

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.09.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.09.001>

· 论著 ·

## 长链非编码 RNA H19, EZH2, Ki-67 及突变型 P53 联合检测 在子宫颈癌诊断中的意义

辜卫红<sup>1</sup>, 余敏敏<sup>2</sup>, 袁智民<sup>1</sup>, 吴玲<sup>1</sup>, 邱峰龙<sup>1</sup>, 项媛媛<sup>1</sup>, 方芳<sup>1</sup>, 杨慧<sup>1</sup>

(1. 淮安市妇幼保健院妇产科, 江苏 淮安 223002; 2. 南京市第二医院妇产科, 南京 210003)

**[摘要]** 目的: 研究长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA) H19, EZH2, Ki-67, 突变型P53联合检测在子宫颈癌诊断中的意义。方法: 取子宫颈活检或手术组织标本进行病检, 其中50例子宫颈癌为研究组, 50例非瘤子宫颈为对照组。采用qRT-PCR检测lncRNA H19在各组组织中的表达量。利用免疫组织化学SP法检测以上2组宫颈组织石蜡标本中EZH2, Ki-67, 突变型P53的表达。应用SPSS 13.0软件包统计分析各组H19, EZH2, Ki-67及突变型P53的表达与子宫颈癌临床和病理诊断结果的相关性。结果: 研究组H19的表达量低于对照组( $P < 0.05$ ); 研究组EZH2, Ki-67, 突变型P53阳性表达量高于对照组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 临床工作中联合检测H19, EZH2, Ki-67, 突变型P53更有利于子宫颈癌的诊断。

**[关键词]** 子宫颈癌; 长链非编码RNA H19; EZH2; 核增殖抗原Ki-67; 突变型P53

## Expression and significance of long non-coding RNA H19, EZH2, Ki-67, and mutant P53 in cervical cancer

GU Weihong<sup>1</sup>, YU Minmin<sup>2</sup>, YUAN Zhimin<sup>1</sup>, WU Ling<sup>1</sup>, QIU Fenglong<sup>1</sup>, XIANG Yuanyuan<sup>1</sup>, FANG Fang<sup>1</sup>, YANG Hui<sup>1</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Huaian Maternal and Child Health Care Hospital, Huaian Jiangsu 223002;  
2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Nanjing 210003, China)

**Abstract** **Objective:** To assess the expression and clinical significance of long non-coding RNA (lncRNA) H19, EZH2, Ki-67, and mutant P53 in cervical cancer. **Methods:** Cervical biopsy or surgical tissue specimens were divided into 2 groups according to pathological diagnosis: 50 cases of cervical cancer were regarded as an experiment group and 50 cases of non-cancerous cervical were a control group. qRT-PCR was used to evaluate the expression levels of lncRNA H19. Immunohistochemistry (SP method) was used to evaluate the expression levels of EZH2, Ki-67 and mutant P53 in fixed specimens. Data were analyzed by the SPSS 13.0 software. The associations of lncRNA H19, EZH2, Ki-67 and mutant P53 levels with clinicopathological features of cervical cancer were assessed. **Results:** lncRNA H19 were significantly low expressed in cervical cancer tissues compared with those of the

收稿日期 (Date of reception): 2018-05-19

通信作者 (Corresponding author): 杨慧, Email: ppouuu@126.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81472431); 淮安市科技计划项目 (HAS2015024)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (81472431) and Science and Technology Planning Project of Huaian City (HAS2015024), China.

control groups ( $P < 0.05$ ). EZH2, mutant P53 and Ki-67 amounts expressed positively in cervical cancer tissues.

**Conclusion:** It is beneficial to combine the detection of lncRNA H19, EZH2, Ki-67 and mutant P53 for the diagnosis of cervical cancer.

