

高危 HPV 感染及 hTERT 基因在宫颈癌发生发展中的相关性 *

王可新 孙宇辉 赵璐 官莹 郑建华[△]
(哈尔滨医科大学附属第一医院临床医学院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 探讨高危人乳头瘤病毒及人类染色体端粒酶基因(hTERT)在宫颈癌发生发展中的关系。方法 2010 年 10 月至 2011 年 05 月就诊于哈尔滨医科大学附属第一医院妇科患者 445 例,采用表面等离子体谐振法(SPR)及荧光原位杂交法(FISH)分别检测高危 HPV 和 hTERT 的表达情况,对任一结果阳性者行阴道镜下宫颈活检和病理学检查,其中炎症对照组 45 例,CIN 组 33 例及宫颈癌组 6 例。结果 单一型 HPV29 例,多重型 26 例,最常见为 HPV16 型合并的二型感染(17 例)。在炎症组,CIN 组,CIN 组、CIN 组及宫颈癌组中多重高危 HPV 比率为 17.78%、28.57%、44.44%、50.00%、66.67%,与炎症对照组比较其他组均有统计学意义($P<0.05$)。hTERT 基因在各组中的阳性表达率分别为 2.22%、14.29%、61.11%、75.00%及 100%。CIN 组及宫颈癌的 hTERT 基因表达与炎症组比较差异均有统计学意义(P 均 <0.01),其中 CIN 及以上各组差异明显。多重 HPV 感染与 hTERT 表达呈中等正相关($r=0.462$, $P<0.01$)。结论 随着宫颈病理类型分级升高,HPV 感染及 hTERT 基因表达率升高,hTERT 基因在宫颈癌发生发展中起重要作用,高危 HPV 感染与 hTERT 基因的异常扩增关系密切,提示二者可能存在因果关系。

关键词 hTERT 基因;人乳头瘤状病毒;多重高危型 HPV;宫颈癌

中图分类号 R737.33 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)25-4826-03

Correlation of High Risk-HPV Infection and the Human Telomerase Gene in Cervical Cancer*

WANG Ke-xin, SUN Yu-hui, ZHAO Lu, GUAN Ying, ZHENG Jian-hua[△]
(The First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship of HR-HPV infection and the Human Telomerase Gene (hTERT) in the generation and progression of cervical cancer. **Methods:** The cervical samples of 445 women visited the First Clinical College of Harbin Medical University from October 2010 to May 2011 underwent the test for HR-HPV with SPR method. hTERT expression was detected by FISH. Then the sample with any positive result underwent colposcopic indicated biopsy and pathological diagnosis. **Results:** The pathological results showed that 45 of inflammation, 33 of CIN and 6 Cervical cancer. Among the 445 cases, there were 29 of single HR-HPV infection and 26 of multi-infection, including HPV 16/X double infection (17/26). The rate of multiple HR-HPV infection was 66.67% in cervical cancer group, 28.57% in CIN group, 44.44% in CIN group, 50.00% in CIN group and 30.56% in inflammation group, respectively. The infection rate of any group was higher than that in inflammation group (all $P<0.05$). The positive amplification rate of hTERT in inflammation group was 2.22%, while it was 14.29% for CIN, 61.11% for CIN, 75.00% for CIN and the cervical 100% for cancer, which showed a significant difference (all $P<0.01$), evidently in CIN and CIN+. The multiple HR-HPV infection was middle-positive correlated to hTERT expression ($r=0.462$, $P<0.01$). **Conclusions:** As the development of cervical cancer, the HR-HPV Infection and hTERT expression increased and hTERT gene may play an important part in the pathogenesis of cervical cancer. The HR-HPV infection may be a positive-stimulated fact of hTERT gene.

