宫颈组织和细胞中 BRD4 在 HPV16 病毒复制中的作用

王　乐,李伟欣,董杨柳,赵　先,朱鑫丽,张雪晨,者湘漪,潘泽民
(石河子大学医学院新疆地方与民族高发病教育部重点实验室,石河子　832002)

摘要　目的　探讨宫颈鳞状细胞癌和宫颈上皮内瘤变Ⅰ级(CINI)组织中复制相关溴结构域蛋白4(BRD4)与人乳头瘤病毒(HPV)16型(HPV16)病毒载量的关系,确定 BRD4 降解剂 MZ1 对宫颈癌细胞病毒载量的影响。**方法**　收集 HPV16 阳性的宫颈癌标本 30 例和非宫颈癌标本 30 例,通过实时荧光定量 PCR 检测标本病毒载量,免疫组织化学和 Western blot 分析 BRD4 的表达情况。**结果**　宫颈癌标本组病毒载量明显高于非宫颈癌标本组,差异有统计学意义($P<0.01$)。免疫组织化学结果显示,BRD4 在宫颈癌标本中的表达水平高于非癌标本,差异有统计学意义($P<0.05$)。BRD4 的表达与病毒载量高低呈正相关,差异有统计学意义($P<0.001$)。**结论**　BRD4 可能参与了 HPV16 病毒的复制,BRD4 降解剂 MZ1 可以抑制 HPV16 病毒的复制。

关键词　宫颈癌;溴结构域蛋白4;人乳头瘤病毒16型;病毒载量;MZ1
中图分类号　R 373.9
文献标志码　A　**文章编号**　1000－1492(2025)06－1080－06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000－1492.2025.06.015

2025－05－09 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:82060518、U1503125);新疆生产建设兵团科技发展专项(编号:2019BC007);石河子大学自主资助支持校级科研项目(编号:ZZZC202134)
作者简介:王　乐,女,硕士研究生;
潘泽民,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail:panteacher89@sina.com

宫颈癌是女性恶性肿瘤中最常见的癌症之一,其发病率在全球女性癌症中排名第四[1]。有研究[2]报道,新疆地区妇女宫颈癌发生率和病死率均处于高位且多为人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)52、HPV53、HPV16 和 HPV18 感染[3]。高危型 HPV 的长期持续感染是宫颈癌发生的主要原因。控制 HPV16 病毒基因组复制可以消退宫颈病

were higher ($P<0.05$). Compared with Anesthesia-3 group, serum CGRPα levels in Anesthesia-4 group were higher ($P<0.05$). Compared with Anesthesia-2 group, CGRPα levels in Anesthesia-4 group serum were higher ($P<0.05$). Compared with Anesthesia-0 group, tissues CGRPα levels in Anesthesia-4 group were higher ($P<0.05$). Compared with Anesthesia-3 group, CGRPα levels in Anesthesia-4 group tissues were higher ($P<0.05$). Compared with Anesthesia-2 group, CGRPα levels in Anesthesia-4 group tissues were higher ($P<0.05$). From the 2nd to 6th week of hypotension modeling induction, compared with pregnancy group, body weight decreased in the model + pregnancy group and the model + pregnancy + phenylephrine group ($P<0.05$). There was no significant difference in baseline systolic blood pressure among all groups ($P>0.05$). At the end of the 6th week, compared with pregnancy group, systolic blood pressure decreased in model + pregnancy group and model + pregnancy + phenylephrine group ($P<0.05$); the levels of CGRPα in serum and placental tissues increased ($P<0.05$). Compared with model + pregnancy group, systolic blood pressure increased in model + pregnancy + phenylephrine group ($P<0.05$). ***Conclusion***　The poor response of pregnant women with hypotension during caesarean section under intraspinal anesthesia to the treatment of phenylephrine may be related to the increased levels of CGRPα in placenta and peripheral blood.

