

维族宫颈病变 HPV16 存在状态及临床意义

Status of HPV16 Infection in Cervical Lesions in Uyger Women and its Clinical Significance// WU Xin-xin, Mayinuer Niyazi, ZHU Kai-chun, et al.

吴欣欣¹, 玛依努尔·尼牙孜², 朱开春², 马正海³

(1.石河子大学,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 830000;

3.新疆大学生命科学与技术学院,新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: [目的] 检测新疆维吾尔族宫颈癌及癌前病变患者人乳头状瘤病毒 16 型(HPV16)存在状态,探索其与维族宫颈病变进展关系。[方法] 对 HPV16 阳性维族宫颈鳞癌(SCC)和宫颈上皮内瘤变(CIN)活检标本采用多重实时 PCR 检测 HPV16 E2 和 E6 拷贝数,通过 E2/E6 比值判断 HPV16 DNA 的存在状态。[结果] 随着宫颈病变程度加重,游离型 HPV16 逐渐减少,并且随着宫颈病变级别的升高,HPV16 整合比率(混合型+整合型)逐渐上升。在 CIN I、CIN II/III、SCC 以及宫颈癌 I~IV 期中,整合率(1-E2/E6)都呈上升趋势,但无统计学差异。[结论] HPV16 E2 基因断裂可能是新疆维吾尔族妇女宫颈癌的致病因素之一,但尚不能认为整合率是评价维吾尔族宫颈癌前病变进展的参考指标之一。

关键词: 宫颈病变;HPV16;整合;多重实时 PCR

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)05-0394-04

新疆是中国宫颈癌的高发地区之一^[1]。新疆维吾尔族女性宫颈癌患病率为 459/10 万~527/10 万^[2],明显高于全国 138.74/10 万^[4]。1992 年 WHO 宣布人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是引起宫颈癌变的首要因素。众多学者进一步报道,高危型 HPV E2 基因的断裂是宫颈癌发病的首要因素。随宫颈病变程度的加重,E2 基因断裂概率增大^[5]。本研究对新疆维吾尔族妇女宫颈病变组织中 HPV16 的存在状态进行检测,分析其与宫颈病变的关系。

1 材料与方法

1.1 标本

组织标本来自 2010 年 8 月至 2011 年 3 月就诊于新疆维吾尔自治区人民医院妇科 51 例维吾尔

族宫颈癌和 54 例癌前病变患者活检或手术标本,经两名病理科高级医师复片。取活检前或术前患者未进行放、化疗。孕妇、免疫功能不全和有过宫颈手术的患者排除。标本于-80℃保存。

1.2 主要试剂及器材

TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)购自天根生物有限公司,PCR SuperMix 购自上海英骏生物技术有限公司,HPV16 URR 引物由上海生工生物有限公司合成,HPV16 E2 E6 引物、探针和 Realtime PCR SuperMix 由大连宝生物有限公司合成并订购,pCR®-XL-TOPO® 3.5kb 质粒及 Siha 细胞株 DNA 为新疆大学生命科学院基因工程国家重点实验室惠赠。使用东盛公司 PCR 仪器及 ABI7500 荧光定量 PCR 仪器。

1.3 宫颈病变组织 DNA 的提取

按照“TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)”说明书进行。制备得到 DNA 溶液-80℃保存备用。

收稿日期:2011-12-15;修回日期:2011-03-12

基金项目:国家自然科学基金(81050021)

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

1.4 PCR 检测 HPV16 阳性样本

根据德国株 HPV16 URR 基因序列设计引物(见表 1),以上述方法提取的新疆维吾尔族宫颈癌(51 例)及宫颈 CIN 病变组织(54 例)DNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增参数:95℃ 5min;94℃ 30s,49℃ 30s,72℃ 1min,35 个循环;72℃ 7min。0.7%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 多重实时 PCR 检测 HPV-16 阳性标本的 E2、E6 拷贝数

1.5.1 阳性标准品制备

经仪器核算定量 pCR® -XL-TOP0® 3.5kb 质粒(以后称标准质粒)DNA 的浓度为 283ng/μl,根据公式拷贝数=质量(g)×6.23×10²³/324.5×2×质粒 DNA 长度(6.23×10²³ 为 1 摩尔物质的分子数,324.5 为碱基的平均分子量),计算标准质粒的拷贝数为 4.8×10¹⁰copies/μl,-20℃保存标准质粒。实时 PCR 实验中,标准质粒按 10 倍梯度进行稀释,以 4.8×10³copies/μl~4.8×10⁰copies/μl,7 个浓度的标准模板系列作为标准品,每个浓度标准品重复检测 3 次。