Key words: hTERT gene; SPR; HR-HPV infection; Cervical cancer

Chinese Library Classification (CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4826-03

前言

在世界范围内,浸润性子宫颈癌是严重威胁妇女健康的主要恶性肿瘤之一,发病率居女性生殖系统恶性肿瘤的第二位^[1]。目前宫颈癌筛查的方法多采用 HPV 检测,数十年来,HPV 检测技术在临床上的应用给宫颈癌的临床诊断和治疗提供了更全面的信息。既往文献显示 HPV 单项检测在子宫颈癌的防治

方面有显著功效,能大大降低其死亡率^[2]。近年来研究表明,几乎所有的癌组织中皆存在端粒酶活性表达,Heselmeyer^[3,4]等学者发现宫颈癌患者 hTERT 基因拷贝数存在特异性变化。

本研究利用 SPR 技术和 FISH 方法阐述了 HPV 感染情况及 hTERT 基因拷贝数变化在早期宫颈病变中的相应表达水平。并且就多重高危 HPV 感染与 hTERT 基因的异常扩增在宫颈病变机制中的作用与相关性做了进一步研究。

* 基金项目:中华医学会分子生物学临床应用研究专项资金(CAMB022010)

作者简介:王可新(1985-),男,硕士研究生,妇产科学,电话:15945141556, E-mail: wangkexin1234@163.com

△通讯作者:郑建华, E-mail: doctzheng52@yahoo.com

(收稿日期:2012-02-15 接受日期:2012-03-12)

1 材料与方法

1.1 研究对象

2010 年 10 月至 2011 年 05 月就诊于哈尔滨医科大学附属第一医院妇科门诊患者 445 例。入选标准：门诊妇科就诊者及机会性筛查者，年龄范围为 25-64 岁。排除标准：在本院或外院已做过阴道镜活检者；已经确诊为 CIN 者；已经物理治疗过的病例。依据组织学的病理结果分为炎症对照组、CIN Ⅰ组、CIN Ⅱ组、CIN Ⅲ组及宫颈癌组。

1.2 方法

从宫颈鳞柱交界处常规刷取细胞，将以液基薄层细胞检测 (Thinprep Cytologic Test ,TCT) 收集的样本 4℃保存，不超过 7 天，并对所有标本进行以下检测，对任一结果阳性患者行阴道镜下宫颈活检和病理学检查：

1.2.1 SPR 技术行 HPV 检测 操作步骤见北京金菩嘉医疗科技有限公司 SPR 技术操作说明。结果判读：阳性对照流池的信号值≥ 40m°，且阴性对照流池信号值<40m°，则可认定为结果有效。分型探针检测阳性，探针的信号值≥ 40m°。

1.2.2 FISH 技术行 hTERT 基因检测 制备、预处理、杂交及复染：具体操作步骤见北京金菩嘉医疗科技有限公司 FISH 技术检测 hTERT 基因操作说明。FISH 信号的判断：红色信号表示 3 号染色体上 hTERT 基因数量。阳性判断标准：计数信号完整 100 个细胞，细胞核内出现红色信号 >2 个且绿色信号≥ 2 个，表现为 hTERT 基因拷贝数增加，即 hTERT 基因有扩增。见图 1。判断阈值的建立：通过 FISH 检测 20 例正常宫颈脱落细胞核中 hTERT 基因的表达，统计每例标本出现上述扩增的异常细胞个数，取均数，建立阈值。阈值 = 均数 +3× 标准差。通过计算，本实验 hTERT 的阈值为 4.91%。提示如果≥ 5 个细胞中，出现 2 个以上的红色信号且不少于 2 个绿色信号，则判断 hTERT 扩增阳性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计学软件进行单因素方差分析和 Spearman 等级相关性检验。两个样本率之间的差异比较用 χ^2 检验， $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理学结果

阴道镜下宫颈活检和病理学检查为 84 例：宫颈炎 45 例、CIN Ⅰ 7 例、CIN Ⅱ 18 例、CIN Ⅲ 8 例，浸润性宫颈癌初诊患者 6 例。

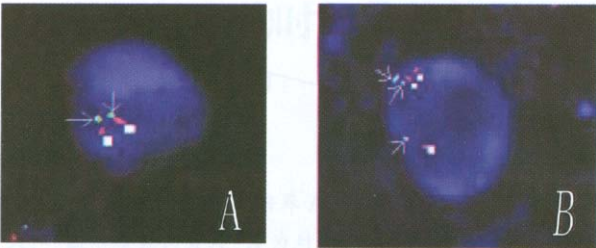


图 1 绿色信号表示 3 号染色体着丝粒；□:红色信号表示 hTERT 基因；
A 图为正常细胞核，B 图为异常细胞核

Fig.1 Green signal showed centromere on chromosome 3; □:Red signal showed hTERT gene; A :Normal nucleus, B: Abnormal nucleus