**Keywords** cervical cancer; lncRNA H19; EZH2; Ki-67; mutant P53

子宫颈癌(cervical cancer, CC)是最常见的妇科恶性肿瘤之一,严重影响妇女的生命和健康<sup>[1]</sup>。高致病基因型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染是子宫颈癌发生的主要原因<sup>[2]</sup>。目前在子宫颈癌的早期诊断依赖细胞学检测、HPV检测、阴道镜、子宫颈锥切等多种手段联用以提高诊断的准确性<sup>[3]</sup>。

研究<sup>[4]</sup>发现长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可以参与人类基因的转录激活和转录后调控,在染色质修饰及基因组印迹等层面也同样能够起到调控作用,并且还参与肿瘤发生、发展。某些特定的lncRNA在特定的肿瘤细胞中可以检测出表达水平的改变。这些lncRNA就可能作为这些肿瘤早期诊断和预防治疗方面新的分子生物学标志及临床监测指标<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>发现lncRNA H19在子宫颈癌组织异常表达。

EZH2、突变型P53在子宫颈癌基因表观遗传学研究中具有重要作用,可能存在调控关系<sup>[6]</sup>。Ki-67可以反映肿瘤细胞增殖活性,在临床中联合检测lncRNA H19, EZH2, Ki-67, 突变型P53,可能为子宫颈癌的诊断提供帮助。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

本研究通过淮安市妇幼保健院医院伦理委员会讨论同意。收集2013年5月至2016年5月在淮安市妇幼保健院行手术摘除子宫术或阴道镜下活检术患者,签署知情同意后留取子宫颈组织标本。排除标准:所有子宫颈癌患者HPV检测为阳性,且未曾接受放化疗、抗HPV治疗、免疫治

疗。子宫颈癌组按照国际妇产科联盟(FIGO, 2009年)的子宫颈癌临床分期标准进行临床分期。

按病理检查结果分为2组:50例子宫颈癌患者为研究组,50例非瘤子宫颈患者为对照组。所有标本均经过病理科医师再次阅片证实原诊断。研究组29~77(平均50.90)岁。对照组28~81(平均43.88)岁。方差齐性检验接受方差整齐( $P = 0.08$ ),通过单因素方差分析各组年龄相比差异无统计学意义( $F = 0.74$ ,  $P = 0.48$ )。

### 1.2 材料

#### 1.2.1 qRT-PCR 试剂与仪器

lncRNA引物、GAPDH引物及RNA抽提试剂TRIzol、反转录酶MMLV(Invitrogen)由美国Invitrogen公司提供。ABI7700实时荧光定量PCR仪购自美国AB公司。

#### 1.2.2 免疫组织化学试剂和仪器

兔抗人EZH2抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人Ki-67抗体、兔抗人P53抗体、快捷型酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物、3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

半自动旋转式石蜡切片机CUT5062购自德国SLEE公司,照相系统BX-50全自动显微照相系统购自日本OLYMPUS公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 qRT-PCR 实验步骤

采用qRT-PCR法检测lncRNA H19在2组100例组织标本中的表达。引物由上海康成生物工程有限公司合成。lncRNA H19引物见表1。

表1 lncRNA H19合成引物列表

Table 1 Primers used for lncRNA H19

| 基因名称  | 双向引物序列  | 退火温度/°C | 产物长度/bp |
|-------|---|---------|---------|
| GAPDH | F: 5'-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3';<br>R: 5'-GAGTGGGTGTCGCTGTGA-3'         | 60      | 299     |
| H19   | F: 5'-AGAAGCGGGTCTGTTTCTTTACT-3';<br>R: 5'-CGATGGTGTCTTTGATGTTGG-3' | 60      | 259     |

引物溶解后抽提RNA, 按照反转录酶使用说明将样品RNA反转录为cDNA。将样品的目的基因以及管家基因进行PCR扩增, 其产物进行梯度稀释用于做标准曲线。标准曲线样品和待测样品分别加入到含甘氨酸钠(sodium glycinate, SG)的qRT-PCR反应液中, 进行qRT-PCR扩增和检测。检测结果校正误差, 得出qRT-PCR实验结果及相关图表。相关性统计分析时lncRNA H19表达量<平均表达量为阳性,  $\geq$ 平均表达量为阴性。

