

HPV58 型在粤东地区宫颈癌中的病毒含量和感染状态研究

周莉, 魏晓龙, 黄萍, 关明飞

(汕头大学医学院附属肿瘤医院, 广东 汕头 515031)

摘要: [目的] 建立灵敏而稳定的人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 58 型病毒含量与整合状态检测方法, 并探讨 HPV58 型在我国粤东地区妇女宫颈癌中的感染特征。[方法] PCR 扩增 HPV58E2 和 E6 基因, PCR 产物纯化, 接入 T 载体, 构建标准品; 检测 30 例宫颈癌和 40 例对照组织样本中 HPV58 的病毒含量和整合状态。[结果] 成功构建含有 HPV58 E2 或 E6 片段的 T 载体质粒作为检测 HPV58 型的病毒含量和判断感染状态标准品。HPV58 型在宫颈癌中的感染率和病毒含量较正常宫颈组织均高, 并且 HPV58 在粤东地区宫颈癌中的感染状态以整合型(66.67%)和混合型(33.33%)为主, 和正常宫颈组织中感染状态分布有显著差异。[结论] 采用荧光定量 PCR 法所建立的 HPV58 型病毒含量和整合状态的检测方法具有灵敏性和稳定性, HPV58 型在粤东地区宫颈癌中的感染以整合状态为主。**关键词:** 人乳头状瘤病毒; 宫颈肿瘤; 病毒含量; 感染; 广东
中图分类号: R737.33; R730.231+3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)04-0268-05

Viral Load and Infection Status of HPV Type 58 in Cervical Cancer in Eastern of Guangdong Province

ZHOU Li, WEI Xiao-long, HUANG Ping, et al.

(Affiliated Cancer Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

Abstract: [Purpose] To establish a sensitive and stable method for measuring human papilloma virus (HPV) type 58 infection status of cervical cancer patients in eastern region of Guangdong province. [Methods] HPV58E2/E6 genes were amplified, PCR products were purified and linked to T vector, and constructed the standard plasmid. HPV58 viral load and infection status of 30 cervical cancer patients and 40 controls were detected. [Results] The standard plasmid of real-time fluorescence quantitative PCR for detecting HPV58 E2/E6 fragments was stable and sensitive. HPV58 infection rate and viral load in cervical carcinoma were higher than those of controls. Further, HPV58 infection status were integrated (66.67%) and mixed status (33.33%) in cervical cancer, which were different from controls. [Conclusion] The standard plasmid of fluorescence quantitative PCR is a high sensitivity and stability method to detect HPV58 virus load and infection status, and integration status is the main infection status of HPV58 in the cervical cancer patients in eastern region of Guangdong province.

Subject words: human papillomavirus; cervical neoplasms; viral loads; infection; Guangdong

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 威胁着我国妇女健康和生存质量。其发病率在女性恶性肿瘤中居第 2 位, 且发病年龄有年轻化趋势^[1]。因此, 宫颈癌的防治工作刻不容缓。人乳头状瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 高危型持续性感染是宫颈癌发生的首要因素且为始动因素。然而世界各地

HPV 各型的感染率差别较大, 给宫颈癌疫苗的研制和应用带来一定的困难。课题组前期 Meta 分析显示, 在我国南方地区, 特别是粤东地区宫颈癌患者 HPV58 型感染率仅次于 HPV16 型, 居宫颈癌高危型 HPV 感染率第 2 位^[2], 但 HPV58 型在肿瘤组织中的病毒负荷及整合状态还不清楚。本文旨在建立灵敏而稳定的 HPV58 型病毒含量与整合状态检测方法, 了解粤东地区妇女宫颈癌中 HPV58 型感染特征, 包括感染率、病毒含量和整合量, 为粤东地区宫颈癌防治工作的顺利进行提供完善而可靠的数据。

基金项目: 广东省汕头市科技计划项目(汕府科 201146 号)

通讯作者: 周莉, 主任医师, 硕士; 汕头大学医学院附属肿瘤医院妇科, 广东省汕头市饶平路 7 号 (515041); E-mail: zlyy-
zl@126.com。

