

通用引物巢式PCR法对哈萨克族食管鳞癌HPV感染的检测

陈卫刚, 杨春梅, 徐丽红, 张宁, 刘晓燕, 马云贵, 霍小玲, 韩玉胜, 田德安, 郑勇

陈卫刚, 杨春梅, 徐丽红, 张宁, 刘晓燕, 郑勇, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

马云贵, 新疆伊犁哈萨克自治州新源县人民医院 新疆维吾尔自治区新源县 835800

霍小玲, 新疆生产建设兵团农四师医院 新疆维吾尔自治区伊宁市 835000

韩玉胜, 新疆伊犁哈萨克自治州友谊医院 新疆维吾尔自治区伊宁市 835000

田德安, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430000

陈卫刚, 主任医师, 副教授, 主要从事消化系肿瘤的基础与临床研究。

国家“十一五”科技支撑计划基金资助项目, No. 2009BAI82B05

作者贡献分布: 郑勇与田德安对本文所作贡献均等; 此课题由郑勇、田德安及陈卫刚设计; 研究过程由陈卫刚、徐丽红、张宁、杨春梅及刘晓燕操作完成; 研究所有组织收集工作由马云贵、霍小玲及韩玉胜共同完成; 数据分析由陈卫刚、杨春梅及刘晓燕完成; 本论文写作由郑勇、田德安及陈卫刚完成。

通讯作者: 郑勇, 主任医师, 教授, 博士生导师, 832000, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科. zy2850@126.com

电话: 0993-2858876

收稿日期: 2011-10-24 修回日期: 2012-01-29

接受日期: 2012-03-28 在线出版日期: 2012-04-28

Received: 2011-10-24 Revised: 2012-01-29
Accepted: 2012-03-28 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To detect human papillomavirus (HPV) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in Xinjiang Kazakh patients by universal primer-mediated nested PCR to investigate the relationship between HPV infection and ESCC.

METHODS: DNA was isolated from ESCC and healthy esophageal mucosal specimens from Xinjiang Kazakh adults and used to amplify HPV using universal primers HPV MY09/11 and HPV-specific primers HPV G5+/6+ by nested PCR. The rate of HPV infection was then calculated.

RESULTS: The rate of HPV infection was 66.67% in the ESCC group and 12.12% in the healthy control group.

CONCLUSION: HPV infection may be involved in the development of ESCC in Xinjiang Kazakh adults. Universal primer-mediated nested PCR is a convenient and reliable method for detection of HPV-DNA.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Human papilloma virus; Nested PCR

Chen WG, Yang CM, Xu LH, Zhang N, Liu XY, Ma YG, Huo XL, Han YS, Tian DA, Zheng Y. Detection of human papilloma virus in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients by general primer-mediated polymerase chain reaction. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(12): 1049-1053

摘要

目的: 应用通用引物巢式PCR技术检测新疆哈萨克族食管鳞癌人乳头瘤病毒(HPV)的感染率, 并探讨HPV与新疆哈萨克族食管鳞癌的关系。

方法: 提取新疆哈萨克族食管鳞癌及正常食管组织的DNA, 应用通用引物HPV MY09/11及HPV G5+/6+进行巢式PCR, 检测新疆哈萨克族食管鳞癌中HPV的感染率。

■背景资料

人乳头瘤病毒(HPV)是双链DNA病毒, 与多种恶性肿瘤相关, 包括食管癌、口腔癌和肺癌等。然而, HPV在恶性肿瘤中的发病机制仍存在争议。

Detection of human papilloma virus in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients by general primer-mediated polymerase chain reaction

Wei-Gang Chen, Chun-Mei Yang, Li-Hong Xu, Ning Zhang, Xiao-Yan Liu, Yun-Gui Ma, Xiao-Ling Huo, Yu-Sheng Han, De-An Tian, Yong Zheng

Wei-Gang Chen, Chun-Mei Yang, Li-Hong Xu, Ning Zhang, Xiao-Yan Liu, Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yun-Gui Ma, Xinyuan County People's Hospital, Xinyuan 835801, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Xiao-Ling Huo, Production and Construction Corps Non-sishi Hospital, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yu-Sheng Han, Youyi Hospital, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Yong Zheng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zy2850@126.com

■同行评议者

任浩, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

■研发前沿
HPV已经是导致食管癌发病率高的一个重要的病因学因素,更多研究证明HPV存在于食管鳞癌的早期发生过程中,有望成为食管癌早期诊断的分子生物学指标之一。

结果:巢式PCR法扩增后检测到食管鳞癌中HPV感染率为66.67%,正常对照组为12.12%,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。