### 1.3.2 免疫组织化学实验步骤

所有标本经中性甲醛固定, 石蜡包埋切片。准备好100例石蜡标本后, 每个石蜡标本块连续切片6张, 每张厚4  $\mu\text{m}$ , 其中两张分别做P53染色和阴性对照、两张分别做Ki-67染色和阴性对照、另外两张分别做EZH2染色和阴性对照。

免疫组织化学染色采用SP法, DAB显色。切片常规脱蜡水化后, 微波抗原修复, 过氧化酶阻断剂灭活内源性过氧化物酶活性, 羊血清工作液封闭, 滴加第一抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。滴加生物素标记的第二抗体, 室温下孵育10 min。滴加链亲和素-过氧化物酶溶液。DAB显色, 苏木精复染。

实验结果判定按1996年全国免疫组织化学技术与诊断标准化专题研讨会意见, 以阳性细胞数<25%为阴性(-), 25%~49%为弱阳性(+), 50%~69%为阳性(++), >70%为强阳性(+++), (++)、(+++)所占比率称为阳性率。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。定性资料以构成比、率表示, 定量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。定量资料接受方差整齐采用单因素方差分析, 拒绝方差整齐通过秩和检验分析。定性资料采用卡方检验或确切概率法。相关分析采用列联系数。所有检验结果以 $\alpha=0.05$ 为水准,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 H19 在子宫颈癌标本中的表达

H19在子宫颈癌标本中的表达量为 $29.95\pm 8.44$ , 显著低于在非瘤变宫颈组织表达量( $115.03\pm 22.15$ ), 差异有统计学意义( $t=-25.38$ ,  $P<0.01$ ; 表2)。

### 2.2 EZH2 在子宫颈癌标本中的表达

EZH2阳性表达主要定位于细胞核, 细胞浆无表达(图1)。EZH2在对照组和研究组的阳性表达分别为10.00%(5/50)和82.00%(41/50), 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 2.3 Ki-67 在子宫颈癌标本中的表达

Ki-67阳性表达主要定位于细胞核, 细胞浆无表达(图1)。Ki-67在对照组和研究组的阳性表达分别为4.00%(2/50)和94.00%(47/50), 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 2.4 突变型 P53 在子宫颈癌标本中的表达

突变型P53阳性表达主要定位于细胞核, 细胞浆无表达(图1)。突变型P53在对照组和研究组的阳性表达分别为4.00%(2/50)和74.00%(37/50), 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 2.5 LncRNA H19, EZH2, Ki-67, 突变型 P53 与子宫颈癌诊断的相关性

50例子宫颈癌中, EZH2和lncRNA H19同为阳性者37例, 同为阴性者8例, EZH2与lncRNA H19的表达相关( $\chi^2=21.18$ ,  $P<0.01$ ); Ki-67和lncRNA H19同为阳性者38例, 同为阴性者3例, Ki-67与lncRNA H19的表达相关( $\chi^2=6.16$ ,  $P=0.01$ ); P53和lncRNA H19同为阳性者33例, 同为阴性者8例, P53与lncRNA H19的表达相关( $\chi^2=10.93$ ,  $P<0.01$ ; 表2)。

表2 LncRNA H19, EZH2, Ki-67, 突变型P53与子宫颈癌诊断相关性

Table 2 correlation analysis of lncRNA H19, EZH2, Ki-67, mutant P53 and cervical cancer diagnosis

| LncRNA H19 | EZH2 |    | Ki-67 |    | P53 |    |
|------------|------|----|-------|----|-----|----|
|            | 阳性   | 阴性 | 阳性    | 阴性 | 阳性  | 阴性 |
| 阳性         | 37   | 1  | 38    | 0  | 33  | 5  |
| 阴性         | 4    | 8  | 9     | 3  | 4   | 8  |

