

• 论 著 •

人乳头瘤病毒、端粒酶基因及 3 号染色体数目与宫颈病变关系的探讨

李亚波¹, 杨 隽², 丁世霖³, 杨红英⁴, 王 卓^{4△}

(1. 云南省中医院检验科, 云南昆明 650021; 2. 云南省中医院治未病中心, 云南昆明 650021; 3. 云南省中医院泌尿外科, 云南昆明 650021; 4. 昆明医科大学第二附属医院检验科, 云南昆明 650101)

摘要:目的 探讨人端粒酶(TERC)基因的表达和人乳头瘤病毒(HPV)感染及 3 号染色体数目突变与宫颈病变的关系。方法 2008 年 6 月至 2009 年 2 月昆明医学院第二附属医院妇科门诊接受诊治者共 81 例,其中健康组(病检结果正常)20 例,子宫颈上皮非典型增生(CIN)1 组 28 例,CIN2 组 12 例,CIN3 组 9 例,宫颈癌组 12 例。采用荧光原位杂交技术(FISH)进行子宫颈上皮脱落细胞 TERC 基因的检测,同时利用实时荧光定量聚合酶链反应(FQPCR)技术检测这 81 例受试者的 HPV 感染情况。并进行宫颈癌与 TERC 基因和 HPV 的相关性分析。同时记录 81 例受试者 3 号染色体数目突变情况。结果 在宫颈病变检测中 TERC 基因检测和 HPV 检测阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),二者阳性率在 CIN1 组、CIN2 组、CIN3 组和宫颈癌组均明显高于健康组($P<0.05$),CIN1 组与 CIN2 组差异无统计学意义($P>0.05$),CIN3 组与宫颈癌组差异有统计学意义($P<0.05$),恶性程度越高,二者阳性率越高。健康组和 CIN1 组 3 号染色体数目异常突变率为 0%;CIN2 组为 16.7%;CIN3 组为 66.7%;宫颈癌组为 100.0%,CIN3 组和宫颈癌组阳性率明显高于健康组、CIN1 组 CIN2 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 在宫颈癌的发生、发展过程中 TERC 基因异常表达、高危 HPV 感染、3 号染色体数目的突变可能起着重要的协同作用。

关键词:宫颈病变; 人端粒酶基因; 人乳头瘤病毒; 3 号染色体; 荧光原位杂交

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)03-0326-03

Study on relationship between human papilloma virus, telomerase gene and chromosome 3 number with cervical lesions

Li Yabo¹, Yang Jun², Ding Shilin³, Yang Hongying⁴, Wang Zhuo^{4△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Center for Preventive Treatment of Diseases; 3. Department of Urologic Surgery, Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650021, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the expression of human telomerase RNA component(TERC) gene, human papilloma virus (HPV) infection and mutation of chromosome 3 number with cervical lesions. **Methods** 81 women received the treatment in the Gynecology Department of the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University from June 2008 to February 2009, including the healthy group(normal pathological examination, 20 cases), CIN1 group(28 cases), CIN2 group(12 cases), CIN3 group(9 cases) and cervical cancer group(12 cases). The TERC gene expression in uterine epithelial exfoliated cells was detected by using the fluorescence in situ hybridization(FISH) method, meanwhile the HPV infection was detected by using the real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(FQPCR) technology. The correlation between cervical cancer with TERC gene and HPV was analyzed. At the same time the number of chromosome 3 mutations in 81 cases was recorded. **Results** In the cervical lesion detection, the detection positive rate had no statistical difference between the TERC gene detection and HPV detection ($P>0.05$), their positive rates in the CIN1, CIN2, CIN3 and cervical cancer groups were significantly higher than that in the healthy group ($P<0.05$), the difference between the CIN1 group and the CIN2 group had no statistical significance ($P>0.05$), while between the CIN3 group and the cervical cancer group had statistical significance ($P<0.05$), the higher the malignant degree, the higher the positive rate. The abnormal mutation rate of chromosome 3 number was 0% in the healthy group and the CIN1 group, 16.7% in the CIN2 group, 66.7% in the CIN3 group and 100.0% in the cervical cancer group, the positive rate in the CIN3 group and the cervical cancer group was significantly higher than that in the healthy group, CIN1 group and CIN2 group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The TERC abnormal gene expression, high risk HPV infection and mutation of chromosome 3 number could play an important synergistic effect during the process of occurrence and progression of cervical cancer.

