

人类乳头状病毒基因分型对 HPV E6/E7 mRNA 表达的影响

周 卉¹ 张普宏^{1,3} 冯 钢^{2,3} 张德轩¹ 陈苗红¹ 雍 炜¹ 帅朝霞¹ 许 岩¹ 吴 竞^{1,3}

(1.皖南医学院第二附属医院 检验科,安徽 芜湖 241002; 2.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 检验科,安徽 芜湖 241001 3.皖南医学院 检验诊断学教研室,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的:探讨 HPV 基因分型对 HPV E6/E7 mRNA 表达的影响。方法:回顾分析 227 例接受 HPV E6/E7 mRNA 检测的 HPV 病毒感染患者,高危型 HPV 病毒感染者 204 例,低危型 HPV 病毒感染者 23 例。PCR 导流杂交方法检测 HPV 基因分型,支链 DNA 法检测 HPV E6/E7 mRNA 载量。结果:高危型 HPV 感染患者宫颈上皮细胞内 HPV E6/E7 mRNA 表达载量 [201.15 (0.00, 671.98)] 较低危型 HPV 感染患者 [0.00 (0.00, 16.00)] 增高 ($P < 0.05$)。多因素回归分析发现 HPV52 ($\beta = 6936.219$)、HPV18 ($\beta = 4551.115$)、HPV45 ($\beta = 5178.912$) 三个高危亚型可影响宫颈上皮细胞内 HPV E6/E7 mRNA 载量 ($P < 0.05$)。结论:高危型 HPV52、HPV18、HPV45 病毒感染可影响宫颈上皮细胞内 HPV E6/E7 mRNA 的表达,进而促进宫颈恶性病变的发生和发展。

【关键词】宫颈癌; 人类乳头状病毒; E6/E7 mRNA; 支链 DNA

【中图分类号】R 737.33 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.05.005

Human papillomavirus genotyping and HPV E6/E7 mRNA expression

ZHOU Hui, ZHANG Puhong, FENG Gang, ZHANG Dexuan, CHEN Miaohong, YONG Wei, SHUAI Zhaoxia, XU Yan, WU Jing

Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the association of human papillomavirus (HPV) genotyping with HPV E6/E7 mRNA expression. **Methods:** Retrospective analysis was performed in 227 HPV infection cases received HPV E6 / E7 mRNA detection, including 204 cases of high-risk HPV types and 23 low-risk HPV types. HPV genotype was detected by PCR diversion hybridization, and HPV E6 / E7 mRNA loading were determined by branched DNA assay. **Results:** The HPV E6 / E7 mRNA loading in cervical epithelial cells was significantly increased in patients infected with high-risk HPV types [201.15 (0.00, 671.98)] compared to those infected with low-risk HPV types [0.00 (0.00, 16.00)], $P < 0.05$. Multiple regression analysis indicated that the HPV E6 / E7 mRNA loading was affected by HPV52 ($\beta = 6936.219$), HPV18 ($\beta = 4551.115$) and HPV45 ($\beta = 5178.912$) ($P < 0.05$). **Conclusion:** Infection with the high-risk types of HPV52, HPV18 and HPV45 may lead to HPV E6 / E7 mRNA loading in cervical epithelial cells, and further result in the development of cervical malignancies.

【Key words】 cervical malignancies; human papilloma virus; E6/E7 mRNA; branched DNA

宫颈癌是一种严重危害女性健康和生命的恶性肿瘤,病死率位居女性恶性肿瘤的第二位,是由宫颈上皮内瘤变缓慢发展而来,一般需要 5~10 年。流行病学证实人类乳头状病毒感染是宫颈癌发生发展的首要因素,约 99.8% 宫颈癌患者可以检测到 HPV 病毒。HPV 病毒有 100 多种亚型,最常见的有 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 等高危型及 6、11、42、43、44、53、66、8304 等低危型^[1]。

高危型 HPV 病毒可通过基因整合等方式引起宫颈上皮细胞恶变,从而引起宫颈癌。E6/E7 基因是 HPV 病毒的致癌基因,E6 可通过泛素途径降解抑癌基因 P53,E7 通过抑制视网膜母细胞瘤蛋白 (pRB) 使细胞周期失控,抑制凋亡,从而诱发癌变^[2]。因此定量检测 HPV E6/E7 mRNA 可了解宫颈上皮细胞内 HPV 病毒基因表达情况,本研究主要探讨 HPV 基因分型对 HPV E6/E7 mRNA 表达的

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2016A737)

收稿日期: 2016-03-04

作者简介:周 卉(1973-),女,主管检验师,(电话) 13956172028,(电子信箱) 1340954280@qq.com;