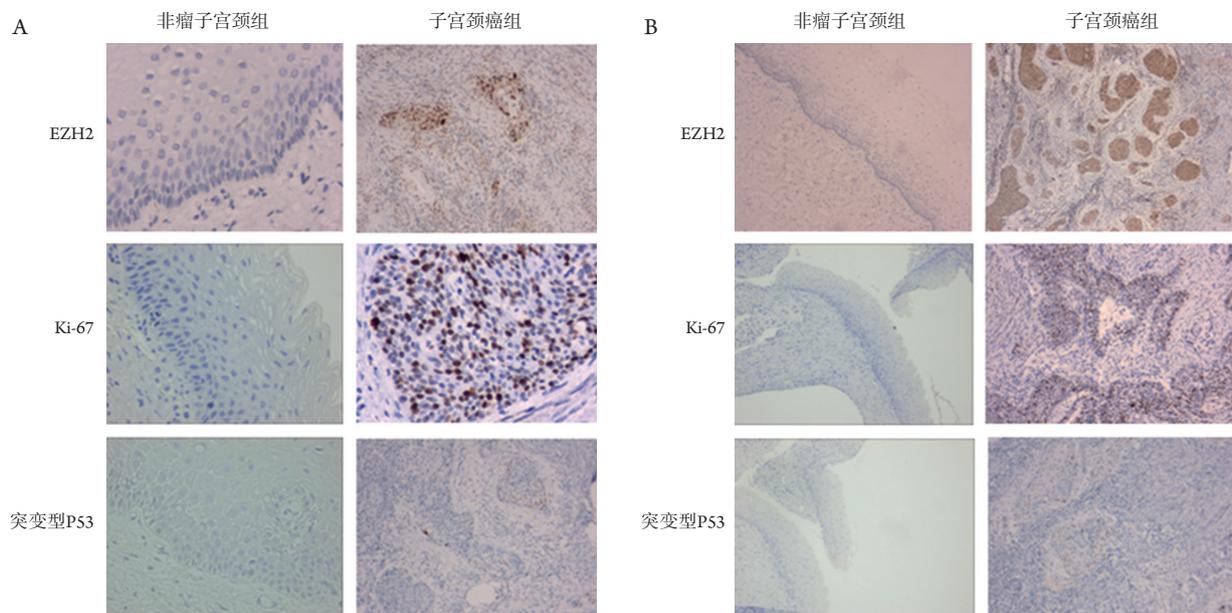


图 1 两组 EZH2, Ki-67, 突变型 P53 的表达

Figure 1 Expression of EZH2, Ki-67 and mutant P53 in the two groups

(A) SP,  $\times 400$ ; (B) SP,  $\times 100$ .

### 3 讨论

宫颈癌是发病率仅次于乳腺癌的妇科恶性肿瘤, 患者和家属往往需承受经济和心理方面的沉重压力, 严重威胁广大妇女的身心健康。宫颈癌主要在有性生活史的生育年龄妇女中高发, 宫颈原位癌发病年龄主要为30~35岁, 浸润癌主要为45~55岁, 近年来其发病有年轻化的趋势<sup>[1]</sup>。宫颈癌的发病原因有多个方面, Hausen<sup>[7]</sup>发现“HPV感染能够导致宫颈癌”获得2008年诺贝尔医学和生理学奖, 证明高致病性HPV持续感染是宫颈癌及SIL发生的主要原因。宫颈癌的发生发展是一个渐进的过程, 通常需要10~15年的时间。因此, 宫颈癌是一种可预防、可治愈的疾病。相对其他肿瘤来说, 宫颈肿瘤较容易早期发现和预防, 也是治疗效果较好的肿瘤<sup>[8]</sup>。

