人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈上皮内病变诊断中的应用价值观察

孙家成

独山县人民医院外二科　贵州独山　558200

【摘要】目的　探讨人乳头瘤病毒（human patillomavirus，HPV）E6/E7 mRNA 的检测在宫颈上皮内病变的意义。方法　用支链 DNA(branched DNA，bDNA) 技术检测 159 例宫颈液基细胞学标本中 HPV E6/E7 mRNA 的表达，并结合其组织学活检标本，观察不同级别宫颈上皮内病变中 HPV E6/E7 mRNA 表达情况。结果　正常组（或慢性炎组）、低级别和高级别鳞状上皮内病变 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率分别为 15.00%、61.82%、72.72%，宫颈上皮内病变组显著高于正常组（或慢性炎组），并且随着病变级别的增高，其阳性率也增高，结果有统计学差异（χ^2=41.19，P<0.01），宫颈上皮内病变组 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数也高于正常组（F=4.26，P<0.05），而高级别和低级别上皮内病变组之间拷贝数无统计学差异。结论　HPV E6/E7 mRNA 的高表达与宫颈上皮内病变进展相关，HPV E6/E7 mRNA 的检测是一种判断宫颈上皮内病变进展或宫颈癌发生风险比较特异性的方法。

【关键词】宫颈上皮内病变；HPV；E6/E7mRNA；宫颈癌

【中图分类号】R737.33 【文献标识码】A【文章编号】1674-9561（2017）06-074-02

人乳头状瘤病毒（HPV）与宫颈癌的关系已经很明确，尤其是高危型 HPV，如 HPV16、HPV18、HP58 等是宫颈癌发生的主要因素之一。因此高危型 HPV 检测在宫颈防癌检查中已经普遍使用，HPV E6/E7 mRNA 是病毒癌基因的转录产物，能更好的反应病毒的活动状态，HPV E6/E7 mRNA 的检测是近年来用于防癌检查的一种新方法，本文主要探讨 HPV E6/E7 mRNA 的检测在宫颈上皮内病变的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院 2013 年 1 月至 2014 年 12 月宫颈液基细胞学标本做 HPV E6/E7 mRNA 检测，并同时追踪其组织活检报告结果，共 159 例，患者年龄从 20 岁到 71 岁，中位年龄 39 岁，经过组织病理学检查：宫颈慢性炎 60 例，低级别鳞状上皮内病变（low grade squamous intraepithelial lesion，LSIL）55 例，高级别鳞状上皮内病变（high grade squamous intraepithelial lesion，HSIL）44 例。

1.2 方法

1.2.1 HPV E6/E7mRNA 检测方法

宫颈液基细胞学标本离心弃上清液后，按照 HPV E6/E7 mRNA 检测试剂盒说明书（购自河南（新乡）中美合资科蒂亚生物技术有限公司）操作，并分别设置两个阴性、阳性对照孔，在 96 孔板经细胞裂解、探针捕获待测目标，再经过杂交信号放大、底物化学发光，结果通过 Quanti Virus™ 冷光仪读取光子数，再经过软件转换为拷贝数。

1.2.2 组织病理学检查

患者由经验丰富的临床医师进行阴道镜检查，对宫颈可疑病灶进行取样送至病理科，组织标本经取材、脱水、包埋、切片、苏木素 / 伊红染色等制成 HE 石蜡切片，由 2 名经验丰富的病理医师诊断。按照 2014 年版女性生殖系统肿瘤 WHO 分类，宫颈鳞状上皮内病变分为 LSIL 和 HSIL 两级，LSIL 包括：宫颈上皮内瘤样病变（cervical intraepithelial neoplasia，CIN）Ⅰ级和 HPV 感染，HSIL 包括：CIN Ⅱ级、CIN Ⅲ级和原位鳞癌。

1.2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件，宫颈不同级别病变 HPV E6/E7 mRNA 阳性率的比较采用 χ^2 检验，HPV E6/E7mRNA 拷贝数的比较采用方差分析，$P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV E6/E7mRNA 检测阳性率与宫颈病变的关系

