

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)17-1584-04

TDI-FP 法检测宫颈癌组织中 HPV16E7 基因 647 位点突变

樊江波¹, 曲群¹, 吴静¹, 张菊², 高艳娥¹, 张格林¹(¹ 西安交通大学医学院第二附属医院妇产科, 陕西 西安 710004; ² 第四军医大学基因诊断技术研究所, 陕西 西安 710033)

Detection of HPV16 E7 gene nt647 point mutation in cervical cancerous tissue using TDI-FP technique

FAN Jiang-Bo¹, QU Qun¹, WU Jing¹, ZHANG Ju², GAO Yan-E¹, ZHANG Ge-Lin¹¹Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China, ²Institute of Gene Diagnostics, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM : To detect HPV16 E7 nt647 point mutation in cervical cancerous tissue using TDI-FP technique in order to provide valuable clinical data for warning, detection, diagnosis, gene therapy, prevention and prognosis of cervical cancer and precancerous lesion with HPV infections. **METHODS** : TDI-FP technique is a compounded reaction including PCR, probe hybridization and base incorporation with high specificity and sensitivity. We detected the point mutation of HPV16 E7 nt647 in the detected HPV 16 positive cervical cancerous tissue by the TDI-FP method, which can explain the correlation between the point mutation and cervical cancer. **RESULTS** : The HPV16 E7 nt647 point mutation rate was 32.35% in the study. The point mutation rate of HPV16 E7 nt647 was significantly different from that of the control group ($\chi^2 = 12.437, P < 0.001$). **CONCLUSION** : The point mutation of HPV16 E7 nt647 may be a high risk factor for cervical cancer.

【Keywords】 human papillomavirus; genotyping; cervical neoplasms; fluorescence polarization; gene mutation

【摘要】目的: 人乳头瘤病毒(HPV)16型E6/E7基因的变异可能和HPV的致癌能力直接相关。E7 647位点的突变可能增强了致癌能力。本课题通过应用TDI-FP法检测宫颈癌HPV16阳性标本中E7 647位点突变情况, 可以对确定高危人群、恶性病变的预警筛查、辅助诊断、疗效判定及预后提供临床价值, 并可以为宫颈癌及其癌前病变的基因治疗、疫苗治疗和预防提供分子水平方面的重要依据。方法: TDI-FP技术是一种在聚合酶链反应的基础上具备液相探针杂交和碱基掺入

三重特异反应的检测新方法, 具有极高的特异性和敏感性。本课题实验在TDI-FP方法的基础上检测宫颈癌患者HPV16 E7基因647位点突变情况, 以进一步明确这些位点突变与宫颈病变的相关性。结果: 应用TDI-FP法检测宫颈癌组织中HPV16型E7 647位突变率为32.35%, HPV16型E7 647位突变与对照组相比具有统计学差异($\chi^2 = 12.437, P < 0.001$)。结论: 本实验初步提示宫颈癌患者中HPV16型E7 647位突变可能是HPV致癌的一个高危因素。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 基因分型; 宫颈肿瘤; 荧光偏振; 基因突变

【中图分类号】R711.74

【文献标识码】A

0 引言

宫颈癌是严重威胁妇女生命健康的恶性肿瘤。目前研究表明, 世界上99%以上的宫颈癌组织中存在HPV感染, 并且世界卫生组织于1996年确认HPV感染是宫颈癌的主要病因。HPV16和HPV18型是宫颈癌中最常见型别, HPV16在至少50%的宫颈癌中能发现。HPV16型存在许多基因变异(突变、插入、颠换等形式)。HPV16型E6/E7基因的变异和HPV的致癌能力可能直接相关。有研究表明HPV16 E7基因的第647位碱基存在一定的突变(A→G, Asn→Ser)此突变在亚洲某些国家具有较强的致病性, 存在此突变提示患者病情较重或预示着癌变的发生。目前, 国内对此研究较少, 故对HPV16 E7 647位点突变的研究对于从基因水平早期预测癌变的发生及疾病的预后有着重要的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 实验组选取通过TDI-FP HPV分型检测法^[1-2]所得到的宫颈癌HPV16型阳性标本共34例, 对照组选取HPV16阳性慢性宫颈炎及癌前病变标本共50例。标本采集自2004-02/2005-08交大二院妇产科宫颈癌、癌前病变及慢性宫颈炎患者之病变组织, 标本于-20℃冰箱保存。所有标本均经病理确诊。实验组按FIGO分期Ia期宫颈癌患者共9例, Ib-IIa期宫颈癌患者共19例, IIb期以上宫颈癌患者共6例, 均经病理确诊为鳞状细胞癌。实验组与对照组患者年龄无统计学差异($P > 0.05$)。目前研究