收稿日期: 2012-11-22; **修回日期:** 2013-01-23

1 材料与方 法

1.1 病例资料

选取 2009 年 1 月~2011 年 2 月在汕头大学医学院附属肿瘤医院行广泛性子宫切除术后获得的宫颈癌新鲜组织 30 例,取同期因子宫肌瘤行全子宫切除的正常宫颈组织 40 例为正常对照。所有标本均经病理学证实。其中宫颈癌患者 32~64 岁,中位年龄 45.8 岁,标本组织取材前均未行化疗或放疗;对照组为 34~49 岁,中位年龄 43.3 岁。所有标本取材后立即保存于-80℃冰箱中。

1.2 实验方法

1.2.1 组织 DNA 提取

组织标本取 20mg,采用安徽优品生物工程有限公司的组织 DNA 提取试剂盒 (JYZ-2-1-3)说明书操作,提取后的组织 DNA 于超微量紫外/可见光分光光度计(Nano Drop 200C,Thermo)检测其 DNA 的质量和浓度。

1.2.2 HPV58E6 和 E2 质粒的制备

HPV58E6 和 E2 标准品参考文献 [2]。HPV58 E6 引物序列: F: 5'-ATGTGACAGCTCAGACGAGG-3', R: 5' -CAGCTGCTGTAGGGTTCGT-3'; HPV58 E2 引

物序列 F:5'-GTGGGTAGTCGGGTAA-3',R: 5' -TCGTCGTCGCTTTG-3'。以经过 PCR 验证单一感染 HPV58 的宫颈癌组织 DNA 为模板,采用普通 PCR 方法扩增获得大量 HPV58 E6 和 E2 基因片段。PCR 产物经切胶回收后分别与 pMD™ 18-T Simple Vector [Takara Biotechnology (DALIAN) Co.,Japan] 载体连接,转化入 DH5α 感受态大肠杆菌,经氨苄青霉素培养皿筛选,挑取阳性克隆摇菌提质粒,经 PCR 初步鉴定阳性者,送公司测序鉴定 HPV58E6 和 E2 序列以及连接的正确性(Figure 1)。提取 HPV58E6 和 E2 重组质粒,在分光光度仪上测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 的值,计算纯化质粒的拷贝数。按 10¹⁰、10⁸、10⁶、10⁴、10² 和 1 拷贝数进行稀释,制成标准模板系列作为标准品,-80℃保存。

1.2.3 定量 PCR 法确定 HPV58 的病毒含量和整合状态

操作方法同参考文献[3]。以每个拷贝数的标准品为模板进行荧光定量 PCR 扩增,反应体积为 20μl,反应体系: SYBR Premix Ex Taq 10μl, 上游引物 F (10μmol /L) 0.4μl, 下游引物 R (10μmol /L) 0.4μl, ROX Reference Dye II (50×) 0.4μl, 模版 1μl, ddH₂O 7.8μl;以 β-globin 为内参。反应条件为: 95℃预变性