慢性炎症组、低级别和高级别鳞状上皮内病变组 HPV E6/E7mRNA 阳性率见表 1，组间比较差别有统计学意义（χ^2=41.19，P<0.01），结果显示随着病变级别增高，HPV E6/E7mRNA 的阳性率也逐渐增高，且宫颈上皮内病变组阳性率显著高于正常（或慢性炎）组。

表 1：HPV E6/E7mRNA 阳性率与宫颈病变的关系

宫颈组织活检病变组别	例数 n	HPV E6/E7mRNA	
		阳性例数	阳性率
正常（或慢性炎）	60	9	15.00%
低级别鳞状上皮内病变	55	34	61.82%
高级别鳞状上皮内病变	44	32	72.72%

2.2 HPV E6/E7mRNA 拷贝数与宫颈病变的关系

表 2：HPV E6/E7 mRNA 表达水平与宫颈病变的关系

宫颈组织活检病变组别	例数 n	E6/E7mRNA（copies/ml）	
		均数	95%CI
正常（或慢性炎）	60	200.70±773.79	0.81-400.59
低级别鳞状上皮内病变	55	4398.85±9665.08	1786.01-7011.69
高级别鳞状上皮内病变	44	8468.46±25050.20	852.51-16084.42

HPV E6/E7mRNA 拷贝数见表 2，如表 2 所示，随着宫颈病变进展，HPV E6/E7mRNA 拷贝数也增加，经方差分析，正常组与上皮内病变组拷贝数有差异（F=4.26，P<0.05），而 LSIL 和 HSIL HPV E6/E7mRNA 拷贝数虽有增加趋势但无统计学差异。

学术期刊网 www.qikanjiancuo.com

3 讨论

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一，HPV 感染特别是高危型 HPV 感染是导致宫颈癌发生的一个重要原因，但并非所有高危型 HPV 感染都会导致宫颈癌，而且高危型 HPV 在女性感染率较高，特别是年龄小于 30 岁的女性，但绝大多数为一过性感染，会被人体免疫系统清除掉，研究显示长期持续 HPV 感染才能导致宫颈上皮内病变最终发展为宫颈癌。HPV 是闭合环状双链 DAN 病毒，表面为衣壳结构，无包膜，病毒基因组 DNA 有 8 千个左右碱基对，分编码区和非编码区，编码区分[1]：早期区（E 区）、晚期区（L 区）；非编码区为上游调节区 (upstream regulating region，URR) 或长调控区 (long control region，LCR)，早期区编码 E1、E2、E4、E5、E6、E7 等早期蛋白，参与病毒 DAN 的复制、转录调节和细胞转化等功能。E1 和 E2 蛋白与 HPV 复制有关，E2 蛋白还可抑制 E6、E7 转录，但其常在 HPV DNA 与细胞基因组整合时断裂而缺失，而失去对 E6、E7 的转录抑制作用，导致 E6、E7 蛋白高表达。E6、E7 是病毒癌基因，其高表达在宫颈上皮内病变进展中起着重要作用；E4 蛋白参与细胞骨架的破坏，有利于病毒颗粒的释放；E5 在细胞的转化中也起着一定的作用；晚期转录区编码主要和次要衣壳蛋白 L1 和 L2，L1 高度保守，L1 蛋白是构成病毒外壳的主要蛋白其表达也为机体免疫反应清除病毒提供了主要靶位点，并可诱导机体产生中和抗体对抗病毒[2]，L2 与 L1 一起参与病毒壳蛋白的组成，上游调节区位于 L1 和 E6 之间。含有病毒 DNA 复制起点和基因转录调控元件，调控 HPV 病毒转录与复制。