收稿日期 2006-03-03; 接受日期 2006-04-29

作者简介 樊江波, 硕士, 主治医师。Tel 13379032075 Email fanjiang-bo2004@163.com

未发现年龄与 HPV16 E7 突变有相关性。主要实验仪器与试剂: TechGene PCR 扩增仪(英国 Techne 公司), Victor2 Multilabel Counter 荧光偏振检测仪(美国 Perkin Elmer 公司), 核酸凝胶片断回收试剂盒 Concert™ Rapid Gel Extraction System(美国 Gibco 公司), 克隆载体试剂盒 pGEM^R-T Easy Vector System I(美国 Promega 公司), 质粒提取试剂盒 GenElute™ Plasmid Miniprep Kit(美国 Sigma 公司), TDI-FP(荧光偏振)检测试剂盒 AcycloPrime™-FP SNP Detection Kit G/T 和 A/G(美国 Perkin Elmer 公司)。pGEM-T Easy 质粒, 由第四军医大学基因研究所张菊副教授惠赠。细菌菌株: DH5 α 基因型: supE44, Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 收录的 HPV 16 基因的原始序列, 利用 DNA Star:Primer5.0 设计包含 HPV 16 E7 647 位点的上下游引物, 引物序列、位置以及 PCR 产物长度如表 1。

表 1 HPV 16 E7 基因引物序列、位置以及 PCR 产物长度

名称	引物	序列(5'→3')	引物位置	产物长度
16E7	F	ttagatttgcaaccagagaca	598-618	168 bp
	R	actctacgcttcgggtgtgc	765-746	
	TDI(647)	tgacagctcagaggaggag	666-648	

1.2.2 HPV16E7 基因 PCR 扩增及扩增产物的纯化 扩增总体积为 25 μ L, 内含上下游引物各 0.25 μ mol/L, 模板 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 1.0 u, dNTPs 150 μ mol/L, MgCl₂ 3.0 mmol/L, 10 \times Buffer 2.5 μ L。具体扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 40 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 10 μ L PCR 反应产物与 1/10 体积的缓冲液混合, 进行 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳: 1 \times TAE 电泳缓冲液 0.5 mg/mL 溴化乙锭, 5 V/cm 电泳 30 min 后紫外灯下观察。参照 TDI-FP 试剂盒说明书进行消化反应, 以除去 PCR 扩增反应中剩余的引物和 dNTP。

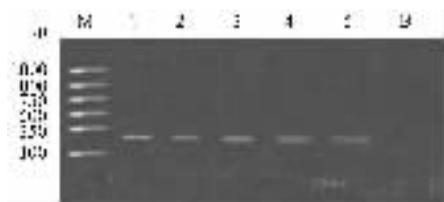
1.2.3 TDI 掺入反应及 FP 检测 将消化以后的产物按照每管 7 μ L 分装于两个干净微量离心管中, 分别加入已配好的掺入反应混合物(Acyclopol 0.05 μ L, 10 \times Buffer 2.0 μ L, 点突变检测探针 0.5 μ L, Acyclopol Terminator MIX 1.5 μ L, 去离子水 8.95 μ L) 13 μ L, 总体积 20 μ L。掺入反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 15 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环后 15 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将掺入产物 10 μ L 加入微孔板, 置于荧光

偏振检测仪 Victor2 Multilabel Counter 中进行 FP 检测。利用荧光偏振分析软件“ SNP macro VICTOR 384v 4.0 ”来分析检测结果。

1.2.4 统计分析及测序 组间突变率比较采用 χ^2 检验, 统计计算经 SPSS 11.0 软件处理, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 时, 有统计学意义。随机挑选 HPV16 E7 647 位突变与未突变标本各 5 例, 进行测序。将其电泳分离、回收克隆入 pGEM-Teasy 载体中, 每份挑选 2 个经氨苄青霉素抗性、蓝白筛选, 以及 PCR 扩增鉴定的阳性克隆, 由上海博亚生物技术有限公司 PE ABI377 自动测序仪测序。

