

259-264

头颈部肿瘤基因组中HPV16 DNA的同源序列

杨平 赵文先 刘学锋 伍欣星

丁晓华 姚昌德* 杨强**

(湖北医学院病毒研究所, 武汉430071)

R373.9

提 要

利用头颈部肿瘤临床活检新鲜组织和石蜡包埋组织的两种处理标本, 分别采用核酸分子杂交和聚合酶链反应(PCR)两种技术, 分析了头颈部肿瘤组织基因组中人乳头瘤病毒16型的同源序列, 并研究HPV16的感染同头颈部肿瘤发生发展的关系。结果表明: 1. 喉鳞状细胞癌DNA中有HPV16 DNA同源序列, 检测频率在20.0%以上。2. PCR扩增石蜡包埋肿瘤组织DNA中HPV16的URR(病毒基因上游调控区)中的序列, 电泳分析扩增产物在喉乳头状瘤、喉癌、鼻腔内翻性乳头瘤和口腔癌中检测率分别是11.1%、20.0%、42.9%和27.3%。3. 研究表明HPV16 DNA阳性率与喉癌原发部位, 分化程度和临床分期之间可能有一定的相关性。人乳头瘤病毒可能是头颈部肿瘤的病毒病因之一。

关键词: 头颈部肿瘤 人乳头瘤病毒 聚合酶链反应 上游调控区 基因扩增

PCR

人乳头瘤病毒及其致病性的研究, 从流行病学、病理学和分子生物学的证据已表明某些肿瘤在其病因学上的重要作用^[1]。它为致肿瘤的dsDNA病毒, 鳞状上皮细胞是它攻击的靶细胞。基因组约为8.0kb, 含8个开放性阅读框, 其中E₆-E₇基因的表达与肿瘤细胞恶化表型的诱发和维持有关^[2]。HPVs曾一直被认为是一类疣的致病因子, 与某些良性肿瘤发生关系。近年来研究表明它与人类某些恶性肿瘤的发生及其发展密切相关, 如HPV16、18、31、35、45、55等型别与人宫颈癌、阴茎癌等发生关系。HPV16、18型分别与人食管癌有关。最近报道HPVs与头颈部肿瘤(口腔, 扁桃体等)也有一定关系^[3], 但国内尚未见报道。

检测HPVs与人类肿瘤发生关系的主要常用技术是核酸分子杂交、组织原位杂交、免疫组化等, 这些方法由于HPV的拷贝数低或抗原性差而往往受其限制。近年来聚合酶链反应(PCR)技术的诞生为深入探讨HPVs的致病致癌性开辟了新的途径^[4]。

本文采用PCR和核酸杂交两种技术和石蜡包埋及临床活检新鲜组织, 检测我国头

本文于1991年7月27日收到, 10月30日修回。

(*)湖北医学院第二附属和(**)第一附属医院。

夫

颈部肿瘤组织基因组中 HPV16 DNA 相关序列。探讨人乳头瘤病毒的感染与该类肿瘤发生发展的关系,并试图找到一种快速检测 HPV 感染的措施,为临床病理和临床实践服务。

材 料 和 方 法

一、主要材料来源

1. HPV16, 18 克隆株: 德国 Zur Hausen 惠赠。HPV16 DNA 的 PCR 引物 (Primers) 由广州第一军医大学生化教研室提供, 引物在 HPV16 DNA 基因组上的位置及其顺序如图 1。

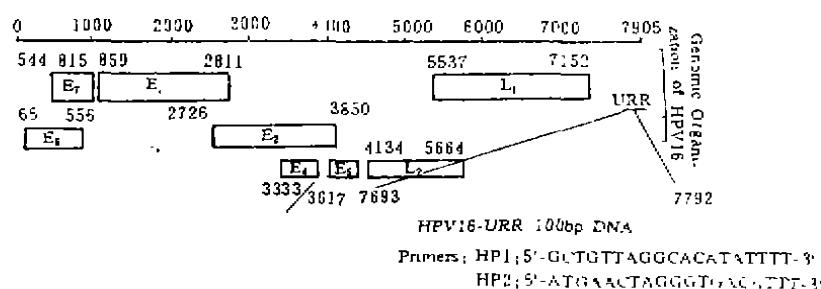


图 1. 人乳头瘤病毒 16 型基因结构, 引物对和 HPV16 基因组中调控区的位置

Fig 1. HPV16 primers and URR site of HPV16

2. 标本中有的来自湖北医学院附属第二医院, 经喉全切除或部分切除术活检新鲜组织。使用前存于 -30°C 的 SSC 液中。石蜡包埋组织来自附属第一医院五官科。所有标本均经病理确诊。按 Goel 等方法从石蜡组织中制备 DNA^[5]。