HPV 在感染过程中，可出现游离状态和与细胞基因组整合状态，宫颈低级别上皮内病变中，病毒常常以游离的状态存在，但随着宫颈病变级的增高，病毒 DNA 的整合状态也逐渐增多[3]，因此 HPV DNA 与宫颈上皮细胞基因组整合而持续存在是宫颈上皮内病变进展为癌的重要因素，当 HPV NDA 与宿主细胞发生整合时，常使 E2 缺失，从而使 E6 和 E7 过表达，进一步使细胞发生恶性转化，E6 和 E7 蛋白导致细胞恶性转化的分子机制主要是使抑癌基因 P53 和 pRB 失活[4]，使宿主细胞永生化，E6 可以和 P53 蛋白结合使其降解，而 E7 则可以影响 pRB 与 E2F 转录因子结合，使细胞进入细胞周期增殖、分化。E6 和 E7 蛋白还可以通过激活端粒酶及其它癌基因而使细胞转化[5]，E7 的过表达还可破坏染色体基因组的稳定性[6]，因此 HPV E6 和 E7 的过表达与宫颈癌的发生密切相关，所以检测 HPV E6 和 E7 的表达产物 mRNA 有着重要意义，可作为临床评估宫颈上皮内病变进展的方法。

本研究主要从 159 例宫颈液基细胞学标本中检测 HPV E6/E7mRNA 表达情况，以观察其过表达与宫颈病变进展的关系，进而了解其过表达的意义。结果显示宫颈上皮内病变组比正常组（或慢性炎）组 HPV E6/E7mRNA 表达阳性率显著增高，而且随着病变程度增加 HPV E6/E7mRNA 阳性率也增高，结果有统计学差别，这与大多国内外研究结果相一致[7-10]，可见 HPV E6/E7mRNA 的表达与宫颈进展密切相关，另外我们也发现，宫颈上皮内病变组 HPV E6/E7mRNA 拷贝数高于正常组，结果有统计学差别，而高级别宫颈上皮内病变组 E6/E7mRNA 拷贝数虽然有增加趋势，但与低级别上皮内病变组无统计学差异，这与智艳芳等[9]报道结果不一致，可能与本研究样本量较少有关，同时我们也发现低级别病变组中少量病例 HPV E6/E7mRNA 出现了很高的拷贝数，这些病例是否更容易进展成高级别病变或癌，还有待于继续追踪观察。

HPV E6/E7mRNA 作为病毒癌基因的表达产物能更好的反应病毒的活动状态，有可能更准确的预测宫颈病变进展状况，Molden[11] 等在对宫颈病变的随访中研究发现 HPV mRNA 比 DNA 对宫颈病变的进展的评估更有特异性，因此检测 HPV E6/E7mRNA 可用以临床判断宫颈病变进展的风险，与其他宫颈癌筛查方法合用可提准确性。

参考文献：

[1] 张小燕，陈庆云，卞美璐等 . 人乳头状瘤病毒感染生物状态与宫颈病变研究进展 [J]. 中国妇产科临床杂志，2006，7（2）：147-150.

[2]Ho GY, Studentsov YY, Bierman R, et al.Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women[J].Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004,13(1):110-116.

[3]Hopman AH,Smedts F,Dignef W,et al.Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities[J].J Pathol. 2004,202(1):23-33.

[4]McCloskey R, Menges C, Friedman A,et al.Human papillomavirus type 16 E6/E7 upregulation of nucleophosmin is important for proliferation and inhibition of differentiation[J].J Virol. 2010,84(10):5131-5139.

[5]Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R.Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter[J].Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 , 100 (14):8211-8216.

[6]Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A,et al.Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses[J].Cancer Lett. 2011，305(2):113-122.

[7]Cattani P, Zannoni GF, Ricci C,et al.Clinical performance of human-papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix[J]. J Clin Microbiol，2009，47（12）：3895:3901.

[8]QCoquillard G, Palao B, Patterson BK.uantification of intracellular HPV E6/E7 mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA[J].Gynecol Oncol. 2011,120(1):89-93.

[9] 智艳芳，李肖甫，沈勇，等 . 人乳头瘤病毒癌基因 E6/E7mRNA 检测在宫颈病变中的临床意义 [J]. 国际遗传学杂志，2014，37(01)6-12.

[10] 王华，陈亚宝，叶丽华等 . 应用支链 DNA 技术检测人乳头瘤病毒 E6/E7mRNA 在宫颈疾病筛查中的价值 [J]. 中华临床医师杂志（电子版），2011，05(15):4362-4366.

[11] Molden T,Nygard JF,Kraus I,et al.Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear[J].Int J Cancer. 2005,114(6):973-976.

学术期刊网 www.qikanjiansuo.com