

132 例维族、汉族 HPV16 阳性宫颈组织中 L1 蛋白表达

L1 Protein Expression of Tissue Samples in 132 Cases with Positive HPV16 in Uighur and Han Women//ZHANG Lan, NIYAZI-Mayinuer, ZHU Kai-chun

张 岚¹, 玛依努尔·尼亚孜², 朱开春³

(1.石河子大学医学院,新疆 石河子 832000;2.新疆维吾尔自治区人民医院,新疆 乌鲁木齐 830001)

摘 要: [目的] 探讨维、汉族 HPV16 阳性宫颈组织中 L1 蛋白表达差异。[方法] 收集新鲜宫颈组织 224 例,PCR 筛选 HPV16 阳性标本 132 例(其中维族 70 例,汉族 62 例),免疫组化法测定 HPV L1 蛋白。[结果] L1 蛋白在 CIN1 组阳性表达率为 52.63%(10/19),其中维族为 57.14%(4/7),汉族为 50.00%(6/12)。L1 蛋白在 CIN2~3 组阳性表达率为 29.17%(7/24),其中维族为 22.22%(2/9),汉族为 33.33%(5/15)。维、汉族 L1 蛋白表达率差异无统计学意义($P>0.05$)。[结论] 维、汉族 HPV16 阳性宫颈组织中 L1 蛋白阳性表达率无统计学差异,L1 蛋白检测可预测宫颈病变进展及预后。

关键词: 宫颈上皮内瘤变;宫颈癌;HPV16;L1 蛋白;维吾尔族

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)02-0153-03

1992 年 WHO 宣布人类乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是引起宫颈癌变的首要因素。目前认为高危型 HPV 持续感染,宿主机体免疫能力及环境因素与宫颈癌及癌前病变密切相关^[1]。高危型中以 HPV16 最常见,宫颈病变组织中 HPV16 阳性检出率超过 50%^[2]。据报道新疆维吾尔族宫颈癌 HPV 总阳性率为 83.14%,HPV16 阳性率为 91.75%^[3]。HPV 晚期蛋白 1 (human papilloma virus late 1 protein, HPV L1)是体现 HPV 感染状态的指标,用于检测 HPV 感染及疫苗制备^[4]。本文分析维、汉族 HPV16 阳性宫颈组织中 L1 蛋白表达,探讨不同民族以及不同级别宫颈病变是否存在 L1 表达差异。

1 材料与方法

1.1 资料来源

新鲜宫颈组织部分来自南疆维吾尔族宫颈癌筛查,部分来源于 2010 年 9 月至 2011 年 3 月新疆自治区人民医院妇科门诊及住院患者,标本采集后分

装冻存管并保存于-80℃冰箱,10%甲醛固定 24h,送至病理科。宫颈组织共 224 例,患者年龄 20~68 岁,平均 38.6±5.0 岁。患者均为无宫颈手术史、未行过宫颈物理治疗及干扰素治疗、受试时未怀孕、无化疗史及骨盆放射治疗史的妇女。入选病例均经病理诊断明确,病例维族和汉族分布情况见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 试 剂

天根牌血液、细胞、组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱形目录号 DP304),PCR SuperMix 购自 Invitrogen 公司(货号 C10572-014)。HPV16 特异性引物由上海生工合成(P1:5'-TGCTAGTGCTTATGCAGCAA-3',P2:5'-ATTTACTGCAACATTGGTAC-3',扩增长度 152bp)。

细胞、组织 HPV L1 检测试剂盒购自美国爱迪

表 1 224 例宫颈标本病例民族分布

病 变	民 族		合 计
	维族	汉族	
宫颈炎	30	30	60
CIN1	12	15	27
CIN2~3	22	32	54
宫颈鳞状细胞癌	53	30	83
合计	117	107	224

收稿日期:2011-10-26;修回日期:2011-12-11

基金项目:国家自然科学基金(81050021)

通讯作者:玛依努尔·尼亚孜,E-mail: mynr68@yahoo.com.cn

旺斯医疗科技有限责任公司 (产品编码: CRC 0330/0331)。

1.2.2 新鲜组织 DNA 提取及 PCR 扩增

提取新鲜宫颈组织 DNA, 采用 20 μ l 反应体系 (模板 1 μ l, P1 0.5 μ l, P2 0.5 μ l, SuperMix18 μ l), 反应条件为预变性 95 $^{\circ}$ C 5min, 变性 94 $^{\circ}$ C 45s, 退火 49 $^{\circ}$ C 30s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30s, 变性到延伸共 32 个循环, 再延伸 72 $^{\circ}$ C 7min。取 5 μ l PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭) 电泳, 凝胶成像系统照相观察扩增条带并保存。实验以 HPV 阴性正常宫颈组织 DNA 作为阴性对照, 宫颈癌 SiHa 细胞株 (购自中国典型培养物保藏中心) 为阳性对照。

