

# 人乳头状瘤病毒感染及端粒酶活性与宫颈癌的关系

吕雯 张广美 隋丽华 王晶

**【摘要】** 目的 探讨不同型别人乳头状瘤病毒(HPV)感染和端粒酶活化与宫颈癌的关系。方法 对 83 例宫颈癌、47 例宫颈上皮内瘤样病变(CIN)及 10 例正常宫颈应用 TRAP-PCR 银染定性及 TRAP-PCR-ELISA 定量法检测端粒酶活性,PCR 法检测 HPV 分型。结果 (1)端粒酶阳性率和 HPV 16/18 型阳性率:宫颈癌>宫颈 CIN>正常宫颈,CIN Ⅲ级>CIN I、Ⅱ级;HPV 6/11 型阳性率:CIN I、Ⅱ级>CIN Ⅲ级。(2)宫颈癌中端粒酶阳性:I 期<Ⅱ期<Ⅲ、Ⅳ期,中分化>高分化,腺癌与鳞癌差异无显著性;HPV 16/18 阳性:I 期<Ⅱ期<Ⅲ、Ⅳ期;HPV 6/11 阳性与临床分期、组织学分级及病理类型无关。(3)端粒酶阳性值:宫颈癌>CIN,CIN Ⅲ级>CIN I、Ⅱ级;HPV 6/11 拷贝数:CIN>宫颈癌,CIN I、Ⅱ级>CIN Ⅲ级;HPV 16/18 拷贝数:宫颈癌>CIN,CIN Ⅲ级>CIN I、Ⅱ级。结论 HPV 感染尤以 16/18 型和端粒酶的激活与宫颈病变恶变关系密切。

**【关键词】** 人乳头状瘤病毒;宫颈肿瘤;端粒酶

**Study on the correlation between the different papillomavirus type and telomerase in cervical cancer** LV Wen\*, ZHANG Guang-mei, SUI Li-hua, WANG Jing. \*Department of Gynecology, the Third Affiliated Hospital Harbin Medical University, Harbin 150040, China  
Corresponding author: LU Wen. The Second Affiliated Hospital, Medical School of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

**【Abstract】 Objective** To define a correlation between different human papillomavirus(HPV) types and telomerase activity in cervical cancer. **Methods** Telomerase activity was detected by TRAP-PCR and different HPV type was determined by PCR in 83 cervical cancer, 47 cervical intraepithelial neoplasia(CIN) and 10 normal cervix cases. **Results** With regard to positive rates of telomerase and HPV 16/18: the results were cervical cancer>CIN>normal cervix, CIN Ⅲ>CIN I, II; with regard to HPV 6/11 positive rate: the results showed CIN I, II>CIN Ⅲ. Positive rates of telomerase cervical cancer and HPV were bearing on grading and staging, but they did not correlate with histologic subtypes. Positive rate of HPV 6/11 had nothing to do with grading, staging and histologic patterns. On expression strength of telomerase and HPV 16/18: the results showed cervical cancer>CIN, CIN Ⅲ>CIN I, II. Regard to HPV 6/11' expression strength: the results showed CIN I, II>CIN Ⅲ, CIN>cervical carcinoma. **Conclusion** HPV 16/18 infection seemed to have played an important role in carcinogenesis of cervical lesions by activation of telomerase.

**【Key words】** Human papillomavirus; Cervical neoplasms; Telomerase

流行病学资料结合实验室的证据已经证实了宫颈人乳头状瘤病毒(HPV)与宫颈癌的病因关系,即 HPV 感染是引起宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌变的首要因素。端粒酶是一种逆转录酶,其活化在肿瘤的发生、发展中起重要作用,并随肿瘤恶性程度增加端粒酶活性也增加,而宫颈 CIN 时即可检测到端粒酶的表达,

