

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00838

## 宫颈脱落细胞中 hTERC 基因表达与宫颈病变及 HPV 感染的关系

何君梅<sup>1</sup>, 尹格平<sup>2\*</sup>, 卢金峰<sup>2</sup>, 李 红<sup>1</sup>

1. 云南省曲靖市第一人民医院妇产科, 曲靖 655000
2. 济南军区总医院, 济南 250031

**[摘要]** **目的** 探讨宫颈脱落细胞中人类染色体端粒酶 mRNA 基因(hTERC)扩增与宫颈病变程度及不同亚型人乳头瘤病毒(HPV)感染的关系。**方法** 宫颈上皮内瘤样变(CIN)患者 34 例,其中 CIN I 8 例,CIN II 9 例,CIN III(包括宫颈原位鳞癌)17 例;浸润型宫颈鳞癌(ISC) 36 例;慢性宫颈炎患者 20 例。对上述患者液基薄层细胞学检测(TCT)剩余样本应用荧光原位杂交技术(FISH)检测 hTERC 基因,快速导流杂交基因芯片技术检测 HPV 感染亚型,分析 hTERC 扩增与宫颈病变程度、HPV 感染的关系。**结果** 慢性宫颈炎、CIN I、CIN II、CIN III、ISC 中 hTERC 扩增率分别为 0.00%(0/20)、50.00%(4/8)、77.78%(7/9)、82.35%(14/17)和 97.22%(35/36),随着宫颈病变程度的增加,hTERC 扩增率增高,组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );慢性宫颈炎、CIN I、CIN II、CIN III、ISC 中 HPV 感染率分别为 10.00%(2/20)、37.50%(3/8)、66.67%(6/9)、88.24%(15/17)、91.67%(33/36);HPV16 型阳性、其他高危型阳性、阴性/低危型阳性组中 hTERC 扩增率分别为 90.38%(47/52)、66.67%(4/6)、28.13%(9/32),组间比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** hTERC 扩增与宫颈病变的进展和 HPV 感染密切相关;HPV16 型感染可能是导致高级别宫颈病变的主要原因,HPV58、33、52 型在 CIN 及 ISC 病变中也有一定优势作用。

**[关键词]** hTERC 基因;人乳头瘤病毒;宫颈上皮内瘤样变;宫颈肿瘤

**[中图分类号]** R 737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0838-04

### Relationship of human telomerase mRNA component gene expression in cervical exfoliated cells with cervical lesions and human papilloma virus infection

HE Jun-mei<sup>1</sup>, YIN Ge-ping<sup>2\*</sup>, LU Jin-feng<sup>2</sup>, LI Hong<sup>1</sup>

1. Department of Obstetrics and Gynecology, First People's Hospital of Qujing, Qujing 655000, Yunnan, China
2. General Hospital, PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250031, Shandong, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the relationship of human telomerase mRNA component gene (hTERC) expression with the degree of cervical lesions and the infection of different genotypes of human papilloma virus(HPV). **Methods** The thinprep cytologic test (TCT) specimens from 34 pathologically confirmed cervical intraepithelial neoplasia(CIN, including 8 CIN I, 9 CIN II, 17 CIN III), 36 invasive squamous cervical carcinoma (ISC), and 20 chronic cervicitis patients were included in the present study. HPV subtype infection was detected by channelization hybridization gene chip and hTERC expression was tested by fluorescence *in situ* hybridization(FISH). The relationship between hTERC expression, the degree of cervical lesions and the infection with HPV was analyzed. **Results** The positive rates of hTERC in chronic cervicitis, CIN I, CIN II, CIN III, and ISC specimens were 0.00%(0/20), 50.00%(4/8), 77.78%(7/9), 82.35%(14/17), and 97.22%(35/36), respectively. The positive rates of hTERC increased with the increase of cervical lesion degree, and there were significant differences between the three subgroups( $P < 0.05$ ). The HPV infection rates were 10.00%(2/20), 37.50%(3/8), 66.67%(6/9), 88.24%(15/17), and 91.67%(33/36), respectively. The positive rates of hTERC in HPV16 type-positive, other high-risk type positive and negative/low-risk type positive groups were 90.38%(47/52), 66.67%(4/6), and 28.13%(9/32), respectively, with significant difference found between each two groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The progress of cervical lesions and HPV infection are closely related to the positive rates of hTERC. HPV16 infection is the main cause for the high-level cervical lesions, and HPV58, 33, 52 have some advantages in CIN or ISC.

