

人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 在不同程度宫颈病变中的应用价值*

廖焕兰¹, 陈 富¹, 王丽娜¹, 周妙姬^{2△}, 冯 辉², 邱 峰^{1△} (1. 广东省中医院检验科, 广州 510120; 2. 凯普生物科技有限公司, 广东潮州 521000)

【摘要】 目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)E6/E7 mRNA 水平在不同程度宫颈病变中的应用价值。**方法** 选取 2011 年 4 月至 2013 年 4 月广东省中医院妇科门诊收治的 HPV 感染患者 430 例, 将 HPV-DNA 阳性标本根据病理资料分为炎症组、CIN I 组、CIN II 组、CIN III 组和宫颈癌组。用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组标本的 HPV E6/E7 mRNA 水平, 比较不同宫颈病变组间 HPV-DNA 病毒载量及 HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率的差异情况。**结果** 随着宫颈病变程度增加, HPV-DNA 病毒载量未呈现逐级递增的趋势, 各病变组间的病毒载量两两比较差异无统计学意义($P>0.05$); 而 HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率则逐级递增, 除炎症组与 CIN I 组的检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$)之外, 其余各组之间的检出率两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** HPV E6/E7 mRNA 与宫颈病变程度有高度的相关性, 可作为宫颈疾病筛查的重要检测指标。

【关键词】 人乳头瘤病毒; E6 基因; E7 基因; 信使 RNA

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.23.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)23-3258-02

The diagnostic value of human papilloma virus E6/E7 mRNA detection in different degrees of cervical lesions* LIAO Huan-lan¹, CHEN Fu¹, WANG Li-na¹, ZHOU Miao-ji², FENG Hui², QIU Feng^{1△} (1. Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. HybriBio Limited, Chaozhou, Guangdong 521000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the diagnostic value of human papilloma virus (HPV) E6/E7 mRNA in different degrees of cervical lesions. **Methods** A total of 430 patients with HPV infection, received by the Outpatient Department of the Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, were enrolled and divided into inflammation, cervical epithelial atypical hyperplasia(CIN) I, CIN II, CIN III and cervical cancer groups according to pathological data. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to detect the HPV-DNA viral load and HPV E6/E7 mRNA level. And the HPV-DNA viral load and positive detectable rate of HPV E6/E7 mRNA were compared among the different degrees of cervical lesions groups. **Results** The HPV DNA viral load was not increased with the cervical lesion degree, and there was no significant differences between any two groups($P>0.05$). While the positive detectable rate of HPV E6/E7 mRNA was increased with the cervical lesion degree, and there were significant differences between any two groups($P<0.05$), except the comparison between the inflammation and CIN I group. **Conclusion** The positive detectable rate of HPV E6/E7 mRNA might be highly correlated with the degrees of cervical lesions, and could be an significant maker for the cervical disease screening.

【Key words】 human papilloma virus; E6 gene; E7 gene; mRNA

宫颈癌是常见的恶性肿瘤之一, 发病率居女性肿瘤的第二位。虽然近二十年来我国大力开展三级预防工作, 但宫颈癌的发病率仍维持在较高的水平, 并且趋于年轻化。对宫颈癌组织标本的研究发现, 99% 以上的宫颈癌存在人乳头瘤病毒(HPV)感染^[1]。要控制和减少宫颈癌的发生, 关键是预防和消除 HPV 感染。因此, 若能在感染的潜伏期或宫颈癌前病变阶段检测出高危型 HPV 并采取适当的治疗措施, 可以有效地阻断宫颈癌的发生。研究表明, 与持续性的感染高危型 HPV 病毒和 HPV 基因整合入宿主染色体、高级别上皮内瘤变及进展为浸润性宫颈癌更密切相关是 HPV E6/E7 mRNA 的表达^[2]。故本研究采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)荧光探针法检测 HPV E6/E7 mRNA, 探讨其在不同程度宫颈病变中的应用价值, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 4 月至 2013 年 4 月广东省中医院妇科门诊收治的 HPV 感染患者 430 例, 年龄 21~70 岁, 均有性生活史, 无药物过敏史。其中炎症组 175 例, 宫颈鳞状上皮轻度不典型增生(CIN I)组 112 例, 宫颈鳞状上皮中度不典型增生(CIN II)组 59 例, 宫颈鳞状上皮重度不典型增生(CIN III)组 61 例, 宫颈癌组 23 例。

