分, > 75% 计 3 分; 阳性细胞着色程度计分: 无显色计 0 分, 浅黄色计 1 分, 棕黄色计 2 分, 棕褐色计 3 分。以 2 种计分结果相乘, 判断 IHC 结果, ≤ 1 分为阴性, ≥ 2 分为阳性。

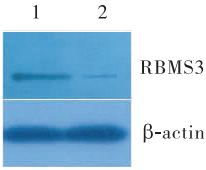
1.6 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两两比较采用 *t* 检验, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验, 检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 宫颈癌细胞中 HPV16 E6 和 ZNF84 的表达 Western blotting 结果见图 1 和图 2。C33-A 细胞不表达 HPV16 E6, 而 SiHa 细胞中 HPV16 E6 阳性表达。C33-A 细胞和 SiHa 细胞中均表达 ZNF84 (C33-A 细胞: 0.102 ± 0.011, SiHa 细胞: 0.345 ± 0.013), 但 C33-A 细胞中 ZNF84 的表达显著低于 SiHa 细胞 (*t* = 24.730, *P* < 0.01)。



1: SiHa 细胞; 2: C33-A 细胞。  
图 1 宫颈癌细胞中 HPV16 E6 的表达  
Fig. 1 Expression of HPV16 E6 in cervical carcinoma cells

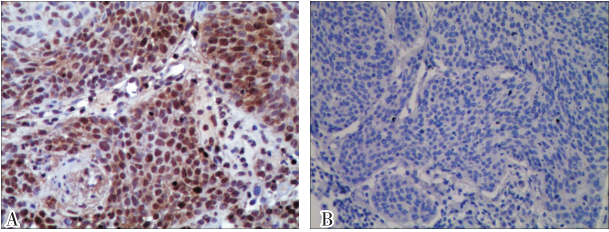


1:SiHa 细胞;2:C33-A 细胞。

图 2 宫颈癌细胞中 ZNF84 的表达

Fig.2 Expression of ZNF84 in cervical carcinoma cells

2.2 宫颈鳞状细胞癌组织中 HPV16 E6 的表达及分组 IHC 染色结果见图 3。HPV16 E6 阳性部位定位于细胞核,呈棕黄色。211 例鳞状细胞癌组织中 HPV16 E6 表达阳性 139 例,HPV16 E6 表达阴性 72 例。

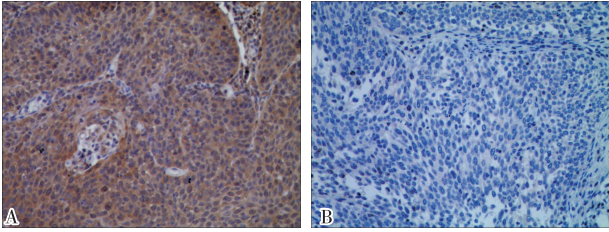


A:HPV16 E6 表达阳性;B:HPV16 E6 表达阴性。

图 3 宫颈鳞状细胞癌组织中 HPV16 E6 的表达(IHC, ×200)

Fig.3 Expression of HPV16 E6 in cervical squamous cell carcinoma tissues(IHC, ×200)

2.3 宫颈鳞状细胞癌组织中 ZNF84 的表达 IHC 染色结果见图 4。139 例 HPV16 E6 表达阳性的鳞状细胞癌组织中 ZNF84 表达阳性 105 例(75.5%), 阴性 34 例(24.5%);72 例 HPV16 E6 表达阴性的鳞状细胞癌组织中 ZNF84 表达阳性 18 例(25.0%), 阴性 54 例(75.0%);HPV16 E6 表达阳性的宫颈鳞状细胞癌组织中 ZNF84 的阳性表达率显著高于 HPV16 E6 表达阴性的宫颈鳞状细胞癌组织( $\chi^2 = 49.832, P < 0.01$ ), HPV16 E6 和 ZNF84 在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达呈正相关( $r = 0.486, P < 0.01$ )。



A:ZNF84 表达阳性;B:ZNF84 表达阴性。

图 4 宫颈鳞状细胞癌组织中 ZNF84 的表达(IHC, ×200)

Fig.4 Expression of ZNF84 in cervical squamous cell carcinoma tissues(IHC, ×200)