二、聚合酶链反应 (PCR)

在特异引物 (HP₁ 和 HP₂) 的诱导下, 通过 Taq DNA 聚合酶催化, 扩增 HPV₁₆ 中的调控区 (URR—见图 1) 的序列^[6]。反应总体积 50 μl , 其中含两个引物各 30 p mol/L, dNTP 各 0.2 mmol/L, Tris-HCl (pH 8.5) 25 mmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mmol/L, MgCl_2 , 1.5 mmol/L, gelatin 0.01%, DMSO 4%, 组织 DNA 2 μl (0.01 μg —10 μg)。混匀, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 分钟移至 55 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟, 加 2U 酶, 加石蜡油 30 μl , 离心分层。转入 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸链 60 秒。以后再 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 秒循环 35 次。取 10 μl 扩增产物, 2% 琼脂糖凝胶 (含 EB) 电泳, 紫外光灯下观察 HPV16 DNA 扩增带。

三、核酸分子杂交

1. 来自 HPV16 克隆质粒, 酶切并回收 7.9 kb DNA, 采用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ (dCTP) 标记制备探针。

2. ^{32}P -HPV16 DNA 探针分别与不同来源的组织DNA进行斑点杂交, 杂交在温和条件下进行 ($T_m=40^\circ\text{C}$)。

结 果

一、PCR技术检测肿瘤组织中HPV₁₆ DNA特异性和敏感性

以HPV₁₆ DNA、HPV₁₈ DNA和正常人白细胞(WBC)DNA为模板, 在一对引物的诱导下, 分别进行PCR扩增DNA。扩增的结果: 仅以HPV₁₆ DNA为模板时, 扩增产物经电泳分析后, 在100bp核苷酸处出现扩增色带。而WBC-DNA, HPV₁₈-DNA作为模板时, 均无此带的出现。扩增模板DNA的用量仅0.01ng, 经35次循环扩增, 就可检测出扩增带(图2)。

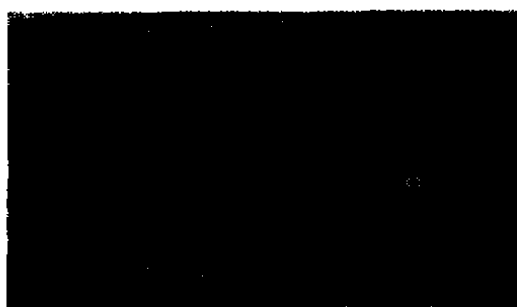


图2 HPV₁₆在引物HP₁和HP₂诱导下, 经PCR技术扩增后基因产物的2%琼脂糖凝胶电泳
Fig 2 HPV₁₆ PCR amplified DNA was analyzed by 2% agarose gel.

1. 质粒DNA BstNI酶切
PBR322/Bst N1
2. 乳头瘤病毒16型DNA
HPV₁₆ DNA
3. 乳头瘤病毒18型DNA
HPV₁₈ DNA
4. 癌DNA
Cancer DNA(10ng)
5. 鼻腔内翻性乳头状瘤
IPON DNA(0.01ng)
6. 白细胞 DNA
WBC DNA (10ng)

二、PCR技术分析头颈部肿瘤组织DNA中HPV₁₆

从表1中可看出PCR扩增头颈部肿瘤石蜡包埋组织DNA中HPV₁₆的调控区(URR) DNA片段、检测HPV₁₆ DNA存在于喉鳞状细胞癌、喉乳头瘤、口腔癌和鼻腔内翻性乳

表1 头颈部肿瘤组织中HPV16DNA的检测
Table 1 Detection of HPV16 DNA in tumor of head and neck with PCR

肿瘤 Tumor	例数 No. of cases	阳性数 Positive	阴性数 Negative	% Percentage
喉乳头状瘤 (LP)	9	1	8	11.1
鼻腔内翻性乳头状瘤 (IPON)	7	3	4	42.9
喉鳞状细胞癌 (LSCC)	20	4	16	20.0
口腔癌 (OC)	11	3	8	27.3
LC-Laryngeal papilloma, OC-Oral cancer.			IPON-Inverted papillomas of the nose Lacc-Laryngeal squamous cell cancer.	