Key words　caesarean section; intraspinal anesthesia; ephedrine; phenylephrine; hypotension; calcitonin gene-related peptide α
Found program　Natural Science Foundation of Ningxia (No. 2022AAC03591)
Corresponding author　Gao Yuhua, E-mail: gaoyuhua01@126.com

变,清除病毒感染,对防治宫颈癌具有重要的意义。

HPV E2 蛋白质是一种转录激活剂和 DNA 复制起始蛋白,由反式激活结构域(氨基末端)、铰链区以及羧基末端(DNA 结合域)构成[4]。HPV16 E2 蛋白质可通过结合 E1 解旋酶协同激活病毒 DNA 复制,也可通过依赖溴结构域蛋白 4(bromodomain-containing protein 4, BRD4)的方式激活转录[5-6],E2-BRD4 复合物与有丝分裂染色体结合,使病毒在胞质内复制继而分裂后分布到子细胞[7],促进肿瘤发生发展。据报道,高病毒载量是侵袭性宫颈癌发展的危险因素之一。BRD4 是溴结构域家族一员,溴结构域蛋白质的染色质靶向活性允许它们进入染色质并通过细胞周期进程调节基因活性[8]。近年来,溴结构域蛋白质的抑制剂作为潜在的抗癌药物得到了广泛的研究。MZ1 可通过泛素-蛋白酶体途径迅速有效地降解 BRD4。目前 MZ1 对宫颈癌细胞病毒复制的作用还不清楚,探索 MZ1 对宫颈癌 SiHa、HeLa 和 CaSki 细胞病毒载量的影响具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司(货号:DP304);免疫组织化学染色一抗 BRD4(货号:CY5423)购自于上海埃必威生物技术有限公司;二抗(兔鼠通用试剂盒,货号:PV6000)购自于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 标本收集和标本 DNA 的提取 分别从喀什地区人民医院、新疆巴州人民医院及石河子大学附属医院共收集 60 例 HPV16 感染阳性患者的宫颈组织标本(30 例宫颈癌标本及 30 例非宫颈癌标本);所有患者均已知情同意且均无长期住在外地的居住史。样品储存于 -80 ℃低温冰箱。使用 DNA 提取试剂盒提取标本 DNA 并于 -20 ℃保存。本研究石河子大学医学院第一附属医院医学伦理委员会批准(编号:KZ2022-004-01)。

1.3 病毒载量的检测 根据 NCBI 数据库提供的 HPV 和 β-actin 基因序列,构建 HPV16 L1、HPV18 L1 和 β-actin 标准品质粒,同时设计 *HPV16*、*HPV18* 和 *β-actin* 的特异性引物,引物序列见表 1[9]。分别提取 HPV16 L1、HPV18 L1 和 β-actin 标准品质粒,琼脂糖凝胶电泳检测质粒质量及浓度,按公式:拷贝数(copies/μl) = 6.02 × 10^{23} (copies/mol) × 质粒浓度(ng/μl) × 10^{-9}/(载体分子量 + 插入片段分子量) ×660(g/mol)。将不同质粒分别稀释为 10^3 ~ 10^9 copies/μl,作为实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR))的模板。根据 C_T 值分别建立 HPV16 L1、HPV18 L1 和 β-actin 的标准曲线,横坐标为每组拷贝数即 10^3 ~ 10^9 copies/μl 的对数,纵坐标为 C_T 值。将每个标本 DNA 浓度分别稀释成统一浓度(50 ng/μl),qPCR 体系为:(正、反向引物各 0.8 μl,TB Green 10 μl,Dye Ⅱ 2 μl,模板 DNA 2 μl),再根据标准曲线求出拷贝数。HPV16 L1 或 HPV18 L1 的拷贝数除以对应标本 β-actin 的拷贝数,即得出相应标本的病毒载量。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5′-3′)
HPV16 L1	F: TTTGTTACTGTTGTTGATACTAC
	R: GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC
HPV18 L1	F: TTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGC
	R: GAAAAATAAACTGCAAATCATATTCCTC
β-actin	F: CGGAACCGCTCATTGCC
	R: ACCCACATCGTGCCCATCTA

