

hTERT 基因扩增在宫颈癌及宫颈癌前病变中的临床意义

成志强 王洋 王晓玫 俞丽娜 贺黎升 彭全州 胡锦涛 陈灼怀

【摘要】 目的 检测hTERT基因在宫颈癌前病变及宫颈癌中的扩增情况,探讨其在宫颈癌筛查中的价值。方法 采用双色荧光原位杂交技术(FISH)检测30例正常者、90例宫颈上皮内瘤变及30例宫颈癌宫颈脱落细胞hTERT基因的表达情况,以对照组的检测结果建立正常阈值。结果 正常组、CIN1组、CIN2组、CIN3组和宫颈鳞癌hTERT基因阳性表达率分别为0%(0/30)、16.67%(5/30)、53.33%(16/30)、80%(24/30)、100%(30/30),随着宫颈病变级别增高,其异常表达百分率亦随之增高。结论 CIN1、CIN2、CIN3及宫颈鳞癌均有hTERT基因扩增,其拷贝数随CIN分级增加而增加。检测宫颈脱落细胞hTERT基因扩增对宫颈癌筛查及宫颈病变进展预测具有良好的临床应用空间。

【关键词】 宫颈上皮内瘤样病变; 原位杂交, 荧光; 宫颈鳞癌; hTERT 基因

Human telomerase RNA component gene amplification in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer with fluorescence *in situ* hybridization and its clinical significance Cheng Zhiqiang, Wang Yang, Wang Xiaomei, Yu Lina, He Lisheng, Peng Quanzhou, Hu Jintao, Chen Zhuohuai. Department of Pathology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China
Corresponding author: Cheng Zhiqiang, Email: chengzhiqiang2004@aliyun.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the amplification of the human telomerase gene(hTERT) in cervical cancer and precancerous lesions of uterine cervix and its value in screening of cervical cancer. **Methods** Cervical cast-off cell specimens were screened from 150 out patients with cervical lesion, including normal, CIN1, CIN2, CIN3 and cervical squamous carcinoma cell from liquid based cytology (each of 30 cases) by dual-FISH technology. The results of normal control group were used to set up the threshold. **Results** The positive rate of hTERT gene amplification in controls, CIN1, CIN2, CIN3 and cervical squamous carcinoma was respectively 0%(0/30), 16.67%(5/30), 53.33%(16/30), 80%(24/30), 100%(30/30), and the percentage of abnormal cells was increased with the cervical lesion degree of pathological grade. **Conclusions** There is an abnormal amplification of hTERT gene in CIN1, CIN2, CIN3 and cervical squamous carcinoma, and its copy numbers are increased with the serious degree of pathological grades. Therefore, it has a certain clinical space for screening cervical cancer and prediction of cervical lesion progression by detection of amplification of hTERT gene in cervical cast-off cells with FISH technology.

【Key words】 Cervical intraepithelial neoplasia; *In situ* hybridization, fluorescence; Cervical squamous carcinoma; Human Telomerase RNA component gene

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.05.006

基金项目: 深圳市科技计划资助项目(201202130)

作者单位: 518020 广东省, 深圳市人民医院病理科(成志强、王洋、王晓玫、贺黎升、彭全州、胡锦涛、陈灼怀), 肛肠外科(俞丽娜)

通讯作者: 成志强, Email: chengzhiqiang2004@aliyun.com

子宫颈癌是仅次于乳腺癌的第二大女性恶性肿瘤,据世界卫生组织(WHO)统计每年全球有大约30万妇女死于宫颈癌,每年新发病例150万左右,且呈现年轻化趋势,因此早期筛查成为世界各国工作之重点。近20年来随着医学技术进步尤其是宫颈脱落细胞学的改进和更新,宫颈癌前病变发现率显著提高并取得良好的治疗效果,但遗憾的是对宫颈癌前病变的进展与转归尚无良策。

