

人乳头状瘤病毒持续感染状态下 E6、E7 蛋白 mRNA 在宫颈癌不同分期的表达结果

李 玲,张秋莹,刘 杨(湖北医药学院附属随州医院医学检验科,湖北随州 441300)

【摘要】 目的 探讨人乳头状瘤病毒(HPV)持续感染状态下 E6、E7 蛋白 mRNA 在宫颈癌不同分期的表达。**方法** 选择 2012 年 8 月至 2015 年 8 月该院收治的宫颈癌患者 91 例。TNM 分期为Ⅰ期 32 例,Ⅱ期 29 例,Ⅲ期 30 例。另选同期该院体检的 42 例宫颈慢性炎性患者进行对照。所有患者宫颈组织标本实施超薄液基细胞学检查(TCT),并做 HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 检测,比较各种方法的检测结果,分析 HPV E6/E7 mRNA 与宫颈癌分期的相关性以及与 HPV DNA 检测的一致性。**结果** 慢性炎性 HPV DNA 阳性检出率较 HPV E6/E7 mRNA 更高,而宫颈癌Ⅰ~Ⅲ期的 HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率更高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。随着宫颈病变程度增加,HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 的相对拷贝值均逐渐增大,不同宫颈癌分期的患者 HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 的相对拷贝值差异均有统计学意义($P<0.05$)。HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率及相对拷贝值与宫颈癌分期均呈正相关,且与 HPV DNA 检测具有较好的一致性。**结论** HPV 持续感染状态下 E6、E7 蛋白 mRNA 的表达与宫颈癌不同分期有关,HPV E6/E7 mRNA 检测有助于早期判断宫颈癌病情进展,具有临床价值。

【关键词】 人乳头状瘤病毒; E6、E7 蛋白 mRNA; 宫颈癌; 不同分期

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.04.032 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)04-0514-03

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤,近年来,随着我国社会的发展和宫颈癌筛查的广泛开展,宫颈癌的发病率以每年约 3% 的比例增加,已成为威胁女性健康的重要疾病^[1]。根据统计,宫颈癌在女性恶性肿瘤的发病率排名第 2,但其致死率却位居首位^[2]。由于宫颈在发生癌变前会经历较长时期的可逆性病变过程,所以早期实施诊断并给予干预是防治宫颈癌变的一个关键因素^[3]。目前研究认为,人乳头瘤病毒(HPV)是导致子宫颈癌的主要原因。而近年来的研究显示,高级鳞状上皮内瘤变及宫颈癌中 HPV E6 和 E7 蛋白的表达水平显著提高,提示 E6 及 E7 蛋白的表达水平可能与宫颈癌进展程度及细胞的恶性转化有密切关系^[4]。现探讨 HPV 持续感染状态下 E6、E7 蛋白 mRNA 在宫颈癌不同分期中的表达结果,目的在于早期辅助诊断宫颈癌患者病情,为防治宫颈癌提供相应的数据和诊断方案。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 8 月至 2015 年 8 月该院收治的宫颈癌患者 91 例,均为女性,年龄 39~68 岁,平均年龄(44.2±2.1)岁。TNM 分期:Ⅰ期 32 例,Ⅱ期 29 例,Ⅲ期 30 例。入选标准^[5]:(1)均符合 WHO 关于宫颈癌的有关诊断标准。(2)均为宫颈鳞癌或腺癌。(3)TNM 分期为Ⅰ~Ⅲ期。(4)年龄大于 35 岁。排除标准:(1)其他类型的恶性肿瘤。(2)有血液类疾病者。另选同期该院体检的 42 例宫颈慢性炎性患者进行对照,年龄 40~65 岁,平均年龄(45.1±2.3)岁。宫颈癌患者与宫颈慢性炎性患者的性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 研究方法 应用 HPV3.0 Assay(bDNA)定量检测试剂盒检测 HPV E6/E7 mRNA,试剂盒为科迪亚公司生产。将所有患者的宫颈细胞标本分别行 5 min 离心,弃上清液,采用蒸馏水清洗 1 次,再离心,弃上清液,将剩余离心物质添加裂解剂后进行裂解处理,所得裂解液进行 HPV E6/E7 mRNA 检测。加入 2.0 mol/L NaOH 溶液至裂解液内,于 55 ℃水浴加热 30 min,加终止反应液使反应终止,获得的标本置于-20 ℃保存

待测,检测步骤严格依照说明书进行。HPV DNA 检测是将处理所得标本置于温箱水浴加热约 5 min 后备用,检测步骤严格按照说明书操作。其中 RNA 提取试剂盒产自德国 QIAGEN 公司,逆转录试剂盒产自 Fermentas,荧光定量 PCR 试剂盒产自上海吉玛公司。