1.4 qPCR 按照 TAKARA 试剂盒说明书设置反应体系和反应程序。预变性 90 ℃,反应时间 30 s,40 个循环,95 ℃变性 10 s、56 ℃反应 30 s 退火、72 ℃反应 30 s 延伸。

1.5 免疫组织化学实验 所有标本均由 10% 中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm 厚进行切片。免疫组织化学染色采用 SP 法,BRD4 抗体购自上海 ABways 公司(货号:CY5423,稀释比 1∶150)。所有染色结果均由病理医师采用双盲法进行判读,再采用半定量计分法进行评分统计。

1.6 细胞培养 在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱培养宫颈癌细胞系 SiHa、HeLa 和 CaSki。用 90% DMEM 高糖培养液、1% 青链霉素和 10% 胎牛血清的培养基培养宫颈癌细胞,间隔 2 ~ 3 d 传代 1 次。

1.7 蛋白质印迹(Western blot)实验 用 RIPA 裂解液(RIPA Lysis Buffer)提取细胞中的总蛋白,按照比例加入 5 × 上样缓冲液,震荡均匀快速离心后在 100 ℃煮沸 10 min,置于 -20 ℃保存备用。配置 8% SDS-PAGE 凝胶,根据蛋白浓度上样,电泳电转后孵育一抗,4 ℃一抗 BRD4(1∶1 000)孵育 12 ~ 16 h。TBST 清洗 6 次(5 min/次)。室温条件下孵育二抗 2 h,后 TBST 清洗 6 次(5 min/次),用 ECL 超敏发光液在化学发光仪下曝光。

1.8 细胞增殖检测 未加 MZ1 处理细胞和加 MZ1 处理 24 h 组细胞分别设置 5 个复孔,接种于 96 孔

板中,每孔 2 000 个细胞,常规培养 5 d。分别于 0、24、48、72 和 96 h 加入 MTT,37 ℃孵育 3 h,吸弃孔中液体,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜(DMSO),490 nm 下测定吸光度值。

1.9 统计学处理 使用 GraphPad Prism 及 SPSS 26.0 统计学软件进行分析及绘图,采用 *t* 检验分析宫颈癌与非癌组织、未处理组宫颈癌细胞及 MZ1 处理组宫颈癌细胞病毒载量差异,非参数检验比较分析免疫组织化学染色结果,Spearman 秩相关性分析 BRD4 表达情况与病毒载量的相关性,*P* 值 <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本病毒载量检测 将收集的 HPV16 阳性的宫颈癌标本 30 例和非宫颈癌标本 30 例进行实时荧光定量 PCR,根据 C_T 值求出拷贝数并计算病毒载量。结果显示,宫颈癌组标本病毒载量平均为 3.2 copies/cell,非宫颈癌组标本病毒载量平均为 0.46 copies/cell,两者比较差异有统计学意义($t=4.012$,$P<0.001$)(图 1),提示宫颈癌组织的病毒载量明显高于非宫颈癌组。

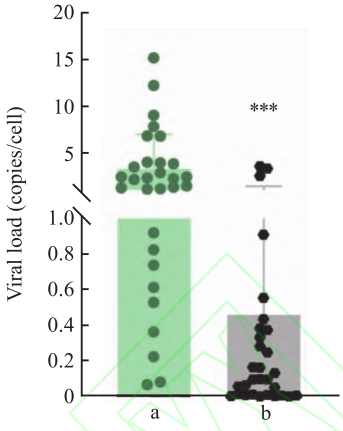

图 1 癌与非癌标本 HPV DNA 病毒载量

Fig. 1 HPV DNA viral load in cancer and non-cancer samples

a: Cancer group; b: Non-cancer group; *** $P<0.001$ *vs* Cancer group.

