技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)12-1689-03

喉癌中 HPV 不同亚型的检测及测序

彭方毅[1],姜海蓉[1],刘 芳[2],杜志银[3],林治华[1],彭方亮[4],赵卫兵[5]

(1. 重庆理工大学化学与生物工程学院制药工程系,重庆 400050;2. 重庆市江北区第一人民医院检验科,重庆 400020;3. 重庆医科大学图书馆文献检索教研室,重庆 400016;4. 重庆市第四人民医院妇产科,重庆 400014;5. 重庆市第四人民医院麻醉科 重庆 400030)

【摘 要】目的:检测人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)各型 DNA 在喉癌组织中的表达,探讨 HPV 在喉癌发生中的作用。方法:用 PCR 检测 123 例喉癌组织及 123 例喉粘膜上皮组织中 HPV 各型 DNA。同时进行 DNA 测序,结果:在 123 例喉癌标本中,HPV-L1,-16E6/E7,-18E6/E7 阳性率都明显高于其他各型。123 例喉粘膜 PCR 结果表明:低危型 HPV 的阳性率与喉癌相近;高危型 HPV 的阳性率虽远远低于喉癌,但随着组织病变程度加重阳性率逐渐升高;HPV-L1 的阳性率高于 HPV-16E6、E7,随着组织病变程度加重,HPV-L1 的检出率逐渐增高。结论:HPV-16 感染会增强喉上皮病变的风险,而 HPV-18 有协同作用;L1 片段适合用于检测 HPV 感染。

【关键词】人乳头瘤病毒; 聚合酶链反应; 序列测定; 喉癌

【中国图书分类法分类号】R739.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-08

Detection and sequencing of different subtypes of HPV in laryngeal carcinoma

PENG Fang-yi, et al

(*Pharmaceutical Engineering Specialty, School of Chemistry and Bioengineering, Chongqing University of Technology*)

【Abstract】*Objective*: To look for the further evidence for different subtypes of HPV as carcinogenic factors in laryngeal carcinoma. *Methods*: We examined representative numbers of specimens from laryngeal cancer with highly sensitive PCR technique and sequencing for the presence of different subtypes of HPV. *Results*: The positive rates of HPV-L1, -16E6/E7, -18E6/E7 were significantly higher than other types in 123 cases of laryngeal carcinoma specimens. PCR was used to screen the prevalence of HPV infection. The prevalence of HPV-16E6 was lower than laryngeal carcinoma. But, as the cells undergoing pathological progress, the HPV-16E6 positive rate was increased. The prevalence of HPV-16E7 was similar to the prevalence of HPV-16E6. The positive rate of HPV-L1 was the highest and the prevalence of HPV-L1 was significantly increased as the cells underwent pathological progress.*Conclusion*: HPV-16 and HPV-18 may synergistically function on the pathogenesis of laryngeal epithelium. L1 segment is fit for detecting HPV infection.

【Key words】HPV; Polymerase chain reaction; Sequencing; Laryngeal carcinoma

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)与喉癌的关系,一直是病因学研究的热点。自首次从喉癌中发现 HPV 以来,人们进行了广泛深入的研究,并取得了一些共识,但不可否认的是阳性检出率相差很大(3%~100%不等)[1]。本实验利用 PCR 和 DNA 测序方法,对重庆地区的 123 例喉癌组织及 123 例喉粘膜上皮进行检测,观察 HPV 不同亚型在喉癌及癌前病变中的表达及其与 HPV 感染的关系。

1 材料和方法

1.1 标本

喉鳞癌 123 例标本来源于 1998 年 7 月至 2008 年 7 月重庆市肿瘤医院及重庆市第四人民医院手术切除标本。所有病例术前均未经放射治疗或化学治疗。其中男 98 例、女 25 例,最高年龄 84 岁,最低 23 岁,平均 61.0 岁。病理分级:高分化 68 例,中分化 47 例,低分化 8 例。全部病例均未发现有远处转移。以上所有标本经常规福尔马林固定、石蜡包埋、连

作者介绍:彭方毅(1970-),男,博士,研究方向:肿瘤分子生物学。

通讯作者:姜海蓉,女,讲师,E-mail:r0102@cqut.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571714;60873103);国家自然科学基金重点项目(30830090);重庆市科委自然基金(CSTC,2008BB5331;2009BB7231);重庆市教委自然基金(KJ090614)。

续切片(5 μm 厚)。123 例喉粘膜上皮,均为既往无喉疾病史,部分有轻微喉相关症状者。其中,男 100 例、女 23 例,平均年龄 54.9 岁。病理诊断结果为：该组标本正常喉上皮 72 例、轻度不典型增生 11 例、重度不典型增生 16 例、癌前病变 24 例。

