

人乳头瘤病毒感染与发生宫颈癌及非癌宫颈疾患危险性分析

张 伟 金顺钱 刘伯奇 梁 肖 商 铭 孙建衡 吴爱如 王希霞 章文华 黎均跃

摘要 采用斑点杂交技术对247份宫颈癌、143份非癌宫颈疾患活检组织标本分别进行了人乳头瘤病毒6/11 (HPV6/11)、HPV16和18型DNA序列检测,实验结果指出:(1)247份宫颈癌标本中,HPV同源序列检出率为65.99%,其中HPV16型检出率为55.06%,占全部宫颈癌HPV阳性标本的71.28%,分别为该组HPV6/11及18型感染的4.25倍和5.67倍。(2)143例非癌宫颈疾患标本中,HPV检出率为51.05%,其中HPV6/11型占全部阳性标本的50.61%。(3)分析比较非癌宫颈疾患组与宫颈癌组 HPV感染与宫颈癌发生的危险性,发现HPV感染后发生宫颈癌危险性明显增高($RR=1.86, P<0.01$);比较两组HPV16/18感染,发现HPV16/18型感染后宫颈癌发生的危险进一步增加($RR=3.43, P<0.001$);比较两组6/11感染与宫颈癌发生无关。

以上结果提示与非癌宫颈疾患相比,宫颈癌的发生可能与HPV感染有关,尤其与HPV16/18型感染关系最为密切。

关键词 人乳头瘤病毒 宫颈癌 相对危险性 斑点杂交

有资料表明,全世界宫颈癌年发病人数为50万人,居人类肿瘤的第五位,约占人类新发肿瘤的7.3%,占妇女肿瘤的15%。而在一些宫颈癌高发区,如非洲、中美洲及南美洲、亚洲(日本除外),宫颈癌为妇女的主要肿瘤,占全部肿瘤的20%~30%,这些病例80%发生在第三世界国家^[1]。

早期流行病学资料指出,宫颈癌的发生与初次性交年龄、性卫生状况及性配偶数有密切关系,提示在宫颈癌的发生过程中,有某些性传播因子介入^[2]。近十年分子流行病学研究表明,妇女宫颈癌与HPV感染有密切关系。目前已知经常感染宫颈的HPV型别为HPV6型、11型、16型、18型、31型、33型及39型等^[3]。不同HPV型别致病性不同。HPV6/11型主要与宫颈及生殖道良性病变有关,如慢性宫颈炎及乳头状瘤、外阴及阴道尖锐湿疣等;而HPV16、18等型则主要与妇女宫颈及下生殖道恶性肿瘤有关^[4]。

研究我国宫颈癌的发生与HPV感染之间的

关系,确定与我国宫颈癌有关的HPV型别,对于进一步了解我国癌宫颈发病有关因素,完善我国宫颈癌防治战略,均具有理论和实际意义。

本文以DNA杂交技术为手段,对247份宫颈癌及143份非癌宫颈组织标本中HPV16、18及6/11型进行了检测,并经统计学处理,得到较为理想的结果。

材料和方法

一、标本收集:247份宫颈癌活检组织标本及143份非癌宫颈组织活检标本均经组织学证实,并-70℃保存。

二、组织DNA提取:自-70℃取出并融化组织标本,加入数滴TES(50mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 62.5mmol/L Na₂EDTA; 2% SDS)。加入适量海沙研至乳糜状,加入10倍体积TE缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH

本文作者单位:中国医学科学院肿瘤研究所 100021
北京市

7.5 mmol/L Na_2EDTA), 使SDS最终浓度为0.2%, 加蛋白酶K (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 37 $^\circ\text{C}$ 过夜。酚、酚/氯仿(1:1)、氯仿各提取一次, 用2倍体积无水乙醇沉淀抽提的组织DNA, 高速离心(15 000r/min) 15分钟, 收集沉淀DNA, TE溶解后加入RNA酶A(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 37 $^\circ\text{C}$ 2小时。进行第二次酚、酚/氯仿、氯仿提取。无水乙醇沉淀DNA后, TE缓冲液溶解, 定量后-20 $^\circ\text{C}$ 保存。

三、HPV DNA 探针标记: HPV6B/11、16及18型质粒DNA分别经BamHI或EcoRI酶切后, 电泳分离出各自DNA片段, 采用Amersham公司生产的同位素标记试剂盒(N5000)和 ^{32}P -dCTP对上述DNA分子分别进行标记, 探针比活 $10^8\text{cpm}/\mu\text{g}$ DNA, 杂交前100 $^\circ\text{C}$ 10分钟水浴变性。