2.2 免疫组织化学检测 BRD4 在不同宫颈组织上的表达 为了检测BRD4在HPV16阳性的宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达情况,采用免疫组织化学分析宫颈癌组织和非宫颈癌组织各 30 例,发现宫颈癌组织 BRD4 的表达明显高于正常宫颈组织,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2 和表 2)。

2.3 宫颈组织病毒载量与免疫组化 BRD4 表达量的关系 对 22 例宫颈组织标本(12 例宫颈癌标本,10 例非癌标本)的病毒载量与 BRD4 表达量进行

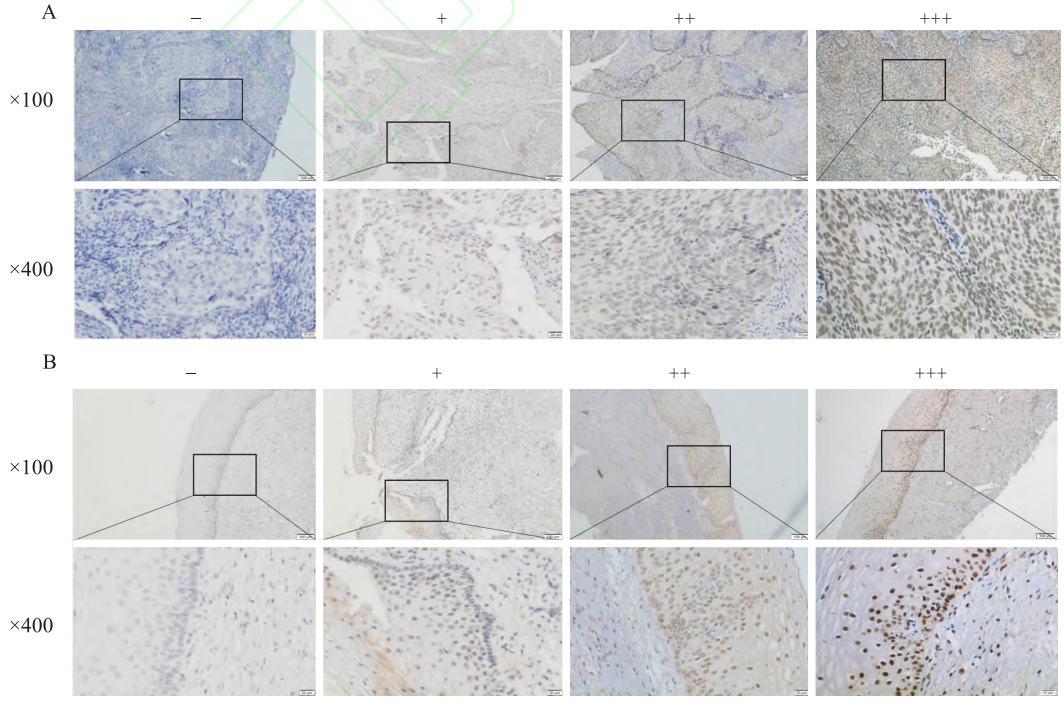

图 2 正常宫颈组织和宫颈癌组织中 BRD4 的表达

Fig. 2 Expression of BRD4 in normal cervical tissue and cervical cancer tissue

A: Immunohistochemical staining image of cervical cancer tissue; B: Immunohistochemical staining image of normal cervical tissue

表 2 BRD4 在不同宫颈组织中的表达分析

Tab. 2 Analysis of BRD4 expression in different cervical tissues

Tissue	*n*	(−)	(+)	(++)	(+++)	Ordinal mean	*Z* value	*P* value
Squamous cell carcinoma	30	1	15	11	3	35.07	−2.433	0.015
Non-Cancer	30	1	25	2	2	25.93		