Key words: cervical disease; human telomerase RNA component gene; human papilloma virus; chromosome 3; fluorescence in situ hybridization

宫颈癌是严重威胁女性健康的疾病,目前研究认为与宫颈癌关系较为密切的是人乳头瘤病毒(HPV)与人端粒酶(TERC)基因,TERC 的表达上调可阻止细胞凋亡,可导致肿瘤产生,端粒酶的激活可能是宫颈癌发生的早期事件,因此端粒酶可作为宫颈癌及癌前病变的有效标志物。高危型 HPV 感染在宫颈癌及癌前病变中的重要作用已得到公认。本研究应用荧光原位杂交技术(FISH)检测 TERC 和荧光定量聚合酶

链反应(FQPCR)技术检测 HPV,探讨宫颈癌与 TERC 基因表达及 HPV 感染的相关性,在进行二者与宫颈癌的关系研究中,发现 3 号染色体数目也存在异常改变,现对三者与宫颈癌的关系报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 6 月至 2009 年 2 月昆明医学院第二附属医院妇科门诊接受诊治的女性共 81 例,其中健康组(病检

结果正常)20 例, 宫颈上皮非典型增生(CIN)1 组 28 例, CIN2 组 12 例, CIN3 组 9 例, 宫颈癌组 12 例, 所有研究对象年龄 22~68 岁。纳入标准: 按照宫颈上皮内瘤样病变诊断处理规范, 分组及宫颈癌诊断按照《妇产科学(第 6 版)》相关诊断标准进行^[1]。

1.2 标本采集 患者先行病理组织学检查, 确定其组织学诊断结果后行脱落细胞取材。(1)脱落细胞取材采用薄层液基细胞学(TCT)检查, 专用宫颈刷插入宫颈口, 在宫颈外口鳞柱状上皮交界处, 以宫颈外口为中心, 均匀旋转 3~5 周, 取出宫颈刷, 放入 TCT 保存液瓶中, 漂洗采样器, 送检。(2)HPV 标本采集, 用无菌生理盐水洗去宫颈外分泌物, 用无菌棉拭子插入宫颈内, 停留 5 s 后旋动棉拭子采集宫颈分泌物, 放入无菌试管内密闭送检。

1.3 检测方法

1.3.1 TERC 检测 将对应的病检正常、CIN1、CIN2、CIN3 及宫颈癌患者的 TCT 保留液中的脱落细胞, 采用 FISH 检测其 TERC 的表达。杂交使用的探针由北京金菩嘉医疗科技有限公司提供。DNA 探针包含 2 种, 在中期染色体与间期核上均能杂交产生明亮的信号。灵敏度与特异度均达 98% 以上, 与非目的染色体无交叉杂交反应。TERC DNA 探针杂交到人类 3 号染色体长臂(3q26, 3), 覆盖整个 TERC 基因, 荧光为橘红色, 对照探针为 CSP3, 探针杂交信号位于人类 3 号染色体 3p11.1~q11.1, 覆盖整个着丝粒区域, 荧光信号为绿色。

1.3.2 HPV 检测 采用中山大学达安基因股份有限公司提供的试剂检测 HPV, 使用美国 Mjopticon2 FQPCR 检测仪进行扩增分析。

1.4 诊断标准

1.4.1 结果分析 正常细胞: 细胞核中红色和绿色信号各 2 个; TERC 基因表达异常细胞: 红色信号大于 2 个, 绿色信号不少于 2 个(绿色信号探针覆盖于着丝粒上, 染色体数为二倍体时, 绿色信号为 2 个, 当染色体数目发生变异时, 如三倍体、四倍体时绿色信号就大于 2 个。)