四、斑点杂交: 细胞及组织标本DNA经100 $^\circ\text{C}$ 水浴变性后, 分别点样于硝酸纤维膜上(1~3 $\mu\text{g}/\text{点}$), 80 $^\circ\text{C}$ 干烤2小时后将其装入杂交袋内, 加入预杂交液(50%甲酰胺, 5 \times SSC, 5倍Denhard's液, 50mmol/L磷酸缓冲液, pH6.8, 0.25mg/ml变性后小牛胸腺

DNA) 42 $^\circ\text{C}$ 预杂交过夜。去除预杂交液, 加入杂交液(5 \times SSC, 5 \times Denhard's液, 20mmol/L磷酸缓冲液, pH6.8, 0.1mg小牛胸腺DNA, 10%硫酸葡聚糖), 分别加入不同型别的分子探针($1.5\times 10^6\text{cpm}/\text{ml}$), 在严格条件下杂交($T_m-17^\circ\text{C}$)48小时, 2 \times SSC(含0.1%SDS)室温洗膜3次, 每次15分钟, 0.1 \times SSC(0.1%SDS)68 $^\circ\text{C}$ 洗膜2小时, -70 $^\circ\text{C}$ 自显影一周。

结 果

1. 在247份宫颈癌DNA标本中, HPV同源序列检出率为65.99%, 其中主要以HPV16型为主, 检出率为46.96%, 包括双重及三重感染在内, HPV16感染率为55.06% (表1)。观察HPV检测阳性标本中各HPV型别分布情况, 发现宫颈癌组HPV16型感染占该组HPV阳性标本的71.28%, 而HPV18及6B/11型只分别占该组阳性标本的15.96%和12.77% (附图)。HPV16型阳性所占比例分别为HPV18型的4.25倍及6B/11型的5.67倍。