**[收稿日期]** 2009-10-30 **[接受日期]** 2010-02-11

**[基金项目]** 国家卫生部科研基金(WKJ2007-3-001). Supported by Science Research Foundation of the Ministry of Health of China (WKJ2007-3-001).

**[作者简介]** 何君梅,硕士生. E-mail: hejunmei120@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0531-86878278, E-mail: ygpwyl@163169.net

[Key words] hTERT gene; human papilloma virus; cervical intraepithelial neoplasia; uterine cervical neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8): 838-841]

高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染与宫颈上皮内瘤样变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)及宫颈癌的发生有密切关系,但是 HPV 感染不是细胞恶性转化的唯一致病因素,还需要其他致病因素的存在,才能最终发展为宫颈癌。研究发现宫颈上皮细胞由非典型性异常向宫颈癌转变过程中几乎都伴有染色体端粒酶 mRNA 基因(human telomerase mRNA component gene, hTERT)表达异常<sup>[1]</sup>。荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是目前 hTERT 基因检测的标准方法。

本研究采用 FISH 方法检测宫颈脱落细胞中 hTERT 基因的表达情况,并用导流杂交基因芯片技术检测宫颈脱落细胞中 HPV 感染亚型,分析不同的 HPV 亚型感染与 hTERT 基因扩增之间的关系,以及 hTERT 基因扩增与宫颈病变进展之间的关系,为 CIN 及宫颈癌的临床辅助诊断提供新的分子生物学证据。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 选择 2008 年 4 月至 2009 年 2 月就诊于济南军区总医院妇科的 90 例患者,患者年龄 20~75 岁,平均(44.9±12.6)岁,均为已婚或有性生活史妇女。所有患者均非孕期,无自身免疫性疾病、肝肾慢性疾病及其他慢性疾病,取材前 3 d 内无性生活、阴道冲洗及用药史等。其中慢性宫颈炎 20 例; CIN 34 例,包括 CIN I 8 例、CIN II 9 例、CIN III(包括宫颈原位鳞癌)17 例;浸润型宫颈鳞癌(ISC) 36 例。均经阴道镜下取活检送病理学检查证实。

1.2 标本采集 患者取膀胱截石位,窥阴器扩开阴道,若见宫颈分泌物多,使用无菌盐水棉球擦拭,然后将细胞采样器的无菌毛刷插入颈管内,将该毛刷均匀散布于子宫颈移行带上,顺时针转动 8~10 圈,将刷头分开并推入保存液中,扭紧瓶盖(取样时尽量避免出血)。标本经液基薄层细胞学(thinprep cytologic test, TCT)制片后留取剩余液基,用于 hTERT 基因及 HPV 检测,如当日不能进行 FISH 检测,可 4℃ 保存,但须在 2 周内完成检测。