现代分子生物学和遗传学研究揭示,人类绝大多数肿瘤常常表现为染色体数目和结构的异常。国内外学者研究发现,宫颈上皮内瘤变(CIN)向宫颈癌演变和转化过程中,宫颈上皮细胞几乎都伴有人类染色体端粒酶基因(the human telomerase gene, hTERC)的扩增^[1-6]。本研究应用双色荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)方法检测正常宫颈脱落细胞、各级宫颈癌前病变及宫颈癌脱落细胞中的hTERC基因的表达情况,分析hTERC基因在宫颈癌前病变和宫颈癌中表达的异常及其临床意义,为宫颈癌的早期筛查、临床诊断及预后判定提供科学依据。

资料与方法

1. 研究对象:依据TBS(the Bethesda system)2001年阴道/宫颈学诊断分类系统,选择深圳市人民医院2012年3~12月份妇科门诊患者宫颈脱落细胞标本,并参照组织病理学检查结果,筛选出CIN1、CIN2、CIN3及宫颈癌患者的标本各30例,并选择30例检查结果为正常者用于正常阈值设定。根据以上纳入标准共收集宫颈细胞学标本150例,最小年龄17岁,最大年龄69岁,中位年龄43岁(表1)。

表1 临床病例资料收集(例)

TBS分类 临床参数	正常/炎症	低级别病变	高级别病变	鳞状细胞癌
年龄				
10~19岁	2	1	0	0
20~29岁	10	6	1	0
30~39岁	5	13	6	3
40~49岁	6	6	16	11
50~59岁	4	3	4	9
60~69岁	3	1	3	7
生育与否				
是	26	25	27	30
否	4	5	3	0
绝经情况				
是	1	3	6	17
否	29	27	24	13

2. 标本采集方法:宫颈细胞标本采集:专科医师用TCT专用采集器插入宫颈口,在宫颈外口鳞柱状上皮交界处,以宫颈外口为中心,稍用力均匀旋转4~5周,取出采集器放入TCT保存液中进行漂洗备用。

3. FISH探针:本实验所用hTERC/CSP3 DNA双色探针购置于北京金菩嘉医疗科技有限公司。因hTERC基因位于3q26.3上,分别用红色(Rhodamine)和绿色(FITC)荧光标记hTERC基因和3号染色体着丝粒,以CSP3探针作为对照。

4. FISH步骤:(1)宫颈脱落细胞抹片预处理:常温下,将宫颈脱落细胞抹片依次放入2×枸橼酸盐水(SSC, pH 7.0)浸泡10 min, 0.1 mol/L盐酸溶液10 min, 2×SSC(pH 7.0)5 min(共2次), 0.01 mol/L胃蛋白酶和盐酸混合液中37℃水浴10~15 min, 2×SSC(pH 7.0)5 min(共2次);再依次放入-20℃70%、85%酒精中各3 min,室温下放入100%无水酒精10 min,自然晾干玻片。(2)杂交:预处理后的细胞抹片用50℃烤片机预热后,在避光环境中将探针混合液10 μl(2 μl探针、1 μl去离子水和7 μl杂交缓冲液)滴于玻片杂交区,加盖玻片,橡皮胶封片,置于DAKO荧光原位杂交仪过夜杂交。(3)洗片:次日移去盖玻片,将玻片置于45℃的50%甲酰胺/2×SSC溶液3 min,依次经去离子水10 min(共3次), 2×SSC溶液5 min(共2次), 2×SSC/NP-40溶液5 min处理。待玻片干燥后加DAPI复染液15 μl,用盖玻片封盖,置于暗盒中15~20 min,随后观察信号情况。

5. FISH信号的判定:用奥林巴斯BX51荧光显微镜在DAPI/FITC/Texas Red三色滤光镜激发下观察间期细胞荧光杂交信号,使用FISH分析软件(由Video Test公司提供)进行图像分析,观察hTERC基因和CSP3双色探针在整张抹片的杂交情况。每个病例随机挑选200个间期细胞核,下述情况不纳入计数:细胞核轮廓不清;细胞有重叠;杂交不均匀区域;记数细胞各通道信号不清晰;背景深影响信号判断。(1)试验结果判定:如单个间期细胞核中红、绿色信号各为2个为正常宫颈上皮细胞;单个间期细胞核中红色信号>2个,和(或)绿色信号≥2个则判定hTERC基因扩增有异常^[7]。(2)正常阈值的设立:将宫颈细胞学抹片结果为正常的30例标本进行FISH检测,每例均按上述标准挑选200个细胞,统计超过2个红色信号细胞数目