头瘤基因组中分别为20.0%、11.1%、27.3%和42.9%。由于HPV₁₆具有明显的致癌潜能, 该型在我国大陆普遍存在。同时HPV₁₆的URR作为其基因组中重要的调控组分, 其

顺序可反映HPV₁₆特异性。URR 基因在病毒感染细胞后往往比较稳定,不易丢失^[7]。故本研究选择性地检测HPV₁₆ DNA基因组中的URR 相关序列。

三、不同病理喉癌新鲜组织DNA与³²P-HPV₁₆探针杂交结果

用斑点(Dot blot)杂交技术检测新鲜喉组织基因组中HPV₁₆同源序列,杂交总阳性率为46.9%(15/32), $P < 0.05$ 。其中除6例正常喉鳞状细胞组织及2例乳头状瘤组织DNA与探针杂交无信号反应外,癌及癌旁组织DNA均呈现有阳性杂交信号(表2)。

表 2 不同病理喉癌新鲜组织DNA与³²P-HPV₁₆探针杂交的结果
Table 2. Comparison among the hybridization of HPV-16 DNA with different lesions of the larynx

组别 Group	检测例数 No. of cases	阳性例数 Positive	阴性例数 Negative	P值 P value
1	6	0	6	
2	2	0	2	
3	8	4	4	<0.05(3; 1)
4	16	11	5	<0.05(4; 1)
合计 Total	32	15	17	<0.05(3, 4; 1)

注: 1.喉正常组织Normal epithelium of larynx 2.喉乳头状瘤LP
3.喉癌旁组织Surrounding edithelial tissue of LSCC
4.喉鳞状细胞癌LSCC

四、HPV₁₆感染与头颈部恶性肿瘤原发部位,分化程度和临床分期之间的关系

用PCR技术检测我国大陆LSCC患者组织中的HPV₁₆相关序列,其阳性率为20.0%(4/20)。从表3中还可看到HPV₁₆ DNA阳性患者均为声门型,表明HPV₁₆感染声门区的机会可能较其他部位的机会高,而且由HPV₁₆感染阳性的LSCC均为高分化癌。然而,HPV₁₆感染与LSCC的临床分期似乎无明显的关系,见表3。

表 3 HPV₁₆阳性率与LSCC原发部位分化程度及临床分期的关系
Table 3 Relationship between HPV-16 positivity and glottic origin and differentiation and clinic

病理号 No.	性别 Sex	年龄 age	原发部位 origin	分化程度 differentiation	临床分期 TNM	乳头瘤病毒16型 探针与样品杂交情况 HPV-16
820503	男 man	62	声门型 glottic	中度分化 middle	T ₁ N ₁ M ₁ (II)	-
85055	男 man	52	声门型 glottic	低分化 poor	T ₁ N ₁ M ₀ (II)	-
812263	男 man	48	声门型 glottic	高分化 well	T ₂ N ₁ M ₀ (III)	+
832193	男 man	34	声门型 glottic	高分化 well	T ₁ N ₀ M ₀ (II)	+
820263	男 man	18	声门型 subglottic	低分化 poor	T ₂ N ₀ M ₀ (III)	-
811289	女 woman	58	声门型 glottic	高分化 well	T ₁ N ₀ M ₀ (I)	+
820269	男 man	32	声门型 flottic	高分化 well	T ₂ N ₀ M ₁ (III)	+
852160	男 man	77	声门型 glottic	低分化 poor	T ₂ N ₀ M ₁ (III)	-

讨 论

一、PCR 技术检测头颈部肿瘤 HPV_s 感染的特异和敏感性: 本研究采用 PCR 技术选择高危致癌的人乳头瘤病毒作为检测对象, 结果表明从临床保存的石蜡包埋组织中提取微量 DNA, 仅用 0.01ng DNA 模板经 PCR 扩增后就可检测出 HPV16 DNA 特异色带。在 HPV16 DNA 的两个引物诱导下, 分别对正常人的白细胞 DNA、HPV18 DNA 和 HPV16 DNA 作模板进行 PCR 扩增。结果仅以 HPV16 DNA 为模板时才出现 DNA 扩增产物, 而其他的 DNA 模板均未出现扩增产物。因此, PCR 技术应用于头颈部肿瘤的病毒性病因的检测或诊断不仅灵敏度高、特异性强, 而且简便快速。它的应用将加速癌症发生机理的揭示。

