

漯河地区食管癌患者癌组织中人乳头状瘤病毒感染检测

崔明辰 岳鹤声 张冬云 赫欣 王建国 宋晓兵

摘要 目的 检测漯河地区食管癌患者中人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染情况,探讨 HPV 感染与我国河南省漯河地区食管癌发生的相关性。**方法** 应用 HPV L1 通用引物 GP5 + /6 +、HPV16E6 和 HPV18E6 型特异性引物多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测漯河地区食管癌组织中 HPV 存在状况。**结果** 115 例食管癌组织中,86 例检测到 HPV 阳性,阳性率为 74.8%;其中 56 例检测到 HPV16E6 基因,阳性率为 48.7%;20 例检测到 HPV18E6 基因,阳性率为 17.4%;12 例 HPV16E6 和 HPV18E6 基因均阳性为混合感染。**结论** 我国河南省漯河地区食管癌与 HPV DNA 感染存在相关性,并且 HPV 感染可能是食管癌发生的重要因素之一。

关键词 食管癌 人乳头状瘤病毒 聚合酶链反应

Detection of Human Papillomavirus in Esophageal Carcinoma Tissues of Patients from Luohe Region of Henan Province. Cui Mingchen, Yue Hesheng, Zhang Dongyun, et al. Molecule Medicine Laboratory of Luohe Medical College, Henan 462002, China

Abstract Objective To investigate the relationship between the human papillomavirus (HPV) and esophageal cell carcinoma in Luohe City of Henan Province. **Methods** We detected HPV DNA in 115 formalin - fixed and paraffin - embedded tissues by PCR with the general primer set of GP5 + /6 + for HPV L1 gene and type - specific primer sets for HPV16 and HPV18. **Results** Totally 86 from 115 esophageal cell carcinoma samples were HPV positive and the rate was 74.8%. Among the samples detected, 56 were HPV16 E6 positive and the rate was 48.7%, 20 were HPV18 E6 positive and the rate was 17.4%. Our result also showed that 12 were the multiple infection containing HPV16 and 18 as well. **Conclusion** The high rate of HPV in the esophageal carcinoma samples suggests that HPV plays an important role in the development of esophageal cancer in Luohe city of Henan Province.

Key words Esophageal cell carcinoma; Human Papillomavirus; Polymerase chain reaction

人乳头状瘤病毒(HPV)与女性生殖道某些肿瘤,尤其是宫颈癌的发生关系密切。近年来,有关 HPV 在食管癌中的研究有大量报道,但结果差别很大。本研究应用 PCR 法,使用 HPV L1 基因区通用引物、HPV16 和 18 型 E6 基因特异性引物对 115 例河南省漯河地区食管癌标本中的 HPV 感染情况进行检测和分析,初步探讨其与漯河地区食管癌的相关性,以期为深入认识 HPV 与食管癌的关系及可能的防治策略提供线索。

材料与方法

1. 材料:115 例石蜡包埋的河南省漯河地区食管鳞状细胞癌术后病理标本,均为 2005 年 1 月~2009 年 3 月漯河医学

高等专科学校第二附属医院病理科存档标本,所有标本经 10% 甲醛溶液固定、石蜡包埋保存,连续 5 μ m 切片。

2. 组织块中全核酸的提取:使用石蜡标本 DNA 提取试剂盒(凯普生物化学有限公司),按说明书提示,提取组织全核酸后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3. HPV 的 PCR 检测:使用 β -actin 作内参(PCR 产物为 290bp),使用 HPV L1 区 GP5 + /6 + 引物、HPV16 E6 和 HPV18 E6 型特异性引物进行 PCR 扩增。按 HPV GP5 + /6^[1]以及 HPV16 E6 和 HPV18 E6 型特异性引物^[2]的扩增条件。PCR 中使用了 Ex - Taq 酶(宝生物,大连),每个反应总体积为 50 μ l,加入 1 μ l 提取的组织全核酸作为模板。阳性对照使用的 HPV16 及 18 全基因组质粒由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所肿瘤病毒室病毒基因工程国家重点实验室刘宏图教授惠赠。本研究使用的引物序列及扩增产物的长度见表 1。

结 果

1. 标本全核酸的提取:标本 DNA 提取后,经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪下进行观察,从图 1 可以明显看出代表人全核酸的条带:所提标本

基金项目:河南省教育厅自然科学研究项目(2009C310006)

作者单位:462002 漯河医学高等专科学校分子医学实验室(崔明辰、岳鹤声、张冬云、赫欣、王建国);462000 漯河医学高等专科学校第二附属医院病理科(宋晓兵)

通讯作者:崔明辰,电子邮箱:cui mingchen123@126.com

表 1 扩增引物序列及扩增产物长度

引物	引物序列 5'-3'	扩增子大小
通用引物 GP		
GP5 +	5'-TTGTTACTGGTAGATACTAC-3'	150
GP6 +	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'	
型特异性引物		
HPVE6		
HPV16E6 -1	5'-TCAAAAACGCCACTGTCTCTCTG-3'	120
HPV16E6 -2	5'-CGTGTCTTGATGATCTGCA-3'	
HPV18E6 -1	5'-CACTTCACTGCAAGACATAGA-3'	322
HPV18E6 -2	5'-GTTGTGAAATCGCTGTTTTTCA-3'	