1.5.2 多重实时 PCR 检测

在同一反应管内行实时 PCR 检测样本 HPV16 E2、E6 基因拷贝数:总反应体系为 30μl,包括模板 2μl,0.2μmol/L E2 上、下游引物,0.2μmol/L E6 上、下游引物,0.33μmol/L E2、E6 Taq Man 探针,15μl Premix Ex Taq™ (2×),0.6μl ROX Reference Dye (50×),9μl 无 RNAase 去离子水。多重实时 PCR 扩增参数为:95℃预变性 30s,95℃变性 5s,58℃退火 34s,72℃延伸 30s,40 次循环扩增反应。对标准品同法操作。在退火阶段,计算机系统检测得到各反应管的荧光信号,并根据标准曲线计算出各样本的 E2、E6 拷贝数。每批标本均设阳性对照和阴性对照,系统阳性对照为标准质粒(0.28ng/μl),系统阴性对照为模板是无菌水的反应体系,样品阴性对照为 Siha 细胞

株 DNA。

1.6 统计学处理

数据分析采用 SPSS17.0 软件,应用秩和检验、单因素方差分析等统计学方法对不同类型的数据进行处理,P<0.05 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 结果

PCR 产物电泳结果可见约 730bp 的片段,与预期的 HPV16 URR 基因片段大小相符,该标本即判断为 HPV16 阳性。

在 54 例宫颈 CIN 病变患者中,32 例(59.3%)为 HPV16 阳性,其中 CIN I 6 例,CIN II 6 例,CIN III 20 例。在 51 例宫颈癌患者中,44 例(86.3%)为 HPV16 阳性。

2.2 多重实时 PCR 结果

2.2.1 标准曲线

标准质粒 E2、E6 多重实时 PCR 扩增产生的标准曲线,由计算机数字系统生成的该 E2、E6 基因片段的方程分别为:

$$Ct = -3.34 \log X_0 + 40.461,$$

$$Ct = -3.417 \log X_0 + 40.521$$

X₀ 为起始拷贝数,Ct(Cycle threshold):反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

根据方程及计算机检测到的各管 Ct,可以计算出各管的 E2、E6 起始拷贝数,从而求得 20 个 E2/E6 值(一个最低浓度的标准品 E6 基因未检测到)。然后计算 20 个 E2/E6 值 95%可信区间为 0.81~1.20,以 0.81 作为区分 HPV16 游离型和整合型的临界值。

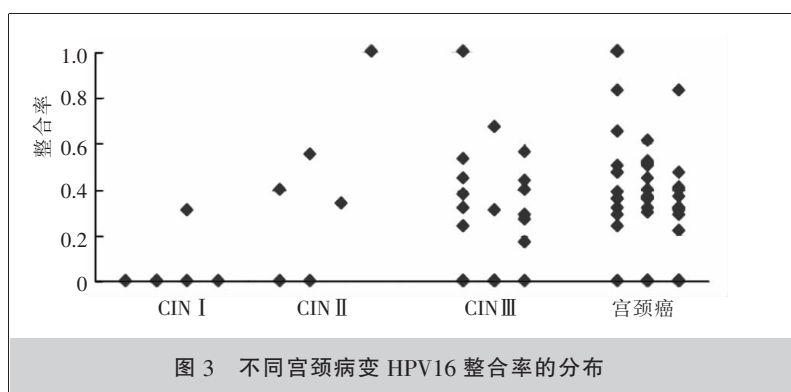
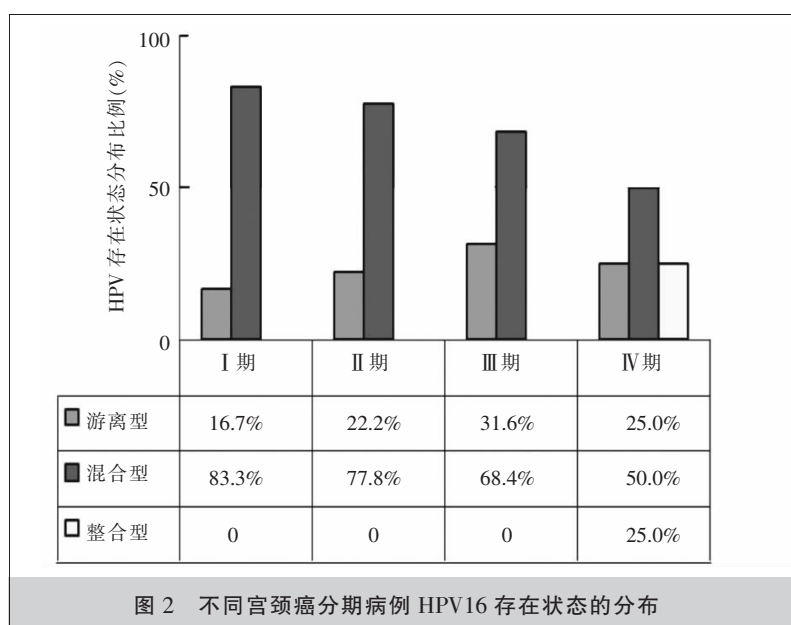
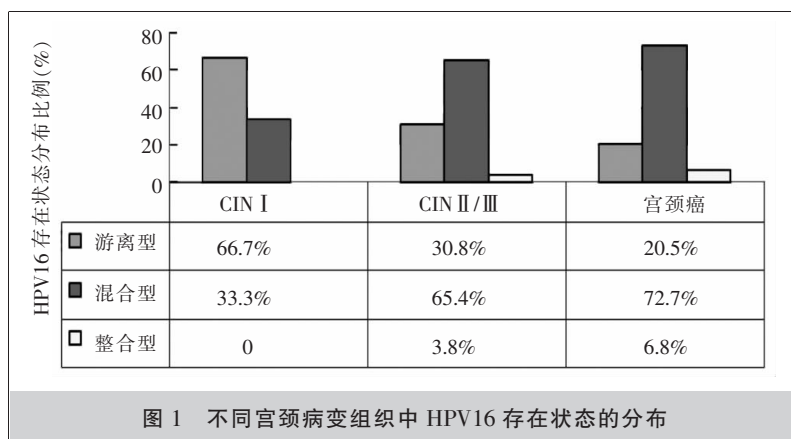
2.2.2 多重实时 PCR 检测标本