宫颈癌时端粒酶激活程度更高。本研究通过检测宫颈癌的不同型别 HPV 感染与端粒酶活性,研究二者相关性,以对宫颈癌的早期发病机理进行深入探讨。

## 材料与方法

1. 标本来源 端粒酶活性检测选取哈尔滨医科大学附属第三医院 1997 年 5 月至 2001 年 6 月诊治的宫颈癌患者手术切除标本 83 例,宫颈 CIN 47 例(CIN I、Ⅱ级 39 例,CIN Ⅲ级 8 例)取自活检,10 例正常宫颈取自子宫肌瘤的子宫切除标本,所有病

作者单位:150040 哈尔滨医科大学附属第三医院(吕雯、隋丽华、王晶);黑龙江中医药大学附属第二医院(张广美)

第一作者现工作单位:310009 杭州,浙江大学附属第二医院

例均经病理学确证。其中宫颈癌均未进行过放疗、化疗,按 FIGO 1994 年分期,Ⅰ期 11 例,Ⅱ期 47 例,Ⅲ、Ⅳ期 25 例;组织学分型中,鳞癌 66 例,腺癌 17 例;组织学分级中,高分化癌 10 例,中分化癌 49 例,低分化癌 24 例。

HPV 检测标本取自宫颈脱落细胞。以无菌生理盐水棉球洗去宫颈外分泌物,用无菌棉拭子插入宫颈内,停 5 s 后旋动取宫颈分泌物,将棉拭子放入无菌试管,无菌密闭送检。

2. 试剂:采用端粒酶 PCR-ELISA 检测试剂盒(Boehringer),阳性对照为肿瘤 293 细胞株(端粒酶检测试剂盒提供),阴性对照为不含蛋白的裂解液;HPV 6、11 型和 16、18 型 PCR 荧光检测试剂盒。

### 3. 检测方法:

(1)标本制备:将脱落细胞或活检标本直接洗脱于 1 000  $\mu$ l 无菌生理盐水中,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,打散沉淀加入裂解液 50~100  $\mu$ l(视细胞量多少而定)混匀;置 4 $^{\circ}$ C 2 h(或 4 $^{\circ}$ C 过夜),12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,置 -30 $^{\circ}$ C 保存备用,同时测定蛋白含量。

(2)TRAP PCR-ELISA:主要试验步骤:取细胞提取液 1~5  $\mu$ l(蛋白含量 50 ng)加入 25  $\mu$ l TRAP PCR 扩增液,用无菌 DEPC 水补足至体积 50  $\mu$ l 混匀,覆盖无菌石蜡油 30  $\mu$ l 后在 PCR 扩增仪(Perkin Eliner 480 型)上按以下步骤进行引物的延伸及扩增反应:25 $^{\circ}$ C 30 min、90 $^{\circ}$ C 5 min 循环 1 个周期后再以 94 $^{\circ}$ C 30 s 变性、50 $^{\circ}$ C 30 s 退火、72 $^{\circ}$ C 90 s 延伸,共循环 30 个周期,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;取上述 PCR 产物 5  $\mu$ l 加变性液 20  $\mu$ l 混匀并置室温 10 min,加入杂交液 225  $\mu$ l 混匀后取出 100  $\mu$ l 包被于抗地高辛的酶标板中室温作用 2 h,加入过氧化物酶并与 TMB 底物显色作用 30 min 后终止反应,用酶标仪( $\Sigma$ 960 型)测其在波长 450 nm 的吸光度(A 值)。

(3)聚丙烯酰胺凝胶电泳:取剩余的 PCR 产物 45  $\mu$ l,加入氯仿:异戊醇(24:1)60  $\mu$ l,混匀后,5 000 r/min 离心 5 min。小心取上清液(PCR 产物)置另一 0.5 ml 离心管中,并加入 5  $\mu$ l 3 mol/L NaAc 溶液和 300  $\mu$ l 无水乙醇,混匀后,置 -30 $^{\circ}$ C 冰箱中 2~4 h(或过夜)。1 500 r/min 离心 20 min,使 PCR 产物沉淀,吸弃无水乙醇,置室温气干,加入 5~10  $\mu$ l 去离子水,使沉淀溶解,加入 5  $\mu$ l 上样缓冲液,进行 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳条件为 180 V、80 min。电泳结束后,