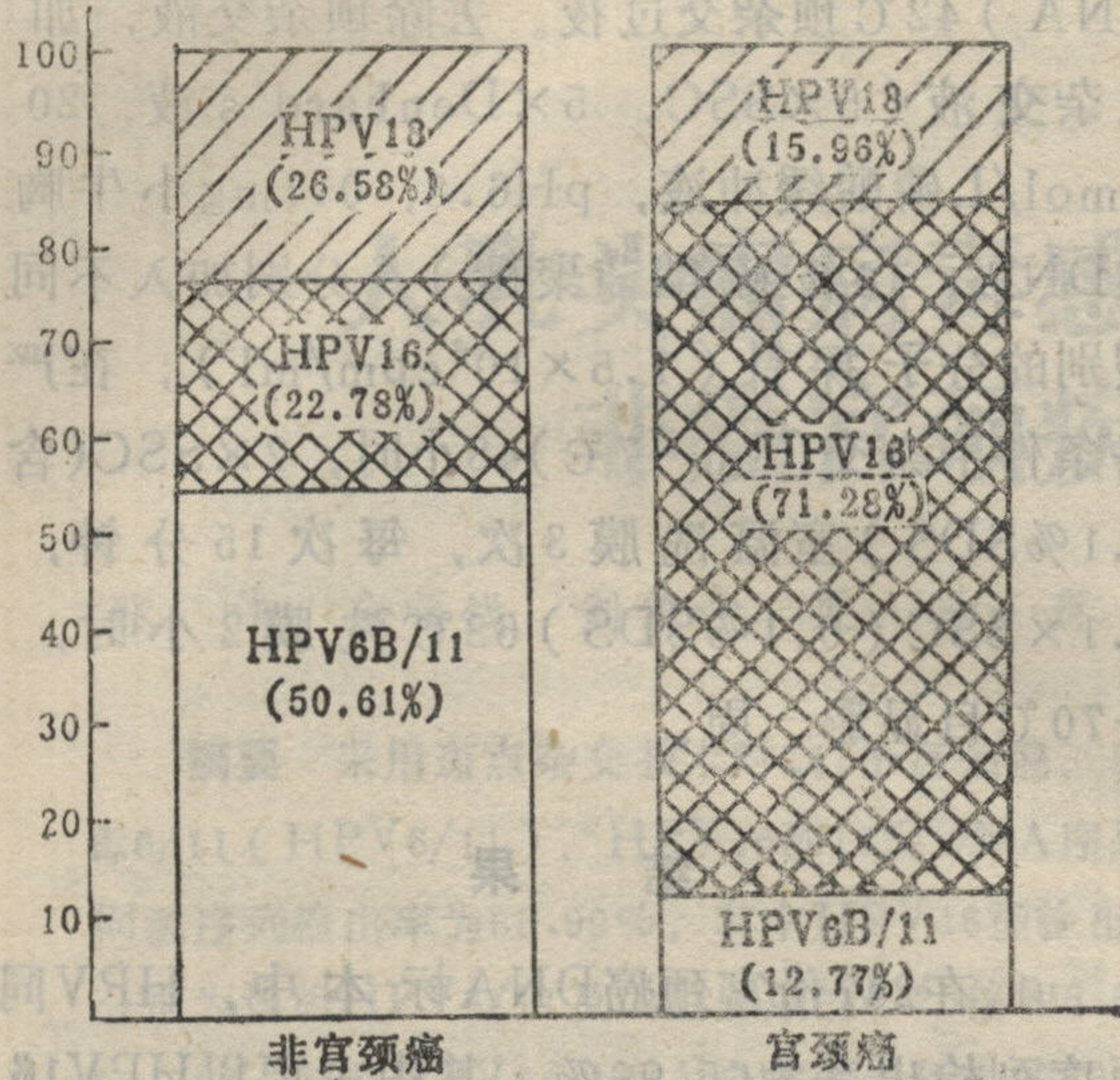
2. 在143份非癌宫颈疾患标本中, HPV检

表1 宫颈癌及非癌宫颈活检标本中HPV同源序列的检测

组织学诊断	标本数	HPV感染阳性					阳性总数
		HPV16	HPV18	HPV6B/11	HPV16/18	三重	
宫颈癌	247	116	12	15	11	9	163
	(%)	(46.96)	(4.86)	(6.07)	(4.45)	(3.64)	(65.99)
非癌宫颈疾患	143	15	18	37	0	3	73
	(%)	(10.49)	(12.59)	(25.87)	(0.00)	(2.09)	(51.05)

出率为51.05% (73/143), 主要以6B/11型感染为主, 感染率为25.87%, 而HPV16及18型感染率只分别为10.49%和12.59% (表1)。查该组HPV阳性标本中各型HPV分布情况时发现, HPV6B/11型占全部阳性标本的50.61%, 而HPV16及HPV18型只分别占该组22.78%和26.58% (附图)。

3. HPV感染后非癌宫颈疾患及宫颈癌危险性分析: 比较非癌宫颈疾患及宫颈癌组总HPV感染, 分析HPV感染与两组疾病发生的危险性, 发现HPV感染后发生宫颈癌危险性明显增高, 经统计学分析差别具有显著性 ($RR=1.86$, $P<0.01$, 95%CI=1.50~2.31), 提示HPV感染与宫颈癌的发生关系密切 (表2), 比较



附图 HPV阳性标本型别分布图

宫颈癌组及非癌宫颈疾患组HPV16/18型感染发现, 该二型病毒感染后患宫颈癌的危险性进一步增加, 经统计学检验差别极其显著 (RR=3.43 $P<0.001$, 95%CI=2.68~4.39)(表2)。提示HPV16/18感染在宫颈癌发生过程中可能起着非常重要的作用。比较HPV6/11型感染后发生宫颈癌及非癌宫颈疾患危险性, 发现发生宫颈癌较发生非癌宫颈疾患危险性明显降低, 而且这种差别在统计学上有显著性意义(RR=0.5, $P<0.05$, 95%CI=0.37~0.68) (表2)。提示HPV6/11感染与非癌宫颈疾患关系密切, 而与宫颈癌的发生关系可能不大。

表2 HPV感染后发生宫颈癌及非癌宫颈疾患危险性分析

组织学诊断	HPV阴性例数 (%)	HPV阳性例数 (%)	HPV16/18阳性例数 (%)	HPV6/11阳性例数 (%)
非癌	70(31.96)	73(33.33)	36(16.44)	40*(18.26)
宫颈癌	84(39.36)	163(74.43)	148(67.58)	24*(10.96)
RR	1	1.86	3.43	0.50
P		<0.01	<0.001	<0.05
95%CI		1.50~2.31	2.68~4.39	0.37~0.68

* 非癌组HPV阳性标本中含有3份三重感染, 在16/18及6/11组中分别统计2次, 故非癌组HPV阳性标本为76份

* 宫颈癌组HPV阳性标本中含有9份三重感染, 分别统计, 故阳性标本总和为172份。RR表示相对危险性

讨论

大量的实验证据支持宫颈癌与HPV之间的病原学关系: (1) 某些HPV型别可引起某些动物的肿瘤。(2) 在绝大多数癌前病变组织、浸润癌及宫颈癌细胞系(如Caski、Hela)中发现HPV16及18型DNA存在。(3) HPV基因组整合于细胞染色体中, 且整合部位大多发生在HPV早期基因的3'末端, 整合后的基因发生了丢失和重排, HPV16及18型转化基因(E6、E7)均稳定地保留下来并不断表达基因产物。(4) 体外实验证实HPV16、18型具有较强的转化活性, 能转化人及哺乳动物非上皮细胞, 转化基因功能定位研究表明, HPV16 E6及E7基因为该病毒的转化基因。(5)