2.2.2.1 宫颈病变组织中 HPV16 的存在状态

系统阳性对照组 E2/E6=0.96,系统阴性对照组均检测不到 E2、E6,样品阴性对照组 E2/E6=0。不同 CIN 病变和宫颈癌中 HPV16 存在状态分布有显著性差异(秩和检验,P=0.02),见图 1。从 CIN I,CIN II/III 到宫颈癌,随着宫颈病变程度加重,游离型 HPV16 逐渐减少,整合比率(混合型+整合型)逐渐增大。不同分期

表 1 HPV16 URR、E2、E6 引物及探针的序列

扩增片段	引物及探针	序 列	扩增片段大小(bp)
HPV16 URR	上游引物	5'-GCTTGTGTAAGTATTGTGTCA-3'	730
	下游引物	5'-GTCCTGAAACATTGCAGTTCTCT-3'	
HPV16 E2	上游引物	5'-GAAACACAGACGACTATCCA-3'	195
	下游引物	5'-TCCGTCCTTTGTGTGAGCTGT-3'	
HPV16 E6	探针	5'-HEX-CCAAGATCAGAGCCAGACAC-Eclipse-3'	132
	上游引物	5'-GAATGTGTGTAAGCA-3'	
	下游引物	5'-GTTGTATTGCTGTCTAATGTTGT-3'	
	探针	5'-FAM-CAGCATATGGATTCCCATCTC-Eclipse-3'	



宫颈癌中 HPV16 的分布见图 2,整合比率无统计学差异(秩和检验, $P>0.05$),但晚期病例出现整合型,即 HPV16 全部断裂。

2.2.2.2 宫颈病变组织中 HPV16 E2/E6 比值

定义整合率为 $1-E2/E6$ 。CIN I、CIN II、CIN III、

宫颈癌中整合率的分布见图 3,在 CIN I 中整合率均不超过 0.5,CIN I、CIN II/III、SCC 组中整合率平均数分别为 0.2695、0.3688 和 0.4136,各组间整合率无统计学差异($P=0.39$)。I 期、II 期、III 期、IV 期宫颈癌中整合率平均数分别为 0.1467、0.3267、0.3563 和 0.4125,随着分期加重,整合率均有增大趋势,但各临床期别间整合率亦无统计学差异($P=0.87$)。

3 讨论

人乳头状瘤病毒(human papillomavirus,HPV) 是一类含双链环状 DNA 核的衣壳病毒,按功能可将其分为 3 个基因区,分别为上游调控区(upstream regulatory region,URR)、早期基因区(early region genes,E 区)和晚期基因区(late region genes,L 区)。E 区编码早期蛋白,为 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7,主要参与病毒 DNA 复制、转录和细胞转化。L 区编码晚期衣壳蛋白 L1 和 L2,主要参与病毒颗粒的组装和 DNA 包装。其中 E2、E6、E7 与宫颈癌致病密切相关。