1.3 观察指标 比较 HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 检测结果,患者 TCT 检测结果,分析 HPV E6/E7 mRNA 与宫颈癌分期的相关性以及与 HPV DNA 检测的一致性。

1.4 统计学处理 使用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,相关性分析应用 Pearson 法进行评价,一致性分析使用 Kappa 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 的检测结果比较 慢性炎性患者 HPV DNA 阳性检出率较 HPV E6/E7 mRNA 高,而宫颈癌Ⅰ~Ⅲ期的 HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率更高,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 的检测
结果比较[n(%)]

类别	n	HPV DNA		HPV E6/E7 mRNA	
		阳性(+)	阴性(-)	阳性(+)	阴性(-)
慢性炎性	42	11(26.19)	31(73.81)	3(7.14)	39(92.86)
宫颈癌	Ⅰ期	21(65.63)	11(34.38)	23(71.88)	9(28.13)
	Ⅱ期	29(79.31)	6(20.69)	25(86.21)	4(13.79)
	Ⅲ期	30(93.33)	2(6.67)	29(96.67)	1(3.33)

2.2 患者 TCT 检测结果比较 随着宫颈病变程度的增加,HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 的相对拷贝值均逐渐增大,不同宫颈癌分期患者的 HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 的相对拷贝值差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 HPV E6/E7 mRNA 与宫颈癌分期的相关性 与 HPV

DNA 的一致性结果比较 HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率及相对拷贝值与宫颈癌分期均呈正相关,且与 HPV DNA 检测具有较好的一致性。见表 3。

表 2 患者 TCT 检测结果比较(±s)

类别	n	HPV E6/E7 mRNA 相对拷贝值	HPV DNA 相对拷贝值
慢性炎性	42	6.428±2.158	2.182±1.017
宫颈癌 I 期	32	233.565±128.244*	1 058.254±733.495*
II 期	29	539.584±226.987* ^a	2 143.939±657.382* ^a
III 期	30	764.281±436.206* ^{ab}	3 059.252±1 452.565* ^{ab}

注:与慢性炎性比较,**P*<0.05;与宫颈癌 I 期比较,^a*P*<0.05;与宫颈癌 II 期比较,^b*P*<0.05。

表 3 HPV E6/E7 mRNA 与宫颈癌分期的相关性
及与 HPV DNA 的一致性结果比较

项目	宫颈癌分期		HPV DNA 检测
	<i>r</i>	<i>P</i>	Kappa
HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率	0.658	0.002	0.795
HPV E6/E7 mRNA 相对拷贝值	0.731	0.000	0.774

3 讨 论

宫颈癌作为女性常见的恶性肿瘤,近年来在国内的发病率有较大的增加趋势。上世纪 80 年代发现 HPV 感染可诱发包括宫颈癌在内的多种恶性肿瘤,并得到医学界的广泛认同^[6]。近年来,随着分子生物学技术的发展,研究发现 HPV 基因组编码的 E6、E7、E1、E2、E4、E5 蛋白与宫颈癌发生、发展密切相关^[7]。尤其是 E6、E7 基因在 HPV16 相关的宫颈癌及 54% 中重度宫颈上皮内瘤变(CIN)中持续表达^[8-9]。提示高危 HPV E6、E7 持续表达是宫颈细胞发生恶性转化及维持其恶性表型的重要因素。因此,分析 HPV 持续感染状态下 E6、E7 蛋白 mRNA 在宫颈癌不同分期中的表达结果对筛查宫颈癌具有较大的临床价值。

本研究结果显示,慢性炎性 HPV DNA 阳性检出率较 HPV E6/E7 mRNA 更高,而宫颈癌 I ~ III 期的 HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率更高,但差异无统计学意义(*P*>0.05),提示低级别宫颈病变中 HPV DNA 的阳性检出率相对较高,但高级别宫颈病变中,HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率稍高。表明使用 HPV DNA 检测更容易将低级别的宫颈病变归入高恶化风险的相关病变中,进而导致对患者的过度检查及治疗,原因是 HPV E6/E7 mRNA 具有较低的阳性检出率,可更好地呈现部分低级别宫颈病变患者机体内可能存在的高危 HPV 病毒的游离状态,以及癌基因的低水平表达,或者是缺少转录活性状态,此类病毒大都具有较好的自然清除作用,因此能够避免过度检查及治疗^[10]。高级别 HPV 持续感染的宫颈病变患者,HPV E6/E7 mRNA 的高转录水平表明高危型 HPV 可能已经整合至宿主的基因组,致使宿主细胞丧失对 E6、E7 的转录控制,提示 E6/E7 基因的过表达成为宫颈病变恶性转化所维持发展的一个必要条件^[11-12]。本组结果表明,随着宫颈病变程度的增加,HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 的相对拷贝值均逐渐增大,不同宫颈癌分期患者的 HPV E6/E7 mRNA 及 HPV DNA 的相对拷贝值差异均有统计学意义(*P*<0.05),说