的百分率,按参考文献中的公式“阈值=平均数+3×标准差”设定正常阈值^[8]。(3)阳性判断标准:计算出每例样本的 hTERC 基因异常细胞百分率,如该样本的 hTERC 基因异常细胞百分率大于正常阈值,表示 hTERC 基因有扩增,则判定为阳性,反之则为阴性。

6. 统计学分析:本研究采用统计软件 SPSS 13.0 对实验数据进行 χ^2 检验分析,检验标准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. FISH 检测结果:由于 hTERC 基因位于 3q26.3,因此无论是正常间期细胞还是异常细胞,在 3 号染色体上均能观察到较强的红色和绿色荧光杂交信号(图 1)。

2. 正常阈值:30 例细胞学涂片判断为正常的标本中异常细胞百分率中有 1 例为 4.50%,4 例为 2.50%,9 例为 3.50%,16 例为 3.00%,按文献公式计算出正常阈值为 5.72%。

3. hTERC 基因在不同 CIN 分级中的扩增情况:本研究发现 hTERC 基因异常扩增呈现 5 种类型:2:3、2:4、2:5、3:3 和 4:4 或以上(红色信号与绿色信号比,图 2),这与国内外文献报道的相一致^[6-8]。hTERC 基因在 CIN1、CIN2、CIN3 及宫颈癌中均异常表达(不同组织学分级中 hTERC 基因异常表达及其百分率见表 2),其异常细胞百分率均大于正常阈值,且异常细胞百分率随病理学分级严重程度增高而增高,提示 hTERC 基因扩增在判定 CIN 的级别和进展趋势有重要临床意义。学者发现除 3:3 类型外,2:3、2:4、2:5 等情况在 CIN1、CIN2、CIN3 及宫颈癌的异常百分率比较,差异有高度统计学意义($P<0.01$)。但是,宫颈癌与低级别上皮内瘤变(CIN1)比较,2:3 类型所占比例明显下降($P<0.001$),2:4、2:5 和 4:4 或以上类型在宫颈癌所占比例明显升高($P<0.001$)。

表 2 各级别 CIN 和宫颈癌 hTERC 基因扩增情况

组别	例数	hTERC 基因扩增例数(+)(例)	hTERC 基因扩增阳性率(%)
正常对照组	30	0	0
CIN1 组	30	5	16.67
CIN2 组	30	16	53.33
CIN3 组	30	24	80.00
SCC 组	30	30	100

讨 论

宫颈癌在女性恶性肿瘤占据第二位,近十年来宫颈癌的发病率持续攀升并趋于年轻化。CIN 是与宫颈浸润性鳞状细胞癌相关的一组癌前病变,根据病变程度可分为 CIN1、CIN2、CIN3 级,或低级别(CIN1 级)和高级别病变(CIN2、CIN3 级),CIN 本身就意味着一个病变发展历程和转化,从 CIN 发展为宫颈癌一般需要十年或以上时间。目前宫颈癌前病变和宫颈癌的筛查方法仅限于定性无法定量,且受细胞诊断医师主观因素的影响,部分病例难以作出确切诊断。高级别的 CIN 可发展为浸润性癌,但绝大多数的低级别 CIN 会转归,只有不到 20% 的低级别 CIN 病灶随着病变进展而演变成浸润性癌。因此,及时发现和诊断宫颈癌前病变,并采取有效的治疗手段,宫颈癌的早期诊断和预防成为可能。

