

论著·临床研究

不同程度宫颈病变单一、多重高危型 HPV 感染状态下 E6/E7 mRNA 的表达*

莫小亮¹, 罗殿中^{2△}, 党裔武², 王 莉²

(广西医科大学第一附属医院:1. 妇产科;2. 病理科, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨不同程度宫颈病变的 HPV 基因型分布特点及高危型 HPV E6/E7 mRNA 在单一、多重感染病例中的表达, 以及其对 HPV 致病力的影响。方法 收集不同程度宫颈病变石蜡组织标本共 236 份。采用基因芯片技术对 236 份标本进行 23 种 HPV 基因型分型检测, 并采用 Taqman 逆转录-PCR 技术测定高危型 HPV E6/E7 mRNA 的表达。结果 HPV 阳性率为 65.3%(154/236), 其中包含了 233 个 HPV 亚型(单一或多种)感染, 60.9%(142/233)病例可检测出 E6/E7 mRNA 的表达, HPV 阳性率和 E6/E7 mRNA 表达水平随宫颈病变级别的上升而升高($P < 0.05$)。在大于或等于 CIN II 的高危亚型感染病例中, HPV45 的 E6/E7 mRNA 表达率最高(93.3%), 其次为 HPV16(81.0%)、HPV18(78.4%)。在大于或等于 CIN II 的病变中, 93.7%(118/126)病例可检测到 E6/E7 mRNA 的表达, 而小于 CIN II 的病变中仅有 39.3%(11/28)的病例可检测到 E6/E7 mRNA 的表达。在所有不同程度宫颈病变中, 多重感染病例 E6/E7 mRNA 表达率较单一感染病例高(61.2% vs. 38.8%, $P < 0.05$)。结论 在任何程度的宫颈病变中, HPV 多重感染, 尤其 HPV45 的 E6/E7 mRNA 高表达水平可能会提高 HPV 的致病力。

关键词: 宫颈病变; HPV; 基因型; E6/E7 mRNA

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.18.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)18-2268-04

Expression of E6/E7 mRNA in single or multiple high-risk HPV infection in different degrees of cervical lesions*

Mo Xiaoliang¹, Luo Dianzhong^{2△}, Dang Yiwu², Wang Li²

(1. Department of Gynecology and Obstetrics; 2. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the HPV genotype distribution characteristics in the patients with different degrees of cervical diseases and the expression of high-risk HPV E6/E7 mRNA in the patients with single or multiple infections and its influence on the HPV pathogenicity. **Methods** A total of 236 formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were collected from women with different degrees of cervical diseases. The gene chip technique was adopted to conduct the genotype detection. The in 23 kinds of HPV genotype on 236 specimens. The TaqmanRT-PCR technique was adopted to measure the expression of high-risk HPV E6/E7 mRNA. **Results** The HPV positive rate was 65.3%(154/236), including 233 cases of HPV subgenotype infection(single or multiple), the expression of HPV E6/E7 mRNA was detected in 60.9% of cases(142/233), the HPV positive rate and the expression level of HPV E6/E7 mRNA were increased with the increase of the cervical lesion grade($P < 0.05$). In the high-risk infection cases of lesion \geq CIN II, the expression rate of HPV45 E6/E7 mRNA was highest(93.3%), followed by HPV16(81.0%) and HPV18(78.4%). In the lesions \geq CIN II, the expression of E6/E7 mRNA was detected in 93.7% of cases(118/126), while which in lesions $<$ CIN II was detected in only 39.3% of cases(11/28). In different degrees of cervical lesions, the expression rate of E6/E7 mRNA in the cases of multiple infection was higher than that in the caes of single infection(61.2% vs. 38.8%, $P < 0.05$). **Conclusion** In any degree of cervical lesion, HPV multiple infection, especially high expression level of HPV45 E6/E7 mRNA could increase the HPV pathogenicity.