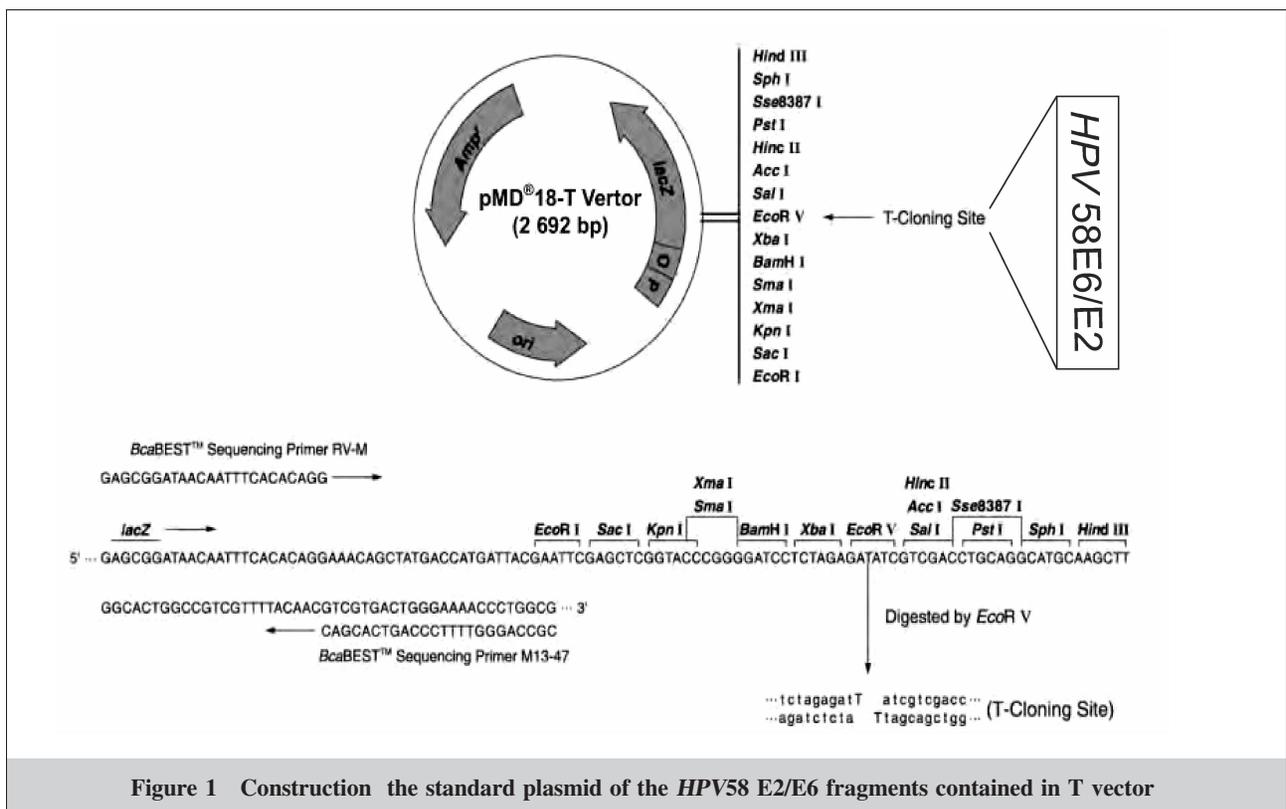


Figure 1 Construction the standard plasmid of the HPV58 E2/E6 fragments contained in T vector

0.5s; 95℃变性 5s, 56℃复性 31s, 40 个循环; 95℃变性 15s, 60 变性 60s, 95℃变性 15s, 作溶解曲线。

每个浓度的标准品重复检测 3 次, 根据 6 个标准品的 Ct 值来分别绘制 E2 和 E6 拷贝数的标准曲线。根据每一待检标本的扩增曲线所确定的 E2 和 E6 Ct 值计算出各模板的 E2、E6 起始拷贝数。同时对于每个样本相对应的内参 (看家基因 β -globin) 也有一个定量值, 该内参的定量值可以反映出对应标本的宫颈细胞数。同一样本的 HPV58 E6 定量值除以 β -globin 定量值, 即为每个细胞的病毒负载量。计算出每一待检标准品的 E2 和 E6 拷贝数比值 (E2 / E6 比值) 以区分 HPV 游离和混合状态的 E2 / E6 比值, 采用标准品 E2 / E6 比值的 95% 参考值范围的下限为判断标准^[4]。对于 HPV58 整合状态的判断为: 7 个相同浓度下分别换算的 E2 和 E6 拷贝数比值, 均介于 0.7801 ~ 1.1747 之间, 其均值为 0.892 ± 0.112 , 定义为游离型 HPV58 病毒感染。HPV58 E2 为 0 时的 Ct 值和其他浓度的 HPV58 E6 的 Ct 比值, 均小于 0.001, 定义为整合型 HPV58 病毒感染; 而 HPV58 E2/E6 介于 0.0001 和 0.7801 之间的定义为混合型 (整合型和游离型并存状态) HPV58 病毒感染。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS16.0 统计软件, HPV58 E2 和 E6 标准曲线采用相关性检验, 正常宫颈组织和宫颈癌中 HPV58 型感染状态的比较采用 Kruskal-Wallis H 检验; 病毒负载量比较采用 t 检验。显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ (双侧), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV58 病毒感染含量和感染状态的确定

