

上可预测 LNG-IUS 治疗子宫腺肌病的疗效。本研究中子宫腺肌病患者仅根据临床症状和超声检查做出诊断,并且例数较少,因此,进行大样本的前瞻性临床研究是非常必要的。此外,进行宫内局部左炔诺孕酮浓度测定以及与药效之间关系的研究,对于指导患者长期放置 LNG-IUS 治疗子宫腺肌病是非常有益的。

参 考 文 献

- [1] 何淑明, 韦明秀, 韩燕华, 等. 左炔诺孕酮宫内缓释系统治疗子宫腺肌病的临床观察. 中华妇产科杂志, 2005, 40: 536-538.
- [2] 魏丽娜, 祁秀娟, 赵文翠, 等. 左炔诺孕酮宫内缓释系统治疗子宫腺肌病疗效观察. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23: 192-194.
- [3] 盛洁, 卢丹, 张建, 等. 左炔诺孕酮宫内缓释系统治疗子宫腺肌病痛经的临床观察. 中华妇产科杂志, 2006, 41: 467-470.
- [4] Braghetto AM, Caserta N, Bahamondes L, et al. Effectiveness of the levonorgestrel-releasing intrauterine system in the treatment of adenomyosis diagnosed and monitored by magnetic resonance imaging. Contraception, 2007, 76: 195-199.
- [5] Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, et al. Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH

analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. Hum Reprod, 2005, 20: 1993-1998.

- [6] Cho S, Nam A, Kim H, et al. Clinical effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine device in patients with adenomyosis. Am J Obstet Gynecol, 2008, 198: 373. 1-7.
- [7] 张琴芳, 张英, 王会凤, 等. 左炔诺孕酮宫内缓释系统对女性生殖激素水平的影响. 中华妇产科杂志, 2006, 41: 774-775.
- [8] 李莉, 叶明, 康佳丽. 左炔诺孕酮宫内缓释系统治疗子宫腺肌病及其对卵巢功能的影响. 中华优生与遗传杂志, 2007, 15: 83-84.
- [9] Vercellini P, Viganò P, Somigliana E. The role of the levonorgestrel-releasing intrauterine device in the management of symptomatic endometriosis. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005, 17: 359-365.
- [10] Lockhat FB, Emembolu JE, Konje JC. Serum and peritoneal fluid levels of levonorgestrel in women with endometriosis who were treated with an intrauterine contraceptive device containing levonorgestrel. Fertil Steril, 2005, 83: 398-404.

(收稿日期: 2009-02-24)

(本文编辑: 潘伟)

年轻妇女子宫颈癌组织人乳头状瘤病毒 16 E6 基因变异与序列分析

胡燕 朱燕英 章圣辉 朱华 帅茨霞

近年来,国内外报道年轻妇女宫颈癌的发病率有上升趋势^[1-2],已经引起了妇科肿瘤学界的关注,而高危型人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)亚型的持续感染是宫颈癌发生的主要原因,临床上以 HPV16 感染率最高^[3,4]。HPV16 E6 基因组是位于 HPV16 全基因组早期基因区的第 6 个开放读码结构,在细胞癌变中起重要作用,是导致细胞转化和恶性表型维持所必需的主要转化基因。目前,已报道 HPV16 E6 有多种型内变异体,且其分布具有明显的地域性,某些变异体与宫颈癌发病相关^[5,9]。为了解温州地区年轻妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6 基因的结构特点及序列变异情况,本研究对来自温州地区的年轻妇女宫颈癌组织 HPV16 E6 基因进行序列分析,并与非年轻妇女宫颈癌组织进行比较,以期研究我国年轻妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6 基因结构特点积累流行病学资料,并为我国 HPV 预防及治疗性疫苗的研究提供理论基础。

一、资料与方法

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2009.09.017

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y204080)

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院妇产科(胡燕、朱华、帅茨霞), 实验诊断中心(朱燕英), 医科所(章圣辉)

通信作者: 胡燕, Email: hywjz123@sina.com

1. 研究对象: 收集 2005 年 6 月至 2008 年 6 月在温州医学院附属第一医院诊治的宫颈鳞状上皮性癌(鳞癌)患者共 98 例,根据诊断时的年龄进行分组,其中年龄 ≤ 35 岁为年轻组,共 37 例,年龄 > 35 岁为非年轻组,共 61 例。所有患者均出生于温州地区,无长期外地生活及居住史。年轻组患者平均年龄为 (32 ± 3) 岁,其中年龄最小者仅 23 岁,未婚已有性生活史 4 年,曾人工流产 1 次。初次性生活年龄平均 (19.1 ± 1.4) 岁,孕次 1~3 次。根据国际妇产科联盟(FIGO, 2000 年)的临床分期标准分为 I b 期 15 例, II a 期 20 例, II b 期 2 例,无 III 期及 IV 期患者;非年轻组患者平均年龄 (50 ± 8) 岁,初次性生活年龄平均 (19.6 ± 1.7) 岁,孕次 1~8 次,临床分期 I b 期 13 例, II a 期 38 例, II b 期 8 例, III 期 2 例,无 IV 期患者。所有宫颈癌患者均经宫颈活检组织病理学证实为浸润性宫颈鳞癌。