Key words: cervical lesion; HPV; genotype; E6/E7 mRNA

宫颈癌的发生、发展是一个长期、渐变的过程, 是多种致癌因素长期协同作用的结果, 其中高危型 HPV E6、E7 癌基因的持续表达是宫颈细胞恶性转化和维持恶性表型的关键因素^[1]。本研究对 236 例不同程度宫颈病变患者石蜡组织标本进行 HPV 基因型分型检测, 并测定其表达水平, 旨在探讨不同程度宫颈病变的 HPV 基因型分布特点, 高危型 HPV E6/E7 mRNA 在单一、多重感染病例中的表达及其对高危型 HPV 致病力的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取广西医科大学第一附属医院病理科

2009~2012 年存档宫颈病变[宫颈炎、宫颈上皮内瘤变(CIN)、宫颈癌]石蜡包埋组织 539 份, 所有病例均经过严格初筛及复筛, 初筛排除宫颈息肉、宫颈尖锐湿疣、复合病变病例, 复筛剔除组织较小及片内坏死和纤维成分较多的样本, 所有病例 HE 染色切片均由 2 名高级病理医师独立阅片, 剔除病理诊断或者病理分级有差别, 或者与原病理诊断有差别病例。通过排除筛选后最终纳入 236 例宫颈病变患者石蜡包埋组织, 包括宫颈炎 41 例, 平均年龄(34.2 ± 11.0)岁; CIN I 级 45 例, 平均年龄(35.11 ± 10.4)岁; CIN II 级 42 例, 平均年龄(40.9 ± 9.9)岁; CIN III 级 41 例, 平均年龄(45.6 ± 8.7)岁; 宫颈鳞癌 39 例,

* 基金项目: 广西自然科学基金资助项目(2013 GXNSFAA019254)。 作者简介: 莫小亮(1980-), 在读博士, 主治医师, 主要从事宫颈肿瘤分子生物学方面的研究。 △ 通讯作者, Tel: 13978802796; E-mail: 13978802796@163.com。

平均年龄(47.4 ± 10.3)岁;腺癌 28 例,平均年龄(45.9 ± 8.1)岁。

1.2 方法

1.2.1 HPV 分型检测 (1)主要仪器、设备和试剂:490 型包埋机(日本 SAKURA FINETECHNICAL 公司)、Microm HM325 型病理组织石蜡切片机(德国 Leica 公司)、DMR+550 型病理图像分析仪(德国 Leica 公司)、PTC-200PCR 仪(MJ-Research 公司)、TC-9600-G-230V PCR 仪(LABNET 公司)、Combi-D24 分子杂交炉(韩国 FINEPCR)、HPV 分型检测试剂盒(深圳亚能生物技术有限公司)。(2)实验方法:去除石蜡组织表层及周边多余的石蜡后进行 5 μm 连续切片,将前 5 片装至 1.5 mL 离心管中待检测。基因芯片分型检测操作步骤按照试剂盒说明书进行,包括 DNA 提取、PCR 扩增、膜杂交、洗膜、显色、结果判读系列过程。每张膜条在 PC(阳性对照)位点处均应出现蓝色斑点,空白对照除 PC 位点外,其他位点均不显色,此次检测结果视为有效,有斑点显现的位置即可断定 HPV 基因型^[2]。

1.2.2 高危型 HPV E6/E7 mRNA 的表达测定 (1)主要仪器、设备和试剂。PTC-200PCR 仪(MJ-Research 公司)、TC-9600-G-230V PCR 仪(LABNET 公司)、离心机、石蜡组织 RNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司)、逆转录试剂盒(Fer-