2 结果

2.1 HPV16 E7 基因的扩增 以 HPV16 阳性标本为模板 PCR 产物 10 μ L 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1, PCR 产物片段长度为 168 bp。



M: DL2000DNA Marker; 1~5 标本 HPV16 E7 PCR 结果; B 空白对照。

图 1 标本中 HPV16 E7 PCR 结果

2.2 HPV16 型 E7 647 位突变 TDI-FP 法检测结果

应用 HPV TDI-FP 突变检测方法对 34 例宫颈癌标本及 50 例对照组标本进行检测。经检测有 13 例标本的检测结果位于散点图右下象限, 表示 ddCTP-R110 掺入, 即 A \rightarrow G 突变; 71 例标本位于左上象限, 表示有 ddTTP-TAMRA 掺入, 无突变; 空白对照结果位于左下象限, 表示无终止子掺入。检测结果见图 2 及表 2。

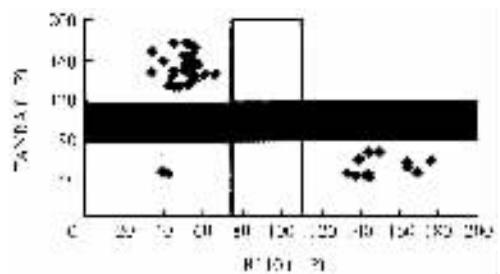


图 2 标本中 HPV16E7 647 位突变检测结果的散点图

2.3 HPV16 E7 647 位检测标本的测序验证 随机挑选 HPV16 E7 647 位突变与未突变标本各 5 例, 由上海博亚生物技术有限公司 PE ABI377 自动测序仪

进行测序,确定 HPV16 E7 647 位点突变情况,与 TDI-FP 检测结果比较,两者符合率为 100%。

表 2 HPV16 E7 647 位点突变情况

宫颈病变	突变	未突变	合计
对照	2	48	50
宫颈癌	11	23	34

$\chi^2 = 12.437$ $P < 0.001$.

3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,每年有 20 多万妇女死于宫颈癌^[3-4]。在发展中国家,占妇女所有癌症的 25%^[5]。大量实验研究表明,世界上 99% 以上的宫颈癌组织中存在 HPV 感染,并且世界卫生组织 (WHO) 已于 1996 年确认 HPV 感染是宫颈癌的主要病因^[6]。流行病学研究表明,HPV16 和 HPV 18 型是宫颈癌中最常见型别。其中 HPV16 型在至少 50% 的宫颈癌中能发现。任何型别的高危型 HPV 感染均可导致宫颈癌的发生,即使其相关性最低者也高于吸烟与肺癌的相关性,而与慢性乙肝与肝癌的相关性相似^[7]。

目前世界各国学者通过对 HPV 致癌机制的研究发现,高危型 HPV (16, 18 型) 感染是致癌的主要原因,而导致高危型 HPV 致癌的主要因素是 HPV 早期基因存在着不同形式的突变,正是由于这些点突变的存在增强了 HPV 的致癌力^[8-12]。研究发现,HPV16 E6/E7 基因的变异和 HPV 的致癌能力直接相关。左亚刚等^[11]对北京地区人乳头瘤病毒 16E7 基因变异和序列分析的研究中,发现 HPV16 全长序列中第 647 位碱基发生突变 (A→G, Asn→Ser),此突变点位于 E7 区。韩国学者^[13]研究发现,HPV16E7 647 位 (A→G, Asn→Ser) 突变在 70% 以上的宫颈癌组织中被检测发现,与对照组比较有统计学差异,提示 E7 癌蛋白的这种变异改变了其生物活性。目前国内对此位点突变的研究较少,Stephen 等^[14]对四川地区的宫颈癌组织检测仅得到其突变,未对其进行进一步分析比较和研究。陈中灿等^[15]应用荧光偏振方法检测了 33 例 HPV16 阳性宫颈癌标本中 HPV16 E7 基因第 29 位密码子 (相当于 HPV16 序列第 647 位核苷酸) 的突变情况,结果发现 13 例发生了突变 (A→G, Asn→Ser),突变率为 43.48%。且突变率随病变程度的升高而增加,提示该突变可能是 HPV 致癌的一个高危因素。故由以上可以看出,HPV16 型 E7 647 位突变可能是导致宫颈癌发生的一个重要因素,但其突变情况可能存在地域、人种等差异。