1.2.3 HPV L1 蛋白免疫组化法检测

选择 HPV16 阳性标本的石蜡组织切片, 62 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱烤 5h, 经二甲苯及梯度酒精脱蜡至水, 后续具体操作按试剂盒说明书进行。结果判定参考文献[5], HPV L1 蛋白为核蛋白质, 细胞核呈红色为特异性阳性染色, 仅有 1 个被红染的病变细胞核即可诊断 HPV L1 蛋白呈阳性表达。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 计数资料采用卡方检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 宫颈组织 HPV16 阳性率

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶成像系统上拍照保存, 阳性对照及 HPV16 阳性标本均在 150bp 处出现高亮条带, 阴性对照及非 HPV16 感染标本则无条带出现 (图 1)。筛选出 HPV16 阳性标本 132 例, 阳性率为 58.93% (132/224), 其中维族 HPV16 阳性率 59.83% (70/117), 汉族 HPV16 阳性率为 57.94% (62/107), 差异无统计学意义 ($P=0.775$)。见表 2。

2.2 HPV L1 蛋白在各种宫颈病变中的表达

HPV L1 蛋白的阳性表达定位于细胞核, 主要表达于宫颈组织的鳞状上皮层 (图 2)。132 例 HPV16 阳性标本中 L1 蛋白阳性表达率为 12.88% (17/132)。宫颈炎和宫颈鳞状细胞癌中均未见 L1 蛋白表达。

CIN1 患者 L1 蛋白阳性率为 52.63% (10/19), CIN2~3 患者 L1 蛋白阳性率为 29.17% (7/24)。

2.3 维、汉族宫颈病变组织中 HPV L1 蛋白阳性表达率

在 HPV 阳性 CIN1 患者, 维族 L1 蛋白阳性表达率为 57.14% (4/7), 汉族为 50.00% (6/12)。CIN2~3 患者中, 维族 L1 蛋白阳性表达率 22.22% (2/9), 汉族为 33.33% (5/15); 维、汉族 L1 蛋白表达率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 维、汉族患者宫颈组织中 HPV 阳性率比较

组别	例数	阳性	阴性	阳性率 (%)
维族	117	70	47	59.83
汉族	107	62	45	57.94
合计	224	132	92	58.93

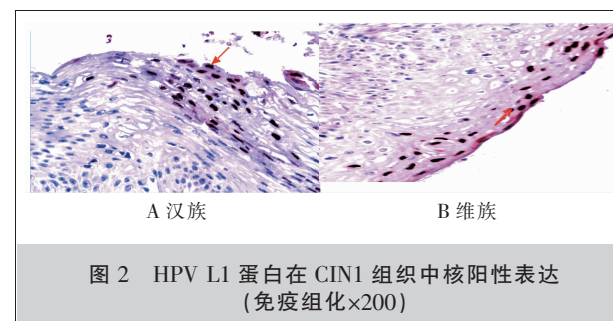
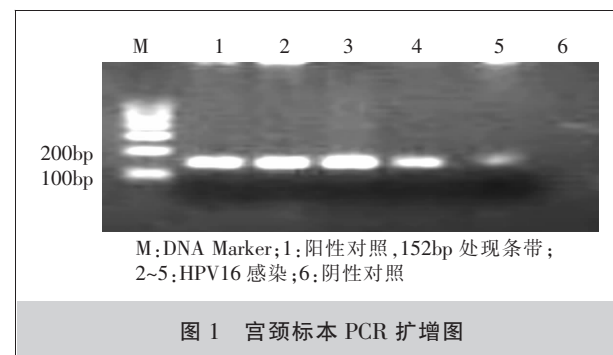


表 3 维、汉族 HPV16 阳性宫颈组织中 HPV L1 蛋白表达比较

病变级别	总例数	维族		汉族	
		例数	HPV L1 蛋白阳性率 (%)	例数	HPV L1 蛋白阳性率 (%)
宫颈炎	25	10	0	15	0
CIN1	19	7	57.14	12	50.00
CIN2~3	24	9	22.22	15	33.33
宫颈鳞状细胞癌	64	44	0	20	0
合计	132	70	8.57	62	17.74

3 讨论

HPV 病毒种类达 200 多种,根据其致病程度与癌症转化能力分为高危型和低危型,HPV16、18 等属于高危型^[6]。高危型 HPV 持续性感染与宫颈癌及 CIN 发生有关^[7]。相关文献报道维族和汉族宫颈组织中高危型 HPV 亚型分布有差异,但 HPV16 型感染在两者中都占了绝大部分^[8-10]。HPV 一般感染有增殖能力的表皮或黏膜上皮细胞,病毒生长周期与感染细胞分化周期一致。随着基底干细胞向表皮细胞分化,病毒依次进行早期蛋白表达、DNA 复制、晚期蛋白表达及病毒颗粒装配,其中高危 HPV 感染、HPV DNA 整合及 E2 基因缺失、L1 蛋白表达的作用举足轻重^[11],HPV L1 蛋白与宫颈良性病变或 HPV 短暂感染密切相关^[12]。