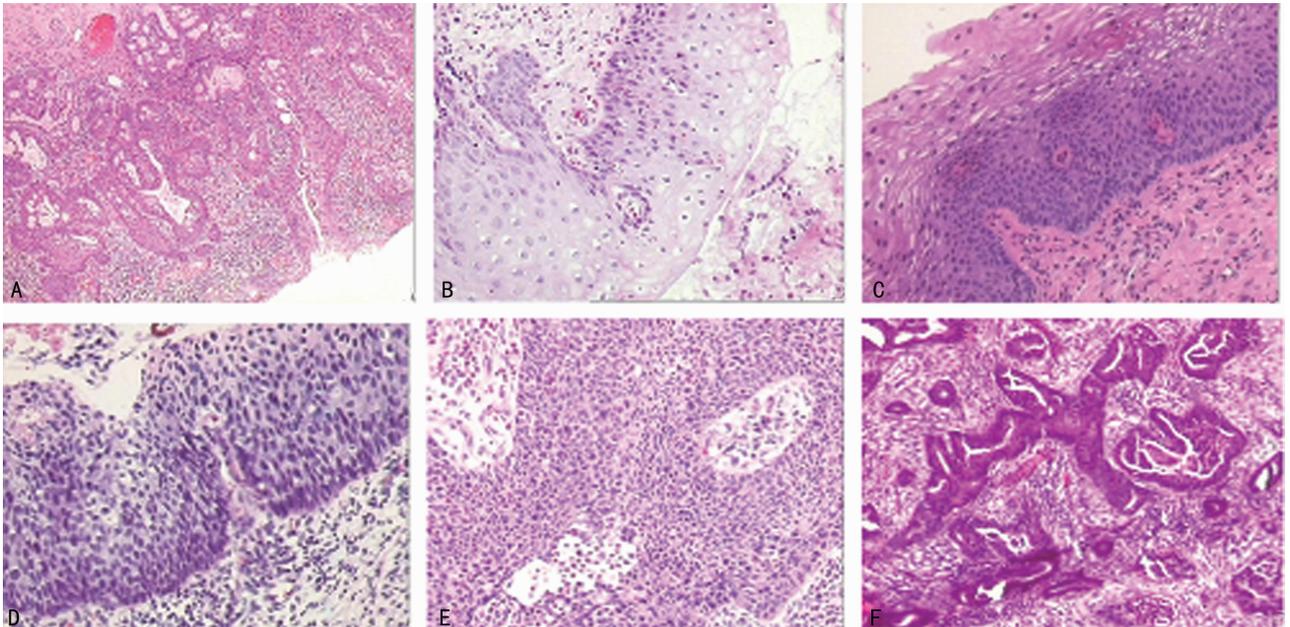
mentas)、荧光定量 PCR 试剂盒(上海吉玛)、琼脂糖、golden-view、Marker 等。(2)实验方法。①引物设计,参照文献[3]合成 12 个高危型 HPV(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59)的引物和荧光标记探针(上海生工生物工程公司)。② RNA 提取,按照 RNA 提取试剂盒说明书上的步骤进行。③ 逆转录,按照试剂盒说明书上的步骤进行。20 μL 逆转录反应体系:2×逆转录缓冲液 10 μL、逆转录引物(1 μmol) 1.2 μL、总 RNA 2 μL、MMLV 逆转录酶(200 U/μL)0.2 μL、DEPC 水加至 20 μL。逆转录反应条件:42 °C 30 min;85 °C 10 min。④ 实时荧光定量 20 μL 反应体系:2× 定量 PCR Master Mix 10 μL,上游引物(20 μmol) 0.08 μL、下游引物(20 μmol)0.08 μL,cDNA 模板 2 μL,Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL) 0.4 μL,探针 5.0 μL,dd H₂O 加至 20 μL。反应条件:95 °C 3 min,95 °C 12 s,62 °C 40 s,共 40 个循环。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件分析数据,采用 Fisher 确切概率法对数据进行统计分析,检验水准 α=0.05,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同程度宫颈病变 HE 染色病理切片 见图 1。

2.2 HPV 基因芯片分型结果 见表 1。



A:宫颈炎;B:CIN I级;C:CIN II级;D:CIN III级;E:宫颈鳞状细胞癌;F:宫颈腺癌。

图 1 不同程度宫颈病变 HE 染色切片

表 1 HPV 基因型分布(n)

宫颈病变程度	n	高危亚型															低危亚型				
		HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV39	HPV45	HPV51	HPV52	HPV56	HPV58	HPV59	HPV66	HPV68	HPV73	HPV6	HPV11	HPV42	HPV43	
炎症	41	7	1	0	1	0	1	1	0	1	2	1	2	0	0	0	0	1	1	0	0
CIN I	45	21	6	0	2	3	1	2	1	0	4	1	3	0	0	0	0	0	1	1	0
CIN II	42	27	8	0	3	4	2	0	3	1	3	2	4	1	1	0	1	0	2	0	0
CIN III	41	39	21	4	5	5	3	3	3	5	4	8	3	1	1	0	1	0	0	0	0
宫颈鳞癌	39	38	31	5	2	2	1	2	3	2	4	2	3	5	1	1	1	2	2	0	0
宫颈腺癌	28	22	6	16	0	1	0	1	4	2	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
合计*	236	154	73	25	13	15	8	9	14	9	19	10	21	9	3	3	2	4	7	1	1