2. 方法: (1) 标本采集: 所有宫颈鳞癌患者取材前均未曾行放疗或化疗,征求患者同意后于妇科检查时,以宫颈钳钳取宫颈组织。宫颈组织标本取下后立即置 -80°C 冰箱保存。(2) 组织标本 DNA 提取: 每份标本各称取 20 mg,应用德国 Qiagen 公司生产的 DNA 抽提试剂盒(DNeasy tissue kit)提取 DNA,然后加 100 μl 三羟甲基氨基甲烷-乙二醇四乙酸缓冲液(AE)溶解,经紫外分光光度计检测吸光度(A)值。

DNA 总量约为 5~20 μg , 浓度约为 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, DNA 纯度: $A_{260}/A_{280}=1.7\sim1.9$ 。(3)引物设计:HPV16 E6 引物设计参照文献[10], HPV16 E6 上下游引物序列分别为 5'-GACATTTTATGCACCAAAAG-3' 和 5'-GTATCTCCATGCATGATTAC-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。(4)PCR 反应:采用 50 μl 的 PCR 反应体系, 其中各成分含量为:宫颈鳞癌组织 DNA 1 μl , 2 $\times$ PCR 标准混合物 25 μl (立陶宛 Fermentas 公司生产), 上下游引物各 1 μl (引物浓度均为 50 $\mu\text{mol/L}$), 水 22 μl 。PCR 反应条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 30 个循环; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。应用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物的质量。以 2 ng 的 HPV16 (德国标准株) 质粒为阳性对照, 已知无 HPV16 感染的正常宫颈组织为阴性对照, 以在 520 bp 处出现 DNA 条带者为扩增出的 HPV16 E6 基因序列。(5)HPV16 E6 DNA 序列测定:HPV16 E6 DNA 扩增阳性的 PCR 产物进行胶纯化后, 送至上海联众基因科技研究院, 采用荧光标记桑格 (Sanger) 双脱氧链终止法双向测序。(6)HPV16 E6 DNA 序列分析:采用 BLAST 软件比较基因库中的 HPV16 碱基序列与测得的基因序列和蛋白序列。变异型命名参照文献[11]。

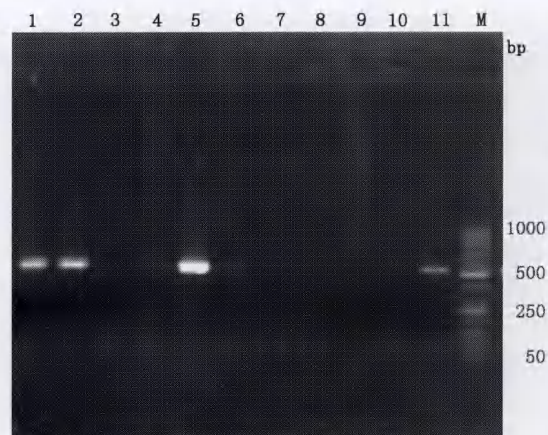
3. 统计学方法:采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理, 两组标本 HPV16 E6 DNA 阳性率的比较及 HPV16 E6 亚洲型变异出现率的比较采用 χ^2 分析。

二、结果

1. 宫颈鳞癌组织中 HPV16 E6 DNA 的扩增结果:以宫颈鳞癌组织 DNA 为模板, 用 HPV16 E6 特异性引物进行 DNA 扩增, 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上约 520 bp 处见清晰的扩增带, 分别与德国标准株 HPV16 E6 扩增产物处于同一水平。见图 1。

2. 两组患者 HPV16 E6 阳性率:98 例宫颈鳞癌患者中, 共检出 HPV16 E6 阳性 36 例, 总阳性率为 37% (36/98)。其中, 年轻组 HPV16 E6 阳性者 19 例, 占 51% (19/37), 非年轻组 17 例阳性, 占 28% (17/61), 两组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.465, P<0.05$)。

3. 两组宫颈鳞癌组织 HPV16 E6 DNA 序列测定结果:用 BLAST 软件将测出的碱基序列与基因库中的 HPV16 碱基序列进行比对, 符合率均达 98% 以上。36 例 HPV16 E6 DNA 阳性患者中发现 5 例为野生型, 年轻组 4 例, 非年轻组 1 例。其余 31 例 HPV16 E6 DNA 序列比对结果均存在点突变, 除 1 例为第 241 位 T $\rightarrow$ G, 属同义突变外, 另 30 例均为错