结论:本实验结果表明HPV可能是新疆哈萨克族食管癌发生的一个重要病因学因素,结合通用引物巢式PCR法可以更加方便可靠的检测HPV-DNA。

关键词:哈萨克族食管鳞癌;人乳头瘤病毒;巢式PCR法

陈卫刚,杨春梅,徐丽红,张宁,刘晓燕,马云贵,霍小玲,韩玉胜,田德安,郑勇.通用引物巢式PCR法对哈萨克族食管鳞癌HPV感染的检测.世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1049-1053

<http://www.wjnet.com/1009-3079/20/1049.asp>

0 引言

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是双链DNA病毒^[1],与多种恶性肿瘤相关,包括食管癌、口腔癌和肺癌等^[2].然而,HPV在恶性肿瘤中的发病机制仍存在争议.自1944年Syrjanen首次报道了HPV与食管鳞癌的关系后^[3,4],大量研究揭示HPV已经是导致食管癌发病率高的一个重要的病因学因素^[5-8],更多研究证明HPV存在于食管鳞癌的早期发生过程中,有望成为食管癌早期诊断的分子生物学指标之一.新疆哈萨克族是我国食管癌的高发民族,已有研究提示HPV16在哈萨克族食管癌中的感染率达到40%^[9].然而,HPV在食管癌中的报道至今仍存在争议,在0-100%之间均有一些报道^[10],原因可能是检测感染率的方法不同引起的.本次研究首次应用巢式PCR法检测新疆哈萨克族食管癌中HPV的感染率,对新疆哈萨克族感染HPV的阳性率进行初步筛查,以期发现HPV与新疆哈萨克族食管癌高发的关系,并为后期进行哈萨克族食管癌HPV基因芯片的检测做好准备工作.

1 材料和方法

1.1 材料 本实验采用1:1病例对照,共收集132例食管组织作为研究对象,来自本课题组新疆伊犁哈萨克族聚集地-新源县现场,及新疆伊犁哈萨克族自治州友谊医院、兵团农四师医院和新源县人民医院于2009-2011年收集的标本.所有病例均未作任何化学、放射治疗,66例食管癌组织均经病理组织学确诊为鳞状细胞癌,其中男37例,女29例,平均年龄56(45-67)岁.收集66例未患食管癌的哈萨克族正常食管组织作为

对照组,其中男41例,女25例,年龄30-68岁,平均年龄49岁.DNA提取试剂盒购自QIAGEN公司;内参β-actin引物、G5+/6+及MY09/11均由上海生物工程有限公司合成;PCR试剂购自北京天根生化科技有限公司;PCR扩增仪T-G ra-dient Thermoblock型(Biometra, 德国);GelDoc凝胶成像分析仪(Bio-Rad, 美国).

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取:采用美国QIAGEN DNA Micro Kit试剂盒,具体步骤:将重量约为2-3 mg的食管黏膜置于1.5 mL EP管;加入180 μL的ATL缓冲液和20 μL的蛋白酶K,振荡混匀15 s后,置于56 °C水浴锅里过夜;次日加入200 μL的AL缓冲液,振荡混匀15 s;加入200 μL酒精,振荡15 s后室温静置5 min;将所有液体转移到离心柱里,以8 000 r/min离心1 min;加入500 μL AW1缓冲液,以8 000 r/min离心1 min;加入500 μL AW2缓冲液,以8 000 r/min离心1 min;以14 000 r/min离心3 min后将离心柱置于1.5 μL的EP管;加入30 μL的AE缓冲液后离心.所有DNA均经过分光光度计进行浓度及纯度测量, A_{260}/A_{280} 在1.7-2.1之间,DNA浓度平均在100 μg/L,均为合格样本.提取DNA.

1.2.2 内参检测DNA:内参β-actin引物序列为上游: ctccatcctggcctcgctgt, 下游: rgctgtcacccaccgttcc, 扩增片段为268 bp. 反应条件为: 94 °C 5 min预变性, 94 °C 30 s → 58 °C 45 s → 72 °C 45 s, 35个循环, 72 °C延伸10 min. 应用内参行PCR.