* :由于每一个阳性样本包含 1 个或多个 HPV 亚型感染,导致各亚型感染总数为 233,大于阳性样本例数 154 例。

表 2 不同程度宫颈病变单一、多重感染 E6/E7 mRNA 表达的比较[n(%)]

宫颈病变程度	n	所有样本(n=236)		单一感染(n=122)		多重感染(n=32)	
		DNA 阳性	mRNA 表达	DNA 阳性	mRNA 表达	DNA 阳性	mRNA 表达
炎症	41	7(17.1)	1(14.3)	7(100.0)	1(100.0)	0	0
CIN I	45	21(46.7)	10(47.6)	18(85.7)	7(70.0)	3(14.3)	3(30.0)
CIN II	42	27(64.3)	24(88.9)	22(81.5)	6(25.0)	5(18.5)	18(75.0)
CIN III	41	39(95.1)	34(87.2)	27(69.2)	10(29.4)	12(30.8)	24(70.6)
宫颈鳞癌	39	38(97.4)	38(100.0)	30(79.0)	15(39.5)	8(21.0)	23(60.5)
宫颈腺癌	28	22(78.6)	22(100.0)	18(81.8)	11(50.0)	4(18.2)	11(50.0)
合计*	236	154(65.3)	129(83.8)	122(79.2)	50(38.8)	32(20.8)	79(61.2)

*: 由于每一个阳性样本包含 1 个或多个 HPV 亚型感染, 导致各亚型感染总数为 233, 大于阳性样本例数 154 例。

2.3 高危型 HPV E6/E7 mRNA 的表达 HPV 阳性率和 E6/E7 mRNA 的表达水平随宫颈病变级别上升而升高($P < 0.05$), 其中大于或等于 CIN II 的病变中, 93.7% (118/126) 的病例可检测到 E6/E7 mRNA 的表达, <CIN II 的病变中仅有 39.3% (11/28) 的病例可检测到 E6/E7 mRNA 的表达, 在不同程度宫颈病变中, E6/E7 mRNA 的表达在多重感染病例中较单一感染病例更显著(61.2% vs. 38.8%, $P < 0.05$), 见表 2。

2.4 各高危型 E6/E7 mRNA 的表达构成百分比比较 HPV45 阳性病例中 E6/E7 mRNA 表达率最高(91.7%), 其次为 HPV16、18、31、52。在 HPV16 阳性的小于 CIN II 及大于或等于 CIN II 病例中 E6/E7 mRNA 的表达(81.2% vs. 50.0%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其余亚型感染病例中小于 CIN II 及大于或等于 CIN II 组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 2。

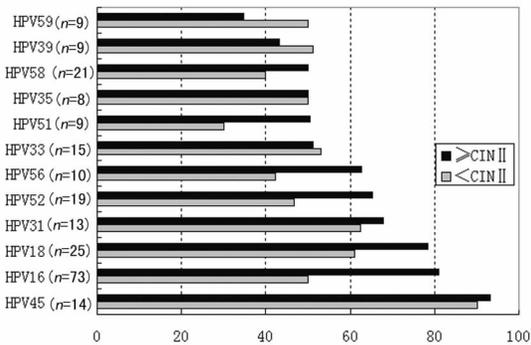


图 2 12 种高危型 HPV E6/E7 mRNA 的表达构成百分比比较

3 讨论

已有大量流行病学调查显示, HR-HPV 持续感染是主要的致病因素, 目前已发现 100 多种 HPV 基因型, 其中至少有 40 多种可侵袭生殖道, 20 余种与宫颈病变有关^[4-5]。目前关于单纯 HPV 感染的研究已经非常深入, 但关于各个 HPV 亚型的致病力、多重感染的致病机制及与其不同程度宫颈病变的相关研究仍较少。

