

· 综述 ·

HPV 检测在宫颈病变进展中的研究进展*

侯素平¹, 张凤芹¹, 张宪军², 冀雪霞² 综述; 张清泉¹ 审校

(衡水市哈励逊国际和平医院: 1. 病理科; 2. 妇科, 河北衡水 053000)

关键词: 乳头状瘤病毒科; 宫颈疾病; 检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)09-1145-02

宫颈癌是常见的妇产科恶性肿瘤, 该病的发病率位居女性恶性肿瘤第二, 尽早发现与及时采取有效治疗措施有助于保护患者的身体健康, 且对挽救生命也具有重要意义^[1-2]。有关资料表明, 人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染是导致宫颈病变的主要因素, 早期对宫颈 HPV 进行筛查对防治宫颈癌具有十分重要的意义。目前发现的 HPV 至少有 110 个型别, 这些型别又大致分为低危型和高危型, 其中, 高危型 HPV16/18 与女性宫颈癌及宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)的进展关系最为密切^[3-4]。

1 HPV 的基因结构

HPV 是小型双链无包膜 20 面体的对称 DNA 病毒, 基因组为闭合环状, DNA 长度为 7 200~8 000 bp, 所有开放读码框(open reading frame, ORF)均位于一条 DNA 链上。这条 DNA 链大致可分为 3 个基因区: 早期蛋白编码区、晚期蛋白编码区及上游调控区。

HPV 基因产物分为早期蛋白和晚期蛋白, 它们主要由 2 种启动子指导合成。早期启动子指导 HPV 早期蛋白的合成及 ORF E6 的上游表达。在未分化的细胞中, 早期启动子的转录先于产物的复制。早期 HPV 蛋白包括 E1、E2、E4、E5、E6、和 E7。细胞的分化触发晚期病毒的转录, 从 E7 的 ORF 起始位点活化。晚期启动子调控晚期基因的表达, 包括编码衣壳蛋白的 L1、L2、E4 及 E5。晚期转录的活化与上皮细胞的分化密切相关, 因此, 人们认为细胞的特定分化因子调控这一过程。

2 HPV 蛋白基因-E6 和 E7

高危的 E6、E7 蛋白在宫颈癌细胞中选择性表达和保留。这些蛋白共同调节细胞的无限增殖和转化。E7 蛋白约有 100 个氨基酸, 主要存在于被感染的细胞核中。高危的 E7 蛋白在 E6 存在并有效调节人角蛋白细胞无限增殖时, 可使小鼠 NTH3T3 成纤维细胞癌变^[5-6]。所有的高危 E7 蛋白均含有 3 个保守区域: CR1、CR2 和 CR3。CR1 和 CR2 含有同源序列, 与腺病毒 E1A 蛋白质相似。

E7 的 CR2 区域含有一个基本的 LXCXE 序列, 此序列对于结合 Rb 家族蛋白非常重要, 而 CR3 区域含有 2 个锌指结构。细胞周期中, E7 与 Rb 家族蛋白的结合物作为基因的构成物发挥作用^[7-8]。与 Rb 家族结合能降低 E7 蛋白的风险。与其相似物比较, E7 蛋白的亲和力更小。Rb 家族成员在上皮细胞分化过程中也控制细胞的正常凋亡。Rb 功能的中断并不影响 E7 在细胞分化过程中的活性, 因为这是病毒复制所必需的。

E7 蛋白也可增加其他细胞调节因子的活性。E7 可与几种物质结合, 如细胞周期蛋白 A(直接结合)、细胞周期蛋白 E(通过 P107 间接结合)、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、抑制剂 P21 和 P27^[9-14]。第 3 类与 E7

结合的蛋白为组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)^[15]。E7 蛋白与 HDAC 的结合增强了转录因子 E2F 的转录和 S 期的进程^[16]。

高危和低危 E6 蛋白约 150 个氨基酸, 存在于细胞核和细胞质中。E6 蛋白拥有 2 个锌指结合域, 4 个 Cys-X-X-Cys 序列^[17], 为癌基因蛋白。E6 的独立表达可使人乳上皮细胞无限增殖, 且可使 NTH3T3 成纤维细胞变形^[18]。而使人角蛋白无限增殖需 E6、E7 蛋白的共同作用^[19]。据报道, E6 可以与超过 12 种的不同蛋白结合^[20]。最有特色的是与肿瘤抑制基因蛋白 P53 结合。E6 是 P53 的负调控因子, 抑制 P53 凋亡前的活动, 促使病毒复制^[21]。在 HPV 感染细胞中, E6 与 P53 和 P300/癌断裂点(cancer breakpoint, CBP)组成了络合物, 抑制了 P300/CBP 对 P53 的乙酰化, E6 抑制 P53 乙酰化的能力及其以后的活化表现为不同的机制, HPV 通过此作用调控细胞的无限增殖^[22]。高危 E6 基因的另一项功能对无限增殖具有重要作用, 它可以活化人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的催化亚基^[23]。

