

HPV 和 HCMV 在慢性宫颈炎病人中的分布及相关性研究¹

孙洵 孟祥金 崔正言 孙玉玲²
李文 朱长义² 邓文²

(山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250001)

提 要

本文采用DNA-DNA分子杂交技术对病理组织学确诊的87例慢性宫颈炎患者和25例健康宫颈的宫颈活检组织DNA进行了HPV 6、11、16、18型DNA及HCMV Hind III E片段检测。结果表明,对照宫颈检出率全部为0,慢性宫颈炎检出率HPV 6为16%, HPV 11为12.6%, HPV 16为11.5%, HPV 18为5%,总的HPV DNA相关序列为29.0%, HCMV为12.64%。经显著性检验, HPV DNA相关序列检出率在慢性宫颈炎与对照组间具显著性差异, HPV DNA相关序列阳性者患慢性宫颈炎的危险性为HPV DNA相关序列阴性者20.81的倍。本实验结果还表明HCMV阳性患者中72.7%的病人同时有HPV感染,提示HCMV感染与HPV感染有关。

关键词: 慢性宫颈炎 人乳头瘤病毒(HPV) 人巨细胞病毒(HCMV)
分子杂交

宫颈癌的病毒病因研究已表明HPV和HCMV与宫颈癌的发生有关^[1,2]。而在宫颈癌的发生、发展中,宫颈炎是危险因素之一,由于宫颈炎在人群中患病率很高,而宫颈癌的发病率较宫颈炎低得多。为了探讨慢性宫颈炎病人中HPV和HCMV分布状况,我们对慢性宫颈炎患者和健康宫颈活检组织中HPV 6, 11, 16, 18型DNA和HCMV同源序列进行了检测,现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、标本采集 标本取自临床诊断为宫颈糜烂病人及健康宫颈(子宫肌瘤全切术后)的宫颈活检组织,分为2份,1份10%福尔马林固定,常规组织学切片,经病理诊断选择87例慢性宫颈炎标本和25例健康宫颈标本。另1份-20℃冰冻保存,提取组织DNA,进行斑点杂交。

本文于1990年7月13日收到,1991年1月2日修回

注 1. 国家自然科学基金资助项目
2. 泰山医学院 邮政编码, 250001

二、组织 DNA 提取 用 2ml 玻璃匀浆器将活检组织磨成匀浆, 蛋白酶K及 10% SDS 处理适当时间后, 酚及氯仿异戊醇(24:1)抽提 3 次, 冷乙醇沉淀 DNA, 751 型紫外分光光度计波长 260nm 测定含量。

三、探针标记 pHPV6, 11, 16, 18 型 DNA 探针由湖北医学院病毒所孙瑜教授提供, pHCMV DNA Hind III E 片段探针由湖北妇幼保健院黄树林先生提供, 通过缺口平移试剂盒(北京福瑞生物工程公司)在体外用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ 进行标记, 探针比活 pHPV6 为 $0.77 \times 10^7 \text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 、pHPV 11 为 $1.1 \times 10^7 \text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 、pHPV16 为 $1.5 \times 10^7 \text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 、pHPV18 为 $5.3 \times 10^8 \text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 、pHCMV 为 $1.6 \times 10^7 \text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 。

四、斑点杂交 将宫颈活检组织 DNA 按每点 2.5 μg 的量点在预处理过的硝基纤维素膜上, 同时以不同浓度的已知 HPV6, 11, 16, 18 型 DNA 和 HCMV DNA 作为系列阳性对照, 鲑精 DNA (SSDNA) 作为阴性对照, 滤膜变性中和后, 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 2 小时, 与 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ 标记的 4 个型别的 pHPV DNA 探针和 pHCMV Hind III E 片段 DNA 探针分别进行斑点杂交, 杂交温度 68 $^{\circ}\text{C}$ 、-70 $^{\circ}\text{C}$ 自显影 1~4 天。

结 果

一、HPV DNA 相关序列分子杂交结果 (表 1, 图版 II 1, 2)