DNA 约在 500bp ~ 20kb 处有泳动条带不等,而人类基因组核酸 DNA 泳动条带约为 20kb,人类新鲜组织所提 DNA 泳动条带约为 20kb,出现这种现象的原因可能是标本经甲醛浸泡或石蜡包埋后使得标本中的 DNA 发生了断裂,出现了较小断裂 DNA 片段。

M M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M1

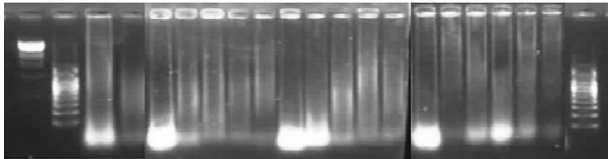


图 1 提取的组织 DNA

M. λ - EcoT14 I digest; M1. 100bp ladder; 1 ~ 18. 食管癌组织 1 ~ 18 样品

2. 标本全核酸的质量控制:使用 β -actin 的内参 PCR 反应对提取的 115 例标本全核酸进行质量控制,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,序列为 TCACCCAC ACTG TG CCCATCT 和 GAACCGCTC ATT GCCAATGG。PCR 反应总体积为 50 μ l,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,95 $^{\circ}$ C 变性 30S,55 $^{\circ}$ C 退火 30S,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,共进行 35 个循环。以 293 细胞提取全核酸为模板的阳性对照,其产物大小为 290bp,提取的食管癌组织全核酸为模板的 PCR 产物大小与阳性对照相近,说明组织中所提全核酸可满足进一步实验要求(图 2)。

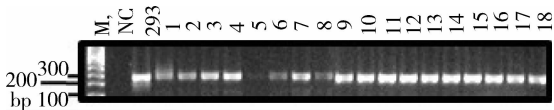


图 2 β -actin PCR 扩增提取的组织 DNA

M. 100bp ladder; NC. 空白对照; 293. 阳性参照品

3. 标本 HPV 检测:GP5 + /6 + 是国际上广泛使用的 HPV L1 基因区通用引物,可检测 20 多个型别 HPV。对 115 例食管癌样品进行了 PCR 检测,用含

有 HPV16、18 全基因组的质粒作为本组实验阳性对照,可观察到约 150bp 的 GP5 + /6 + 扩增产物。与之参照,115 例食管癌样品中,检测到 86 例 HPV 阳性, HPV 阳性率为 74.8%。同时,我们分别使用 HPV16 和 18 两型别 E6 基因特异性引物对样品进行了 PCR 检测。有 56 份样品检出 HPV16 E6 基因,其阳性率为 48.7%;20 个样品可检测到 HPV18 E6 基因,其阳性率为 17.4%;12 个样品同时具有 HPV16 和 18 两个型别 E6 基因的扩增子,可以认为这 12 份样品是 HPV16 和 18 两个型别的混合感染。HPV16 和 18 总感染率为 55.7%(表 2)。

表 2 河南省漯河地区食管癌组织中 HPV DNA 检测结果

组别	标本(n)	阳性[n(%)]
通用引物 GP		
HPV L1 GP	115	86(74.8)
型特异性引物		
HPVE6	115	56(48.7)
HPV18E6	115	20(17.4)
混合型		
HPV16 + HPV18	115	64(55.7)

讨 论

食管癌是世界上最常见的 6 大恶性肿瘤之一,也是我国最常见的恶性肿瘤,占我国恶性肿瘤相关死因的第 4 位^[3]。1982 年 Syrjanen^[4]首次提出食管癌形态学改变与生殖道疣非常相似,认为人乳头状瘤病毒和食管癌的发生可能有关。HPV 是一组体积较小的双链 DNA 病毒,目前已分离了 120 多种亚型,其中 15 种高危型 HPV 的感染已被证明是引起宫颈癌的必要因素^[4]。

但是与宫颈癌组织中 HPV 感染情况不同的是,食管癌组织中 HPV 感染率在不同的国家、不同的地区及同一地区差异极大。刘宏图教授领衔的研究团队曾使用 HPV6、11、16 和 18 的通用引物,在广东潮汕地区检测过新鲜食管癌切除组织样品,发现 HPV16 和 18 的分布频率分别约为 40% 和 20%,检出率随不同批次有所改变,两型别合计存在比率在 60% ~ 70% 之间变动;应用 HPV L1 通用引物 GP5 + /6 +、HPV16 E6 和 HPV18 E6 型特异性引物,在河南省林州市食管癌样品中 HPV16 和 18 的检出率为 71.0%^[5]。本研究中,漯河地区石蜡包埋食管癌组织中 HPV 检出率为 55.7%,低于上述两地食管癌标本中 HPV16、18 检出率,造成这些差异的原因可能与标本来源、病变取材部位、标本数量、环境地理因素、遗