1.2.3 巢式PCR法:此法采用两种HPV通用引物分别为: G5+/6+和MY09/11,引物具体序列见表1.所有PCR体系均采用25 μL的反应体系.试验采用宫颈癌阳性标本作为对照,调整PCR反应条件. PCR方法:首先采用MY09/11进行首次PCR, 10×Reaction Buffer 2.5 μL, dNTP 2.5 μL(200 mmol/L),引物1 μL(0.15 mmol/L),Taq酶0.5 μL, DNA 2.5 μL(平均50 μg/L); ddH₂O 16 μL. 反应条件为: 94 °C 5 min预变性, 94 °C 30 s → 57 °C 30 s → 72 °C 45 s, 35个循环, 72 °C延伸10 min.再将扩增产物作为模板,用G5+/6+进行巢式PCR, 反应条件为: 94 °C 5 min预变性, 94 °C 30 s → 58 °C 30 s → 72 °C 45 s, 35个循环, 72 °C延伸10 min.取出3 μL PCR反应产物,用2%琼脂糖电泳, 5×Loading Buffer进行染色,紫外线灯下分析结果.用MY09/11进行首次PCR.用G5+/6+进行巢式PCR.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行处理. 阳性率的比较采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

表 1 引物序列

引物	5'-3'序列	基因位置	长度(bp)	扩增大小(bp)
HPV/MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATCa	L1	20	398
HPV/MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGGa	20	398	
HPV/G5+	TTTGTTACTGTGGTAGACTAC	L1	23	150
HPV/G6+	GAA AAATAAACTGTAAATCATATT	25	150	

a: M = A+C; R = A+G; W = A+T; X = G+C.

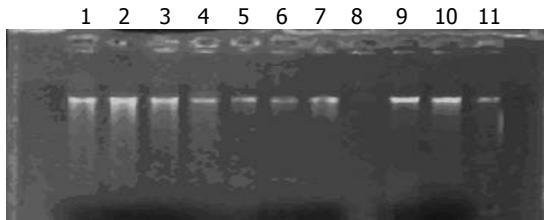


图 1 1%琼脂糖凝胶电泳检测食管组织DNA. 8: 阴性对照; 1-7, 9-11提取成功.

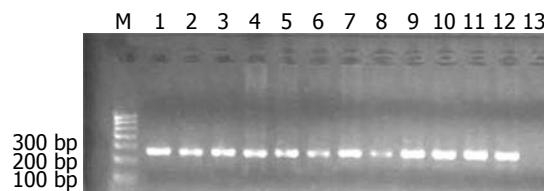


图 2 内参行PCR电泳图片. M: Marker1, 分子量约为268 bp; 1-12: 阳性标本; 13: 阴性标本.

2 结果

对提取的组织DNA的完整性进行电泳检测如图1, PCR检测内参表达结果如图2.

2.1 食管癌组HPV感染率与性别关系 食管鳞癌中HPV感染率无性别差异(表2).

2.2 食管癌组及正常对照组经通用引物巢式PCR后两组HPV感染率比较 用MY09/11进行首次PCR并结合G5+/6+进行巢式PCR的结果如图3, 4. 行巢式PCR后可检测到食管癌组HPV感染率为66.67%, 对照组为12.12%. 根据表的 χ^2 检验, 可得到 $P<0.05$, 表明新疆哈萨克族食管癌感染HPV的阳性率明显高于正常对照组, 两者阳性率差异具有统计学意义(表3).

3 讨论

HPV是一类双链闭合环状DNA病毒, 基因组约为8 000 bp^[11], HPV DNA基因组按其功能分为3个编码区: (1)早期基因编码参与病毒DNA复制、转录及细胞转化的蛋白; (2)晚期基因编码病毒结构蛋白; (3)上游调节区位于E区和L区之间, 包含启动子等调控元件, 与病毒DNA复制转

■创新点

本实验应用通用引物巢式PCR法初步筛查了新疆哈萨克族食管鳞癌的HPV感染率并发现新疆哈萨克族食管鳞癌与HPV的关系.

表 2 性别分布

性别	n	阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2 值	P值
男性	37	28	9	64.86		
女性	29	24	5	64.96	0.12	>0.05
总数	66	52	14	66.67		

表 3 食管癌组和正常对照组HPV感染率

分组	阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2 值	P值
食管癌组	44	22	66.67		
正常组	8	58	12.12	41.12	<0.05

录的调控有关^[12]. 现已经明确基因组全序列有80多种DNA病毒分型^[13]. 其中15种高危致病亚型包括HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73和82^[14,15], 与多种良恶性肿瘤有关^[16], 例如宫颈癌、肺癌、头颈部癌、消化系肿瘤等. 目前已有证实HPV16和HPV18病毒分型与食管癌相关. 但是, 关于新疆食管癌高发民族-哈萨克族感染HPV的相关研究, 目前知之甚少.