HPV58 E2、E6 PCR 扩增产物经纯化, 转化接入 Teay 载体, 摇菌扩增后提取质粒 DNA 分别送测序, 序列结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析, 结果表明 HPV58 E2、E6 质粒正确构建, 证实构建质粒可以作为标准品。

对每个浓度的 HPV58 E6 和 E2 标准品分别进行了 3 次重复定量 PCR 扩增, 分别得到拷贝数和 Ct 值之间的标准曲线, 及其相关系数分别为 0.9703 和

0.9977 (Figure 2), 相关性检验 $P < 0.05$, 说明 E2 和 E6 作为检测 HPV58 的病毒含量和整合标准品稳定性好。

2.2 宫颈癌中 HPV58 病毒含量和感染状态分析

本研究发现, 在粤东地区宫颈癌和正常宫颈组织中 HPV58 的感染率分别为 20.00% (6/30) 和 5.00% (2/40), 其病毒含量分别是 (223.62 ± 503.43) copy/cell (4.11 ~ 1439.33 copy/cell) 和 (53.79 ± 74.67) copy/cell (0.99 ~ 106.59 copy/cell); HPV58 在宫颈癌中的感染率和病毒含量均高于正常宫颈组织, 统计学分析有显著性差异。其感染状态在宫颈癌中 66.67% 为整合状态, 33.33% 为混合状态; 而在正常宫颈组织中 50.00% 为游离状态, 50.00% 为混合状态, 其感染状态分布有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

HPV DNA 整合入宿主基因组被认为发生于宫颈癌发展的早期阶段, 也是宫颈病变恶性转化的重要因素^[5]。目前有关 HPV 整合状态的研究主要集中于 HPV16 型。多项研究结果发现, HPV16 型在正常宫颈组织或低级别的宫颈上皮内瘤变组织中大多处于游离状态, 很容易随上皮老化而被排除。而在部分高级别的宫颈上皮内瘤变或宫颈癌中 HPV16 型则以整合状态的形式存在, HPV16 E6/E7 片段插入宿主基因组, 从而引起宿主正常细胞某些基因表达失调或活化, 诱导细胞发生恶性转化, 这已成为高危型 HPV 相关恶性肿瘤发病机制的主要诱因之一。

本课题组前期 Meta 分析发现, HPV58 型是我国南方、特别是粤东地区妇女下生殖道仅次于 HPV16 型感染的常见 HPV 亚型, 且 HPV58 型感染与宫颈上皮内瘤样变 (CIN) 及宫颈癌发生显著相关, 其感染率随宫颈病变程度加重而升高, 该结果和川北地区一致^[6]。为进一步探明 HPV58 在粤东地区宫颈癌中的感染病毒含量和感染状态, 本研究首先构建 HPV58 E2 和 E6 的标准品, 采用实时定量 PCR 法绘制标准曲线, 通过换算建立 HPV58 型的感染量和整合量的预测模型, 为研究粤东地区妇女宫颈癌中 HPV58 的感染状态提供了方法。实时定量荧光 PCR 是迄今为止定量最准确、重复性最好的定量方法, 已得到全世界的公认^[4]。与普通 PCR 相比, 实