(下转第 93 页)

LSCs PTEN 蛋白阳性率仅 25.58% ,与正常 HSCs 比较表达量明显减低,但是 p - Akt 和 p - ERK 水平却显著增高。提示 LSCs PI₃K/PTEN/Akt 和 MEK/ERK 信号通路被激活。生理条件下,PTEN 分子特异地从肌醇环上 3 位脱磷酸,使 PI(3,4,5)P₃ 转化成 PI(4,5)P₂,抑制 PI₃K/Akt 信号转导途径,从而调控 HSCs 的生长、分化和凋亡。LSCs 由于 PTEN 蛋白过度减少,PI(3,4,5)P₃ 不能转化成 PI(4,5)P₂ 而不断积累,PI₃K 途经信号增强活化 Akt。同时高表达的 CD123 与 IL - 3 结合,一方面通过信号通路 MEK/ERK 使 PU.1 磷酸化;另一方面通过 PI₃K/Akt 信号通路激活 CREB;两者共同作用引起 mcl - 1 基因转录,而 mcl - 1 是一种抗凋亡的基因,最终促使 LSCs 分化、凋亡受阻而持续克隆性增殖和自我更新。

综上所述,LSCs 可能是白血病细胞不断生长的根源,是白血病发生、发展的起始细胞。少量的 LSCs 具有无限增殖和自我更新能力,能逃逸化学药物治疗作用,从而导致白血病复发。如果通过针对 LSCs 高表达的分化抗原进行单克隆抗体靶向治疗,以及针对 PI₃K/PTEN/Akt 和 MEK/ERK 信号通路开发小分子靶向抑制药物,可望彻底清除 LSCs,从而达到临床长期稳定缓解,为急性白血病治疗提供新的策略。

参考文献

- 1 Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 759 - 806
- 2 Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, *et al.* The interleukin - 3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells[J]. *Leukemia*, 2000, 14(10):1777 - 1784
- 3 Van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, *et al.* Aberrant marker expression patterns on the CD34⁺ CD38⁻ stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the nor-

- mal stem cell compartment both at diagnosis and in remission[J]. *Leukemia*,2007,21(8):1700 - 1707
- 4 Bardet V, Tamburini J, Ifrah N, *et al.* Single cell analysis of phosphoinositide 3 - kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry[J]. *Haematologica*,2006, 91(6):757 - 764
- 5 Yang J, Liu J, Zheng J, *et al.* A reappraisal by quantitative flow cytometry analysis of PTEN expression in acute leukemia[J]. *Leukemia*,2007,21(9):2072 - 2074
- 6 Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells[J]. *Leukemia*,2002,16(4):559 - 562
- 7 Rhenen A, Feller N, Kelder A, *et al.* High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(18):6520 - 6527
- 8 Hosen N, Park CY, Tatsumi N, *et al.* CD96 is a leukemic stem cell specific marker in human acute myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(26):11008 - 11013
- 9 Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, *et al.* Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33 positive acute myeloid leukemia in first recurrence[J]. *Cancer*, 2005, 104(7): 1442 - 1452
- 10 Charrad RS, Gadhouch Z, Qi J, *et al.* Effects of anti - CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell line[J]. *Blood*, 2002, 99(1):290 - 299
- 11 Jin L, Hope KJ, Zhai Q, *et al.* Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells[J]. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1167 - 1174
- 12 Maria - Carolina T, Pint O, Luciana C. *et al.* Determination of P - glycoprotein, MDR - related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung - resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia[J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2008,74B(3): 163 - 168
- 13 Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, *et al.* Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia[J]. *Leukemia*,2008, 22(4):686 - 707

(收稿:2011 - 03 - 24)

(修回:2011 - 09 - 09)

(上接第 74 页)

传易感性和检测方法不同有关。本研究确定了我国河南省漯河区食管癌组织中有 HPV 存在,其中 HPV16 的感染占很大比例,并且 HPV 感染可能是食管癌发生的重要病因。这为下一步阐明食管癌多阶段演进的分子机制,建立高危人群检测和早期诊断生物指标和手段奠定了工作基础。

参考文献

- 1 Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, *et al.* Use of multiple PCR sets for optimal detection of human papillomavirus[J]. *J Clin Microbiol*,1996, 34(2):2095 - 2100
- 2 Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, *et al.* Detection and typing of human

- papillomavirus by E6 nested multiplex PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2004,42(5):3176 - 3184
- 3 Gao GF, Roth MJ, Wei WQ, *et al.* No association between HPV infection and the neoplastic progression of esophageal squamous cell carcinoma: Result from a cross - sectional study in a high - risk region of China[J]. *Int J Cancer*,2006,119(3):1354 - 1359
- 4 Zur HH. Cervical carcinoma and human papillomavirus on the road to preventing a major human cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*,2001,93(6): 252 - 253
- 5 李淑英,李颖,王立东,等.应用聚合酶链反应检测食管癌组织中乳头状瘤病毒[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*,2008,22(3):251 - 253

(收稿:2010 - 12 - 30)
(修回:2011 - 02 - 18)