Spearman 秩相关性分析,结果显示 $R=0.884\ 3$,$P<0.000\ 1$。提示 HPV16 阳性标本病毒载量与 BRD4 表达高低具有强正相关性。见图 3。

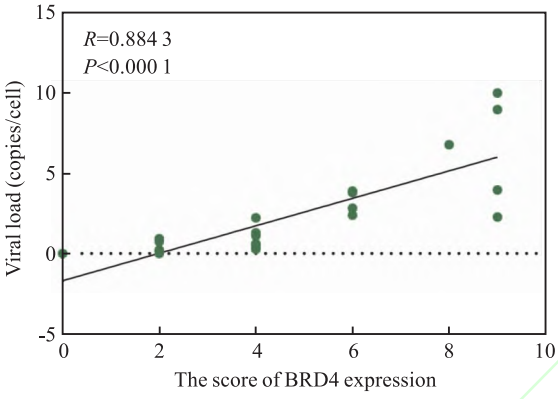

图 3 BRD4 的表达情况与病毒载量的关系

Fig. 3 The relationship between BRD4 expression and viral load

2.4 BRD4 降解剂 MZ1 对宫颈癌细胞的病毒载量及增殖迁移能力的影响

2.4.1 BRD4 抑制剂 MZ1 浓度的确定 根据 MTT 方法对加药后细胞活力测定,对 3 种宫颈癌细胞系 SiHa、HeLa 和 CaSki 的 MZ1 半数致死量进行分析,同时分别用不同浓度 MZ1 处理宫颈癌 SiHa、HeLa 和 CaSki 细胞 24 h 后,提取蛋白质进行 Western blot 实验,结果显示,用 MZ1 处理过的宫颈癌细胞的 BRD4 表达水平均显著降低(图 4),提示 BRD4 降解剂 MZ1 成功降解 BRD4。

2.4.2 MZ1 降解 BRD4 后对宫颈癌 SiHa、HeLa 和 CaSki 细胞病毒载量的影响 用 250 nmol/L MZ1 处理宫颈癌 SiHa、HeLa 和 CaSki 细胞 24 h 后,分别提取未处理组和 MZ1 处理组细胞的 DNA,将 DNA 浓度统一稀释为 25 ng/μl 后计算标本病毒载量。结果显示:未加 MZ1 处理的宫颈癌 SiHa、HeLa、CaSki 细胞的病毒载量高于加药后宫颈癌细胞的病毒载量,差异有统计学意义($t=6.018$,$P<0.01$;$t=3.131$,$P<0.05$;$t=6.416$,$P<0.01$)(图 5),提示降低 BRD4 的表达可以显著降低宫颈癌细胞的病毒载量。

3 讨论

宫颈癌严重危害妇女健康,一过性的 HPV 感染可能会在 8~10 个月被机体清除,持续感染 HPV 可能导致宫颈癌的发生[10-11]。病毒在机体内复制使病毒载量增高,不同级别宫颈病变与 HPV16 病毒载