3 HPV 感染与宫颈病变的关系

大量研究认为癌前病变与宫颈癌的发病与 HPV 感染有着紧密关联, 同时高危型 HPV 出现持续性感染更易导致宫颈细胞向恶性转变, 最终发展为宫颈癌^[24-25]。

几乎所有宫颈癌标本中均能检测到 HPV 的存在, 在 CIN I 级中 HPV 的检出率为 20%~50%, 在 CIN II、CIN III 级中为 70%~90%^[26]。多项研究证实 HPV 感染无任何临床症状, 而且多数 HPV 感染是“一过性”的, 并不引发宫颈病变, 可在感染后的数月至 2 年内被清除; 只有慢性、持续性高危型 HPV 感染, 才能最终引发宫颈癌; 在 HPV 感染中, HPV16(40%)是最普遍的类型, 其次是 HPV31、HPV45(13.3%)和 HPV18(4.1%)^[27]。除了持续的高危 HPV 感染及免疫因素(HPV 特异性的 T 细胞反应、抗原提呈)作用外, 被感染细胞基因组产生变化才能导致恶性肿瘤的发展; 而高危型 HPV 是通过 E6、E7 蛋白发挥致癌性的^[28]。HPV16 与宫颈鳞状细胞癌的发生相关, 而 HPV18 与腺癌的发生相关, 二者均对鳞状细胞癌的预后有一定影响, HPV 检测阳性者, 预后较差。

4 HPV 的检测方法

目前 HPV 检测方法有多种:(1) 细胞形态学检查。该方法通过 HPV 感染所致宿主细胞发生的形态学改变而推断 HPV 的感染, 特征性的挖空细胞可以诊断 HPV 感染, 但不能据此分型, 且该方法敏感性低, 假阴性率高, 主观性大, 很难与其他病毒感染相区别。(2) 组织病理学检查。(3) 免疫组织化学检测。通过检测 HPV 的衣壳抗原进一步确诊 HPV 感染, 其所得阳性反应的定位明确, 判断可靠, 但须在 HPV DNA 复制成熟后, 才有衣壳装备, 其敏感性及阳性强度均较低。(4) 以

* 基金项目: 河北省衡水市科学技术研究与发展计划项目(11007A)。 作者简介: 侯素平, 女, 硕士, 主要从事病理诊断工作。

杂交法为基础的检测方法(核酸杂交法、杂交捕获法)。该类方法敏感性低、耗时,需要大量高度纯化的 DNA,且需要新鲜样本,不适用于临床 HPV 分型的检测应用。虽然杂交捕获法可以区分高危和低危 HPV 病毒,但 HPV 亚型无法单独鉴别。(5)以 PCR 为基础的检测方法(型特异性 PCR 法、通用引物 PCR 法、实时荧光定量 PCR 法、DNA 基因芯片技术、导流杂交基因芯片技术)。(6)HPV 血清抗体检测。多数人感染 HPV 后均有可能在血清中出现抗体,并非宫颈癌所特有,因此,目前尚不能用血清学方法对 HPV 进行确诊及分型。

DNA 和 RNA 检测都可用于 HPV 感染检测。HPV DNA 检测不能从宫颈 HPV 退行性感染中区分活性的、持续性的及进行性发展的 HPV 感染,且 HPV DNA 在凋亡细胞及细胞碎屑等临床无关条件下也可表达;阳性结果不能准确说明致癌风险,反而使患者增加检查费用和精神负担。而 RNA 检测与癌进展相关基因 mRNA 的表达,未检测出 RNA 转录物的样本说明病毒仍处于游离状态或休眠状态,体内正常的转录过程处于高效状态,这样感染被自发清除,在高度发育异常的细胞中,E6/E7 转录活动的高频率说明高危 HPV 已整合入宿主基因,癌基因的转录失去控制,其结果导致 E6/E7 表达产物增加,这些表达产物的增加是病毒进展和维持的必要条件^[20-29]。因此,2006 年欧洲生殖器感染及肿瘤研究组织认为 HPV E6/E7 mRNA 检测应作为重点研究对象。