本研究发现lncRNA H19在宫颈癌组织低表达, lncRNA H19基因定位于人染色体11p15.5, 中文名称母系印记基因转录本H19, H19是第一个被发现与癌症有关的lncRNA, 它有抑癌和促癌的双重作用<sup>[9]</sup>。Hoppe-Seyler等<sup>[10]</sup>提出H19在宫颈癌标本异常表达, lncRNA可能通过改变HPV的转录调控, 如降低HPV致癌过程中的表达, 阻断宫颈病变的进展。本研究结果与上述一致。有研究<sup>[11]</sup>报道lncRNA H19能够通过绑定PRC2行使生物学功能。

EZH2是PRC2的组成成分之一, 通过检测子

宫颈组织EZH2的表达可以了解PRC2的变化情况。PRC2是一种组蛋白甲基转移酶, 主要作用于组蛋白H3赖氨酸位点K27, 具有高度保守性, 组成成分有EZH2, AEBP2Su(z)12, RbAp48和EED。PRC2复合体的亚基E(z)/EZH2的活性与组蛋白甲基转移酶相同, 可以优先甲基化修饰组蛋白H3K27<sup>[12]</sup>。本研究发现EZH2在宫颈癌旁组中阳性表达高于非瘤子宫颈组, 说明在宫颈癌组织中PRC2的表达量增高, 与相关报道<sup>[13-14]</sup>一致。

目前在肿瘤相关实验中, Ki-67是反映肿瘤细胞增殖活性最具代表性的指标之一。宫颈癌细胞增殖过程中, 宫颈组织中的Ki-67阳性表达率升高<sup>[15]</sup>。目前Ki-67已广泛用于肿瘤的生物学研究及恶性肿瘤的预后分析。国内外多项研究<sup>[15-17]</sup>均证实Ki-67的表达与恶性肿瘤的发生、转移和预后密切相关, Ki-67在多种恶性肿瘤中均存在过度表达。Ki-67可能促进恶性肿瘤发生发展, 可作为反映宫颈癌细胞增殖活性的一项指标<sup>[16]</sup>。本研究中研究组Ki-67阳性表达量高于对照组, 差异有统计学意义, 与相关报道<sup>[15-17]</sup>一致。表明在非瘤子宫颈组中细胞增殖活性增高。

突变型P53是致癌基因, 免疫组织化学可以检测出突变型P53蛋白表达产物<sup>[17]</sup>。说明突变型P53的过表达在宫颈癌的发生发展中起重要作用。本研究结果突变型P53在研究组中阳性表达高于对照组, 差异有统计学意义, 与相关研究<sup>[17-19]</sup>结果一

致。野生型P53能下调lncRNA H19的表达<sup>[11]</sup>。在恶性肿瘤发生发展过程中, 抑癌基因P53可能通过调控lncRNA的表达发挥生物学作用<sup>[19]</sup>。

综上所述, 在子宫颈癌组织中lncRNA H19低表达, EZH2, Ki-67, 突变型P53阳性表达。lncRNA H19, EZH2, Ki-67, 突变型P53之间表达具有相关性, 可能存在调控关系, lncRNA H19, EZH2有望成为新的子宫颈癌诊断和监测标志物, 具有良好的临床应用前景。临床上联合检测lncRNA H19, EZH2, Ki-67, 突变型P53有利于子宫颈癌的诊断。