M:DNA 标志物 1,2,5:阳性条带 3,4,6~9:阴性

条带 10:阴性对照 11:阳性对照

图1 HPV16 E6 DNA 扩增电泳图

义突变, 每组宫颈鳞癌患者各为 15 例。在 30 例错义突变中, 最常见的碱基突变是第 178 位 T $\rightarrow$ G (图 2A), 属亚洲型, 占 77% (23/30), 所引起的氨基酸突变为 D25E [第 25 位天冬氨酸 (Asp) 突变为谷氨酸 (Gly)], 年轻组 15 例 [其中 3 例同时伴碱基第 393 位 G $\rightarrow$ T, 相应氨基酸突变为 C97F, 即第 97 位半胱氨酸 (Cys) 突变为苯丙氨酸 (Phe)], 非年轻组 8 例, 均为单一碱基第 178 位突变; 第 350 位 T $\rightarrow$ G (图 2B), 属欧洲型, 所引起的氨基酸突变为 L83V [第 83 位亮氨酸 (Leu) 突变为缬氨酸 (Val)], 占 10% (3/30), 也仅出现于非年轻组宫颈癌患者中, 其中 1 例同时伴碱基第 168 位 C $\rightarrow$ G, 相应氨基酸突变为 T22S, 即第 22 位苏氨酸 (Thr) 突变为丝氨酸 (Ser), 而非年轻组宫颈癌患者中未发现有欧洲型变异。第 335 位 C $\rightarrow$ T 合并第 442 位 A $\rightarrow$ C (图 2C), 属非洲 I 型, 占 13% (4/30), 所引起的氨基酸突变为 H78Y/E113D [第 78 位组氨酸 (His) 突变为酪氨酸 (Tyr)/第 113 位谷氨酸 (Gly) 突变为 Asp], 仅出现于非年轻组患者中。

4. 两组宫颈鳞癌组织 HPV16 E6 亚洲型变异出现率的比较:在检测到 HPV16 E6 的各种变异体中, 最常见的碱基突变为亚洲型突变。年轻组宫颈鳞癌患者的出现率为 41% (15/37), 非年轻组患者的出现率为 13% (8/61), 两组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=9.645, P<0.05$)。

三、讨论

1. HPV16 E6 阳性与宫颈鳞癌年轻化趋势的相关性:宫颈癌是女性生殖道发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 通常以

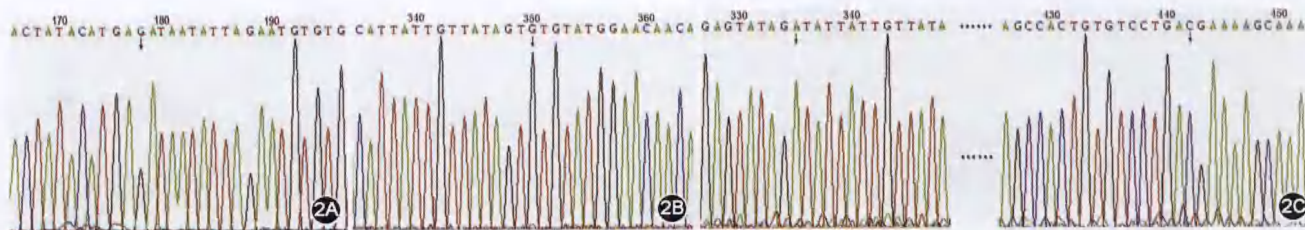


图2 HPV16 E6 DNA 变异型测序峰图 2A:第 178 位 T $\rightarrow$ G 2B:碱基第 350 位 T $\rightarrow$ G 2C:碱基第 335 位 C $\rightarrow$ T, 合并碱基第 442 位 A $\rightarrow$ C

参 考 文 献

年龄 35 岁为界划分,年轻与年长宫颈癌患者比较,其宫颈癌具有恶性程度高、非鳞癌比例增高、容易早期转移、预后差、5 年生存率低的特点^[12-13],已引起妇科肿瘤学界的重视。在对宫颈癌发病年轻化趋势的研究中发现,高危型 HPV16 感染与宫颈鳞癌年轻化有关^[14-15]。本组 HPV16 E6 总阳性率为 37%,且年轻组阳性率明显高于非年轻组。