绝大多数 CIN 自愈可能与 HPV L1 的激活有关。若 CIN 的级别较低,则上皮能够进入良好的分化状态,从而启动 HPV 晚期事件的发生,促使 L1 蛋白的表达;反之,若宫颈组织损伤较重,其转录早期阶段丢失可能导致免疫系统的无效刺激,减少细胞免疫反应,从而促进未成熟上皮细胞的进一步转变,则上皮无法进入良好分化状态,导致 L1 蛋白表达的缺失^[13]。近年大量研究表明,随着 CIN 进展,HPV L1 蛋白表达呈下降趋势,可作为判断 HPV 感染后病毒复制状态的有效指标^[14]。Griesser 等^[15]用免疫组化方法检测 84 例高危 HPV 感染轻、中度宫颈上皮不典型增生标本中的 HPV L1 衣壳蛋白,平均随访 22.8 个月(6~46 个月)。结果发现,HPV L1 蛋白阳性 29 例中 9 例(31%)随后发生 CIN2~3 改变,另外 20 例(69%)疾病自然缓解。55 例 HPV L1 衣壳蛋白阴性患者中 13 例(23.6%)缓解,42 例(76.4%)进展为 CIN2~3、微浸润癌。提示低中度不典型鳞状上皮病变中,HPV L1 蛋白阴性病例比阳性病例更倾向于进展。肖巍等^[16]认为 HPV L1 蛋白表达情况可以帮助了解宫颈的病变程度,预测宫颈病变的发展趋势,尤其对细胞学检查诊断为不除外高度病变的不典型鳞状上皮细胞和低度鳞状上皮内病变的患者。Rauber 等^[17]对 279 例 CIN1~2 患者研究中发现 9.4% HPV L1 蛋白阳性患者疾病进一步进展,而阴性患者疾病进展则占 25.9%($P<0.05$),提示 HPV L1 蛋白与 CIN1~2 的预后相关。本研究发现在 HPV16 阳性宫颈组织中,相同病变组中维族、汉族 L1 蛋白阳性表达不存在民族差异。综上所述,HPV L1 蛋白可以检测 HPV 感染状态和宿主免疫状态,从而预测

CIN 生物学行为,指导临床医生对患者进行个性化治疗。

参考文献:

- [1] Bosch FX, Munoz N, Chichareon S, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer [J]. Clin Pathol, 2002, 55(4):244-246.
- [2] Liu SS, Tsang PC, Chan KY. Distribution of six oncogenic types of human papillomavirus and type 16 integration analysis in Chinese women with cervical precancerous lesions and carcinomas[J]. Tumor Biology, 2008, 29(2):105-113.
- [3] 古扎丽努尔·阿不力孜, 帕提曼·米吉提, 李庭芳, 等. HPV 各亚型在新疆各地区维吾尔族宫颈鳞癌中的分布[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(5):513-517.
- [4] Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, et al. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results[J]. JAMA, 1999, 281(17):1605-1610.
- [5] Choi YS, Kang WD, Kim SM, et al. Human papillomavirus L1 capsid protein and human papillomavirus type 16 as prognostic markers in cervical intraepithelial neoplasia[J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(2):288-293.
- [6] Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 34(8):518-527.
- [7] Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia [J]. Lancet Oncol, 2002, 3(1):11-16.
- [8] 古丽娜·库尔班, 阿依努尔·买买提, 古扎丽努尔·阿不力孜. 人类乳头瘤病毒亚型在新疆南部地区族妇女宫颈组织中的分布[J]. 中国癌症杂志, 2002, 12(5):405-408.
- [9] 刘开江, 刘青, 唐海峰, 等. 维、汉妇女宫颈鳞癌患者感染 HPV 亚型和 TERC 基因扩增的关系 [J]. 中华妇产科临床杂志, 2008, 9(6):449-452.
- [10] 古扎丽努尔·阿不力孜, 程静新, 米克热木. 新疆维吾尔族妇女宫颈鳞癌的 HPV 研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(5):379-382.
- [11] Yoshida T, Sano T, Kanuma T, et al. Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid based cytology samples from uterine cervical lesions [J]. Cancer, 2008, 114(2): 83-88.
- [12] Lukaszuk K, Liss J, Woznia I, et al. Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2): 608-612.
- [13] Middleton K, Peh W, Southem SA, et al. Organization of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers[J]. J Virol, 2003, 77(19):10186-10201.
- [14] Melsheimer P, Kaul S, Dobeek S, et al. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA[J]. Acta Cytol, 2003, 47(2):124-128.
- [15] Griesser H, Sander H, Hilfrich R, et al. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in papsmears with regression of highrisk HPV positive mild/moderate dysplasia [J]. Anal Quant Cytol Histol, 2004, 2(6):241-245.
- [16] 肖巍, 卞美璐, 马莉, 等. 子宫颈液基细胞学检查异常的涂片中乳头状瘤病毒 L1 蛋白的表达其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2009, 44(12):887-891.
- [17] Rauber D, Mehlhorn G, Fasehing PA, et al. Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions[J]. Eur J Obstet Gynecol Biol, 2008, 40(2):258-262.