小心取下凝胶,用 10% 乙醇固定 5 min,1% 硝酸银浸胶 5 min,染色 10 min,用少许显色液洗胶 2 次,再加入剩余显色液轻摇至条带出现,用 10% 乙酸终止反应,并制成干胶保存。端粒酶活性阳性标本经 PCR 扩增形成 6 个核苷酸重复片段,在银染的 SDS-PAGE 凝胶上形成等距离梯形条带图谱。

(4)HPV 检测:标本试管加入 1 ml 无菌生理盐水,震荡摇匀,吸取液体转至 1.5 ml 离心管中,12 000 r/min 离心 5 min。再重复洗涤 2 次。沉淀直接加 50  $\mu$ l DNA 提取液混匀,沸水浴 10 min,转至 4 $^{\circ}$ C 静置 6~8 h 以充分裂解。10 000 r/min 离心 5 min,取上清液 2  $\mu$ l 做 PCR 反应,按下列条件扩增:93 $^{\circ}$ C 45 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 120 s,反应 10 个循环后置 33 $^{\circ}$ C 保温 3 min 后迅速逐个将反应管放入荧光检测仪,读取并记录读数  $A_0$  值。荧光激发波长为 487 nm,检测波长为 525 nm。最后按 93 $^{\circ}$ C 45 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 120 s,共做 30 个循环后置 33 $^{\circ}$ C 保温。(所得拷贝数/2) $\times$ 1 000 即为每毫升的拷贝数。

4. 统计学方法:端粒酶及 HPV 阳性率比较采用  $\chi^2$  检验,端粒酶活性水平比较采用  $t$  检验,端粒酶阳性值及 HPV 感染拷贝数以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 结 果

1. 宫颈癌 HPV 不同型别感染与端粒酶阳性见表 1。由此可见,端粒酶阳性:宫颈癌 > 宫颈 CIN ( $\chi^2 = 7.21, P < 0.01$ ) > 正常宫颈 ( $\chi^2 = 8.84, P < 0.005$ ); 宫颈 CIN Ⅲ级 > CIN Ⅰ、Ⅱ级 ( $\chi^2 = 5.98, P < 0.025$ )。HPV 16/18 型阳性:宫颈癌 > 宫颈 CIN ( $\chi^2 = 7.55, P < 0.01$ ); 宫颈 CIN Ⅲ级 > CIN Ⅰ、Ⅱ级 ( $\chi^2 = 4.04, P < 0.05$ ) > 正常宫颈。HPV 6/11 型阳性:CIN Ⅰ、Ⅱ级 > CIN Ⅲ级 ( $\chi^2 = 5.85, P < 0.025$ )。

表1 宫颈癌 HPV 不同型别感染与端粒酶阳性

组织类型	份数	端粒酶阳性	HPV 型别	
			16/18	6/11
宫颈癌	83	71(85.5)	65(78.3)	41(49.4)
CIN	47	29(61.7)	26(55.3)	34(72.3)
Ⅰ、Ⅱ级	39	21(53.8)	19(48.7)	31(79.5)
Ⅲ级	8	8(100.0)	7(87.5)	3(37.5)
正常宫颈	10	1(10.0)	1(10.0)	1(10.0)

注:括号外数据为阳性份数,括号内数据为阳性率(%)

2. 不同临床分期、组织学分级、组织学类型宫颈癌中 HPV 不同型别感染及端粒酶阳性见表 2。Ⅰ期 < Ⅱ期 ( $\chi^2 = 5.07, P < 0.025$ ) < Ⅲ、Ⅳ期 ( $\chi^2 =$