2. HPV16 E6 变异型与宫颈癌发病地域的相关性:近年来,国内外相继报道,HPV16 E6 突变增强了 HPV16 致癌的危险性,同时其各种变异型的致癌危险性具有地域性,即同一 HPV16 E6 变异型在不同地区的致癌危险性存在明显差异^[7-9]。已报道的变异型^[11]有:欧洲型、亚洲型、亚美洲型、非洲 I 型、非洲 II 型、北美型。2004 年 de Boer 等^[16]在印度尼西亚发现了爪哇型(Java)。HPV16 E6 的各种基因变异株具有不同的生物与生化特性,可通过不同机制逃避机体体液和细胞免疫的攻击,这给针对 E6 蛋白的宫颈癌疫苗的研究带来了困难。因此,对 HPV 高危亚型进行分型研究,对了解病情、判断预后及指导治疗有重要价值。目前,我国对各地区 HPV16 型内变异的流行病学资料较为欠缺。马正海等^[17]报道的我国新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6 的碱基变异热点为 nt350 位,为欧洲型变异,而刘国炳等^[18]及 Wu 等^[5]报道的来自广州及南昌地区妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6 的碱基变异热点为 nt178 位,为亚洲型变异,本研究对来自温州地区的宫颈鳞癌 HPV16 E6 阳性者的基因序列分析结果发现,最常见的变异位点为 nt178 位,提示温州地区妇女宫颈癌组织中最常见的 HPV16 E6 碱基突变也为亚洲型突变。目前,虽然国内其他地区的宫颈癌患者 HPV16 E6 碱基变异尚缺乏资料,但亚洲型变异在以上南方城市妇女宫颈癌患者中的多见及与其他国家和我国新疆维吾尔自治区报道结果的不同,值得关注。

3. HPV16 E6 特异性变异与年轻宫颈癌发病的相关性:Radhakrishna Pillai 等^[7]及 Berumen 等^[9]发现,HPV16 E6 亚美洲型变异在印度及墨西哥年轻妇女宫颈癌组织中多见,提示在这两个地区此类型 HPV16 E6 变异的致癌性更强,较其他类型变异体更容易导致年轻妇女宫颈癌的发生。本研究结果显示,HPV16 E6 的亚洲型变异在年轻患者中的出现率明显高于非年轻患者,并且在非年轻患者中发现的其他 HPV16 E6 变异类型,如非洲 I 型及欧洲型在年轻患者中均未发现,提示,在本地区亚洲型变异致癌性更强,较其他类型变异体更容易导致年轻妇女宫颈癌的发生。本研究结果可为研究我国年轻妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6 基因结构特点积累流行病学资料,对阐明年轻妇女宫颈癌发病率升高的原因有一定意义。但尚需进一步扩大样本并进行纵向的研究,以评估 HPV16 E6 特异性变异体在年轻妇女宫颈癌发病中的作用。

- [1] 吴云燕,梁美蓉,李隆玉,等. 1990—2007 年 4223 例子宫颈癌住院患者的调查分析. 中华妇产科杂志,2008,43:433-436.
- [2] Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, et al. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976—2000. *Cancer*, 2004,100:1035-1044.
- [3] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*, 2007,121:621-632.
- [4] Wu Y, Chen Y, Li L, et al. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *J Clin Virol*, 2006, 35:264-269.
- [5] Wu Y, Chen Y, Li L, et al. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol*,2006,87:1181-1188.
- [6] de Araujo Souza PS, Maciag PC, Ribeiro KB, et al. Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer. *BMC Cancer*, 2008,8:246-254.
- [7] Radhakrishna Pillai M, Sreevidya S, Pollock BH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2002,87:268-273.
- [8] Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, et al. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol*, 2004,74:117-126.
- [9] Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*,2001,93:1325-1330.
- [10] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett*, 2000,156:159-165.
- [11] Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*, 1997,71:2463-2472.
- [12] 刘兰芳,孙海燕. 831 例 35 岁以下妇女宫颈癌的临床病理特点和预后. 中国癌症杂志,2008,18:298-301.
- [13] 朱华,帅茨霞. 年轻妇女宫颈癌 134 例初步分析. 临床肿瘤学杂志,2004,9:383-385.
- [14] 高天杨,王秋艳,齐爽. 宫颈癌患者年轻化与人乳头瘤病毒感染增加的关系. 黑龙江医学,2008,32:170-172.
- [15] 黄永刚,帅茨霞,胡燕,等. 年轻宫颈癌患者癌组织 HPV16 检测结果分析. 山东医药,2006,46:25-26.
- [16] de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, et al. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol*, 2004,94:488-494.
- [17] 马正海,张富春,梅新娣,等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 E6 基因突变分析. 癌症,2004,23:1016-1020.
- [18] 刘国炳,刘欣,庞战军,等. 宫颈癌组织中 HPV16E6 序列多态性及同源性分析. 肿瘤防治杂志,2005,12:985-988.

(收稿日期:2008-12-29)

(本文编辑:潘伟)