1.4.2 阈值建立 采集 20 例健康人宫颈细胞进行 FISH 试验, 每份标本至少分析 200 个细胞, 统计出现 2 个以上 TERC 基因信号的细胞数目的百分比。阈值=平均数(\bar{x})+3×标准差(s)。

1.4.3 结果判断 每份标本随机计数 100 个细胞, 如果检测值大于阈值, 判定为 TERC 基因表达的阳性患者; 如果检测值小于阈值, 判定为无 TERC 基因表达的阴性患者。

1.5 统计学处理 采用 dyes 统计软件进行数据处理及统计学分析。由于进行分析的数据资料是 TERC 基因和 HPV 的阳性百分比, 故分析时通过平方根反正弦变换, 将原始数据开平方根再取反正弦后使用。多组间比较采用方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TERC 与 HPV 检测阳性率比较 在对 81 例受试者的宫颈病变检测中, FISH 检测 TERC 阳性率与 FQPCR 对 HPV 检测的阳性率比较, 差异无统计学意义(P>0.05)。

2.2 不同病变程度患者的 TERC 与 HPV 检测阳性率比较 TERC 基因与 HPV 的阳性率随病变级别升高而增加, CIN1 组、CIN2 组及 CIN3 组与健康组比较, 差异有统计学意义(P<0.05); 各病变组间相比, CIN1 组与 CIN2 组差异无统计学意义(P>0.05); CIN3 组与 CIN1 组比较, 差异有统计学意义(P<0.05); CIN3 组与宫颈癌组比较, 差异有统计学意义(P<0.05)。不同病变程度患者的 TERC 与 HPV 检测阳性率见表

1~2。

表 1 各组宫颈脱落上皮细胞 TERC 基因表达与 HPV 检测结果[n(%)]

组别	n	TERC 表达	HPV
健康组	20	0(0.0)	0(0.0)
CIN1 组	28	7(25.0)*	12(42.9)*
CIN2 组	12	6(50.0)*	6(50.0)*
CIN3 组	9	7(77.8)*#△	6(66.7)*#△
宫颈癌组	12	12(100.0)*	11(91.7)*

*: P<0.05, 与健康组比较; #: P<0.05, 与 CIN1 组比较; △: P<0.05, 与宫颈癌组比较。

表 2 各组宫颈脱落上皮细胞 TERC 基因表达与 HPV 检测结果的比较[n(%)]

组别	n	TERC 阳性		TERC 阴性
		HPV 阳性	HPV 阴性	HPV 阳性
健康组	20	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
CIN1 组	28	4(14.3)	3(10.7)	9(32.1)
CIN2 组	12	3(25.0)	3(25.0)	3(25.0)
CIN3 组	9	4(44.4)	3(33.3)	2(22.3)
宫颈癌组	12	11(91.7)	1(8.3)	0(0.0)

2.3 3 号染色体数目异常突变率 在健康组和 CIN1 组 3 号染色体数目异常突变率为 0%; CIN2 组为 16.7%; CIN3 组为 66.7%; 宫颈癌组为 100.0%。CIN3 组和宫颈癌组阳性率明显高于健康组、CIN1 组、CIN2 组, 差异有统计学意义(P<0.05)。3 号染色体数目变异阳性率随着宫颈病变恶性程度升高而上升, 在健康组、CIN1 组及 CIN2 组中不易见到 3 号染色体数目的变异, 但在 CIN3 组和宫颈癌组中 3 号染色体数目变异阳性率明显上升, 该变异常伴随着 TERC 基因的异常扩增。