本研究收集不同程度宫颈病变石蜡组织标本, 采用基因芯片技术对 236 份标本进行 23 种 HPV 分型检测, 并采用 Taqman 逆转录-PCR 测定 12 种高危型 HPV E6/E7 mRNA 的表达, 旨在探讨不同程度宫颈病变的 HPV 基因型分布特点, 高危型 HPV E6/E7 mRNA 在单一、多重感染病例中的表达及其对 HPV 致病力的影响。本研究检测到 HPV16、18、58、52、33

为广西前 5 种最常见的高危亚型, HPV16 居首位, 其次在 CIN 中是 HPV58, 在宫颈癌中为 HPV18, 其中宫颈腺癌与 HPV18 关系尤为密切, HPV6、11 是最常见的低危亚型, HPV 感染率随宫颈病变级别上升而升高, 高危型多重感染常见于 CIN 和宫颈癌, 这与本课题组前期工作的发现也是一致的^[6]。作者在原有工作的基础上进一步分析了不同程度宫颈病变中 12 种高危型 HPV E6/E7 mRNA 在单一、多重感染状态下的表达水平, 检测到表达 E6/E7 mRNA 的基因型与现有报道宫颈病变中常见的基因型一致^[7]: HPV16、18、31、33、35、45、52、58。本研究还发现, 在所有高危型 HPV 中 HPV45 的 E6/E7 mRNA 表达率最高, 其次为 HPV16、18、31、52。HPV45 阳性病例中能够检测到 E6/E7 mRNA 表达的样本甚至多于 HPV16 阳性病例(91.4% vs. 47.8%), 本研究还对比了 HPV16 阳性病例中小于 CIN II 及大于或等于 CIN II 病例中 E6/E7 mRNA 的表达差异(81.2% vs. 50.0%), 结果差异有统计学意义($P < 0.05$), \geq CIN II 病例中 HPV16 E6/E7 mRNA 的表达显著高于小于 CIN II 病例。HPV16 在 CIN 及宫颈癌中是最常见的基因型, 且 HPV16 阳性病例中能够检测到 E6/E7 mRNA 表达的病例数仅次于 HPV45, 这也说明 HPV16 较其他基因型来说不仅是常见的, 也是具有高度致病性的^[8]。因此推测, 虽然在感染的所有基因型中 HPV45 并不是最多见的, 但其致病力可能是由于 E6/E7 mRNA 表达水平的增加而增加^[9]。不同样本中特殊亚型的 E6/E7 mRNA 表达水平可能在致病力方面起着重要的作用。

由于不同 HPV 亚型中编码外壳蛋白的基因有很大变异性, 导致不同亚型间尚缺乏交叉保护抗体, 易造成不同高危型 HPV 多重感染, 关于 HPV 多重感染是否会增加或促进宫颈病变的发生一直是国内外学者们关注的焦点, 但目前尚未得出一致结论, Lee 等^[10]认为单一 HPV 感染可使宫颈癌的患病风险增加 19.9 倍, 而多重 HPV 感染则使患病风险增加 31.8 倍。有研究却认为 HPV 多重感染可能引起不同程度的宫颈病变, 但不增加宫颈癌及癌前病变的危险性和发生率^[11-12]。虽然宫颈病变中 HPV 多重感染是常见的, 但要确定多重基因型感染的病例中哪一个或哪几个基因型造成了细胞损伤及恶性转化却非常困难, 与以往的研究不同, 本研究致力于单独分析特殊 HPV 亚型的致病力, 并探讨多重感染的致病力的影响因素。HPV-DNA 包括早期基因区(E), 晚期基因区(L)和长控制区(LCR) 3 个部分, E 区编码 E1、E2、E4、E5、E6 及 E7 等早期蛋白, 与病毒的复制、转录、翻译调控和细胞转化有关, 其中 E6、E7 在病毒复制过程中起关键作用, 它们可以与许多蛋白分子