2.2 高危型 HPV 感染情况

应用 SPR 方法检测的入组 445 例患者中，高危 HPV 感染率为 12.36%(55/445)，其中单一高危 HPV 感染率为 6.52%(29/445)，多重高危 HPV 感染率为 5.83%(26/445)，最常见为 HPV16 型合并的二型感染(17 例)。84 例宫颈活检患者在病理学分组中单一高危 HPV 感染各组间差异无统计学意义($P>0.05$)；多重 HPV 感染的比率随宫颈病理级别增加而增加，这种增长趋势尤为明显，与炎症对照组比较有统计学意义($P<0.05$)，见表 1。但对于宫颈癌组，感染比率与部分文献不符^[5]，可能与研究人群的地区差异有关。此外，随宫颈病变级别的增加，HPV 总阳性率逐渐升高。

2.3 hTERT 基因表达情况

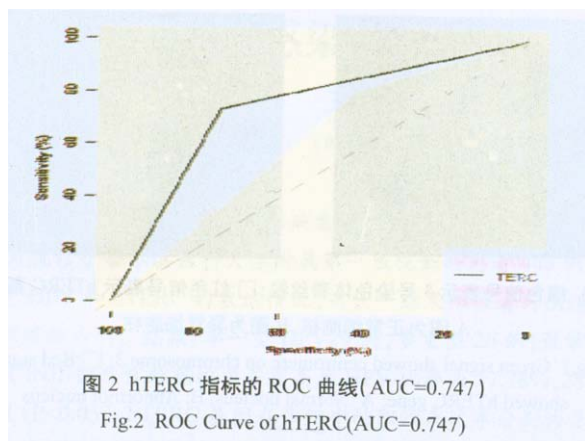
445 例入组患者中 hTERT 基因扩增阳性比率为 6.97%(31/445)。在炎症、CIN Ⅰ、CIN Ⅱ、CIN Ⅲ、宫颈癌组中的阳性表达率分别为 2.22%(1/45)、14.29%(1/7)、61.11%(11/18)、75.00%(6/8)及 100%(6/6)。CIN Ⅲ及以上组的 hTERT 基因表达分别与炎症/CIN Ⅰ组比较均有统计学意义($P<0.05$)，随病理学进展，hTERT 阳性率逐渐升高。CIN Ⅲ及以上各组整体与炎症/CIN Ⅰ组比较亦有统计学意义 ($P<0.01$)，经单变量分析，AUC=0.747，见图 2。

2.4 高危型 HPV 感染与 hTERT 基因表达

445 例入组患者中，多重高危 HPV 感染患者中 hTERT 基因扩增比例为 57.63%(15/26)，单一 HPV 感染及 HPV 阴性患者比例分别为 27.59%(8/29)和 2.05%(8/390)，前者较后者差异具有统计学意义($P<0.05$)。多重高危 HPV 感染与 hTERT 基因表达比较相关性，分析显示，多重高危 HPV 感染与 hTERT 基因表达呈中等正相关($r=0.462$ $P<0.01$)。

表 1 宫颈病变组高危 HPV 感染分布[n(%)]
Table 1 The positive rate of HPV in the different disease groups

Pathological Group	No.	Single HPV		Multiple HPV	
		No.	Positive rate (%)	No.	Positive rate(%)
Inflammation group	45	19	42.22	8	17.78
CIN Ⅰ group	7	2	28.57	2	28.57
CIN Ⅱ group	18	4	22.22	8	44.44
CIN Ⅲ group	8	2	25.00	4	50.00
Cervical cancer group	6	2	33.33	4	66.67
Total	84	29	34.52	26	30.95



3 讨论

人乳头瘤病毒持续性的感染已被公认是宫颈癌发生的重要原因之一^[6],它的作用机制是病毒自身 DNA 通过长时间与宿主细胞接触,通过逐渐整合进入宿主细胞基因组并得以表达,促进宿主细胞向永生化(恶变)发展^[7,8]。但绝大多数高危型 HPV 感染会在 3~7 个月通过自身免疫机制得到清除,大部分 CIN 病变会在 2 年内消退。HPV 多重感染是病毒持续感染的一种特殊表现形式,高危 HPV 多重感染者可能更易发展为宫颈癌^[9]。本研究实验数据表明多重高危 HPV 感染对宫颈病变甚至宫颈癌的发生发展起促进作用。Ho 和 Bierman^[10]等认为 HPV 多重感染者出现持续感染的危险性更大,而 HPV 的持续感染是宫颈病变发生的原因之一,本研究结果显示,多重高危 HPV 感染病例中多以 HPV16 型合并的二型感染为主,HPV16 型是众多亚型中致癌力最高的一种^[11],推测多重高危 HPV 感染时更易发生宫颈病变。但是宫颈癌发病率比 HPV 在人群中的感染率要低得多,并且多数 HPV 阳性的病人在一年左右就会转阴,意味着除了 HPV 感染外还有其他的机制在子宫颈癌发生与进展中发挥着作用。