本实验应用通用引物MY09/11行PCR后, 食管癌组HPV感染率仅为7.58%, 正常对照组均为阴性, 阳性率偏低. 再次应用通用引物GP5+/6+进行巢式PCR时就能出现明显的扩增产物, 食管癌组和对照组HPV感染率分别为66.67%和12.12%, 两组阳性率均明显增高. 表明巢式PCR法明显提高了灵敏度, 说明PGMY/GP方法是灵敏而可靠的^[17]. 阳性率提高的原因是因为MY09/11和GP5+/6+是从HPV-L1区中选择保守序列设计合成通用引物, 该引物与6, 11, 16, 18, 33型有互补序列, 可扩增其他型别的HPV^[18]. 本实验应用2种通用引物巢式PCR法一次检测包括HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 52, 53, 56和58共15个病毒型别, 初步筛查了新疆哈萨克族食管鳞癌的HPV感染率. 此外, 本次研究发现新疆哈萨克族食管鳞癌与HPV的关系, 根据实验结

■ 同行评价

本研究具有较强的创新性和较好的临床应用价值,为HPV与食管癌及后者的早期诊治提供了一定依据。

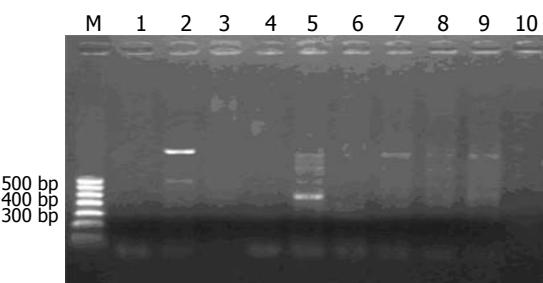


图3 应用MY09/11行PCR。M: 700 bp的Marker 1; 1-4, 6-10: 阴性; 5: HPV MY09/11的阳性位置, 在400 bp左右。

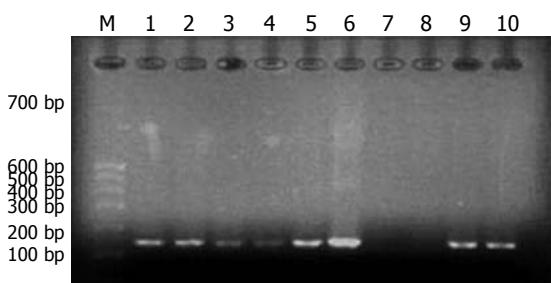


图4 巢式PCR。M: 700 bp的Marker 1; 1-6, 9-10: 巢式PCR法的阳性位置, 在150 bp左右; 7, 8: 阴性。

果哈萨克族食管癌HPV感染率无男女性别差异。

本次实验结果显示新疆哈萨克族食管癌中HPV的感染率为66.67%,与端木忠等^[19]的汉族食管癌HPV感染率38.3%相比较高。本实验结果与国内外相关实验不符的原因,考虑存在以下3方面因素:(1)HPV感染可能存在种族差异;(2)HPV在正常人群消化系中都有一定的感染率,具有自限性,大部分感染是暂时的。当机体的防御机制改变或者宿主的基因发生突变时,HPV感染可发生恶性转化。而新疆哈萨克族生存环境较差,饮食单一,缺乏叶酸、维生素等营养物质,又好食烫、咸奶茶,结合肿瘤的发生是由多种因素共同作用形成^[20],故考虑新疆哈萨克族食管癌中HPV的高感染率可能由于抑癌基因的失活、癌基因的激活等因素共同作用导致;(3)本次实验结果HPV感染率高可能为检测方法不同导致的,本实验应用通用引物巢式PCR法一次可检测15种病毒型别在食管癌中感染率,较单独设计15种病毒型别的引物检测HPV感染率更加方便、可靠,当然,此方法的不足之处是无法明确每个阳性标本中具体感染哪一种病毒分型,或者是同时感染哪几种病毒分型。

总之,HPV感染是新疆哈萨克族食管鳞癌发生的重要危险因素之一,HPV可能是新疆哈萨克族食管癌发生的一个重要病因而学因素。本次实验筛选出食管鳞癌组感染HPV的阳性标本后,

后续将针对阳性标本进行含有23种型别探针的基因芯片的检查,以期发现与新疆哈萨克族食管癌发生密切相关的特异性HPV高危致病亚型,为食管癌的分子生物学机制提供理论基础。