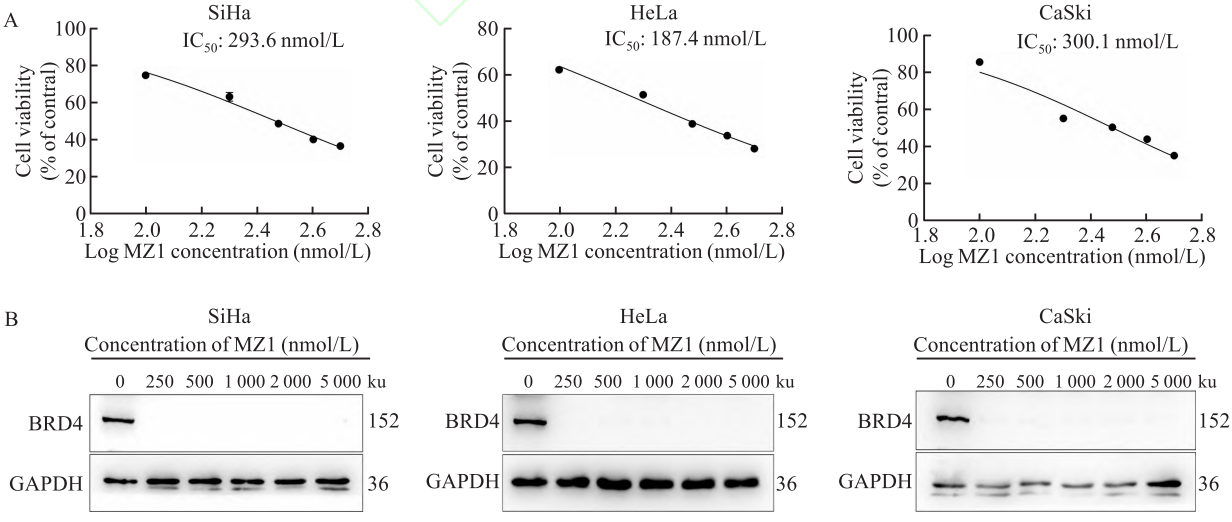

图 4 MZ1 处理后细胞活力测定和 BRD4 蛋白表达情况

Fig. 4 Cell viability assay and BRD4 protein expression after MZ1 treatment

A: Cell viability assay after treatment with different concentrations of MZ1 using MTT; B: Western blot to detect BRD4 protein expression levels.

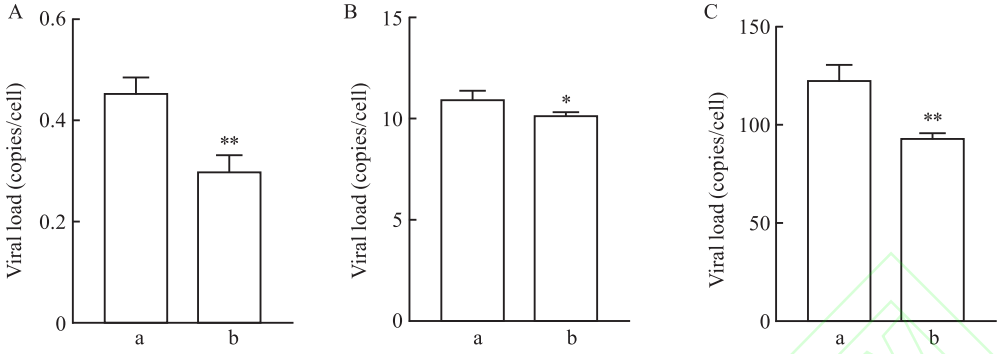

图 5 未加 MZ1 的宫颈癌细胞与加 MZ1 处理的宫颈癌细胞的 HPV DNA 病毒载量

Fig. 5 HPV DNA viral load in cervical cancer cells with and without MZ1 treatment

A: Viral load results in untreated and treated cervical cancer SiHa cells; B: Viral load results in untreated and treated cervical cancer HeLa cells; C: Viral load results in untreated and treated cervical cancer CaSki cells; a: Control group; b: MZ1 group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* Control group.