端粒酶(telomerase)是一种逆转录酶,是 RNA-蛋白质复合物,它能以自身的 RNA 为模板合成端粒 DNA,并加到染色体末端以维持端粒的长度。其公认模板序列为 5'-CUAACCUAAC-3'^[12]。端粒酶的激活是细胞永生化的必要途径,而永生化被认为是肿瘤恶化的必要步骤^[13]。人类染色体端粒酶基因(hTERT 基因,位于 3q26.3)的扩增可阻止细胞凋亡,因而可导致肿瘤产生^[14,15]。本实验发现,hTERT 基因阳性扩增在宫颈各病理阶段都有所表达,在炎症/CINI 的病例中,hTERT 基因有一定的低水平表达,说明端粒酶的激活可能发生在细胞恶变的早期;而在 CIN 及 CIN+ 的阳性表达率明显高于炎症/CINI,且呈逐渐增高趋势,说明随宫颈恶变程度的增加,端粒酶的阳性扩增越明显,它的过度表达可能发生在细胞恶变的中晚期。而近年来国外研究提示 hTERT 基因的异常扩增与高级别宫颈病变关系密切^[16-18],并在临床随访过程中得到进一步证实,支持本实验结果。在临床实践中,CIN 是物理治疗,甚至是手术治疗的分水岭,而 hTERT 基因检测在 CIN 及 CIN+ 中提示有诊断性意义^[19]。国外相关文献有报道,在长时间对宫颈病变易感人群随访后发现检测 hTERT 基因扩增情况对了解宫颈疾病有一定的预测功能^[20]。所以,hTERT 基因检测可作为预

测并判断宫颈高度病变的独立指标,对手术治疗指证的鉴定亦具有重要的临床意义。

本研究结果显示,多重高危型 HPV 感染与 hTERT 基因表达在宫颈病变过程中呈中等正相关($r=0.462$, $P<0.01$)。说明 HPV-DNA 整合进入宿主细胞基因组与 hTERT 基因的激活存在一定的关系。而在炎症/CIN 中 HPV 的感染率达到 59.62% (31/52),与同组 hTERT 基因表达相比有统计学意义($P<0.01$),表明在宫颈病变早期,高危 HPV 在经过被自身免疫系统消除之后,残存的 HPV 基因可能通过特定的分子生物学机制在经过某一时间临界点后成功激活 hTERT 基因,故在疾病的中后期二者的表达趋向于一致,提示二者之间可能存在因果关系。但一个原癌基因的激活与调控是一个极其复杂的多环节过程,宫颈病变的发生发展也绝不是一个基因所能诱导激活的,因此对 hTERT 基因的研究仍有待进一步的开展并予以证实。

参考文献(References)

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74-108
- [2] N W J Bulkman, J Berkhof, L Rozendaal, et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial[J]. Lancet, 2007, 370: 1764-1772
- [3] Kerstin HH, Viktor J, Philip EC, et al. Detection of Genomic Amplification of the Human Telomerase Gene (TERT) in Cytologic Specimens as a Genetic Test for the Diagnosis of Cervical Dysplasia [J]. American Journal of Pathology, 2003, 163: 1406-1416
- [4] Ying Li, Wen-Jie Zeng, Feng Ye, et al. Application of hTERT in thin-prep samples with mild cytologic abnormality and HR-HPV positive [J]. Gynecologic Oncology, 2011, 120: 73-83
- [5] 姚军, 李曼, 钟萍, 等. HPV 多重感染与宫颈病变的相关性研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2010, 39(5): 705-707, 715
- [6] Yao Jun, Li Man, Zhong Ping, et al. Correlation of Multiple HPV Infection and Cervical Dysplasia [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2010, 39(5): 705-707, 715(In Chinese)
- [7] Gilbert G, Donders G, Gabrovská M, et al. Knowledge of cervix cancer, human papilloma virus(HPV) and HPV vaccination at the moment of introduction of the vaccine in women in Belgium[J]. Arch Gynecol Obstet, 2008, 277(4): 291-298
- [8] von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections[J]. Eur J Cancer, 2002, 38: 2229-2242
- [9] Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, et al. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 3059-3063
- [10] Lansbury Jr P T. Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 1997, 1(2): 260-267
- [11] Ho G Y, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women [J]. N Engl J Med, 1998, 38(7): 423-428
- [12] Basu P, Roychow S, Bafna LID, et al. Human papilloma virus genotype distribution in cervical cancer in India: Results from a multicenter study[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2009, 10(1): 1125-1127