本实验对宫颈癌组织 HPV16 型 E7 647 位突变情况进行 TDI-FP 法检测,实验组 34 例宫颈癌组织中 11 例发生了突变 (A→G, Asn→Ser),突变率 32.35%,对照组 50 例中有 2 例发生了突变 (A→G, Asn→Ser),突变率 4.0%。经统计学分析,具有统计学差异 ($\chi^2 = 12.437$ $P < 0.001$)。提示该突变可能是 HPV 致癌的一个高危因素,并且该突变可能较为常见。将实验结果与临床资料进行进一步分析比较, Ia 期宫颈癌患者共 9 例,经检测 HPV16 型 E7 647 位的突变率为 11.11% (1 例突变); Ib-IIa 期共 19 例,突变率为 36.84% (7 例突变); IIb 期以上共 6 例,突变率为 50.00% (3 例突变)。由此可以初步发现,宫颈癌患者中 HPV16 型 E7 647 位突变率随病变程度的加重而增加,提示该突变可能是 HPV 致癌的一个高危因素。

TDI-FP 方法是一种全新的基因变异分析方法,用于基因点突变的检测有突出的优点,首先它的特异性和敏感性高,引物扩增、探针杂交及荧光素标记碱基掺入三重把关保证了其高特异性与敏感性。其次是检测系统容易建立和优化,检测快速且通量高,一天之内可以完成数千个位点分析^[16]。另外引物不需要特殊修饰,操作简便,所以成本低廉,因而具有简便、快捷、准确及高通量等特点。

目前研究认为,从高危型 HPV 的最初感染到浸润性宫颈癌的发生大约需要 15 年左右的时间^[17]。所以,宫颈癌是可以通过早期诊断,继之早期治疗高危型 HPV 感染来预防的一种特殊癌症。用定期进行 HPV TDI-FP 法分型检测补充传统的细胞学普查,特别在细胞学正常及不典型性增生的人群中,对预警宫颈细胞癌变倾向,及时发现和预防治疗早期宫颈癌极为重要。同时通过检测与宫颈癌密切相关的恶变点突变,有利于对 HPV 感染相关良恶性增生病变高危人群的筛查,并且可以对恶性病变危险度进行进一步预警分析,为进一步的生物、疫苗、基因等治疗奠定了基础并提供了技术平台。

【参考文献】

- [1] Gao YE, Zhang J, Wu J, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissues with fluorescence polarization [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2003, 35(11): 1029-1034.
- [2] Zhang J, Gao YE, Yan XJ, et al. Development of a high throughput gene diagnosis assay for genotyping human papillomavirus [J]. Chin J Lab Med 2003, 26(3): 145-147.
- [3] Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population [J]. Int J Cancer 2002,

- 97-72-81.
- [4] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(6): 827-841.
- [5] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16(1): 1-17.
- [6] Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia[J]. *Lancet Oncol* 2002, 3(1): 11-16.
- [7] Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia[J]. *Lancet Oncol* 2002, 3(1): 11-16.
- [8] Hu X, Pang T, Guo Z, et al. HPV16 E6 gene variations in invasive cervical squamous cell carcinoma and cancer in situ from Russian patients[J]. *Br J Cancer* 2001, 84(6): 791-795.
- [9] Pang T, Hu X, Mazurenko N, et al. Multiple variants of HPV16 E6 gene in cervical invasive squamous cell carcinoma[J]. *Anticancer Res* 2002, 22(2A): 1011-1016.
- [10] Radhakrishna Pillai M, Sreevidya S, Pollock BH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol* 2002, 87(3): 268-273.
- [11] 左亚刚, 王家壁, 许雪梅, 等. 北京地区人乳头瘤病毒 16E6E7 基因变异和序列分析[J]. *中华皮肤科杂志* 2003, 36(11): 650-652.
- [12] Vaeteewoottacharn K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co-mutation of human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinoma[J]. *Anticancer Res* 2003, 23(2C): 1927-1931.
- [13] Song YS, Kee SH, Kim JW, et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women[J]. *Gynecol Oncol* 1997, 66: 275-281.
- [14] Stephen AL, Thomposm Ch, Tattersall MH, et al. Analysis of mutations in URR and E6/E7 oncogenes of HPV16 cervical cancer isolates from central China[J]. *Int J Cancer* 2000, 86: 695-701.
- [15] 陈中灿, 张菊, 高艳娥, 等. 荧光偏振方法快速检测 HPV 16 E7 第 29 位密码子点突变[J]. *第四军医大学学报* 2004, 25(15): 1403-1406.
- [16] Chen X, Levine L, Kwok PY. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis[J]. *Genome Res*, 1999, 9(5): 492-498.
- [17] Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer[J]. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91(6): 506-511.