表 1 宫颈活检组织 DNA 与 pHPV DNA 相关序列斑点杂交结果
Table 1. Results of hybridization of DNA from cervicitis and normal cervixes with HPV6, 11, 16, 18 DNA probe

诊 断 Diagnosis	试 验 数 Tested No.	阳 性 数 Positive No.				Total
		(阳 性 率 %) (Positive rate %)				
		HPV 6	HPV 11	HPV 16	HPV 18	
Chronic cervicitis	87	14(16.1)	11(12.8)	10(11.5)	5(5.7)	25(28.0)
Normal cervixes	25	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
χ^2		3.24	2.22	1.96	6.45	7.67

由表 1 可见, 慢性宫颈炎组织 DNA HPV6、11、16、18 型同源序列检测, 阳性率分别为 16%, 12.8%, 11.5%, 5.7%, 而对照宫颈全部为阴性, 经显著性检验, 只有 HPV6 接近显著性水平。对总的 HPV DNA 相关序列与对照宫颈进行比较, 具有非常显著性差异 ($\chi^2 = 7.67$, $P < 0.01$), HPV DNA 相关序列阳性者患慢性宫颈炎的危险性为 HPV DNA 相关序列阴性者的 20.81 倍 ($OR = 20.81$)^[3]。

二、HCMV Hind III E 片段 DNA 分子杂交结果

在慢性宫颈炎活检组织 DNA 中, HCMV 阳性率为 12.6% (11/87), 对照宫颈为阴性 (0/25), 经显著性检验, 二者无显著性差异。

三、HCMV 感染与 HPV 感染的相关性^[4] (表 2, 图版 II 3)

87 例慢性宫颈炎患者中 HPV DNA 相关序列阳性例数为 25 例, HCMV 阳性例数为 11 例, 其中 HPV 和 HCMV 同时阳性者为 8 例 (表 2), 分别占 HPV 阳性者的 32%, 占

表 2 HCMV 感染与 HPV 感染的相关性
Table 2. The relationship between HCMV and HPV infection

		HCMV DNA		总计 Total
		+	-	
HPV DNA	+	8	17	25
	-	3	59	62
Total		11	76	87

 $\chi^2=9.57$ $P<0.01$

HCMV 阳性者的72.7%。经二者相关性检验, $\chi^2=9.57$, $p<0.01$, 其相关系数 $r=0.54$ 。提示 HCMV 感染与 HPV 感染有关, 慢性宫颈炎病人 HCMV 感染者 HPV 感染率亦高。

讨 论

自从 Durst^[5] 和 Boshart^[6]应用 Southern blot 核酸杂交方法在宫颈癌组织中检测到 HPV16和HPV18序列以来, HPV 作为宫颈癌的高危致癌因子的观点已普遍被接受。而 HCMV 与宫颈癌的关系尚不太清楚。但由于目前已从宫颈癌活检组织或宫颈癌组织培养细胞中分离到 HCMV^[7], 有学者报道 HCMV Hind III E片段中有一个490bp 结构具诱导形态转化作用^[8]。许多学者应用核酸分子杂交技术在宫颈癌活检组织中检测到 HCMV DNA 序列^[9,10], 而且宫颈癌患者血清内 HCMV 抗体滴度增加^[11], 从而认为 HCMV 与宫颈癌的发病可能有关。

大量资料表明慢性宫颈炎常可演变为宫颈癌, 但宫颈癌的发病较宫颈炎低得多, 因而考虑可能在某些宫颈炎病人中还存在着高危致癌因子。Syrjanen 等^[12]曾作了一个临床前瞻性研究, 对314例生殖道 HPV 感染妇女从1981年到1985年进行随访, 平均随访病人 18 个月后, 其中病情发展者为 15%, 5.5% 发展成为原位癌, 1例 HPV 感染患者, 由于没有接受随访治疗, 在不满 3 年的时间里发展为浸润性宫颈癌。本文对慢性宫颈炎活检组织检测结果表明 HPV DNA 相关序列与宫颈炎有关, HPV6, 11, 16, 18型 DNA 同源序列检测, 在宫颈炎组均高于对照组, 但未达到显著性水平。已有研究表明, HPV 16、18主要存在于宫颈癌, HPV 6, 11主要见于宫颈良性疾患^[9], 本结果也显示出这种趋势, HPV 6, 11型检出率高于 HPV16, 18型。HCMV 检出率在慢性宫颈炎高于对照宫颈, 但无显著性差异, 因而 HCMV 与宫颈炎的关系需进一步研究。