1.2 方法

1.2.1 HPV-DNA 荧光 PCR 定量检测 采用凯普生物科技有限公司“高危型人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)”检测患者宫颈脱落细胞 HPV-DNA 载量, 共检测 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 等 13 种高危型 HPV。该方法以 HPV L1 基因为靶基因, 采用多重荧光 PCR 技术, 经离心、

* 基金项目: 广东省中医药局科研项目(20122126); 广东省人口和计划生育委员会科研项目(20133061)。

作者简介: 廖焕兰, 女, 本科, 主管技师, 主要从事临床检验工作。 △ 通讯作者, E-mail: qsfsl@126.com; from wanglina@163.com。

细胞重悬、细胞裂解、PCR 扩增等实验步骤进行操作,以 ROCHE LightCycler 480 扩增仪检测和判读结果。

1.2.2 HPV E6/E7 mRNA 荧光 PCR 定性检测 采用凯普生物科技公司“14 种高危型 HPV E6/E7 mRNA 荧光 PCR 试剂盒(RT-PCR-荧光探针法)”检测患者宫颈脱落细胞的 HPV E6/E7 mRNA。该方法基于多重荧光 PCR 结合 TaqMan 探针技术,通过样本 RNA 提取、脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)处理、mRNA 反转录、cDNA 扩增,以 ROCHE LightCycler 480 扩增仪检测和判读结果。可在同一反应管中通过仪器的两种荧光检测通道分别检测 14 种高危型 HPV E6/ E7 mRNA (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68)及细胞内对照 GAPDH mRNA。细胞内对照 mRNA 用于评估样本质量及 PCR 抑制因素。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较各组间 HPV-DNA 病毒载量差异采用配对 t 检验;计数资料以百分率表示,比较各组间 HPV E6/E7 mRNA 的检出率差异采用 χ^2 检验;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同宫颈病变组中 HPV-DNA 病毒载量及各组间差异比较 分组后的 HPV-DNA 定量结果取对数值并计算各组均值。结果显示,随着宫颈病变级别的增加,HPV-DNA 病毒载量并没有呈现逐级递增的趋势;炎症组与其余 4 个病变组内 HPV-DNA 病毒载量分别进行比较,组间差异均有统计学意义($P<0.05$);而对 4 个病变组的 HPV-DNA 病毒载量进行两两比较,组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 不同宫颈病变组中 HPV-DNA 病毒载量
($\bar{x} \pm s$, log IU/mL)

组别	<i>n</i>	HPV-DNA 病毒载量
炎症组	175	5.33±1.27
CIN I 组	112	5.93±1.35
CIN II 组	59	6.25±1.21
CIN III 组	61	6.13±1.06
宫颈癌组	23	6.03±1.22

2.2 不同宫颈病变组中 HPV E6/E7 mRNA 检出率的比较

由于本研究中炎症组和 CIN I 组患者较多,为节约成本和便于统计,分别随机选取 60 例标本检测 HPV E6/E7 mRNA,其余 3 个组均对所有患者进行检测。HPV E6/E7 mRNA 的阳性检出率随着宫颈病变程度的升高而逐级升高,见表 2。除了炎症组与 CIN I 组的 HPV E6/E7 mRNA 检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$),其余各组之间的检出率两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

表 2 不同宫颈病变组中 HPV E6/E7 mRNA
检出情况[*n*(%)]

组别	<i>n</i>	阳性	阴性
炎症组	60	5(8.33)	55(91.67)
CIN I 组	60	7(11.67)	53(88.33)
CIN II 组	59	19(32.20)	40(67.80)
CIN III 组	61	41(67.21)	20(32.79)
宫颈癌组	23	21(91.30)	2(8.70)