HPV16E6、E7基因与活化的ras基因及人疱疹病毒转化基因共同转染, 能使大鼠肾上皮细胞及人角质上皮细胞转化。提示在宫颈癌的发生过程中HPV起着重要作用。

研究结果表明, 宫颈癌组HPV感染率为65.99%, 其中主要以具有转化能力的HPV16型为主, 其检出率为55.06%。同时观察HPV阳性标本中HPV各型别分布, 发现HPV16型感染占绝对优势, 占全部阳性标本的71.28%, 其分别为该组HPV18及6/11的4.25倍和5.67倍。以上结果提示, 在宫颈癌组织标本中HPV基因组存在极为普遍, 而且在宫颈癌标本中存在的HPV基因组主要以HPV16型为主, 支持HPV16型感染在宫颈癌发生过程中的病原学意义。在非癌宫颈疾患组HPV检测中, 虽

然阳性率为51.05%，但其主要为HPV6/11型感染，其占全部阳性标本的50.61%；而在宫颈癌组HPV阳性标本中，HPV6/11只占全部阳性标本的15.96%。以往研究认为HPV6/11型感染与宫颈癌关系不大。

比较非癌宫颈疾患组及宫颈癌组活检组织标本中HPV基因组的存在，发现HPV感染在宫颈癌组织中明显升高，且有非常显著的统计学意义（RR=1.86， $P<0.01$ ，95%CI=1.50~2.31），提示HPV感染在宫颈癌的发生过程中起着重要作用。

进一步分析比较不同型别HPV感染率在二组活检组织中的差别，发现HPV16/18感染率在宫颈癌组高于非癌宫颈疾患组（RR=3.43， $P<0.001$ ，95%CI=2.68~4.39）；而HPV6/11感染率较低（RR=0.5， $P<0.05$ ，95%CI=0.37~0.68）。以上结果提示宫颈癌的发生与HPV感染密切相关；HPV16/18型在宫颈癌的发生过程中可能起着更为重要的作用；而6/11则可能主要与非癌宫颈疾患有关。

Relative Risk Analysis of the Development of Cervical Noncancer Lesion and Cervical Carcinoma Associated with HPV Infection
Zhang Wei, et al., Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021

Two-hundred and forty-seven DNA samples extracted from cervical carcinoma tissues and 143 from cervical noncancer lesions were examined for the presence of human papillomavirus (HPV) type 6, 11, 16 and 18 DNA sequences by means of dot blot hybridization using ^{32}P -dCTP-labelled HPV probes ($T_m-17^\circ\text{C}$). The result showed that the overall positive rate of HPV infection in this group of cervical cancer was 65.99%, HPV type 16 was dominantly found in the group (55.06%) and accounted for 71.28%

in all the positive samples of cervical cancers, which were 4.25 and 5.67 times higher than those of HPV type 6/11 and 18, respectively. Detectable sequences homologous to HPVs in the cervical noncancer group was 51.05% and HPV types 6/11 accounted for 50.61% in the HPV-positive samples. The relative risk analysis of HPV infection in the two groups was performed and the relative risk (RR) of HPV infection for development of cervical cancer was increased (RR=1.86, $P<0.01$). Further analysis revealed that HPV 16, 18 infection in cervical epithelium might be the higher risk factor in the development of cervical carcinoma (RR=3.43, $P<0.001$); whereas HPV type 6/11 might be the lower risk factor for the development of cervical cancer (RR=0.5, $P<0.05$). Our results implied that the development of cervical cancer may be closely associated with HPV infection, especially with HPV type 16 and 18.

Key words Papillomaviruses Cervical cancer Relative risk Dot blot hybridization

参 考 文 献

- Munoz N. Human papillomavirus and cervical cancer. No94. Lyon IARC Scientific Publications, 1989. 123~154.
- Buckley JD, Doll R, Harris RWC, et al. case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. *Lancet*, 1981, ii: 1010.
- Schneider A, Kraus H, Gissmann L, et al. HPV infection of lower genital tract; Detection of Viral DNA in gynecological Swabs. *Int J Cancer*, 1985, 35: 443.
- Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. A papillomavirus DNA from cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983. 80: 3812.

(收稿: 1993-01-28 修回: 1993-05-08)