近年来, 许多学者趋向于宫颈癌的病毒病因的多因素学说。本实验结果显示 HCMV 阳性者中有72.7%的病例同时为 HPV 阳性者, 提示 HCMV 感染可能与 HPV 感染有关, 二者在宫颈炎的发生发展中可能起协同作用。根据 HPV 和 HCMV 与宫颈癌的关系的研究, 我们认为这类宫颈炎病人将来发展成为宫颈癌的可能性比没有感染 HPV 和 HCMV 者的慢性宫颈炎病人要大, 因此对于慢性宫颈炎病人中感染 HPV 或 HPV 和 HCMV 者应予以重视, 积极治疗, 定期随访, 以防止宫颈癌的发生。如果能够及时对 HPV 或 HPV 和 HCMV 感染的慢性宫颈炎病人早期发现、早期治疗, 从而使宫颈癌的发病率下降, 将

从另一侧面证明 HPV 和 HCMV 与宫颈癌发生的关系。

考 参 文 献

- [1] 孟祥金等, 1988, 中华微生物学与免疫学杂志, 8: 319.
- [2] 孟祥金等, 1989, 中华肿瘤杂志, 11: 663.
- [3] [日]重松逸造, 1985, 流行病学方法论, 第45页。
- [4] 杨树勤, 1985, 中国医学百科全书——医学统计学, 第101页。
- [5] Dürst, M. et al., 1983, *Proc Natl Acad Sci*, 80: 3812.
- [6] Boshart, M. et al., 1984, *EMBOJ*, 3: 1151.
- [7] Rapp, F. et al., 1981, *Gynecol oncol*, 12: 25.
- [8] Galloway, DA. et al., 1984, *Proc Natl Acad Sci*, 81: 4736.
- [9] 孟祥金等, 1983, 国外医学妇产科学分册, 1: 16.
- [10] Huang, ES. et al. 1983, New York and Basel, pp188.
- [11] 韩日才等, 1990, 癌症, 9: 145.
- [12] Syrjanen, KJ. et al., 1985, *Lancel*, 1: 510.

A Study on the Distribution and Correlation of HPV and HCMV Infection in Chronic Cervicitis¹

Sun Rui Meng Xiang-jin Cui Zheng-yan Sun Yu-ling²
Li Wen Zhu Chang-yi² Deng Wen²

(Institute of Basic Medical Sciences, Shandong Academy of
Medical Sciences, Jinan 250001)

Human Papillomavirus (HPV) DNA-related sequences (including HPV type 6, 11, 16, 18) and Human Cytomegalovirus (HCMV) Hind III E fragment were detected by DNA dot blot hybridization in cervical biopsies which were pathologically diagnosed as chronic cervicitis (87 cases) and normal cervixes (25 cases). The results showed that the positive rates of both HPV DNA (type 6, 11, 16, 18)-related sequences and HCMV DNA sequences in control group were 0, but those in cervicitis group were 29.0% (16.1%, 12.6%, 11.5%, 5.7%) and 12.64% respectively. There was significant difference between cervicitis and normal cervixes for HPV-related sequences ($X^2 = 7.67, P < 0.01$). The results also showed that HCMV DNA was co-existence with HPV DNA in some specimens. HPV DNA-related sequences were found in 72.7% of HCMV positive specimens, which indicated that HPV and HCMV infections in cervicitis specimens are correlated.

Key words, Cervicitis Human Papillomavirus (HPV) Human Cytomegalovirus (HCMV) Dot blot hybridization

1. The Project supported by National natural sciences foundation of China

2. Tai-shan Medical College