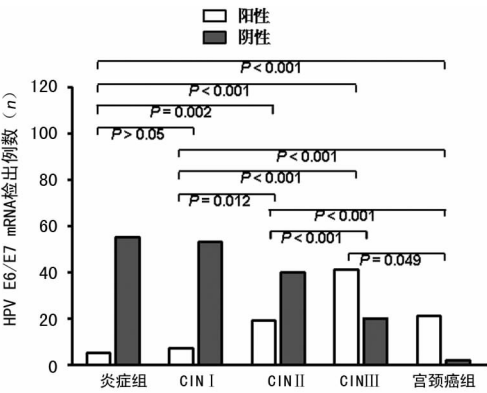


图 1 不同宫颈病变组中 HPV E6/E7 mRNA 检出率及差异比较

3 讨 论

目前,国内宫颈筛查主要采用宫颈液基细胞学检测(TCT)联合 HPV-DNA 检测,通过观察细胞形态的改变和检测 HPV-DNA 病毒载量对宫颈疾病进行筛查和初步诊断。特别是 HPV-DNA 检测,因其灵敏度高、检测时间短、费用低等优势已在临床广泛应用。但随之而来困扰临床医务工作者的是,检测 HPV-DNA 只能提示病毒的有无,对于宫颈病变的具体程度则需要阴道镜和病理活检的进一步诊断。而且,对于 HPV-DNA 病毒载量与宫颈病变程度是否有相关性,学者间持不同观点。周斌兵等^[3]运用二代杂交捕获(HC-II)方法分析病毒负荷量与 987 例宫颈癌及其癌前病变的关系中指出,随着宫颈病变严重程度的增加,HPV-DNA 的检出率随之增加,但是从病毒负荷量的集中及离散趋势来看,HPV-DNA 负荷量并未随着宫颈病变等级的增加而增加,反而有些有所减少,结果显示病毒负荷量与宫颈病变的严重程度无相关性。姜玲等^[4]与 Schiffman 等^[5]也分别报道指出两者之间没有相关性。而不同的观点来自于 Josefsson 等^[6]所做的一个时间跨度长达 26 年的研究,结果指出宫颈原位癌发生的危险性随着 HPV-DNA 负荷量的增加而增加。本研究结果显示,HPV-DNA 病毒负荷量并未随着宫颈病变程度的增加而增加,病毒负荷量与宫颈病变的严重程度无相关性,这可能与本研究的病例数、人群分布及未根据 HPV 类型进行分组等因素有关。因此,选择能够更加全面和准确的评估、预测宫颈病变程度的检测指标成为临床需求和研究重点。

E6 和 E7 是病毒癌基因,可显著介导抑癌基因 p53 和 pRb 的降解,从而干扰细胞周期调节,它们的表达导致宿主细胞恶性转化。mRNA 是 E6 和 E7 的转录产物,一旦 HPV 整合进入人体的基因组,E6/E7 mRNA 的表达将不受限制。国外多位学者研究证实 E6/E7 mRNA 水平与宫颈病变的严重程度相关^[7-8]。此外,有文献报道 HPV E6/E7 mRNA 的表达与病变严重程度的相关性检测,其灵敏度与 HPV-DNA 检测相似,但特异性却优于 HPV-DNA 检测^[2]。

国内也有学者和机构对 HPV E6/E7 mRNA 的临床应用进行探讨和总结。王华等^[9]报道应用支链 DNA(bDNA)技术检测 HPV E6/E7 mRNA,该技术是一种三明治结构的核酸杂交方法,采用 bDNA 分子放大捕获的目标 DNA/RNA 信号,所得结论与本研究相似。但是 bDNA 技术方法复杂,对实验室条件要求较高,不利于在临床实验室广泛推广。本研究采用的 RT-PCR 技术,操作简单,对实验室要求不高,易于在临床推广使用。本研究结果显示,HPV E6/E7 mRNA 的检出率随着宫颈病变程度的升高而逐级升高,除了炎症组(下转第 3262 页)