吴 竞,男,主管检验师,(电子信箱) wjwj1973@126.com,通信作者。

影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2014年10月~2016年2月期间于皖南医学院第一附属医院、第二附属医院妇产科因妇科炎症、月经不调、阴道异常出血等原因就诊,自愿接受HPV病毒基因分型检测患者10156例,其中接受HPV E6/E7 mRNA检测的HPV病毒感染患者共227例,204例感染高危型HPV病毒(HR-HPV),23例感染低危型HPV病毒(LR-HPV)。排除标准:宫颈物理治疗及手术史,妊娠,1周内阴道用药,严重内科疾病,其他部位肿瘤。本研究获得医院伦理委员会批准,患者知情同意。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 采用ThinPrep宫颈采样器置于宫颈口与鳞柱上皮交界处,逆时针方向旋转3圈,采集宫颈上皮细胞置于标本瓶中4℃保存。

1.2.2 导流杂交法检测 HPV 基因分型 HPV DNA检测采用PCR导流杂交方法,该方法可以检测最常见的13种HR-HPV病毒(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68型)及8种LR-HPV(HPV6、11、42、43、44、53、66、8304型)病毒。提取病毒DNA,经PCR扩增后导流杂交。21种(HPV)分型检测试剂盒购于广东凯普生物科技股份有限公司(中国,广东),严格按照说明书操作。

1.2.3 支链DNA法检测 HPV E6/E7 mRNA 载量 支链DNA法是一种类似夹心法的核酸杂交检测方法,整个过程不需要提取mRNA和反转录PCR,可以直接检测HPV mRNA。主要步骤:①裂解细胞。裂解宫颈上皮脱落细胞,释放HPV病毒颗粒中的mRNA。②杂交捕获mRNA。采用“三明治”核酸杂交法,捕获探针和固定探针结合到HPV的基因组5'-非翻译区和E6和E7区域,将HPV mRNA固定于96孔平板底部。③信号放大。放大探针结合到预放大探针上形成支链DNA复合物,复合物末端有支链DNA探针标记的碱性磷酸酶,可产生化学发光检测信号。④化学发光。碱性磷酸酶与底物结合,用Quanti Virus™冷光检测仪检测标本的光子数,经过软件转换为拷贝数,拷贝数>0为阳性。Quanti Virus™宫颈稳态检测试剂盒购于科蒂亚生物技术有限公司(中国,新乡),严格按照说明书操作。

1.3 统计学方法 计量资料以[M(P₂₅, P₇₅)]表示,两组间年龄、HPV E6/E7 mRNA的比较用Mann-Whitney U检验。多因素回归分析 HPV 基因型对 HPV E6/E7 mRNA 表达的影响,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 HPV 感染患者流行病学情况 10156例接受HPV病毒基因分型检测患者中仅有1248例患者感染高危型HPV病毒(占12.3%)。204例感染HR-HPV患者中有114例患者HPV E6/E7 mRNA阳性(占55.9%),90例为阴性(占44.1%)。23例感染低危型HPV病毒(LR-HPV)患者中有6例患者HPV E6/E7 mRNA阳性(占26.1%),17例患者阴性(占73.9%)。120例HPV E6/E7 mRNA阳性患者中有114例HR-HPV患者(占95%),而感染低危型HPV病毒患者仅6例(占5%)。

2.2 高低危型 HPV E6/E7 mRNA 载量比较 高危型HPV感染患者与低危型HPV感染患者年龄无统计学差异;HPV E6/E7 mRNA载量差异有统计学意义(P<0.05),见表1。

表1 高低危型 HPV E6/E7 mRNA 载量比较[M(P₂₅, P₇₅)]

	高危型(n=204)	低危型(n=23)	Z	P
年龄/岁	41(33,46)	44(39,50)	-1.798	>0.05
E6/E7 mRNA	201.15 (0.00,671.98)	0.00 (0.00,16.00)	-2.869	<0.05

2.3 HPV 基因分型对 HPV E6/E7 mRNA 载量的影响 多因素回归分析发现 HPV52、HPV18、HPV45三个高危亚型可影响 HPV E6/E7 mRNA 载量(P<0.05),见表2。

表2 HPV 基因分型对 HPV E6/E7 mRNA 载量的影响

	β	SE	t	P	β 95%置信区间
HPV52	6936.219	1571.270	4.414	<0.05	3841.234~10 031.203
HPV18	4551.115	1231.530	3.695	<0.05	2125.327~6976.902
HPV45	5178.912	1438.999	3.599	<0.05	2344.466~8013.358

3 讨论

HPV 基因分型检测在宫颈癌筛查中发挥着巨大的作用,但90%患者HPV感染后可通过自身免疫清除,大多数检测阳性患者仅是一过性、暂时性感染,且HPV感染到发生癌前病变和癌变需要5~10年,这是一个漫长的过程,只有极小部分患者才会发生宫颈癌变。因此,HPV基因分型对预测宫颈上皮内瘤变及宫颈癌变无实质性意义,HPV基因分型检测对宫颈病变的预测过早,更无法判断HPV病毒的活动程度,对宫颈病变进展也不能进行有效的评估^[3]。王昕等^[4]对本地区1107例宫颈病变患者检测HPV基因分型发现,仅有15.63%患者伴发高危