量呈正相关[12]。因此,探索病毒复制的机制对清除 HPV16 感染具有重要意义。HPV16 E2 蛋白质可以与 BRD4 相互作用从而影响病毒复制[13]。

HR-HPV 病毒载量在诊断 CIN 2 以上病变具有很高的特异性和敏感性,可以通过检测高危型 HPV 病毒载量对宫颈癌进行筛查。HPV E2 可以在 LCR 区与复制相关蛋白质 BRD4 结合调节病毒复制[14]。免疫组织化学实验结果显示,BRD4 在宫颈癌组织高表达而在非癌组织低表达,有文献[8]报道 BRD4 与 E2 结合影响病毒复制。标本的病毒载量检测显示,宫颈癌组织中 HPV16 病毒载量显著高于非宫颈癌组织,在 BRD4 高表达的标本中,病毒载量也高表达,表明 BRD4 蛋白质可能参与了 HPV16 病毒的复制,BRD4 的高表达可能会使病毒复制水平增加,而长期感染 HPV16 病毒将导致侵袭性宫颈癌的发生。抑制 BRD4 的表达可能降低 HPV16 病毒的感染从而降低宫颈癌发生的可能性。近年来,许多 BRD4 抑制剂进入临床试验,在肿瘤治疗方面取得了令人振奋的结果[15]。抑制 BRD4 可以诱导细胞凋亡,降低癌细胞活力,并在体内抑制肿瘤生长[16]。本研究表明抑制 BRD4 的表达可以降低病毒复制,用 BRD4 降解剂 MZ1 处理宫颈癌 SiHa、HeLa 和 CaSki 细胞后,MZ1 处理组细胞的病毒载量相较于未处理组明显降低。说明 BRD4 降解剂 MZ1 通过降解 BRD4 蛋白质,有效降低了宫颈癌细胞的病毒载量,这为清除病毒感染及防治宫颈癌提出了新的思路。

综上所述,宫颈组织中 BRD4 表达水平和 HPV16 病毒载量具有强正相关性。而 BRD4 的抑制剂 MZ1 可以高效快速降解 BRD4 从而降低病毒复制水平。研究为关于 BRD4 降解剂治疗 HPV 感染实体肿瘤奠定了基础。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49. doi:10.3322/caac.21660.

[2] Wang J, Tang D, Wang K, et al. HPV genotype prevalence and distribution during 2009-2018 in Xinjiang, China: baseline surveys prior to mass HPV vaccination[J]. BMC Womens Health, 2019, 19(1): 90. doi:10.1186/s12905-019-0785-3.

[3] 程豪政, 妥 静, 董杨柳, 等. 新疆维吾尔自治区妇女宫颈感染人乳头瘤病毒 16 型 E4 和 L2 的遗传变异分析[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(11): 1884-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.014.
Cheng H Z, Tuo J, Dong Y L, et al. Genetic variation analysis of Human Papillomavirus 16 E4 and L2 in women with cervical infection in Xinjiang Uygur Autonomous Region[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(11): 1884-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.014.

[4] Zwolinska K, Bienkowska-Haba M, Scott R S, et al. Experimental support for human papillomavirus genome amplification early after infectious delivery[J]. J Virol, 2023, 97(6): e0021423. doi:10.1128/jvi.00214-23.

[5] Forte N, Dovala D, Hesse M J, et al. Targeted protein degradation through E2 recruitment[J]. ACS Chem Biol, 2023, 18(4): 897-904. doi:10.1021/acschembio.3c00040.

[6] Wu S Y, Nin D S, Lee A Y, et al. BRD4 phosphorylation regulates HPV E2-mediated viral transcription, origin replication, and cellular MMP-9 expression[J]. Cell Rep, 2016, 16(6): 1733-48. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.001.

[7] Timbang M R, Sim M W, Bewley A F, et al. HPV-related oropharyngeal cancer: a review on burden of the disease and opportunities for prevention and early detection[J]. Hum Vaccin Immunother, 2019, 15(7-8): 1920-8. doi:10.1080/21645515.

2019.1600985.

[8] Prabhakar A T, James C D, Fontan C T, et al. Direct interaction with the BRD4 carboxyl-terminal motif (CTM) and TopBP1 is required for human papillomavirus 16 E2 association with mitotic chromatin and plasmid segregation function[J]. J Virol, 2023, 97(10): e0078223. doi:10.1128/jvi.00782-23.