E6 蛋白与一种泛素连接酶结合形成 E6·AP 复合物,E6·AP 使 p53 泛素化分解失活来发挥作用^[6]。在正常宫颈组织中,E6 表达受到 E2 蛋白的调控。E7 蛋白通过与抑癌基因 RB 蛋白结合,使 pRB 释放转录因子 E2F,E2F 使已分化了的宫颈上皮细胞重新进入 S 期。若病毒 E2 基因断裂,则解除其对 E6、E7 表达的抑制作用,逆转了 p53 和 pRb 肿瘤抑制蛋白的功能,使细胞进入增生期,甚至永生。

Li 等^[7]对 CIN I 每 4~6 个月随访 1 次,进行 18 个月的追踪研究,分析发现 HPV 持续感染和病变进展更多见于 HPV16 DNA 以整合状态存在的 CIN I 中,而不是以游离状态存在,说明高危型 HPV DNA 与宿主基因整合是引起宫颈病变进展的一个主要因素。

本研究显示 HPV16 在维吾尔族不同 CIN 病变和宫颈癌中有不同比例的存在状态,从 CIN I、CIN II/Ⅲ到宫颈癌,游离型 HPV16 逐渐减少,整合比率(混合型+整合型)逐渐增大。可见随宫颈病变程度增大,HPV16 整合比率增大。这与上述 Li 等^[7]研究结论一致。在中国,郑莹^[8]、时艳梅^[9]、李科珍^[10]等均发现,HPV16 与宿主基因组整合的发生率随病变病变级别的升高亦呈上升趋势。HPV16 与宿主基因组的整合可能是病毒致癌的早期因素。HPV16 E2 基因的断裂,可能引起了致癌蛋白 E6、E7 的过度表达,导致细胞过度增生,最终恶性变。

大部分 HPV 感染者经 8~13 个月可被清除。HPV 感染后可发生 CIN I,但大部分 CIN I 患者 3 年内可自行转归^[9],当感染持续存在,尤其是 HR-HPV 如 HPV16、HPV18 感染时,CIN I 可进展为 CIN II/Ⅲ,进而发生宫颈癌。

HPV16 整合比率反映其在不同级别宫颈病变组织上整合的难易程度。本研究中 CIN I、CIN II、CIN III、宫颈癌中整合率均数无统计学差异,即在各级宫颈病变中 HPV16 与宿主整合程度无显著性差异,可能与样本量较少有关。但从整合率的分布来看,在 CIN I 中整合率均不超过 0.5,故当整合率超过 0.5 时,可视为 CIN I 向高级 CIN 病变进展的高危因素,这与 Saunier 等^[11]报道相似。本课题还发现随宫颈癌临床分期加重,整合率有增大趋势,但无统计学差异,可能与各分期中样本量较少有关。HPV16 E2 整合与维族宫颈病变进展有关,但仍有待扩大样本量继续研究。

参考文献:

- [1] 赵玲,耿力,董兆文. 国内外宫颈癌的发病状况及趋势[J]. 中国计划生育学杂志,2003,11(8):509-511.
- [2] 李庭芳,古丽娜·库尔班,古丽热沙,等. 新疆伽师县夏普桃勒乡妇女子宫颈癌防治研究[J]. 新疆医学院学报,1996,19(3):199-203.
- [3] 姜淑清,王涛,土送爱,等. 新疆策勒县宫颈癌的流行病学调查研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2006,22(5):379-381.
- [4] 曹泽毅,翁梨驹,郎景和,等. 中华妇产科学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,2004. 2012-2019.
- [5] 李慧弘,肖长义. HPV DNA 整合、E2 破坏、HPV E2/E6 比值与宫颈癌关系的研究[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(7):670-672.
- [6] 吕涛,马正海. 人乳头状瘤病毒复制机制的研究进展[J]. 生命科学,2010,22(8):743-747.
- [7] Li W, Wang W, Si M, et al. The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(12):1355-1361.
- [8] 郑莹,彭芝兰,楼江燕,等. 宫颈癌及癌前病变 HPV-16 存在状态检测的研究[J]. 中国肿瘤临床,2006,33(17):961-964.
- [9] 时艳梅,叶红,肖长义,等. 宫颈病变患者病变组织 HPV 整合状态的变化及意义[J]. 山东医药,2009,49(6):1-3.
- [10] 李科珍,金鑫,艾继辉,等. HPV 16 整合状态与宫颈癌发生的相关性研究[J]. 中国妇幼保健,2011,26(27):4241-4244.
- [11] Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(11): 3678-3685.