菌,国内有报道肺炎链球菌耐药率增高,青霉素耐药率已达到 100%^[3];国外也有报道,儿童青霉素不敏感型肺炎链球菌(PNSSP)的高分离率在亚洲地区普遍存在^[8]。但本组资料中肺炎链球菌对左氧氟沙星和青霉素耐药率均较低,分别为 13.6%、27.3%,对复方磺胺甲噁唑、四环素、红霉素和克林霉素耐药率较高,未发现万古霉素和利奈唑胺耐药株,与 2011~2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测数据基本一致^[6-7]。金黄色葡萄球菌是引起儿童 CAP 最主要的革兰阳性菌。20 世纪 90 年代以来社区获得性金黄色葡萄球菌 CA-MRSA 感染开始流行并可在儿童中广泛定植,它的高毒力,高并发症率,连同广泛扩散率已经引起医学界重视。虽然本资料显示,金黄色葡萄球菌 MRSA 检出率较低,也未发现对万古霉素、利奈唑胺耐药株。但鉴于已有万古霉素耐药的报道^[9],医院仍应注意加强监管万古霉素等抗菌药物的治疗用量,以延缓细菌耐药的产生,节约医药卫生资源。

近年来,随着免疫抑制剂和大量广谱抗菌药物的应用,多重耐药菌株感染病例日益增加。对于儿童 CAP,病原菌及耐药性的报道不一,其原因可能是各家医院用药情况不同,细菌所面临的抗菌药物压力不同,以及与研究对象年龄、研究时间以及地域性的差异等因素有关。因此对儿童 CAP 致病菌进行耐药监测,可以准确了解不同时期病原菌在我国不同地区的分布情况及耐药现状,从而指导临床医生参照本地区流行病学特点合理使用抗菌药物,以控制细菌耐药率的上升,这对医院感染控制起着积极的作用。

参考文献

[1] Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav ZA, et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia [J]. Bull World

Health Organ, 2008, 86(5): 408-416.

[2] 编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(2): 83-90.

[3] 谭转欢, 罗友军, 朱秀兰. 儿童细菌性肺炎的病原菌分布及其耐药状况研究[J]. 中国现代医生, 2013, 51(18): 15-17.

[4] 张枫, 马萍. 儿童社区获得性肺炎病原菌分布特点及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(22): 3069-3070.

[5] 王喆, 季伟, 郭红波, 等. 儿童社区与院内获得性肺炎的细菌病原构成及其耐药性对比研究[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(3): 211-216.

[6] 杨青, 俞云松, 孙自镛, 等. 2011 年中国 CHINET 呼吸道病原菌分布和耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 357-364.

[7] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 321-330.

[8] Kim SH, Song JH, Chung DR, et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of Streptococcus pneumoniae isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(3): 1418-1426.

[9] 周晓英, 张书海. 耐万古霉素金黄色葡萄球菌耐药机制及检测方法研究进展[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(7): 422-424.

(收稿日期: 2014-04-07 修回日期: 2014-08-15)

(上接第 3259 页)

与 CIN I 组的检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$), 其余各组之间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$), 与众多文献报道一致。但本研究也发现, 宫颈癌组中有 2 例 E6/E7 mRNA 呈阴性, 可能与癌细胞在活动状态下, 其基因不稳定, 出现突变、插入、重排、基因沉寂等机制有关, 有待进一步探索研究。

综上所述, HPV E6/E7 mRNA 能为临床提供更具有特异性和预测价值的检测结果, 对于宫颈癌的早期诊断、控制其发展及预后监测有着极其重大的意义。

参考文献

[1] 李园园. HR-HPV 与宫颈癌及癌前病变发生及预后的相关性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2013.

[2] Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2008, 8(4): 405-415.

[3] 周斌兵, 孙丽洲, 尤志学. 高危型人乳头瘤病毒测定与宫颈癌及其癌前病变的关系[J]. 江苏医药, 2009, 35(7): 774-777.

[4] 姜玲, 李劼, 汤彩, 等. 应用 HC-II 法检测宫颈高危型人乳头状病毒 479 例临床分析[J]. 实用癌症杂志, 2006, 21(1): 36-38.

[5] Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica [J]. JAMA, 2000, 283(1): 87-93.

[6] Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study [J]. Lancet, 2000, 355(9222): 2189-2193.

[7] Cattani P, Zannoni GF, Ricci C, et al. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 3895-3901.

[8] Cattani P, Siddu A, D'onghia S, et al. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(7): 2136-2141.

[9] 王华, 陈亚宝, 叶丽华, 等. 应用支链 DNA 技术检测人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 在宫颈疾病筛查中的价值[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(15): 4362-4366.

(收稿日期: 2014-04-23 修回日期: 2014-08-30)