4.12,  $P < 0.05$ ); 中分化 > 高分化 ( $\chi^2 = 6.54, P < 0.025$ ); 腺癌与鳞癌差异无显著性 ( $\chi^2 = 2.11, P > 0.05$ )。HPV 16/18 阳性: I 期 < II 期 ( $\chi^2 = 4.17, P < 0.05$ ) < III、IV 期 ( $\chi^2 = 4.42, P < 0.05$ ); 高分化 < 中分化 ( $\chi^2 = 4.94, P < 0.05$ ) < 低分化 ( $\chi^2 = 7.03, P < 0.01$ )。HPV 6/11 阳性与临床分期、组织学分级及病理类型无关。

表2 宫颈癌不同临床分期、病理学诊断中 HPV 不同型别感染及端粒酶阳性

组别	份数	端粒酶阳性份数	HPV 型别	
			16/18	6/11
临床分期	83	71	65	41
I	11	6	5	4
II	47	40	36	26
III、IV	25	25	24	11
组织学分级	83	71	65	41
高分化	10	5	4	5
中分化	49	42	37	25
低分化	24	24	24	11
组织学分型	83	71	65	41
腺癌	17	12	12	11
鳞癌	66	59	53	30

3. CIN 及宫颈癌 HPV 不同型别感染程度及端粒酶活性水平见表 3。可见, 端粒酶阳性值: 宫颈癌 > CIN ( $t = 11.08$ ), CIN III 级 > CIN I、II 级 ( $t = 4.235$ ); HPV 6/11 型拷贝数: CIN > 宫颈癌 ( $t = 13.93$ ), CIN I、II 级 > CIN III 级 ( $t = 4.63$ ); HPV 16/18 型拷贝数: 宫颈癌 > CIN ( $t = 36.54$ ), CIN III 级 > CIN I、II 级 ( $t = 13.93$ )。以上各项均  $P < 0.001$ 。

表3 CIN 及宫颈癌 HPV 不同型别感染程度及端粒酶活性水平

组织学类型	例数	端粒酶活性值	HPV 拷贝数	
			16/18 型 ( $\times 10^6$ )	6/11 型 ( $\times 10^4$ )
宫颈癌	83	1.631 ± 0.526	34.1 ± 4.55	1.96 ± 0.76
CIN	47	0.764 ± 0.362	9.01 ± 3.23	5.24 ± 1.51
I、II 级	39	0.501 ± 0.211	8.52 ± 4.23	7.16 ± 2.47
III 级	8	0.926 ± 0.410	16.21 ± 7.12	2.96 ± 1.42

## 讨 论

1. 宫颈癌与端粒酶的激活: Sakamoto 等<sup>[1]</sup>对 118 例宫颈、宫体和卵巢肿瘤的研究发现, 端粒酶与妇科肿瘤发生、发展密切相关, 且随肿瘤恶性程度增加端粒酶活性增强。本研究中, 端粒酶的阳性率及活性值依次为宫颈癌 > CIN III 级 > CIN I、II 级 > 正常宫颈, 与文献报道一致<sup>[2]</sup>。端粒酶活性值与此

有线性关系, 但阳性率无此线性关系。尽管对各阶段端粒酶是否同等激活的报道不一致, 但端粒酶激活发生在癌前病变则提示它是宫颈癌变的早期事件<sup>[3]</sup>。Zheng 等<sup>[4]</sup>对 245 例宫颈刮片检测发现, 仅有 1 例细胞异型, 而 16 例端粒酶阳性, 在 11 例端粒酶阳性活检中发现 9 例 CIN I 级, 提示端粒酶活性与宫颈癌前病变有关, 宫颈脱落细胞端粒酶活性检测是宫颈癌前病变筛查的更有效的非损伤方法, 与本研究结果相符。本研究中端粒酶阳性率及活性值与肿瘤分期及分化程度有关, 与病理学类型无关, 也提示端粒酶活性是肿瘤进展及恶性程度的一个全新标志, 但是否是 CIN 病变进展的确切信号, 尚待长期随访后定论。