3 讨论

流行病学和生物学资料已证明 HPV 感染是引起宫颈癌及癌前病变的重要危险因素, HPV 的感染在宫颈癌前病变中很普遍, 但只有很少的一部分感染者最后发展为宫颈癌, 这与 HPV 感染的过程有关, 在感染的初期, HPV 是以游离状态存在的, 在 CIN1 中 HPV 的整合比较少见, 甚至是缺乏的, 但在大部分浸润性宫颈癌中, HPV 都会整合到宿主细胞上, 整合后引起 E6、E7 基因的过度表达, 导致 P53 的降解, P53 丢失或失活会减少有丝分裂的准确性, 增加基因组重排的频率^[2]。导致含有高危 HPV 宿主细胞的染色体不稳定, 发生基因突变, 突变的细胞大量增生, 反复合成 DNA, 最终出现多倍体和非整倍体^[3]。

近年来国内外相关研究表明, 端粒酶活性在宫颈癌的发生、发展过程中起重要作用, 端粒酶的激活可能发生在宫颈癌的早期, 随着病变的发展, 端粒酶的活性表达增高^[4-8]。Helsmeyer-Haddad 等^[8]采用 FISH 三色探针对已染色的细胞学涂片进行 TERC 基因检测, 发现在所有 CIN1、CIN2 的患者中为二倍体模式无 TERC 基因异常表达的, 最终自行修复为正常细胞, 这种 CIN 情况一般是生理状态下自然形成的; 有 TERC 基因异常表达的非二倍体模式在不经治疗的情况下是不会自行消退到正常状态的, 都向宫颈癌方向发展, 提示 3 号染色体数目的突变与 TERC 基因激活一起参与宫颈癌的病变过程。国外的研究显示, 在浸润性宫颈癌中 HPV 的整合与 TERC 基因的异常表达紧密联系在一起^[9-11], 2006 年 Hopman 等^[12]的对比研究中证实, 在从宫颈上皮发育不良发展到浸润

性宫颈癌的过程中, HPV 基因的整合与 TERC 基因的表达有紧密关系。在病变发展过程中, HPV 从游离状态整合到宿主细胞内是一个重要的危险因素, TERC 基因的异常表达和 HPV 的基因整合能够推动形成非整倍体细胞。但并不是所有 HPV 阳性的细胞都会出现 TERC 基因异常表达, 10 例存在 HPV 整合的二倍体病变中只有 8 例有 TERC 基因异常表达, 这就意味着 HPV 病毒整合到宿主细胞后存在两种不同的发展方向, 其中之一就是与染色体基因突变无关^[13], 而染色体基因的突变在宫颈癌的形成过程中起着关键作用, 这也许可以说明为什么在宫颈癌前病变中 HPV 的感染很普遍, 但只有极少的一部分最终发展为浸润性宫颈癌。

本研究中 20 例健康人正常的宫颈脱落上皮细胞中无 TERC 基因的异常表达, 而在 CIN 至宫颈癌中 TERC 基因的异常表达呈递增趋势, 且宫颈癌中阳性表达率是 100.0%, 明显高于不同分期 CIN ($P < 0.05$), 提示 TERC 基因的异常表达存在于宫颈癌的发生、发展过程中, 恶性程度越高, 异常表达率越高。12 例宫颈癌中 HPV 阳性率是 91.7%, TERC 基因表达阳性率是 100.0%, 提示 TERC 基因异常表达在宫颈癌的发生、发展过程中起着关键作用。

3 组 CIN 患者中均有 HPV 阳性而 TERC 基因表达阴性的病例, 提示不是所有 HPV 阳性的患者都会出现 TERC 基因的阳性表达, 这说明只有 HPV 整合到宿主细胞后才可能在宫颈癌的形成过程中, 具有致癌性。在宫颈癌的发展过程中伴随 TERC 基因异常表达出现的 HPV 阳性率随着病变恶性程度的增加而逐渐上升, 在宫颈癌中阳性率最高达到 91.7%, 二者的同时出现可能说明在宫颈癌的发展中 HPV 与 TERC 基因有着某种协同作用。