宫颈癌和癌前病变的早期筛查和诊断成为国内外关注的重点。宫颈细胞学检查是宫颈癌早期筛查主要方法,传统的细胞学检查由于涂片标本的制作粗糙导致假阴性率偏高,随着液基薄层细胞学发展,假阴性率较前大大降低。但病理医师对液基细胞学的明确分级和宫颈癌的判定尚存在主观性和偏差,因此如何寻找客观的分子指标是国内外学者研究的热点。学者 Caraway 等^[6]对宫颈癌染色体微卫星的研究中发现,常见染色体 3q 增加和 2p, 6p, 13p, 11q 的缺失,并且异常基因区多位于 3q26.1~q28,其认为最重要引起宫颈上皮病变及恶性转化的基因可能是人类染色体端粒酶基因(hTERC 基因)。

hTERC 基因位于人类染色体 3q26 区域,其编码的基因产物端粒末端转移酶与 3 号染色体长度和稳定性的维持密切相关。研究发现,宫颈上皮细胞由非典型增生逐步发展为宫颈癌的过程中几乎都伴有 3 号染色体长臂扩增,端粒酶活性上调常伴发在宫颈癌发生、发展过程中,因此 hTERC 基因的扩增与 CIN 和宫颈癌的发生和转化有密切关联。学者 Kloth 等^[9]采用 FISH 技术检测液基细胞学样本,发现 3q26.3 扩增比例在宫颈高级别病变与鳞癌中占较高百分率,而在正常宫颈与宫颈低级别病变中不出现显著扩增。因此,检测 hTERC 基因扩增情况对宫颈癌的筛查、早期诊断及预后转归有重要的临床参考价值。

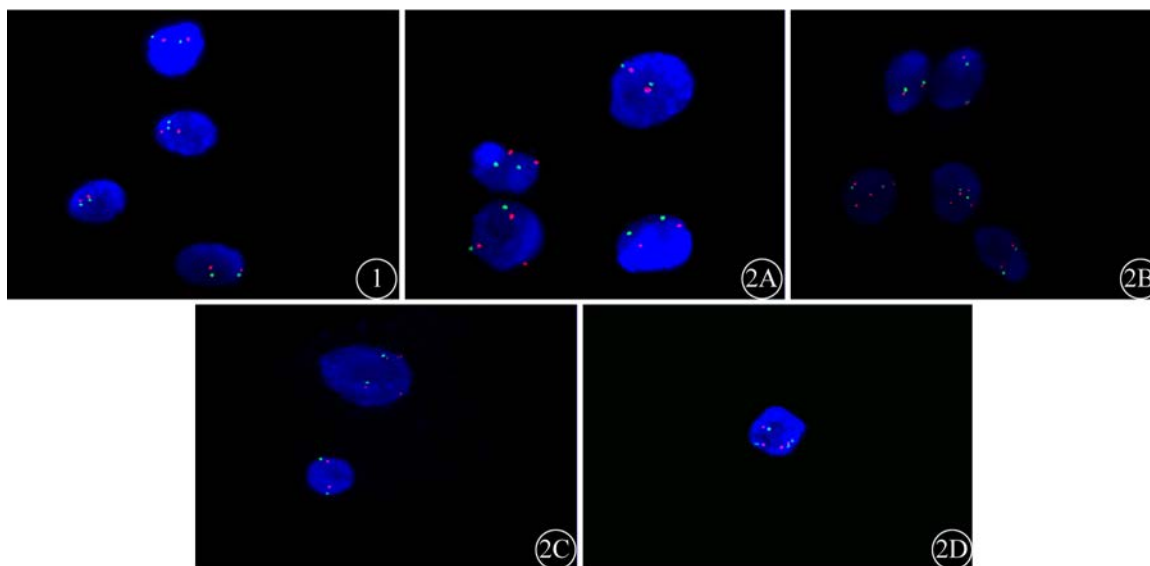


图1 FISH检测正常宫颈细胞示2个红色信号和2个绿色信号 图2 FISH检测异常宫颈细胞的hTERT基因表达, 2A: 红绿信号比为2:3; 2B: 红绿信号比2:4; 2C: 红绿信号比2:5; 2D: 红绿信号比4:4

FISH是20世纪80年代末在放射性原位杂交技术基础上发展起来的一种非放射性分子细胞学核心技术,其基本原理是通过荧光素标记的寡核苷酸探针特异地和互补核酸序列在完整的细胞内结合,可以对间期细胞染色体或特异基因的数目异常、特定片段的缺失、异位和重排进行检测分析。国内外医疗机构已广泛将FISH技术用于产前及产后遗传病诊断与各种恶性肿瘤的基因检测。目前国内常采用FISH技术检测癌组织的靶基因扩增或移位,而用于宫颈脱落细胞辅助诊断宫颈上皮病变和宫颈癌的报道国内尚不多见。本研究采用双色间期FISH技术检测人宫颈上皮内瘤变(CIN1、CIN2、CIN3级)及宫颈癌脱落细胞hTERT基因扩增情况,结果显示hTERT基因在CIN1、CIN2、CIN3及宫颈癌中均有扩增,每例样本的hTERT基因异常细胞百分率均大于正常阈值,从而揭示CIN从低级别至高级别直至宫颈癌的各个阶段均有hTERT基因异常扩增。