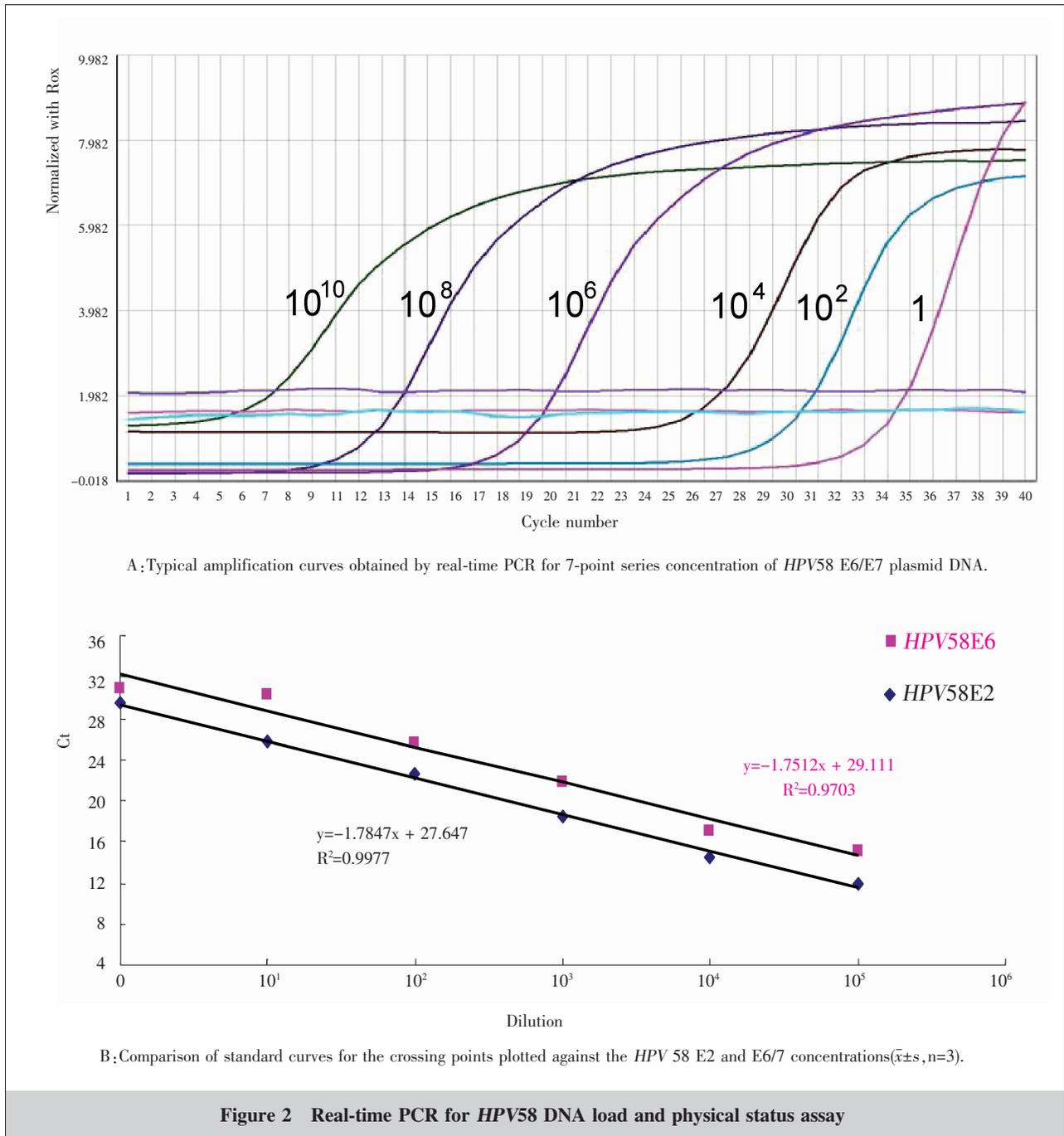


Figure 2 Real-time PCR for HPV58 DNA load and physical status assay

时定量 PCR 敏感性高, 对检测结果的判断明确, 有较高的特异性和可靠性, 并可用于多种临床标本的检测。本研究发现 HPV58E2/E6 标准曲线相关性好, 证明本课题组构建的质粒可以作为标准品应用于病毒含量和整合的检测, 能够对 HPV58E2/E6 基因进行准确的定量, 结果具有可信性。本课题组构建的标准品检测方法可以在并存大量游离 HPV 病毒时, 也能检测到少量整合病毒的存在。HPV58 在宫颈癌中

的感染率 (20.00%) 和病毒含量均高于正常宫颈组织, 低于我们前期的报道 HPV16 的感染率 (48.72%), 但稍高于 HPV18 的感染率 (18.95%)^[3]。其中 HPV58 在粤东地区宫颈癌中的感染率略高于台湾地区 HPV58 型的感染率 (16.5%, 350/2188)^[7], 和中国山西地区、香港地区、韩国及其他亚洲地区宫颈癌中的感染率相当^[8-10]。