研究中, 通过 CSP3 对照探针的绿色信号客观地反映出 TERC 基因异常表达的细胞中存在非二倍体细胞。随着病变恶性程度的增加, 非二倍体细胞出现的频率也增加, 在 CIN1 和 CIN2 中二倍体多见, 几乎见不到非二倍体, 在 CIN3 中非二倍体比例升高, 宫颈癌中最高, 提示染色体数目的变异可能与宫颈癌的发生有一定的联系。

综上所述, TERC 基因异常表达和高危 HPV 感染与宫颈癌的发生、发展密切相关。在宫颈癌的发生、发展过程中, TERC 基因异常表达、高危 HPV 感染、3 号染色体数目的突变可能起着重要的协同作用。

参考文献

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 191-192.
- [2] Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, et al. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer[J]. Nat Rev Cancer,

2003, 3(9): 695-701.

- [3] 李晓红, 董卫红, 黄在菊, 等. 子宫颈癌前病变组织 DNA 倍体分析与人乳头状瘤病毒亚型检测[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(3): 205-206.
- [4] 奚玲, 朱涛, 吴鹏, 等. 人端粒酶逆转录酶在子宫颈癌组织中的表达变化及其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(6): 407-410.
- [5] Oikonomou P, Mademtzis I, Messinis I, et al. Quantitative determination of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in premalignant cervical lesions and correlation with human papillomavirus load[J]. Hum Pathol, 2006, 37(2): 135-142.
- [6] Jarboe EA, Thompson LC, Heinz D, et al. Telomerase and human papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma[J]. Hum Pathol, 2004, 35(4): 396-402.
- [7] Heselmeyer-Haddad K, Janz V, Castle PE, et al. Detection of genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in cytologic specimens as a genetic test for the diagnosis of cervical dysplasia[J]. Am J Pathol, 2003, 163(4): 1405-1416.
- [8] Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer[J]. Am J Pathol, 2005, 166(4): 1229-1238.
- [9] Evans MF, Cooper K. Human papillomavirus integration: detection by in situ hybridization and potential clinical application[J]. J Pathol, 2004, 202(1): 1-4.
- [10] Peitsaro P, Johansson B, Syrjinen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 886-891.
- [11] Graham DA, Southern SA, McDicken IW, et al. Interphase cytogenetic evidence for distinct genetic pathways in the development of squamous neoplasia of the uterine cervix[J]. Lab Invest, 1998, 78(3): 289-296.
- [12] Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP, et al. Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer[J]. J Pathol, 2006, 210(4): 412-419.
- [13] Graham DA, Southern SA, McDicken IW, et al. Interphase cytogenetic evidence for distinct genetic pathways in the development of squamous neoplasia of the uterine cervix[J]. Lab Invest, 1998, 78(3): 289-296.

(收稿日期: 2015-11-05)

(上接第 325 页)

- [9] 刘瑜, 陈晓兰, 叶丹捷, 等. 精子成熟障碍对孕早期自发性流产与胚胎停育的影响[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(8): 532-537.
- [10] Marchetti F, Essers J, Kanaar R, et al. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(45): 17725-17729.
- [11] 陈泯燕, 黄国宁, 王亚平, 等. 精子 DNA 碎片与体外受精结局的关系[J]. 生殖与避孕, 2010, 30(11): 732-737.
- [12] 方小武, 韦剑洪, 吴日然, 等. 精子 DNA 碎片率与早期自发性流产的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013(6): 112.
- [13] 刘居理, 罗明, 卢雪芳, 等. 男性不育患者精子核蛋白组型转换与

精子密度及活力分析[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(13): 1061-1062.

- [14] Li Y, Lalancette C, Miller D, et al. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus[J]. Asian J Androl, 2008, 10(4): 535-541.
- [15] 方小武, 陈捷, 韦剑洪, 等. 复发性流产男性配偶精子核蛋白不成熟度检测的临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(1): 108.

(收稿日期: 2015-09-25)