3 讨论

研究显示,高危型 HPV 感染宿主细胞后,其基因组 DNA 中的 2 个早期基因(E6 基因和 E7 基因)常整合入宿主细胞基因组 DNA 中,并能够持续表达(分别编码 E6 蛋白和 E7 蛋白)。E6 蛋白可引起 p53 蛋白通过泛素依赖途径降解,基本机制是:E6 蛋白首先与 E6 相关蛋白(E6 associated protein, E6AP)结合形成 E6-E6AP 复合物,该复合物再与 p53 蛋白结合形成 E6-E6AP-p53 复合物,引起 p53 蛋白降解;并在随后发生的一系列遗传事件的推动下导致细胞恶性转化<sup>[3-5]</sup>。本课题组前期研究发现沉默 E6 表达后,ZNF84 基因表达下调。因此,深入研究 E6 与 ZNF84 的关系,对探索 HPV16 相关肿瘤新的治疗方法具有重要意义。

ZNF84 属于锌指蛋白家族成员,位于人类 12 号染色体 q24-q33 区,ZNF84 具有转录抑制因子的特征和遗传性突变位点,其突变与肿瘤的发生存在密切关系<sup>[6]</sup>。研究显示,在人类胚胎干细胞和卵母细胞中 ZNF84 呈高水平表达<sup>[7]</sup>。ZNF84 可以激活 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(Janus kinase 2, JAK2)-信号转导和转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路(JAK2-STAT3 信号通路),磷酸化的 STAT3 能反式激活 c-Jun,诱导 cyclinD1 表达增加,促进细胞增殖<sup>[8]</sup>;ZNF84 还可通过与肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体相互作用,抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>;另外,ZNF84 高表达可诱导肿瘤细胞侵袭能力增强<sup>[10]</sup>。

本研究通过 Western blotting 方法检测 ZNF84 在宫颈癌 SiHa 细胞(HPV16 E6 表达阳性)和宫颈癌 C33-A 细胞(HPV16 E6 表达阴性)中表达的结果显示,ZNF84 在 HPV16 E7 表达阴性的 C33-A 细胞和 HPV16 E7 表达阳性的 SiHa 细胞中均呈阳性表达,但 C33-A 细胞中 ZNF84 的表达显著低于 SiHa 细胞。本研究通过 IHC 染色方法检测并分析 ZNF84 在 HPV16 E6 表达阳性和阴性的宫颈鳞状细胞癌组织中表达结果显示,HPV16 E6 表达阳性的宫颈鳞状细胞癌组织中 ZNF84 的阳性表达率显著高于 HPV16 E6 表达阴性的宫颈鳞状细胞癌组织, HPV16 E6 和 ZNF84 在宫颈鳞状细胞癌组织中表达呈正相关;提示 ZNF84 表达上调可能参与了 HPV16 E6 诱导宫颈癌发生发展的过程,即 ZNF84 可能在 HPV16 相关宫颈癌发生过程中有一定作用,但关于 E6 与 ZNF84 之间的具体相互作用机制还有待进一步研究。

低,海马组织超微结构损伤。而且持续光照可致大鼠海马 A $\beta$  含量增多,诱导大鼠海马组织 tau 蛋白 Ser396/404 和 Ser199/202 位点过度磷酸化,异常磷酸化的 tau 蛋白主要分布在海马的 CA3 区。因此,持续光照这种非创伤的方法可以通过模拟 AD 患者睡眠功能紊乱,成功复制 AD 样动物模型,是较理想的阿尔茨海默病模型,适用于 AD 发病机制及药物疗效评价的研究。

**参考文献:**

[1] 陈娟,周琼. 朊蛋白在阿尔茨海默病视网膜退行性病变中的作用研究进展[J]. 眼科新进展,2015,35(1):81-83,97.

[2] 周琼,刘章,陈娟. 细胞型朊蛋白在不同月龄小鼠视网膜中表达的实验研究[J]. 眼科新进展,2015,35(2):108-110,115.

[3] 徐志强,齐鹏,杨晓庆,等. 干细胞在中枢神经系统疾病治疗中的应用[J]. 新乡医学院学报,2013,30(1):71-74.

[4] 于天莲,赵小贞. 阿尔茨海默病动物模型研究概况[J]. 医学综述,2009,16(18):2726-2729.

[5] 王德生,张守信. 老年性痴呆[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:60-77.

[6] Palma J A,Urrestarazu E,Iriarte J. Sleep loss as risk factor for neurologic disorders:a review[J]. *Sleep Med*,2013,14(3):229-236.