本研究结果发现在粤东地区宫颈癌患者组织中

HPV58 的病毒含量是 (223.62 ± 503.43) copy/ cell, 显著高于正常对照组, 但和课题组前期报道的 HPV16 型和 18 型病毒含量无显著性差异^[3]。结合 HPV 存在状态, 即整合入宿主基因组与否, 我们发现粤东地区宫颈癌患者组织样本中 66.67% 为整合状态的 HPV58, 33.33% 为混合状态 (即部分整合, 部分游离状态)。大量 HPV58 基因整合入宿主基因组后, 稳定表达的 E6 或 E7 癌蛋白, 可结合并诱导经泛素介导的 p53 蛋白降解, 并结合非磷酸化的 pRb 分子, 释出 E2F 转录因子, 从而使正常宫颈上皮细胞周期调控紊乱和细胞凋亡受阻, 以致最终导致细胞发生恶性转化。另外 HPV58 还可通过调控 p21 蛋白的表达, 进一步加快细胞的恶性转化过程^[11]。

虽然, 目前对于高危型 HPV 病毒负载量、整合状态与宫颈癌发生及癌前病变之间的关系, 仍有争议。有学者认为宫颈癌发生发展过程中 HPV 整合并非必要因素。但越来越多的研究结果证实, 高病毒负载可导致病毒复制及支持病毒持续存在, 抑制机体的免疫反应, 从而减少病毒清除和细胞学转归的机会。高病毒负载和大量癌基因整合入宿主基因组更易造成持续和反复感染^[12, 13]。

检测 HPV58 型在粤东地区宫颈癌的感染状态, 建立 HPV58 病毒含量和整合状态的预测模型, 将有利于预测宫颈癌前病变的转归和提高本地区宫颈癌筛查的准确性, 为宫颈癌的早期诊断、早期治疗、预后评估及疾病预防提供更为有力的实验室证据。

参考文献:

- [1] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9): 533-543.
- [2] Zhang DH, Lin MS. Meta-analysis of human papillomavirus (HPV) prevalence and type distribution in cervical lesions in chinese population [J]. *Chinese General Practice*, 2010, 13(4C): 1287-1290. [张东红, 林美珊. 人乳头瘤病毒在国人宫颈病变中感染及型别分布特征的 Meta 分析[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(4C): 1287-1290.]
- [3] Zhang D, Zhang Q, Zhou L, et al. Comparison of prevalence, viral load, physical status and expression of human papillomavirus-16, -18 and -58 in esophageal and cervical cancer: a case-control study [J]. *BMC Cancer*, 2010, 26(10): 650.
- [4] Manawapat A, Stubenrauch F, Russ R, et al. Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study [J]. *Am J Cancer Res*, 2012, 2(2): 192-203.
- [5] Hamid NA, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(10): 1700-1717.
- [6] Ren Y, Zhang L, Yang JR, et al. Investigation on infection of human papillomavirus in cervical cancer tissues in North of Sichuan [J]. *Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics*, 2006, 22(8): 617-618. [任源, 张玲, 杨晋蓉, 等. 川北地区 68 例宫颈癌组织人乳头瘤病毒感染调查 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2006, 22(8): 617-618.]
- [7] Chao A, Jao MS, Huang CC, et al. Human papillomavirus genotype in cervical intraepithelial neoplasia grades 2 and 3 of Taiwanese women [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(3): 653-659.
- [8] Chan PK, Mak KH, Cheung JL, et al. Genotype spectrum of cervical human papillomavirus infection among sexually transmitted disease clinic patients in Hong Kong [J]. *J Med Virol*, 2002, 68(2): 273-277.
- [9] Jou O. The prognosis of the HPV infected cervical lesions after followed-up for a long term [J]. *J Saitama Med School*, 2003, 30(2): 147-153.
- [10] Cho NH, An HJ, Jeong JK, et al. Genotyping of 22 human papillomavirus types by DNA chip in Korean women: comparison with cytologic diagnosis [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 188(1): 56-62.
- [11] Li H, Zhang R, Cai Y, et al. Determination of integrated HPV58 sequences in cervical lesions [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012, 22(7): 1234-1237.
- [12] Chan PK. Human papillomavirus type 58: the unique role in cervical cancers in East Asia [J]. *Cell Biosci*, 2012, 2(1): 17.
- [13] Schmitz M, Driesch C, Beer-Grondke K, et al. Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(5): E593-602.