## 参考文献

- Guo F, Li Y, Liu Y, et al. Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(3): 224-229.
- Aleman L, de Sanjose S, Tous S, et al. Time trends of human papillomavirus types in invasive cervical cancer, from 1940 to 2007[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(1): 88-95.
- Yang L, Lin C, Liu W, et al. lncRNA and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 773-788.
- Lai MC, Yang Z, Zhou L, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1810-1816.
- 刘晶. 宫颈癌HPV E7与致癌因子CIP2A相互调控机制的初步研究及预后价值的评估[D]. 济南: 山东大学, 2016.  
LIU Jing. Preliminary study on the mutual regulation mechanism of HPV E7 and carcinogen CIP2A in cervical cancer and evaluation of its prognosis value[D]. Jinan: Shandong University, 2016.
- 杨慧, 余敏敏, 陆晓媛. 长链非编码RNA在宫颈癌及宫颈上皮内瘤样病变中的表达[J]. *江苏医药*, 2014, 40(22): 2685-2688.  
YANG Hui, YU Minmin, LU Xiaoyuan. Expression of long chain non coding RNA in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2014, 40(22): 2685-2688.
- Hausen HZ. HPV vaccines for cervical cancer: Past, present and future[J]. *Future Virology*, 2015, 10(6): 671-673.
- Hariri S, Steinau M, Rinas A, et al. HPV genotypes in high grade cervical lesions and invasive cervical carcinoma as detected by two commercial DNA assays, North Carolina, 2001-2006[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34044.
- Feigenberg T, Gofrit ON, Pizov G, et al. Expression of the h19 oncofetal gene in premalignant lesions of cervical cancer: a potential targeting approach for development of nonsurgical treatment of high-risk lesions[J]. *ISRN Obstet Gynecol*, 2013, 2013: 137509.
- Hoppe-Seyler F, Hoppe-Seyler K. Emerging topics in human tumor virology[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(6): 1289-1299.
- Luo M, Li Z, Wang W, et al. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression[J]. *Cancer Lett*, 2013, 333(2): 213-221.
- Deb G, Singh AK, Gupta S. EZH2: not EZHY (Easy) to deal[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(5): 639-653.
- 刘跃洋. EZH2基因对宫颈癌预后的影响及调控宫颈癌CaSki细胞株增殖的研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.  
LIU Yueyang. EZH2 influence the prognosis of cervical cancer and regulate the proliferation of CaSki cervical cancer cells[D]. Jinan: Shandong University, 2013.
- 刘莹, 高庆, 高艳娥, 等. 宫颈癌中EZH2的表达与细胞增殖和血管生成的关系[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2013, 34(5): 580-584.  
LIU Ying, GAO Qing, GAO Yan'e, et al. Expression of EZH2 in cervical cancer and its relationship with cell proliferation and angiogenesis[J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University. Medical Sciences*, 2013, 34(5): 580-584.
- Kisser A, Zechmeister-Koss I. A systematic review of p16/Ki-67 immuno-testing for triage of low grade cervical cytology[J]. *BJOG*, 2015, 122(1): 64-70.
- Qian QP, Zhang X, Ding B, et al. Performance of P16/Ki-67 dual staining in triaging hr-HPV-positive population during cervical Cancer screening in the younger women[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 483: 281-285.
- Stoenescu TM, Ivan LD, Stoenescu N, et al. Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki-67, P53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution[J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2011, 115: 485-492.
- Tagle DK, Sotelo DH, Illades-Aguir B, et al. Expression of E6, P53 and P21 proteins and physical state of HPV16 in cervical cytologies with and without low grade lesions[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(1): 186-193.
- Miličević Z, Bajić V, Živković L, et al. Identification of p53 and its isoforms in human breast carcinoma cells[J]. *ScientificWorldJournal*, 2014, 2014: 618698.

本文引用: 辜卫红, 余敏敏, 袁智民, 吴玲, 邱峰龙, 项媛媛, 方芳, 杨慧. 长链非编码RNA H19, EZH2, Ki-67及突变型P53联合检测在子宫颈癌诊断中的意义[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(9): 1823-1827. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.09.001

**Cite this article as:** GU Weihong, YU Minmin, YUAN Zhimin, WU Ling, QIU Fenglong, XIANG Yuanyuan, FANG Fang, YANG Hui. Expression and significance of long non-coding RNA H19, EZH2, Ki-67, and mutant P53 in cervical cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(9): 1823-1827. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.09.001