HPV 病毒感染,本研究的结果与其相似,发现仅有 12.3% 宫颈病变患者伴有高危 HPV 病毒感染,且高危型 HPV 病毒感染患者仅有 55.9% 患者伴发 HPV E6/E7mRNA 阳性;而 44.1% 患者仅仅为一过性感染,未发现 HPV 致癌基因的表达。而在低危型 HPV 病毒感染患者中仅有 26.1% 的患者伴有 HPV E6/E7mRNA 阳性,73.9% 的患者仅仅是一过性的感染,暂不需要临床干预。HPV E6、E7 基因位于早期编码区,是病毒的致癌基因,其表达产物 E6、E7 蛋白是宫颈上皮内瘤变和宫颈癌变的关键。E6 蛋白可以降解 p53 蛋白,使细胞周期紊乱,进而导致恶性增殖,还可抑制细胞凋亡,使恶变的细胞持续增殖^[5]。E7 蛋白可与 pRB 特异性结合,促进细胞分裂增殖,E7 蛋白还使细胞生长负向调节因子 p27、p16 失活,导致细胞周期紊乱,引起细胞增殖恶变。E6、E7 蛋白还可与干扰素调节因子结合,影响免疫功能,导致病毒免疫逃逸。持续性的高危型 HPV 感染是宫颈癌变的主要病因,低危型 HPV 病毒感染主要引起尖锐湿疣等生殖道疾病^[6-7]。本研究发现高危型 HPV 感染患者 HPV E6/E7mRNA 载量较低危型 HPV 病毒感染患者明显增高,验证了高危型 HPV 感染才是导致宫颈癌变的主要致病因素。Argyri E 等提出 HPV E6/E7mRNA 可反映 E6/E7 基因表达情况,更能预测病情的进展^[8]。本研究发现 95% 的 HPV E6/E7mRNA 阳性患者为高危型的 HPV 病毒感染患者,多因素回归分析也提示高危型 HPV52、HPV18 和 HPV45 病毒可影响 HPV E6/E7mRNA 载量,而未发现低危型 HPV 病毒是 HPV E6/E7mRNA 表达的影响因素,提示 HPV E6/E7mRNA 的检测可一定程度上反映 HPV 感染分型情况,有助于疾病的诊断和治疗。宫颈组织中 E6/E7 mRNA 阳性表明有 HPV 感染且病毒致癌基因处于活动期,宫颈上皮细胞发生恶变的风险性较高,故对于高危型 HPV 感染且 E6/E7 mRNA 阳性的妇女应该给予治疗。支链 DNA 技术是一种核酸探针信号放大检测技术,较传统 Real-Time PCR 而言,敏感度和特异度更强,安全性好,且不需要 PCR 扩增,操作更方便,近年来用于 HPV 检测,较传统细胞学检测、HPV 基因分型检测特异度和阳性率更高^[9]。总之,本研究通过多因素回归分析 HPV 基因分型对 HPV

E6/E7 mRNA 表达的影响,发现高危型 HPV52、HPV18 和 HPV45 病毒感染可影响 HPV E6/E7 mRNA 的表达,提示高危型 HPV 病毒感染进而促进宫颈恶性病变的发生和发展。本研究存在一些不足之处,如尚未完善组织病理学的检查,对于 HPV E6/E7 mRNA 载量检测在宫颈病变诊断及治疗中的运用等仍需要进一步的研究。

【参考文献】

- [1] FREGA A, SESTI F, LOMBARDI D, *et al.* Assessment of HPV-mRNA test to predict recurrent disease in patients previously treated for CIN 2/3 [J]. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2014, 60 (1): 39-43.
- [2] KAJITANI N, SCHWARTZ S. RNA binding proteins that control human papillomavirus gene expression [J]. *Biomolecules*, 2015, 5 (2): 758-774.
- [3] ZHAO FH, LEWKOWITZ AK, CHEN F, *et al.* Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method [J]. *Journal of the National Cancer Institute* 2012, 104 (3): 178-188.
- [4] 王昕, 马少华, 王金桃, 等. 1107 例宫颈病变患者人乳头瘤病毒感染及基因型分析 [J]. *皖南医学院学报*, 2014, 33(6): 528-530.
- [5] FAN R, HOU WJ, ZHAO YJ, *et al.* Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1 α upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells [J]. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2015, Oct 28, online.
- [6] NALLIAH S, KARIKALAN B, KADEMANE K. Multifaceted usage of HPV related tests and products in the management of cervical cancer—a review [J]. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 2015, 16(6): 2145-2150.
- [7] GUSTINUCCI D, GIORGI ROSSI P, CESARINI E, *et al.* Use of Cytology, E6/E7 mRNA and p16INK4a-Ki-67 to Define the Management of Human Papillomavirus (HPV)-Positive Women in Cervical Cancer Screening [J]. *American journal of clinical pathology*, 2016, 145(1): 35-45.
- [8] ARGYRI E, TSIMPLAKI E, DASKALOPOULOU D, *et al.* E6/E7 mRNA expression of high-risk HPV types in 849 Greek women [J]. *Anticancer research* 2013, 33(9): 4007-4011.
- [9] DOCKTER J, SCHRODER A, HILL C, *et al.* Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions [J]. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2009, 45(1): 55-61.