编辑 许福明

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)17-1587-01

合后无明显疤痕形成。

康惠尔溃疡贴治疗深度褥疮 6 例

刘西梅, 刘鑫, 刘英

(陕西武警总队医院神经外科, 陕西 西安 710054)

【关键词】溃疡贴; 褥疮; 治疗

【中图分类号】R671.24 【文献标识码】B

1 临床资料 2003-03/2005-07 住院的 6 例 III° ~ IV° 褥疮患者, 年龄 62 ~ 78(平均 69.3) 岁, 其中脑出血后遗症 3 例, 脑中风 2 例, 脑梗塞后瘫痪 1 例。褥疮分级 III° 4 处, IV° 5 处, 褥疮面积 8 cm 以上 4 处, 6 cm 以上 2 处, 5 cm 以下 3 处。褥疮发生的部位: 骶尾部 4 处, 髌部 1 处, 足跟部 2 处, 踝部 2 处。用上海利康公司生产的安尔碘高效消毒液消毒创面周围皮肤, 3 mL/L H₂O₂ 清洗创面, 无菌剪刀剪去死皮及黑痂, 生理盐水冲洗创面, 创面较深或有窦道者用康惠尔溃疡贴糊剂填塞, 再用相应大的康惠尔溃疡贴贴创面, 溃疡贴大小超过创面边缘 1.5 cm 为宜。当溃疡贴外观由黄色变为乳白色时, 说明已吸收饱和, 立即更换敷料。一般刚开始使用时两天更换敷料 1 次, 1 wk 后根据创面愈合情况, 换药时间可适当延长。结果 6 例全部愈合, 褥疮愈合时间 27 ~ 76(平均 62.8) d, 平均换药 40.2 次, 治疗中未见副作用, 换药局部无皮疹、红肿、感染症状, 愈

2 讨论 康惠尔溃疡贴是一种新型的水胶体敷料, 对创面愈合有较好的促进作用^[1], 其表层为聚氨基甲酸二酯半透膜, 允许氧气和水蒸气通过, 阻隔水分和各种微生物的侵入, 对褥疮起到保洁、保湿作用, 同时维持褥疮部位的氧气压, 促进微循环, 有利于肉芽组织的生长。由于这类敷料弹性好和中间厚、四周薄的特殊结构设计, 与皮肤粘贴紧密不易脱落, 不限制躯体活动, 对危重老年长期卧床受压的皮肤可进行保护性治疗。其康惠尔清创胶、溃疡糊促进黑痂脱落, 可填塞窦道, 促进肉芽组织生长, 溃疡粉可促进上皮组织生长。由于湿润创面的自溶作用, 其愈合可简化清创术, 促进伤口的清洁, 伤口渗出少, 含有相当数量的生长因子, 而且湿润创面可保护肉芽组织颗粒, 有助于创面的上皮化^[2-3]。此外, 它能保持湿润环境加速创面的上皮化、肉芽形成, 维生素和坏死物质的降解, 抑制了细菌的繁殖和扩散, 从而缩短了创面愈合的时间, 降低感染率, 敷料与创面不粘连, 对新生上皮和肉芽组织无损伤, 使用后伤口分泌物减少, 疼痛减轻, 愈后无明显疤痕形成。护理操作简便, 省时省力、无副作用, 同时有效避免了老年卧床患者大小便后污染创面, 从一定程度上缩短了患者治疗时间, 节省了费用, 减轻临床护理工作量, 值得推广。

【参考文献】

- [1] 徐归燕. 长期卧床病人的褥疮管理[J]. *国外医学护理学分册*, 1992, 11(3): 12.
- [2] 李亚洁. 密闭性敷料的研究和展望[J]. *国外医学护理学分册*, 2002, 21(3): 105.
- [3] Kerstein MD. Moist wound healing[J]. *Am J Surg*, 1994, 167(1A): 1.

收稿日期 2006-07-30; 接受日期 2006-08-25

作者简介: 刘西梅, 主管护师. Tel: (029) 82245824 Email: li-

uximei1971@163.com

编辑 许昌泰