有学者在正常宫颈及轻度、重度鳞状上皮内病变和宫颈鳞癌中均检测到端粒酶表达, 但差异有显著性, 与本研究结果一致, 说明检测实体瘤的端粒酶表达仅是肿瘤诊断的一个辅助手段, 应在进一步研究中建立准确定量检测端粒酶活性的方法, 对不同组织的肿瘤细胞和相应正常组织细胞的端粒酶表达进行量化, 将端粒酶活性的高低及其他临床病理因素一起进行多因素分析, 尽可能得出科学结论。

2. 宫颈病变与 HPV 的感染: HPV 是引起 CIN 和宫颈癌的重要原因, 它们可通过各种病毒基因整合到细胞基因中而引起自身调节基因和宿主调节基因表达失调, 使细胞发生恶性转化。用 PCR 和 ELISA 检测发现, 在 CIN 病灶中 HPV 检出率 > 80%, 而 CIN 病灶周围的非不典型增生上皮内的检出率为 54%<sup>[5]</sup>。根据病毒致病力大小, HPV 可分为高危型及低危型两类, 高危型有 16、18、31 等, 主要导致高度 CIN, 多见于高龄妇女, 不易自然缓解, 与宫颈癌发生密切相关; 低危型有 6、11、30 等, 主要引起生殖道外生性湿疣、扁平湿疣及低度 CIN 等, 多见于年轻妇女中, 自然缓解率较高, 仅 1% 可进展为宫颈癌<sup>[6]</sup>。

由于 HPV 尤其是高危型持续存在是 CIN 复发及恶变的高危因素, 因此对 16/18 等高危型 HPV 感染伴 CIN 者应密切随访及治疗。

3. 宫颈癌 HPV 感染与端粒酶活性的关系: 端粒酶的激活已成为研究 HPV 致癌机制的新热点。有研究用 HPV16DNA 转染两组不同的人宫颈上皮细胞株, 发现细胞株传代数可超过 100 代并有端粒酶强表达, 提示 HPV 感染与端粒酶激活有关。Michael 等<sup>[7]</sup>用 HPV 感染宫颈上皮细胞株, 引起了

细胞永生,也证实了这点。但也有实验证明<sup>[8]</sup>, 宫颈癌端粒酶激活与 HPV 感染关系不密切,而在 CIN 病例中也有类似报道<sup>[9]</sup>。本研究 83 例宫颈癌组织有 71 例端粒酶活性表达,65 例 16/18 型及 41 例 6/11 型 HPV 感染,提示 HPV 感染,尤为高危型 HPV 感染和端粒酶的激活对细胞永生可能有一定作用,是导致癌变的重要因素。

本研究表明,从正常宫颈、CIN 到宫颈癌,HPV 和端粒酶的协同表达及表达强度依次递增,但 HPV 在癌前病变早期就有较多感染,而端粒酶则在癌前病变中晚期激活,这与有关报道相似<sup>[10]</sup>,说明癌变发生初期,高危型 HPV 感染尚未伴端粒酶激活,随细胞恶性度加重,二者渐趋一致,推断二者在癌变过程中有时序性差异,即 HPV 感染是启动因子,导致端粒酶的重新激活,使细胞获得无限增殖能力。但端粒酶激活是 HPV 的直接作用还是间接作用,还有待进一步探讨。

#### 参 考 文 献

- 1 Sakamoto M, Toyozumi T, Kikuchi Y, et al. Telomerase activity in gynecological tumors. *Oncol Rep* 2000; 7:1003-1009.
- 2 王淑珍,孙建衡,张伟,等. 宫颈上皮内瘤变端粒酶活性的研究. *中华妇产科杂志* 2001; 5:275-277.