明不同分期的宫颈癌病变组织 HPV E6/E7 mRNA 具有一定的差异性^[13]。本组结果显示,HPV E6/E7 mRNA 阳性检出率及相对拷贝值与宫颈癌分期均呈正相关,且与 HPV DNA 检测具有较好的一致性。提示 HPV 持续感染状态下 E6、E7 蛋白 mRNA 在宫颈癌的表达与其分期的严重程度密切相关,所以判断 HPV E6/E7 mRNA 的检测对宫颈病变的反馈具有十分重要的诊断价值,且不会受到低级别宫颈病变的干扰,在高级别宫颈病变的检测方面也与 HPV DNA 具有相似的检测结果。Li 等^[14]的研究报道中也可找到类似结果进行证实。

综上所述,HPV 持续感染状态下 E6、E7 蛋白 mRNA 的表达与宫颈癌不同分期有关,临床检测 HPV E6/E7 mRNA 有助于早期判断宫颈癌的病情进展,具有重要的临床意义。

参考文献

[1] 闫蓓,杨黎明,杨琛,等.上海市浦东新区 2002~2010 年宫颈癌流行状况及生存分析[J].中国慢性病预防与控制,2014,22(4):506-508.

[2] 赵旭晖,崔勇,姜淑芳,等.高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈癌筛查中的意义[J].中华医学杂志,2014,94(43):3432-3435.

[3] Zhu D,Ye M,Zhang W,et al.E6/E7 oncoproteins of high risk HPV-16 upregulate MT1-MMP,MMP-2 and MMP-9 and promote the migration of cervical cancer cells[J].Int J Clin Exp Pathol,2015,8(5):4981-4989.

[4] 曹泽毅.中华妇产科学[M].6 版.北京:人民卫生出版社,2005:2010-2012.

[5] 刘桐宇,谢榕.人乳头瘤病毒 E6、E7 基因致癌机制及临床应用进展[J].中华生物医学工程杂志,2013,19(2):172-176.

[6] Wang HY,Park S,Lee D,et al.Prevalence of type-specific oncogenic human papillomavirus infection assessed by HPV E6/E7 mRNA among women with high-grade cervical lesions[J].Int J Infect Dis,2015,8(37):135-142.

[7] 黄宝英,周伦顺,富显果,等.HPV E6/E7 mRNA 检测对宫颈癌筛查意义的初步评价[J].中华肿瘤防治杂志,2013,20(14):1061-1064.

[8] Paulraj F,Abas F,Lajis NH,et al.The curcumin analogue 1,5-Bis(2-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one induces apoptosis and downregulates E6 and E7 oncogene expression in HPV16 and HPV18-infected cervical cancer cells[J].Molecules,2015,20(7):11830-11836.

[9] 郭毅,唐艳君,赵楠,等.HPV16 E6 通过阻碍 ING4 与 p53 的结合抑制子宫颈癌细胞凋亡的实验研究[J].中华妇产科杂志,2012,47(11):861-863.

[10] Cesur A,Nicol C,Groves H,et al.The subcellular localisation of the human papillomavirus (HPV) 16 E7 protein in cervical cancer cells and its perturbation by RNA aptamers[J].Viruses,2015,7(7):3443-3461.

[11] 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].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(15):4362-4366.

[12] Phaton R,Gutierrez J,Jiang Z,et al.Naive and radiola-

beled antibodies to E6 and E7 HPV-16 oncoproteins show pronounced antitumor activity in experimental cervical cancer[J]. Immunotherapy, 2015, 7(6): 631-640.

[13] 刘桐宇, 谢榕, Zhang LL, 等. TCT 标本检测高危 HPV E6/E7 mRNA 及在宫颈病变中的应用研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志: 电子版, 2011, 7(3): 202-205.

[14] Li F, Cui J. Human telomerase reverse transcriptase regu-

lates vascular endothelial growth factor expression via human papillomavirus oncogene E7 in HPV-18-positive cervical cancer cells[J]. Med Oncol, 2015, 32(7): 199-200.