综上所述,随着对 HPV 研究的深入,HPV E6/E7 mRNA 检测将有利于在宫颈病变的防治中取得更大进展,通过筛查可以早期发现宫颈癌前病变及宫颈癌。

参考文献

- [1] 张东红,林美珊.人乳头瘤病毒在国人宫颈病变中感染及型别分布特征的 Meta 分析[J].中国全科医学,2010,13(12):1287-1290.
- [2] 郭岩,李杰. HPV 感染与宫颈癌前病变及宫颈癌的相关性[J].中国实用医药,2009,4(31):39-42.
- [3] Wentzensen N, Wilson LE, Wheeler CM, et al. Hierarchical clustering of human papilloma virus genotype patterns in the ASCUS-LSIL triage study[J]. Cancer Res, 2010, 70(21): 8578-8586.
- [4] Giorgi Rossi P, Chini F, Bisanzi S, et al. Distribution of high and low risk HPV types by cytological status: a population based study from Italy[J]. Infect Agent Cancer, 2011, 6: 2.
- [5] Riley RR, Duensing S, Brake T, et al. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2003, 63(16): 4862-4871.
- [6] Faridi R, Zahra A, Khan K, et al. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer[J]. Virol J, 2011, 8: 269.
- [7] Edmonds C, Vousden KH. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein[J]. J Virol, 1989, 63(6): 2650-2656.
- [8] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(8): 550-560.
- [9] Bradshaw JM. The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches[J]. Cell Signal, 2010, 22(8): 1175-1184.
- [10] Yasmeen A, Alachkar A, Dekhil H, et al. Locking Src/Abl Tyrosine Kinase Activities Regulate Cell Differentiation and Invasion of Human Cervical Cancer Cells Expressing E6/E7 Oncoproteins of High-Risk HPV[J]. J Oncol, 2010, 2010: 530130.
- [11] Al Moustafa AE, Yasmeen A, Achkhar A. Src inhibitors are promising therapy molecules for human cervical carcinomas[J]. Med Hypotheses, 2011, 77(5): 812-814.
- [12] Faridi R, Zahra A, Khan K, et al. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer[J]. Virol J, 2011, 8: 269.
- [13] Kong L, Deng Z, Shen H, et al. Src family kinase inhibitor PP2 efficiently inhibits cervical Cancer cell proliferation through down-regulating phospho-Src-Y416 and phospho-EGFR-Y1173[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 348(1/2): 11-19.
- [14] Sen B, Johnson FM. Regulation of SRC family kinases in human cancers[J]. J Signal Transduct, 2011, 2011: 865819.
- [15] Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(2): 362-372.
- [16] Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs[J]. EMBO J, 2005, 24(10): 1821-1830.
- [17] Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins[J]. J Virol, 1989, 63(3): 1404-1407.
- [18] Liu Y, Chen JJ, Gao Q, et al. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells[J]. J Virol, 1999, 73(9): 7297-7307.
- [19] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: the next Generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [20] zur Hausen H. Papillomaviruses and Cancer: from basic studies to clinical application[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5): 342-350.
- [21] Min L, Dong-Xiang S, Xiao-Tong G, et al. Clinicopathological and prognostic significance of Bmi-1 expression in human cervical Cancer[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2011, 90(7): 737-745.
- [22] Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300[J]. J Virol, 1999, 73(8): 6209-6219.
- [23] Hyland PL, Medade SS, McCloskey R, et al. Evidence for alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and epigenetic reprogramming in human papillomavirus type 16 E6/E7-expressing keratinocytes [J]. Journal of virology, 2011, 85(21): 10999-11006.
- [24] 刘英文. 169 例子宫颈癌前病变患者高危型 HPV 感染的研究分析[J]. 中国实用医药, 2010, 5(11): 119-120.
- [25] 黄锐,李有恒,黄碧青.高危型 HPV 病毒负荷在宫颈癌前病变中的临床意义[J].中国医药指南,2011,9(23):88-89.
- [26] Dogan NU, Salman MC, Yuce K. The role of HPV DNA testing in the follow-up of cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure[J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283(4): 871-877.
- [27] Pitta DR, Campos EA, Sarian LO, et al. Prevalence of HPV 16, 18, 45 and 31 in women with cervical lesions[J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2010, 32(7): 315-320.
- [28] Chua KL, Hjerpe A. Human papillomavirus analysis as a prognostic marker following conization of the cervix uteri[J]. Gynecol Oncol, 1997, 66(1): 108-113.
- [29] Wise-Draper TM, Wells SI. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets[J]. Front Biosci, 2008, 13(13): 1003-1017.