### 1.3 FISH 方法检测 hTERT 基因扩增

1.3.1 制片及预处理 用 TCT 制片后剩余的新鲜

液基细胞标本 2 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min,去上清。加入 4 ml 胶原酶 II 工作液,37℃ 水浴 30 min。1 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min,去上清。加入 5 ml 37℃ 去离子水,混匀,37℃ 水浴 20~40 min。加入 2 ml 固定液(甲醇:冰乙酸=3:1),混匀,1 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min,去上清。加入 5 ml 固定液后室温放置 10 min×2 次。1 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min,去上清至原体积的 1/5~1/10。吹打,滴片,56℃ 2 h 或室温过夜。将玻片置于 2×SSC(5 min, pH 7.0±0.2)×2 次,0.1 mol/L 盐酸 10 min,37℃ 0.01 mol/L 盐酸/胃酶 8 min,2×SSC(5 min)×2 次,70%、85%、100%乙醇溶液梯度脱水各 3 min,自然干燥,56℃ 烤片 1~3 min。

1.3.2 基因变性与杂交 避光环境下 73℃ 70% 甲酰胺/2×SSC 变性液 5 min, -20℃ 70%、85%、100%乙醇溶液梯度脱水各 3 min,取出自然干燥。将配好的探针混合液[7 μl 杂交缓冲液+1 μl 去离子水+2 μl hTERT/CSP3 DNA 探针(由北京金菩嘉医疗科技有限公司提供)]73℃ 水浴中变性 5 min,取出迅速移置 46℃ 水浴中;玻片置 45~50℃ 烤片机上预热 3 min,将变性后的探针混合物 10 μl 加在玻片杂交区,加盖玻片,封片胶封片,置于湿盒中 42℃ 孵箱中过夜杂交。

1.3.3 玻片洗涤与观察 将玻片置于 46℃ 甲酰胺洗涤液(10 min)×3 次,第 1 瓶中晃去盖玻片;于 46℃ 2×SSC 10 min,46℃ 2×SSC/0.1% NP-40 溶液 5 min,取出玻片暗处自然干燥。将 12 μl DAPI 复染剂滴加杂交区,加盖玻片,暗处复染 20 min 后荧光显微镜下观察细胞核中红绿荧光信号。

1.3.4 FISH 信号判断 细胞核中红色荧光信号为 3q26.3 位点(目标信号),绿色荧光信号为 3 号染色体着丝粒(参照信号)。20 例慢性宫颈炎患者均随机计数 100 个细胞,按“异常细胞百分比均数+3×标准差”计算出 hTERT 基因异常扩增的阈值为 6%,异常细胞百分比大于 6% 即为 hTERT 基因扩增。正常细胞的单个细胞核中红色信号一般为 2 个,异常细胞的单个细胞核内红色信号≥3 个,红色信号越多表示 hTERT 基因扩增的程度越高。计数时只能选择细胞核内绿色信号不少于 2 个的细胞

计数。

1.4 导流杂交基因芯片技术检测 HPV 亚型 用 DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司产品)、DNA 导流杂交配套试剂盒(凯普生物科技有限公司)对 TCT 制片后剩余液经 DNA 提取、PCR 杂交、导流杂交基因分型、显色程序,根据 HPV 基因型分布图对每一张基因芯片上相应的 HPV 型别进行判断。本方法可同时检测每一样品的 21 种 HPV 基因型,包括 5 种低危亚型(6、11、42、43、44),13 种高危亚型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)和 3 种中国人常见亚型(66、53、CP8304)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 hTERC 在不同级别宫颈病变中的表达 慢性宫颈炎、CIN I、CIN II、CIN III 和 ISCC 中 hTERC 扩增率分别为 0.00%(0/20)、50.00%(4/8)、