4 参考文献

- 廖佩花, 谭晓华, 张海峰, 雷丽娟, 曾同霞, 陈波, 李锋, 杨磊, 秦江梅. HPV6b感染与新疆哈萨克族食管癌的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 194-197
- Tew WP, Kelsen DP, Ilson DH. Targeted therapies for esophageal cancer. *Oncologist* 2005; 10: 590-601
- Herrera-Goepfert R, Lizano M, Akiba S, Carrillo-García A, Becker-D'Acosta M. Human papilloma virus and esophageal carcinoma in a Latin-American region. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3142-3147
- Gao GF, Roth MJ, Wei WQ, Abnet CC, Chen F, Lu N, Zhao FH, Li XQ, Wang GQ, Taylor PR, Pan QJ, Chen W, Dawsey SM, Qiao YL. No association between HPV infection and the neoplastic progression of esophageal squamous cell carcinoma: result from a cross-sectional study in a high-risk region of China. *Int J Cancer* 2006; 119: 1354-1359
- Xueqian Wang, Xiuyun Tian, Fangfang Liu, Yiqiang Zhao, Min Sun, Dafang Chen, Changdong Lu, Zhong Wang, Xiaotian Shi, Qingying Zhang, Dong-hong Zhang, Zhongying Shen, Feng Li, Curtis C Harris, Hong Cai, Yang Ke. Detection of HPV DNA in esophageal cancer specimens from different regions and ethnic groups: a descriptive study. *BMC Cancer* 2010; 10: 19-29
- Mammas IN, Sourvinos G, Zaravinos A, Spandidos DA. Vaccination against human papilloma virus (HPV): epidemiological evidence of HPV in non-genital cancers. *Pathol Oncol Res* 2011; 17: 103-109. Epub 2010 Jul 18
- Afonso LA, Moysés N, Cavalcanti SM. Human papillomavirus detection and p16 methylation pattern in a case of esophageal papilloma. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 694-696
- 马群风, 江红, 冯永强, 王小平, 周勇安, 刘锟, 贾再利. 人食管鳞状细胞癌标本中乳头状瘤病毒DNA的检测. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1218-1224
- Ayshamgul H, Ma H, Ilyar S, Zhang LW, Abulizi A. Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 341-346
- Bohn OL, Navarro L, Saldivar J, Sanchez-Sosa S. Identification of human papillomavirus in esophageal squamous papillomas. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7107-7111
- Kusumoto-Matsuo R, Kanda T, Kukimoto I. Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes Cells* 2011; 16: 23-33
- Rachel Raybould, Alison Fiander, Sam Hibbitts. Human Papillomavirus Integration and its Role in Cervical Malignant Progression. *The Open Clinical Cancer Journal* 2011; 5: 1-7
- Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol* 2007; 107: S2-S5
- Alba A, Cararach M, Rodríguez-Cerdeira C. The Human Papillomavirus (HPV) in Human Pathol-

- ogy: Description, Pathogenesis, Oncogenic Role, Epidemiology and Detection Techniques. *The Open Dermatology Journal* 2009; 3: 90-102
- 15 Jalal H, Stephen H, Bibby DF, Sonnex C, Carne CA. Molecular epidemiology of genital human papillomavirus and Chlamydia trachomatis among patients attending a genitourinary medicine clinic - will vaccines protect? *Int J STD AIDS* 2007; 18: 617-621
- 16 姜蕊, 吴翠环, 郑丽端, 赵时宇, 陈多恩. 人乳头瘤病毒感染与非小细胞肺癌发生的相关性. 华中科技大学学报(医学版) 2005; 34: 141-144
- 17 Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Hanna N, Woo YL, Fränzer JT, Sterling JC, Stanley MA, Sudhoff H, Goon PK. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer* 2009; 9: 440
- 18 Cobo F, Talavera P, Concha A. Review article: relationship of human papillomavirus with papillary squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a review. *Int J Surg Pathol* 2008; 16: 127-136
- 19 端木忠, 田韧, 曹秀峰. HPV与食管癌的关系. 实用医技杂志 2005; 12: 11-12
- 20 Lu Y, Zhang Z, Liu Q, Liu B, Song X, Wang M, Zhao X, Zhao Q. Immunological protection against HPV16 E7-expressing human esophageal cancer cell challenge by a novel HPV16-E6/E7 fusion protein based-vaccine in a Hu-PBL-SCID mouse model. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 150-156

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价.

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术.

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务.