

# 高危型人乳头状瘤病毒在子宫颈癌组织和外周血表达的意义

郑宏波<sup>1,2</sup>, 汪学龙<sup>1</sup>

[摘要]目的: 分别检测子宫颈癌组织和外周血标本中人乳头状瘤病毒(HPV)(16型, 18型), 探讨 HPV感染与子宫颈癌的关联性以及在肿瘤微转移中的表达。方法: 采用荧光定量 PCR(FQ-PCR)和逆转录 PCR(RT-PCR)技术检测 24份子宫颈癌组织及其治疗前后 48份外周血标本, 慢性宫颈炎组织及其外周血标本各 20份。结果: 24份子宫颈癌组织(I~II b期)中 HPV DNA 16型阳性率为 66.7%, HPV DNA 18型阳性率为 29.2%, 两型均阳性的阳性率为 8.3%; 48份外周血标本 HPV mRNA 16型阳性率为 2.1%; 20份慢性宫颈炎组织 HPV DNA 16型阳性率为 15.0%, HPV18型为阴性, 其外周血均为阴性。子宫颈癌 HPV DNA 16型组与慢性宫颈炎 HPV DNA 16型组比较差异有统计学意义( $P < 0.005 \sim P < 0.05$ )。结论: 高危型 HPV感染与子宫颈癌发生高度相关。外周血 HPV检出率低, 临床价值有待进一步研究。

[关键词] 子宫颈癌; 人乳头状瘤病毒; 荧光定量聚合酶链反应; 微转移

[中国图书资料分类号] R 737.33 [文献标识码] A

## Expression of high risk type human papillomavirus in the tissues and peripheral blood of cervical carcinoma

ZHENG Hongbo<sup>1,2</sup>, WANG Xue-long

(1. Department of Medical Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032

2. Department of Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] Objective: To detect expression of human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 in carcinoma tissues and peripheral blood of patients with cervical carcinomas and to explore the relationship between HPV infection and cervical carcinomas as well as its expression in tumour micrometastase. Methods: Real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect HPV in 24 cases of tissues and 48 samples of peripheral blood of cervical carcinomas and 20 cases of tissues and 20 samples of peripheral blood of chronic cervicitis. Results: In the 24 tissues of cervical carcinomas (I-II b), the positive rate of HPV DNA type 16 was 66.7%; the positive rate of HPV DNA type 18 was 29.2%; the positive rate of both positive HPV DNA 16 and HPV DNA 18 was 8.3%. In the 48 samples of peripheral blood cervical carcinomas, the positive rate of HPV mRNA type 16 was 2.1%. In the 20 chronic cervicitis tissues, the positive rate of HPV DNA type 16 was 15.0% and HPV DNA type 18 was negative. Both HPV type 16 and 18 of peripheral blood were negative. The difference was markedly significant between cervical carcinomas and chronic cervicitis ( $P < 0.005 \sim P < 0.05$ ). Conclusions: The quantitation of HPV is highly associated with cervical carcinomas. Detection of HPV mRNA in the peripheral blood of cervical carcinomas is low and its clinical significance needs further evaluation.

[Key words] cervix neoplasms; human papillomaviruses; fluorescence quantitative polymerase chain reaction; micrometastasis

子宫颈癌是最为常见的女性生殖道恶性肿瘤, 发生于子宫颈鳞状上皮或腺上皮。1974年 zur Hause<sup>[1]</sup>首次提出人乳头状瘤病毒(human papillomaviruses, HPV)感染与子宫颈癌有因果关系。大量流行病学调查表明, 几乎 100%子宫颈鳞状细胞癌和 70%子宫颈腺癌中检出 HPV<sup>[2,3]</sup>。目前对于子宫颈癌发生和转移的诊断仍采用常规组织病理学, 而体液循环中微转移(micrometastasis)的理论提示, 肿瘤不仅局限于原发灶, 还有发展为远处转移的

可能。本研究采用荧光定量 PCR(FQ-PCR)和逆转录 PCR(RT-PCR)技术检测子宫颈癌和慢性宫颈炎组织和外周血中的高危型 HPV(16型, 18型), 现将结果作一报道, 并探讨其表达意义。