本实验结果显示,随着CIN级别的提高,hTERT基因异常扩增的细胞数和异常细胞比率均呈上升趋势,且扩增类型不同。在CIN各级别病变中,2:3类型所占比例随宫颈上皮病变级别的增加而下降,而2:4,2:5和4:4或以上类型所占比例均随之增加,提示hTERT基因扩增细胞比率随着宫颈病变级别的增高逐步增高,在宫颈癌中表现出最高峰值,这说明hTERT基因扩增可能与高级别CIN相关。试验结果进一步证实,随着CIN分级的增加,hTERT基因扩增的拷贝数随之亦增加,这与国

外学者Olaharski等^[10]报道相一致。

由此可见,hTERT基因扩增在宫颈病变中是一个动态的增加过程,随着病变级别的增加,hTERT扩增率和扩增拷贝数均在增加,学者认为通过检测hTERT扩增情况可以预测宫颈上皮病变的进展和转归,该结论与国外学者^[11]的观点相吻合。因此,hTERT基因是CIN和宫颈癌筛查中重要的分子标志物,通过检测hTERT扩增情况可以帮助确定CIN分级,同时可以预测宫颈各级病变演变和进展的风险程度。由于本研究CIN及宫颈癌的病例数有限,有待进一步扩大样本数量继续研究hTERT基因异常扩增在宫颈癌筛查中的价值及预测宫颈病变的发展和转归。

参 考 文 献

- [1] Francoise AG, Mckaylee MR, Annie KH, et al. Proliferative Defects in Dyskeratosis Congenita Skin Keratinocytes are Corrected by Expression of the Telomerase Reverse Transcriptase, TERT, or by Activation of Endogenous Telomerase through Expression of Papillomavirus E6/E7 or the Telomerase RNA Component, TERC[J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(3): 279-288.
- [2] Jones AM, Beggs AD, Carvajal-Carmona L, et al. TERC polymorphisms are associated both with susceptibility to colorectal cancer and with longer telomeres[J]. *Gut*, 2012, 61(2): 248-254.
- [3] Listerman I, Sun J, Gazzaniga FS, et al. The major reverse transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits telomerase activity but protects from apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(9): 2817-2828.
- [4] Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PPH, 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): 412-420.

[5] Andersson S, Wallin KL, Hellstrom AC, et al. Frequent gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 in cervical adenocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2006, 95(3): 331-338.

[6] Caraway NP, Khanna A, Dawlett M, et al. Gain of the 3q26 region in cervicovaginal liquid based pap preparations is associated with squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(1): 37-42.

[7] 郭瑞霞, 负文晶, 乔玉环, 等. 宫颈脱落细胞中 hTERC 基因扩增的初步研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2011, 12(6): 440-443.

[8] 刘维, 孙丽君. 荧光原位杂交技术检测宫颈上皮内瘤变及宫颈癌中 TERC 基因的扩增及临床意义[J]. 实用妇产科杂志, 2010, 26(2): 124-127.

[9] Kloth JN, Oosting J, VanWezel T, et al. Combined array comparative genomic hybridization and single nucleotide polymorphism loss of heterozygosity analysis reveals complex genetic alterations in cervical cancer[J]. BMC Genomics, 2007, 32(1): 48-53.

[10] Olaharski AJ, Sotelo R, Solorza Luna G, et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(2): 337-343.

[11] 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: 1229-1238.

(收稿日期: 2014-02-18)

(本文编辑: 戚红丹)

成志强, 王洋, 王晓玫, 等. hTERC 基因扩增在宫颈癌及宫颈癌前病变中的临床意义 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(5): 834-838.