(收稿日期: 2015-08-22 修回日期: 2015-10-15)

• 临床研究 •

多潘立酮联合埃索美拉唑治疗胃食管反流病的临床疗效

刘兆云, 陈 轩, 郭炜伦, 吴仲玉, 郑菁菁, 谢佳玲, 王 琦, 张银龙(福建中医药大学附属宁德市中医院消化内镜室, 福建宁德 352100)

【摘要】 目的 探讨多潘立酮及埃索美拉唑联合应用治疗胃食管反流病的临床效果。**方法** 2012 年 10 月至 2014 年 6 月该院治疗的 94 例诊断为胃食管反流病的患者, 随机分为 2 组, 均给予多潘立酮进行基础治疗, 对照组患者加用奥美拉唑, 治疗组患者加用埃索美拉唑, 2 组治疗方案均为 2 周, 比较 2 组患者临床症状改善时间、住院时间、复发率及临床总有效率。**结果** 治疗组患者的临床症状消失时间、胃黏膜恢复时间及住院时间均明显少于对照组, 2 组患者 3 项指标对应比较, 差异有统计学的意义($P<0.05$); 治疗组患者复发 7 例, 占 14.9%, 明显低于对照组(38.3%)复发率, 差异有统计学意义($P<0.05$); 治疗组患者临床总有效率为 95.7%, 明显高于对照组(72.3%), 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 多潘立酮与埃索美拉唑联合使用治疗胃食管反流病临床效果显著, 好于多潘立酮联合奥美拉唑, 该方法改善患者症状更明显, 值得临床推广应用。

【关键词】 多潘立酮; 埃索美拉唑; 胃食管反流病; 临床疗效观察

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.04.033 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)04-0516-02

胃食管反流病(GERD)是一种临床十分常见的消化系统疾病, 其主要发病原因是胃及十二指肠的内容物反流入食管, 其中反流物包括胃酸和胃蛋白酶, 这些成分腐蚀食管, 造成患者的进一步损害; 同时, 如果分泌物进入肺部或气管, 诱发咳嗽、喘息等症状, 危及患者生命安全^[1]。胃食管反流病临床表现症状明显, 表现为反酸、烧心、吞咽困难、吞咽疼痛等, 对患者的生活造成极大影响, 临床特别需要新的、有效的治疗方案。现探讨多潘立酮及埃索美拉唑联合应用治疗胃食管反流病的临床效果。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 10 月至 2014 年 6 月该院治疗的 94 例胃食管反流病患者, 均符合胃食管反流病的诊断标准^[2]。将 94 例患者随机分为 2 组, 各 47 例。治疗组患者男 36 例, 女 11 例, 年龄 24~66 岁, 平均年龄(49.2±5.5)岁, 病程 0.4~3 年, 平均病程(1.5±0.3)年; 对照组患者男 35 例, 女 12 例, 年龄 25~66 岁, 平均年龄(48.7±6.2)岁, 病程 0.5~3 年, 平均病程(1.6±0.3)年。2 组患者的年龄、性别、病程等一般资料比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 治疗方法 对照组患者给予多潘立酮(西安杨森制药有限公司)联合奥美拉唑肠溶胶囊(浙江金华康恩贝生物制药有限公司)进行治疗, 其中多潘立酮剂量为 10 mg 每次, 每天 3 次, 奥美拉唑肠溶胶囊每日 1 次, 每次 10 mg。治疗组患者使用多潘立酮, 剂量同对照组, 同时加用埃索美拉唑(阿斯利康制药有限公司), 40 mg 每次, 每天 1 次, 2 组治疗方案均为 2 周。

1.3 疗效判定标准 包括痊愈、反酸、烧心、吞咽困难、吞咽疼痛等临床症状。显效: 痊愈、反酸、烧心、吞咽困难、吞咽疼痛等临床症状有较大改善, 且不影响日常工作和生活。有效: 痊愈、反酸、烧心、吞咽困难、吞咽疼痛等临床症状有一定的改善, 但

不明显, 影响正常工作和生活。无效: 临床症状无改善, 甚至加剧, 患者无法正常工作和生活。临床总有效率=痊愈+显效+有效的例数之和, 再除以总例数, 最后乘以 100%。

1.4 统计学处理 使用 SPSS14.0 统计软件进行数据分析, 计数资料采用卡方检验, 计量资料应用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组患者临床症状的改善时间及住院时间结果比较 治疗组患者临床症状消失时间、胃黏膜恢复时间及住院时间均明显少于对照组, 2 组患者 3 项指标比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 2 组患者临床症状改善时间及住院时间结果比较($\bar{x}\pm s, d$)				
组别	<i>n</i>	临床症状消失时间	胃黏膜恢复时间	住院时间
治疗组	47	7.1±1.6*	10.4±3.3*	6.2±2.4*
对照组	47	9.8±2.1	14.5±2.1	13.8±2.2

注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

2.2 2 组患者治疗后复发率结果比较 治疗组患者复发 7 例, 占 14.9%; 对照组复发 18 例, 占 38.3%, 治疗组明显低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 2 组患者治疗后复发率结果比较			
组别	<i>n</i>	复发例数(<i>n</i>)	复发率(%)
治疗组	47	7	14.9*
对照组	47	18	38.3

注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

2.3 2 组患者临床疗效结果比较 治疗组患者痊愈 23 例, 占