相互作用,并引起细胞的无限增殖和恶性转化,是主要的致癌基因^[13]。研究中发现 E6/E7 mRNA 表达多存在于所有宫颈癌及 93.7% 大于或等于 CIN II 的病例中(HPV-DNA 阳性),E6/E7 mRNA 的表达在多重感染病例中较单一感染病例更显著(61.2% vs. 38.8%, $P < 0.05$),无论在高度病变还是在低度病变中,多重感染病例较单一感染病例更易检测到 E6/E7 mRNA 表达,且若一个样本为多重感染(双重、三重或四重感染),那么多重感染中的任何一个亚型表达 E6/E7 mRNA 的概率较单一感染高,该结果与国外一些研究的结果是一致的^[14-15]。以往的工作中十分重视 HPV16、18 的检测和治疗,但从本研究结果看,不仅应着重检测本地区常见的 HPV 基因型,且 HPV45 感染尤其是合并其他多个高危亚型的多重感染应引起重视,有条件的地区可以进行高危型 HPV E6/E7 mRNA 检测,这对于高危型 HPV 致病力的评估、在宫颈病变进展过程的预测及患者的个体化诊治均具有重要的临床意义。虽然石蜡包埋组织固定、包埋技术及蜡块保存时间等因素可能会对组织中的 RNA 水平有一定影响,石蜡包埋组织中 RNA 的提取和 PCR 扩增比较困难,影响因素颇多,且目前本研究尚未能做到 mRNA 的绝对定量,但从另一个角度也可说明档存石蜡包埋组织无论对于临床还是科研来说均不失为一个很好的研究素材,几种基因型同时感染固然增加了 E6/E7 mRNA 的检出率,但也反映了多个 HPV 亚型之间可能具有某种协同效应,而此种协同效应的机制和明确究竟是哪一种基因型造成了细胞的损伤,还需要进一步研究来加以明确。

参考文献:

- [1] Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis [J]. *J virol*, 2004, 78(21):11451-11460.
- [2] Adebamowo CA, Akarolo-Anthony S. Cancer in Africa: opportunities for collaborative research and training [J]. *Afr J Med Med Sci*, 2009, 38(2):5-13.
- [3] Lindh M, Gorander S, Andersson E, et al. Realtime Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types [J]. *J Clin Virol*, 2007, 40(4):321-324.
- [4] Hovland S, Muller S, Skomedal H. E6/E7 mRNA expression analysis: A test for the objective assessment of cervical adenocarcinoma in clinical prognostic procedure [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(6):1533-1539.
- [5] 杨赞平, 杨双双, 张莉萍. 重庆地区妇女高危型 HPV 感染现状及年龄的分层分布 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(3):249-254.
- [6] 党裔武, 叶健, 陈罡, 等. 宫颈上皮内瘤变组织中人类乳头状瘤病毒分型检测的意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(23):2870-2873.
- [7] Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(4):927-935.
- [8] Sjoeborg KD, Trope A, Lie AK, et al. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 118(1):29-34.
- [9] Andersson E, Krrberg C, Rdberg T, et al. Type-dependent E6/E7 mRNA expression of single and multiple high-risk human papillomavirus infections in cervical neoplasia [J]. *J Clin Virol*, 2012, 54(1):61-65.
- [10] Lee SA, Kang D, Seo SS, et al. Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNA chip [J]. *Cancer Lett*, 2003, 198(2):187-192.
- [11] Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(6):464-474.
- [12] Bosch FX, Lorincz A, Muoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(4):244-265.
- [13] Keegan H, Mc Inerney J, Pilkington L, et al. Comparison of HPV detection technologies: hybrid capture 2, PreTect™ HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV 18 and HPV33E6/E7 mRNA positive specimens [J]. *Virol Methods*, 2009, 155(1):61-66.
- [14] Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, et al. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease [J]. *J Infect Dis* 2011, 203(7):910-920.
- [15] Spinillo A, Dal Bello B, Gardella B, et al. Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 113(1):115-119.

(收稿日期:2013-12-27 修回日期:2014-02-22)

(上接第 2267 页)

- [13] Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon: a tool for the scientist or a clinical reality [J]. *Circ Res*, 2000, 87(7):543-5501.
- [14] Graham EM, Atz AM, Gillis J. Differential effects of aprotinin and tranexamic acid on outcomes and cytokine profiles in neo-nates undergoing cardiac surgery [J]. *J*

Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 143(5):1069-1076.

- [15] 赵宇东, 李晓峰, 李仲志, 等. 逆行自体血预充和改良超滤在儿童体外循环中的应用 [J]. *中国循环杂志*, 2008, 23(1):47-49.

(收稿日期:2013-12-08 修回日期:2014-02-03)