### 1 材料与方法

1.1 标本来源 收集本院妇瘤科和妇科收治的子宫颈癌患者组织 24份(FIGO分期为 I~II b期), 其中 I 期 10份, II a 期 9份, II b 期 5份。治疗前后外周血 48份。同时采集 20份慢性宫颈炎患者的活检组织及其 20份外周血, 对宫颈糜烂的活检组织进行 CN 分级, 其中 CN II 11份, CN III 9份。

### 1.2 方法

1.2.1 组织标本的 FQ-PCR 检测 采用“酚氯仿提取法”<sup>[4]</sup>提取 HPV(16型, 18型) DNA。从试剂盒(深圳匹基公司)取 PCR 反应液、Taq 酶及 UNG 按

[收稿日期] 2007-06-08

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2005kj48zd)

[作者单位] 1 安徽医科大学 病原生物学教研室, 230032 2 蚌埠医学院第一附属医院 中心实验室, 233004

[作者简介] 郑宏波(1968-), 男, 副主任技师。

[通讯作者] 汪学龙, 研究生导师, 教授。

37.8 0.2 0.06的比份取各试剂混匀, 2 000 r/min离心 10 s, 取 38  $\mu$ l 加入 PCR管, 加 2  $\mu$ l 已抽取 DNA标本放入荧光定量 PCR仪 (美国 MJ OPTICON 公司) 进行热循环, 程序设置为: 37  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40个循环。基线取 2~10个循环的荧光信号, 阈值以刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点,  $C_{\pm 0.0}$  为准。

1.2.2 外周血的 RT-PCR测定 抽取患者静脉血, EDTA抗凝, 采用“异硫氰酸胍 (GuSCN) 结合氯仿-酚法”<sup>[4]</sup> 提取 HPV(16型, 18型) RNA, 采用随机引物, 逆转录 RT合成 cDNA。

HPV PCR反应体系: 超纯水 14.7  $\mu$ l, 反应缓冲液 2.5  $\mu$ l, dNTP 0.5  $\mu$ l, 上、下游引物各 2  $\mu$ l, Taq酶 0.3  $\mu$ l, cDNA模板 3  $\mu$ l。循环温度: 94  $^{\circ}$ C 5 min (94  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min)  $\times$  35, 72  $^{\circ}$ C 7 min。上游引物: 5'-CTCTG AATTC GCCAC CATGC ACCAA AAGAG AACTG-3'; 下游引物: 5'-CCCTC GAGGT ATCTC CATGC ATGAT TACAC-3'。PCR扩增产物在 2%琼脂糖凝胶 (含溴乙锭) 电泳, 150 V 30 min。以超纯水代替模板为阴性对照, 以宫颈癌患者组织为阳性对照。

1.3 统计学方法 采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 HPV DNA阳性检出率 (1) 24份宫颈癌 (I~II b期) 组织中, HPV DNA 16型阳性 16份 (66.7%), DNA平均拷贝数为  $3.27 \times 10^5$ ; HPV DNA 18型阳性 7份 (29.2%), DNA平均拷贝数为  $2.61 \times 10^4$ ; HPV DNA 16型、18型均阳性 2份 (8.3%)。(2) 20份慢性宫颈炎患者的活检组织 HPV DNA 16型阳性 3份 (15.0%), DNA平均拷贝数为  $7.20 \times 10^3$ ; HPV DNA 18型均为阴性。宫颈癌患者和慢性宫颈炎组织 HPV DNA 16、18型阳性结果差异均有统计学意义 ( $\chi^2 = 11.87, P < 0.005$  和  $\chi^2 = 4.93, P < 0.05$ )。

2.2 外周血 HPV mRNA 16型检测结果 (1) 48份宫颈癌手术前后外周血标本, 仅 1份 (术后) HPV mRNA 16型阳性 (见图 1), 其它均为阴性。(2) 20份慢性宫颈炎患者外周血标本未检出 HPV mRNA。

## 3 讨论

HPV为乳头状瘤属的双链闭合环状 DNA病毒, 迄今为止已发现 100多型。以其致病性不同, 将其分为低危和高危两大类, 低危型包括 HPV 6、11、34、40、42等引起尖锐湿疣等良性病变的 HPV型别, 高危型包括 HPV 16、18、31、33、35、39、45等型