二、头颈部良、恶性肿瘤组织基因组中 HPV16 的检测结果表明: 头颈部肿瘤用 PCR 技术扩增石蜡包埋组织的微量 DNA 或是采用探针杂交新鲜组织 DNA 的方法, 均能检测到 HPV16 DNA 的同源序列。其中喉癌、口腔癌和鼻腔内翻性乳头状瘤的检测频率分别为 20.0%、27.3% 和 42.9%。这就表明, 头颈部肿瘤的发生发展与 HPV 的感染有着密切的关系。HPV_s 的感染可能是这类肿瘤疾病的高危因子之一。以往的概念是 HPV_s 型与致肿瘤性病理有关, 例如 HPV6、11 型与良性肿瘤发生联系, HPV16、18 等型与恶性肿瘤发生关系。那么, 当良性肿瘤发展成恶性肿瘤时, HPV_s 的型别是如何过渡的? 这仍是个谜。近年来分子生物学的发展揭示 HPV 的基因组中有某些亚基因 (如 E₆/E₇) 或调控基因 (如 URR), 在诱癌和维持肿瘤恶化表型起着至关重要的作用。若是 HPV_s 基因组中存在这类亚基因同源片段, 显然研究这类亚基因与致病肿瘤的关系比研究 HPV_s 型别与肿瘤的关系重要得多。或许不同型别中存在某亚基因或其产物对细胞原癌基因结构产生某些作用 (激活原癌基因) 而诱发肿瘤的可能性也是存在的。该谜底的最终揭示, 寄望于病毒学和肿瘤学的分子生物学研究。

三、HPV_s 感染与临床病理的关系⁽⁶⁾, PCR 技术的应用显著提高了头颈部疾病患者组织中 HPV 的检出率, 本文的研究结果进一步证明 HPV16 的感染与头颈部肿瘤的发生相关, 同时探讨了 HPV16 DNA 的阳性率与 LSCC 原发部位, 分化程度之间存在一定的关系。HPV16 感染声门区的频率较感染其他部位的频率高, 而且 HPV16 DNA 阳性的 LSCC 均为高分化癌。作者认为, 若 HPV16 证实为 LSCC 病因, 由 HPV16 所致的 LSCC 往往分化程度较好, 对临床分期与患者就诊时 LSCC 的发展程度的判断是具有实际意义的。

参 考 文 献

- (1) McCance, DJ., 1986, *Biochimica et Biophysica Acta*, 823: 195.
 (2) Sendorf, K. et al., 1985, *Virology*, 145: 181.
 (3) Syrjama, SM. et al., 1988, *J. Oral Pathol.*, 17(6): 273.
 (4) Meshera, W. et al., 1989, *J. of Medical Virology*, 27: 239.
 (5) Goetz, SZ. et al., 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130: 118.
 (6) SAike, RK. et al., 1988, *Science*, 239: 487.
 (7) Choo, KB. et al., 1988, *J. Virol.*, 62: 1659.
 (8) Brandsma, IL. et al., 1989, *Archives of Oto Laryngology and Head and Neck Surgery*, 115: 621.

Detection of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Head and Neck Tumors

Yang Ping et al

(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan 430071)

In order to probe the relationship between human papillomavirus type 16 and head-neck tumors, using fresh tissue and paraffin-embedded tissue sections preparing DNA to detect HPV16 DNA in head and neck tumor, by PCR and hybridization technique. The results showed that HPV16 DNA sequences were positively amplified in one laryngeal papilloma (11.1%), in 3 inverted papillomas of the nose (42.9%), in 4 laryngeal squamous cell carcinomas (20%), in 3 oral cancers (27.3%). LSCC of glottic origin showed higher HPV16 DNA positivity as compared to that of other origin, HPV16 DNA positive tumors were most frequently well differentiated LSCC.

Key words: Head and neck neoplasm Human papillomaviruses
 Polymerase chain reaction (PCR) Upstream regulatory region (URR)
 Gene amplification