77.78%(7/9)、82.35%(14/17)和 97.22%(35/36),hTERC 异常细胞百分比(%)分别为  $2.40 \pm 1.19$ 、 $10.75 \pm 7.44$ 、 $15.33 \pm 9.81$ 、 $18.76 \pm 12.96$ 、 $38.00 \pm 23.35$ 。随着宫颈病变程度的增加,hTERC 扩增率及 hTERC 异常细胞的比例增高,组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.2 HPV 感染情况与宫颈病变程度的关系 慢性宫颈炎、CIN I、CIN II、CIN III 和 ISCC 中 HPV 感染率分别为 10.00%(2/20)、37.50%(3/8)、66.67%(6/9)、88.24%(15/17)、91.67%(33/36),即随着宫颈病变程度的增加,HPV 感染率增高( $P < 0.05$ )。对照组(慢性宫颈炎组)中 2 例 HPV 阳性(16 型、39 型),其余 HPV 均为阴性。实验组中 13 例 HPV 为阴性,3 例 58 型阳性,1 例 6 型阳性,1 例 52 型阳性,1 例 33 型阳性,3 例为 2 种 HPV 亚型混合感染(16 型与 33 型;16 型与 18 型;16 型与 11 型),其余均为 16 型阳性。表 1 结果显示随着宫颈病变程度的增加,HPV 16 型阳性率也增加( $P < 0.01$ )。

表 1 HPV 感染与宫颈病变程度的关系

Tab 1 Relationship between infection of HPV and degrees of cervical lesion

[n(%)]

Infection of HPV	Chronic cervicitis (N=20)	CIN I (N=8)	CIN II (N=9)	CIN III (N=17)	ISCC (N=36)
HPV 16	1(5.00)	2(25.00)	5(55.56)	13(76.47)	31(86.11)
Other HPV genotypes	1(5.00)	1(12.50)	1(11.11)	2(11.76)	2(5.56)
Total	2(10.00)	3(37.50)	6(66.67)	15(88.24)	33(91.67)

HPV 16-based group including HPV 16 and HPV 16 infection mixed with other HPV genotypes. HPV: Human papilloma virus; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; ISCC: Invasive squamous cervical carcinoma

2.3 HPV 感染与 hTERC 表达的关系 HPV 16 型阳性、其他高危型阳性、阴性/低危型阳性组中 hTERC 扩增率分别为 90.38%(47/52)、66.67%(4/6)、28.13%(9/32),HPV 16 型感染组 hTERC 扩增率较其他高危型 HPV 感染组 hTERC 扩增率高( $P < 0.01$ ),阴性/低危型 HPV 感染组 hTERC 扩增率明显低于高危型 HPV 感染组( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

人类染色体端粒酶由端粒酶 mRNA(hTERC)、端粒酶反转录酶(hTERT)和端粒酶结合蛋白(hTP1)三部分组成,人端粒酶 RNA 序列含有 450 个碱基对,其中有一段长 11 个核苷酸区域,发生在该模板区域的 hTERC 突变将导致端粒酶功能改变,出现染色体异常,从而导致细胞逃避凋亡,形成

肿瘤。Heselmeyer-Haddad 等<sup>[2]</sup>应用 FISH 技术检测宫颈涂片 hTERC 基因,发现低级别鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)中 hTERC 基因阳性率为 7.14%,高级别鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)占 76%,认为检测 hTERC 基因可视作预测 HSIL 的指标;随访 1~3 年后,发现所有进展者都伴有 hTERC 扩增,而自愈者无一例有 hTERC 扩增。目前有观点认为 hTERC 扩增主要与 LSIL 到 HSIL 进程有关<sup>[3]</sup>。本研究发现慢性宫颈炎、CIN I、CIN II、CIN III、ISCC 中 hTERC 扩增率分别 0.00%(0/20)、50.00%(4/8)、77.78%(7/9)、82.35%(14/17)和 97.22%(35/36),说明随着宫颈病变程度的增加,hTERC 扩增率增高,与以往文献报道<sup>[4-5]</sup>一致,进一步证明了 hTERC 扩增与