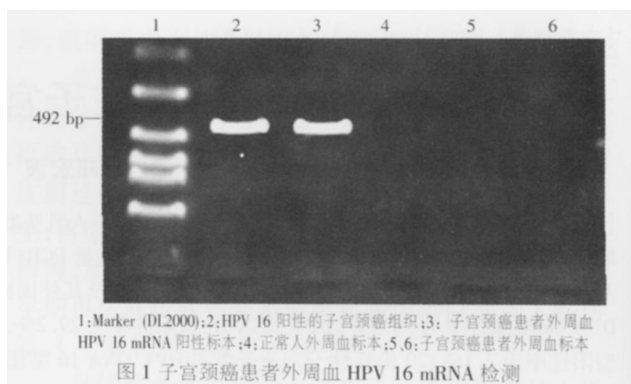


图1 宫颈癌患者外周血 HPV 16 mRNA 检测

别, 能编码具有生长、刺激和转化功能的癌蛋白, 主要导致宫颈上皮内瘤变 (CIN) 和子宫颈癌的发生<sup>[2,5]</sup>。本研究的结果是在宫颈癌组织中 HPV 16型和 18型的阳性率为 87.5%, 与文献<sup>[6~8]</sup>报道的宫颈癌阳性率 83.05%相一致; 而本组慢性宫颈炎组织阳性率仅为 15.0%, 宫颈癌组织和宫颈炎组织阳性率差异有统计学意义, 显示宫颈癌与高危型 HPV 16、18型有一定的关系。

FQ-PCR使用荧光标记的特异性探针, 较常规 PCR巢式 PCR敏感性和特异性更高; 使用 Ct值来定量 PCR扩增指数增长期的起始拷贝数, 避免了常规 PCR平台效应的影响; 全封闭反应, 无需电泳等 PCR后处理, 避免 PCR产物造成的实验室污染。因此, 可以将 FQ-PCR技术作为宫颈癌的临床实验室检测方法。

微转移是指非血液系统恶性肿瘤在发展过程中, 播散并存活于血循环、淋巴道、骨髓及各种组织器官中, 尚未形成转移结节, 且无任何与之有关的临床表现, 常规检查方法如影像学、临床病理学等难以检测到的微量转移。目前的检测技术中, RT-PCR是近年来肿瘤微转移研究中应用较多的技术, 其敏感性可达  $1/10^6 \sim 1/10^7$ 。由于 mRNA仅能存活于活的肿瘤细胞, 细胞死亡后 mRNA极易被降解, 而 HPV DNA在死亡细胞中仍能稳定存在, 因此在微转移的检测中, HPV mRNA较 DNA的检出具有更高的特异性和临床价值。

国外报道宫颈癌外周血 HPV的检出率为 20%~92.3%, Li等<sup>[9]</sup>检测 60份宫颈癌患者治疗前后的外周血 HPV DNA, 阳性率为 20%, 程玺等<sup>[10]</sup>应用巢式 RT-PCR技术检测 30份宫颈癌患者的外周血, 检出率为 10.0%。本研究共检测宫颈癌患者手术前后外周血 48份, 仅有 1份手术前标本 HPV 16型为阳性, 检出率为 2.1%, 这与国外报道尚有一定差距。因此采用 HPV mRNA作为肿瘤特异性标志物来检测宫颈癌的微转移, 存在一定的局限性, 宫颈癌外周血检测的临床价值, 有待大样本量的长期研究证实。

[文章编号] 1000-2200(2007)06-0649-03

。临床医学。

# survivin基因检测在胃癌辅助诊断中的应用

张成斌<sup>1</sup>, 燕善军<sup>1</sup>, 王启之<sup>1</sup>, 承泽农<sup>2</sup>, 陶仪声<sup>2</sup>

[摘要]目的: 探讨 survivin基因检测在胃癌辅助诊断中的应用价值。方法: 收集 49例胃癌组织及相应的癌旁非瘤胃组织标本, 分别采用 RT-PCR和 IHC两种方法检测胃癌和癌旁组织中 survivin mRNA和 survivin蛋白的表达。结果: 65.3% (32例)的胃癌组织 survivin mRNA和 63.3% (31例)的胃癌组织 survivin蛋白表达阳性, 而癌旁非瘤胃组织内 survivin mRNA和 survivin蛋白均无阳性表达; 运用 RT-PCR法较 IHC法检测 survivin表达的阳性率略高, 但其差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: survivin在胃癌组织中表达上调, 免疫组化和 RT-PCR检测胃癌组织 survivin基因的表达有望成为一种新的胃癌辅助诊断指标。