[9] 王露月. 新疆地区 HPV 基因型检测及 HPV16 E1、E2 基因多态性分析[D]. 石河子: 石河子大学, 2022. doi:10.27332/d.cnki.gshzu.2022.000716.
Wang L Y. Detection of HPV genotype and analysis of HPV16 E1 and E2 gene polymorphism in Xinjiang region[D]. Shihezi: Shihezi University, 2022. doi: 10.27332/d.cnki.gshzu.2022.000716.

[10] Perkins R B, Wentzensen N, Guido R S, et al. Cervical cancer screening: a review[J]. JAMA, 2023, 330(6): 547-58. doi: 10.1001/jama.2023.13174.

[11] Wongjampa W, Nakahara T, Tanaka K, et al. An *in vitro* carcinogenesis model for cervical cancer harboring episomal form of HPV16[J]. PLoS One, 2023, 18(2): e0281069. doi: 10.1371/journal.pone.0281069.

[12] Wang M, Hou B, Wang X, et al. Diagnostic value of high-risk human papillomavirus viral load on cervical lesion assessment and ASCUS triage[J]. Cancer Med, 2021, 10(7): 2482-8. doi: 10.1002/cam4.3653.

[13] Prabhakar A T, James C D, Fontan C T, et al. Human papillomavirus 16 E2 interaction with TopBP1 is required for E2 and viral genome stability during the viral life cycle[J]. J Virol, 2023, 97(3): e0006323. doi:10.1128/jvi.00063-23.

[14] Jose L, Androphy E J, DeSmet M. SETD6 regulates E2-dependent human papillomavirus transcription[J]. J Virol, 2022, 96(22): e0129522. doi:10.1128/jvi.01295-22.

[15] Yang H, Wei L, Xun Y, et al. BRD4: an emerging prospective therapeutic target in glioma[J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 21: 1-14. doi:10.1016/j.omto.2021.03.005.

[16] Hu J, Pan D, Li G, et al. Regulation of programmed cell death by Brd4[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(12): 1059. doi:10.1038/s41419-022-05505-1.

The role of BRD4 in HPV16 virus replication in cervical tissue and cells

Wang Le, Li Weixin, Dong Yangliu, Zhao Xian, Zhu Xinli, Zhang Xuechen, Zhe Xiangyi, Pan Zemin
(*Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases*, *School of Medicine*, *Shihezi University*, *Shihezi* 832002)

Abstract ***Objective*** To explore the relationship between the replication-associated bromodomain protein 4 (BRD4) and human papillomavirus (HPV) 16(HPV16) viral load in cervical squamous cell carcinoma and CIN Ⅰ tissues, confirm the effects of BRD4 degradation agent MZ1 on viral load. ***Methods*** Thirty HPV16-positive cervical cancer specimens and 30 non-cervical cancer specimens were collected, and the viral load of the samples was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the expression of BRD4 was analyzed by immunohistochemistry and Western blot. ***Results*** The viral load was higher in the samples of cervical cancer group than in the samples of non-cancer group, the difference is statistically significant ($P<0.01$). Immunohistochemistry results showed that the expression of BRD4 were significantly higher in cervical cancer specimens than in noncancerous specimens, the difference is statistically significant ($P<0.05$). BRD4 expression was significantly and positively correlated with high viral loads, the difference is statistically significant ($P<0.001$). the BRD4 degradation agent MZ1 significantly reduced the viral load, the difference is statistically significant ($P<0.01$). ***Conclusion*** BRD4 may be involved in the replication of HPV16 virus, and BRD4 degradation agent MZ1 can inhibit the replication of HPV16 virus.

Key words cervical cancer; bromodomain protein 4; human papillomavirus16; viral load; MZ1

Fund programs National Natural Science Foundation Project (Nos. 82060518, U1503125); Special Program for Scientific and Technological Development of the Xinjiang Production and Construction Corps (No. 2019BC007); Shihezi University Self-Funded Support Project (No. ZZZC202134)

Corresponding author Pan Zemin, E-mail: panteacher89@sina.com