(下转第 4832 页)

- [8] You S. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 91(1): 47-60
- [9] Lévi F. Circadian chronotherapy for human cancers[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(5): 307-315
- [10] 袁源, 刘保安. 昼夜节律与肿瘤的相关研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(5): 976-978
Yuan Yuan, Liu Bao-an. Advances in the Relationship between Circadian Rhythm and Cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(5): 976-978
- [11] 赵越, 张建法. 生物节律影响巨核细胞发育和血小板产生的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(20): 3958-3960
Zhao Yue, Zhang Jian-fa. Effects of Biological Rhythm on Megakaryocyte Development and Platelet Formation [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(20):3958-3960
- [12] Pati AK, Parganiha A, Kar A, et al. Alterations of the characteristics of the circadian rest-activity rhythm of cancer in-patients [J]. Chronobiol Int, 2007, 24(6): 1179-1197
- [13] Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anti-cancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy[J]. Curr Top Med Chem, 2002, 2(2): 113-132
- [14] 张志勇, 彭耀金. Bcl-2 与急性白血病患者骨髓组织血管新生的关系[J]. 肿瘤药理学, 2011, 1(6): 08-11
Zhang Zhi-yong, Peng Yao-jin. Relationship of BCL-2 with bone marrow angiogenesis in patients with acute leukemia [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(6): 08-11
- [15] Zhong Ling, Yuan Li-ming. The impact of Xuefu Zhuyu Decoction on the Expression of Estrogen Receptor and BCL-2 in Hysteromyoma [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2012, 2(1): 34-36

(上接第 4828 页)

- [12] Cristofari G, Lingner J. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting[J]. Embo J, 2006, 25(3): 565-574
- [13] Sakamoto O, Toyozumi T, Kikuchi Y, et al. Telomerase activity in gynecological tumors[J]. Oncol Rep, 2000, 7(5): 1003-1009
- [14] Parkinson EK, Minty F. Anticancer therapy targeting telomerase and telomerase: current status[J]. BioDrugs, 2007, 21(6): 375-385
- [15] Crookes RE, Dyson M, Smith JF, et al. Detection of human telomerase gene (TERC) amplification in cervical neoplasia: a retrospective study of 50 patients with normal smears or mild or moderate dyskaryosis[J]. Cytopathology, 2007, 18(s1): 16-16
- [16] Heselmeyer H, Sommerfeld K, White NM, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer [J]. Am J Pathol, 2005, 166 (4): 1229-1238
- [17] Sui WG, Ou ML, Dai Y, et al. Gain of the human telomerase RNA gene TERC at 3q26 is strongly associated with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19 (8): 1303-1306
- [18] Tua Z, Zhang A, Wu R, et al. Genomic amplification of the human telomerase RNA gene for differential diagnosis of cervical disorders [J]. Cancer Genet Cytogen, 2009, 191(1): 10-16
- [19] 魏力, 刘冬涌, 蒋宏颀. 荧光原位杂交法检测宫颈脱落细胞端粒酶基因及其与人乳头瘤病毒感染的相关性[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(05): 368-370
Wei Li, Liu Dong-yong, Jiang Hong-jie. The study of the relationships between hTERC gene of the women and human papillomavirus with cervical lesions by FISH [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and obstetrics, 2010, 26(05): 368-370
- [20] Francesc A, Blanca E, Cristina C, et al. 3q26 (hTERC) gain studied by fluorescence in situ hybridization as a persistence-progression indicator in low-grade squamous intraepithelial lesion cases [J]. Human Pathology, 2009, 40: 1474-1478