[7] Duncan M J,Smith J T,Franklin K M,*et al.* Effects of aging and genotype on circadian rhythms,sleep,and clock gene expression in APPxPS1 knock-in mice,a model for Alzheimer's disease[J]. *Exp Neurol*,2012,236(2):249-258.

[8] 谢宁,送琳莉,牛英才,等. 老年性痴呆动物模型研究进展及评

价[J]. *实验动物与比较医学*,2006,26(1):50-53.

[9] 曾芳,余曙光,唐勇,等. 老年性痴呆复合动物模型研究概况[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*,2007,14(4):197-200.

[10] Ownby R L,Peruyera G,Acevedo A,*et al.* Subtypes of sleep problems in patients with Alzheimer disease[J]. *Am J Geriatr Psychiatry*,2014,22(2):148-156.

[11] Shin H Y,Han H J,Shin D J,*et al.* Sleep problems associated with behavioral and psychological symptoms as well as cognitive functions in Alzheimer's disease[J]. *J Clin Neurol*,2014,10(3):203-209.

[12] Schaffer S,Asseburg H,Kuntz S,*et al.* Effects of polyphenols on brain ageing and Alzheimer's disease:focus on mitochondria[J]. *Mol Neurobiol*,2012,46(1):161-178.

[13] Cavallucci V,Ferraina C,D'Amelio M. Key role of mitochondria in Alzheimer's disease synaptic dysfunction[J]. *Curr Pharm Des*,2013,19(36):6440-6450.

[14] Manczak M,Sheiko T,Craig W J,*et al.* Reduced VDAC1 protects against Alzheimer's disease,mitochondria,and synaptic deficiencies[J]. *J Alzheimers Dis*,2013,37(4):670-690.

[15] León-Espinosa G,DeFelipe J,Muñoz A. Effects of amyloid- $\beta$  plaque proximity on the axon initial segment of pyramidal cells[J]. *J Alzheimers Dis*,2012,29(4):841-852.

[16] Licastro F,Chiappelli M,Thal L J,*et al.* alpha-1-Antichymotrypsin polymorphism in the gene promoter region affects survival and synapsis loss in Alzheimer's disease[J]. *Arch Gerontol Geriatr Suppl*,2004(9):243-251.

( 本文编辑:李胜利 英文编辑:孟 月 )

( 上接第 712 页 )

**参考文献:**

[1] 郭真真,马鹏,郭学瑾,等. HPV16 E6 和 E7 对乳腺癌 MCF-7 细胞中基质金属蛋白酶-9 蛋白表达的影响[J]. 新乡医学院学报,2011,28(5):586-589.

[2] 张霞,千新来,崔静,等. 乳腺良、恶性病变组织中 Livin 和 Smac 的表达[J]. 郑州大学学报:医学版,2009,44(4):735-738.

[3] Zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*,1994,186:131-156.

[4] Tan S,Hougardy B M,Meersma G J,*et al.* Human papilloma virus 16 E6 RNA interference enhances cisplatin and death receptor-mediated apoptosis in human cervical carcinoma cells[J]. *Mol Pharmacol*,2012,81(5):701-709.

[5] 尹宝靓,潘莹. 人乳头瘤病毒感染与宫颈癌[J]. 新乡医学院学报,2014,31(12):1055-1056,1060.

[6] Rosati M,Rocchi M,Storlazzi C T,*et al.* Assignment to chromosome 12q24. 33, gene organization and splicing of the human

KRAB/FPB containing zinc finger gene ZNF84[J]. *Cytogenet Cell Genet*,2001,94(3/4):127-130.

[7] Assou S,Cerecedo D,Tondeur S,*et al.* A gene expression signature shared by human mature oocytes and embryonic stem cells[J]. *BMC Genomics*,2009,10:10.

[8] Lakshmanan I,Ponnusamy M P,Das S,*et al.* MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells[J]. *Oncogene*,2012,31(7):805-817.

[9] Matte I,Lane D,Boivin M,*et al.* MUC16 mucin(CA125) attenuates TRAIL-induced apoptosis by decreasing TRAIL receptor R2 expression and increasing c-FLIP expression[J]. *BMC Cancer*,2014,14:234.

[10] Shimizu A,Hirono S,Tani M,*et al.* Coexpression of MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Sci*,2012,103(4):739-746.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超 )