[关键词] 胃肿瘤; survivin; 免疫组织化学

[中国图书资料分类号] R 735.2 [文献标识码] A

## Survivin gene in auxiliary diagnosis of gastric carcinoma

ZHANG Cheng-bin<sup>1</sup>, YAN Shan-jun<sup>1</sup>, WANG Qi-zhi<sup>1</sup>, CHENG Ze-nong<sup>2</sup>, TAO Yi-sheng<sup>2</sup>

(1 Department of Gastroenterology The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004

2 Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] Objective: To explore the value of the expression of survivin gene in auxiliary diagnosis of gastric cancer. Methods: The gastric carcinoma tissues and the neighboring noncancerous tissues of 49 cases with histologically verified gastric carcinoma were obtained. The survivin mRNA level was measured by RT-PCR and the protein expression of survivin was detected by immunohistochemical assay. Results: Survivin mRNA proved positive in 65.3% (32 cases) of the gastric cancerous tissues and 63.3% (31 cases) of the protein respectively. In contrast, no expression of survivin was detected in the corresponding noncancerous tissues. The expression of survivin gene detected by RT-PCR was a bit higher than IHC with no statistical significance ( $P > 0.05$ ). Conclusion: The expression of survivin in gastric cancerous tissues is up-regulated. Detection of survivin gene by immunohistochemistry or RT-PCR would be a new method in diagnosis of gastric cancer.

[Key words] stomach neoplasms; survivin; immunohistochemistry

### 胃癌因早期缺乏明显的症状和体征而致诊断困难

[收稿日期] 2006-06-01

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目 (2002k060)

[作者单位] 1 蚌埠医学院第一附属医院 消化科, 安徽 蚌埠 233004; 2 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 张成斌 (1975-), 男, 硕士, 住院医师。 (现工作于蚌埠医学院第二附属医院 消化科, 安徽 蚌埠 233040)

[通讯作者] 燕善军, 主任医师, 副教授。

难。凋亡抑制因子 IAP (inhibitor of apoptosis) 是一族凋亡抑制蛋白。survivin是新近发现的 IAP家族成员之一, 具有不同于 IAP家族其他成员的独特结构和性质。在正常成人组织中不表达 (除胸腺、生殖器官), 而选择性的表达于恶性肿瘤组织<sup>[1]</sup>。由于 survivin的肿瘤特异性, 有可能使其成为恶性肿瘤诊断的新靶基因蛋白。本研究运用免疫组化、RT-PCR方法, 对胃癌组织、癌旁非瘤组织 survivin

### [参考文献]

[1] zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, et al. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *J. Int J Cancer* 1974; 13 (5): 650-656.

[2] Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *J. Cancer* 1995; 76 (10 Supp): 1888-1901.

[3] Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *J. Vaccine* 2006; 24 (Suppl 1): S1-S15.

[4] 申子瑜, 李金明主编. 临床基因扩增检验技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 68-75.

[5] 徐波. 人乳头状瘤病毒 E6、E7 原癌蛋白致癌的机制 [J]. 国外医学。妇产科学分册, 2001, 28 (4): 198-200.

[6] Zehbe J, Wilander E. Human papillomavirus infection and

invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology [J]. *J Pathol* 1997; 181 (3): 270-275.

[7] Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Wright T, et al. Cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: A review [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1996; 21 (1): 17-25.

[8] 马彩玲, 李轶杰, 张富春, 等. 应用荧光定量聚合酶链方法检测宫颈组织中乳头状瘤病毒 16 E6 基因 [J]. 中华医学杂志, 2004, 84 (6): 469-473.

[9] Liu W, Tsang P, Yip A, et al. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *J. Gynecol Oncol* 2001; 82 (2): 269-272.

[10] 程玺, 蔡树模, 李子庭, 等. 宫颈癌患者外周血中 CK 19 mRNA 和 HPV 16 mRNA 基因的检测及其意义 [J]. 中国癌症杂志, 2004, 14 (4): 313-316.