宫颈病变的进展有密切关系。

目前已发现和鉴定了 200 多种 HPV 亚型,其中 30 余种可以感染生殖道皮肤或黏膜。不同亚型的 HPV 感染可导致不同的临床病变,根据其致病性的不同,将 HPV 亚型分为高危亚型和低危亚型<sup>[6]</sup>。国外有学者报道不同级别的宫颈病变中常见的感染型别存在一定差异,但 HPV 16、18、33、58 型在 CIN I 以上病变组均有一定优势,提示上述型别具有较高致癌性<sup>[7]</sup>。本研究显示不同程度宫颈病变中 HPV 基因型存在差异,从慢性宫颈炎组至 ISCC 组 HPV 感染率呈增高趋势,且 HPV 16 型感染率也呈增高趋势,ISCC 组中 HPV 16 型感染率达 86.11%(31/36),高级别宫颈病变和宫颈癌组中有 HPV 58、33、52 型感染者或 HPV 16 型与其他亚型混合感染者,提示 HPV 16 型感染是导致高级别宫颈病变的主要原因,HPV 58、33、52 型在导致 CIN 及以上病变过程中也有一定优势,这与国外研究结果相似。

虽有大量文献报道 HPV 感染是宫颈癌的主要致病因素,甚至 95% 的癌前病变患者携带 HPV 癌基因,但只有少数病例最终发展到 ISCC,因此 HPV 感染不是细胞恶性转化唯一的致病因素。Hopman 等<sup>[8]</sup>研究了宫颈病变中 hTERC 表达及 HPV 整合情况的关系,结果显示:随病变进展 hTERC 拷贝数逐渐增加,而 hTERC 扩增标本中,HPV 也大部分被整合,从而认为宫颈 HPV 感染与 hTERC 扩增有关,高危型 HPV 的基因整合和 hTERC 扩增可能是宫颈由非典型细胞向浸润癌发展的重要原因。本研究中 HPV 16 型阳性中 hTERC 扩增率达 90.38%(47/52),而阴性/低危型 HPV 感染组为 28.13%(9/32),更进一步证明了 HPV 感染与 hTERC 扩增有关,特别是 HPV16 型等高危型 HPV 感染更容易导致 hTERC 扩增。因此,HPV 感染与 hTERC 扩增有密切关系,在 HPV 阳性患者中进行 hTERC 检测,可能提高宫颈癌及 CIN 筛查的特异度和阳性预测值,但这尚需大样本量的病例对照研究加以证实。

总之,hTERC 在宫颈病变的早期表达,有望成为宫颈病变中早期诊断的新的基因靶点。对高危型 HPV 感染患者进行 hTERC 基因检测可能会提高宫颈癌及 CIN 筛查的特异度和阳性预测值。但是目前关于 HPV 感染与 hTERC 扩增导致宫颈病变进展的机制尚未研究清楚。随着研究的深入,HPV 与 hTERC 将为宫颈病变的基因诊断提供重要的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Heselmeyer-Haddad K, Janz V, Castle P E, Chaudhri N, White N, Wilber K, 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, 163:1405-1416.
- [2] Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White N M, Chaudhri N, Morrison L E, Palanisamy N, 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.
- [3] Costa C, Espinet B, Molina M A, Salgado R, Salido M, Baró T, et al. Analysis of gene status in cervical dysplastic lesions and squamous cell carcinoma using tissue microarrays[J]. *Histol Histopathol*, 2009, 24: 821-829.
- [4] 彭玉池, 凌 斌, 周 颖. 宫颈病变脱落细胞中端粒酶的表达及临床意义[J]. *实用癌症杂志*, 2008, 23: 574-576.
- [5] 余 兰, 王树玉, 贾婵维, 周明书, 魏丽惠. hTERC 基因异常扩增在宫颈病变的临床意义[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2009, 17: 28-29.
- [6] Castellsagué X, Bosch F X, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis[J]. *Virus Res*, 2002, 89: 191-199.
- [7] Hwang T S, Jeong J K, Park M, Han H S, Choi H K, Park T S. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray[J]. *Gynecol Pncol*, 2003, 90: 51-56.
- [8] Hopman A H, Theelen W, Hommelberg P P, Kamps M A, Herrington C S, Morrison L E, 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: 412-419.

[本文编辑] 商素芳, 孙 岩