- 3 Nagai N, Oshita T, Murakami J, et al. Semiquantitative analysis of telomerase activity in cervical cancer and precancerous lesions. *Oncol Rep* 1999; 6:325-328.
- 4 Zheng PS, Twasaka T, Zhang ZM, et al. Telomerase activity in papanicolaou smear-negative exfoliated cervical cells and its association with lesions and oncogenic human papillomaviruses. *Gynecol Oncol* 2000; 77:394-398.
- 5 Merkebach-Bruses Jakob C, Tietae L, et al. Consensus polymerase chain and enzyme-linked immunosorbent assay for human papillomavirus detection and typing in cervical specimens. *Diag Mol Pathol* 1999; 8:32-38.
- 6 Tjong MY, Out TA, Ter Schegget J, et al. Epidemiologic and mucosal immunologic aspects of HPV infection and HPV-related cervical neoplasia in the lower female genital tract: a review. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11:9-17.
- 7 Michael C, Popescu N, Woodworth C, et al. Human herpesvirus 1 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomaviruses gene expression. *J Virol* 1994; 68:1173-1175.
- 8 Cheah PL, Looi LM, Ng MH, et al. Telomerase activation and human papillomavirus infection in invasive uterine cervical carcinoma in a set of Malaysian patient. *J Clin Pathol* 2002; 55:22-26.
- 9 Reesing-Peters N, Helder MN, Wisman GBA, et al. Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol* 2003; 56:31-35.
- 10 Mutirangura A, Sriuranpong V, Termrungruanglert W, et al. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. *Br J Cancer* 1998; 78:933-939.

(收稿日期:2003-02-10)

(本文编辑:张林东)

## · 疾病控制 ·

### 两起疟疾爆发的处理报告

羊金灵 林经盛 陈国志

2002 年 6 月 16 日、8 月 20 日分别接到粤海铁路芙蓉田农场段工地和儋州市兰洋镇番打乡疟疾疫情的报告。粤海铁路芙蓉田农场段工地四面环山,两侧有两条小溪沟,沟旁灌木丛生荫蔽。工地上居住着 286 名工人,都是来自广西、四川、湖南省区的民工。2002 年 6 月 16 日先后有 4 名工人因发冷、发热而就诊,血检发现 3 例间日疟,1 例恶性疟原虫阳性,据反映工地上仍有同样症状者几十人。表明已有疟疾爆发疫情。兰洋镇番打乡居住着黎族、苗族的农民,有上山垦植、放牧、采伐而住山寮或露宿山林之习惯,地形复杂,高山峻岭植被茂密,溪流纵横。有 4 个自然村,村间距离较远,居住着 389 人。该乡是一个老的疟疾区。2002 年 8 月 20 日,有 3 名村民来就诊,血检发现 2 例间日疟,1 例间日疟和恶性疟原虫均阳性而确诊。据这 3 名村民反映该乡有类似症状者几十人。

根据疫情,我们对该工地所有人员 286 人采血进行疟原

虫调查,发现 39 例间日疟阳性,13 例恶性疟阳性。对兰洋镇番打乡进行所有村民 389 人采血进行疟原虫检测,发现 36 例间日疟原虫阳性,8 例恶性疟阳性。

对粤海铁路芙蓉田农场段工地和兰洋镇番打乡的所有人员给予哌喹 1 200 mg 合并防 II 1 070 mg、伯氨喹 45 mg,2 天分服,恶性疟原虫阳性者服磷酸萘酚喹片总量 10 片,首次服 6 片,24 h 服 4 片。用爱克宁 10% 可湿性粉剂滞留喷洒室内及周围环境,用大灭(2.5% 微囊剂)喷洒蚊帐,按稀释比例 1:100 配药,用喷雾器将蚊帐喷湿。经过对粤海铁路芙蓉田农场段工地和兰洋镇番打乡全民服药、全面喷洒后,均无新的疟疾病例发生。此次调查表明,工地的疟疾爆发是输入性传染源和存在大量易感人群所致,而兰洋镇番打乡是由于带虫者未彻底治疗所致。两起疟疾爆发提示,凡有流动人口进入疟区,应做好登记及预防工作,要坚持加强对流动人口的管理。

(收稿日期:2003-03-06)

(本文编辑:张林东)