1.2 细胞株及试剂

Hela 细胞和 Caski 细胞本室保存。Taq 酶(Promega 公司)。蛋白酶 K(Merk 公司)。

1.3 引物

详见表 1。所用引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 PCR 检测方法

所有 PCR 均采用 25 μl 反应体系：10 × PCR buffer (2.5 μl);25 mmol/L Mg^{2+} (1.5 μl);10 mmol/L dNTP (0.5 μl);5 μmol/l Primer1(1.0 μl);5 μmol/L Primer2(1.0μl);TaqDNA polymerase(0.3 μl);TemplateDNA(2.0 μl);ddH_2O(16.2 μl)。阳性对照为 Hela 细胞(HPV-18 阳性)、Caski 细胞(HPV-16 阳性)的 DNA;HPV-31E7、33E7、45E7、52E7 全长质粒,阴性对照不加模板。在 PCR 扩增仪上进行如下反应:94℃预变性 2 min,94℃变性 45 s,58℃复性 45 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环后,72℃再延伸 5 min。20 μl PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳（含 0.5 μg/ml 溴化乙锭),75 V,1 h 后在紫外灯下观察结果并拍照。

1.5 HPV DNA 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

2 结 果

2.1 喉癌组织 HPV DNA PCR 及测序结果

阳性 PCR 产物凝胶电泳后在约 150、321、100、415 和 100 bp 处出现扩增带，分别为 HPV 通用型 L1、特异型 -16E6、-16E7、-18E6 和 -18E7、-31E7、-33E7、-45E7、-52E7 阳性(图 1)。

123 例喉癌标本中，绝大多数 HPV-18 与 HPV-16 共感染于同一病例。以上各特异型有一项为阳性者则通用型 L1 也为阳性。以上指标有一项阳性则判断为 HPV 感染,得出喉癌中 HPV 的总阳性率为 76.42%(表 2)。

对 123 例喉癌标本进行 DNA 测序,结果表明 HPV 各特异型大多与 HPV-16 型共感染于同一病例,HPV-L1 阴性的标本中没有出现 HPV 特异型阳性的结果。

2.2 喉标本 PCR、DNA 测序结果见表 3

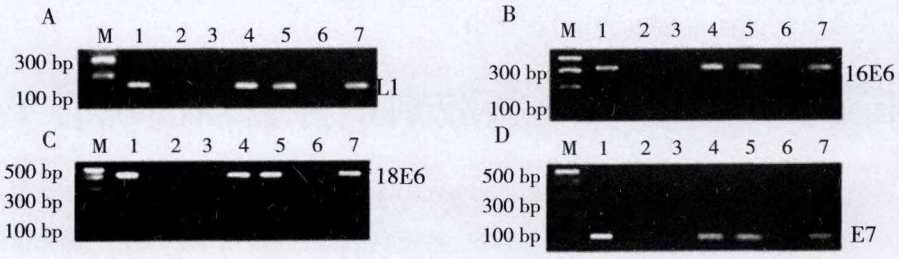
123 例喉粘膜样本中 HPV-16E6 PCR 阳性者绝大多数同时 HPV-18 E6 阳性。随着组织病变加重 HPV-L1、16 E6/E7 和 18 E6/E7 的检出率增高(表 3)。

3 讨 论

HPV 在喉癌中的检测,以往文献已有报道,但因结果不同尚无定论[2-6]。本课题用不同引物进行 PCR 检测,同时进行 DNA 测序。从多方面研究重庆地区喉癌患者及喉上皮病变与 HPV 感染的关系。

表 1 HPV 引物序列及扩增长度

引物名称	引物序列	扩增长度
HPV L1	GP5:TTTGTTACTGTGGTAGATAC(CT)AC	150 bp
	GP6:GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	
HPV16E6	U:GCAAGCAACAGTTACTGCGA	321 bp
	D:CAACAAGACATACATCGACC	
HPV16E7	U:GATGAAATAGATGGTCCAGC	100 bp
	D:GCTTTGTACGCACAACCGAAGC	
HPV18E6	U:GCGCTTTGAGGATCCAACAC	415 bp
	D:ACGAATGGCACTGGCCTCTA	
HPV18E7	U:AAGAAAACGATGAAATAGATGGA	100 bp
	D:GGCTTCACACTTACAACACA	
HPV31E7	U:GGGCTCATTTGGAATCGTGTG	100 bp
	D:AACCATTGCATCCCGTCCCC	
HPV33E7	U:TGAGGATGAAGGCTTGGACC	100 bp
	D:TGACACATAAACGAACTGTG	
HPV45E7	U:CCCACGAGCCGAACCACAG	100 bp
	D:TCTAAGGTCCTCTGCCGAGC	
HPV52E7	U:GCAGAACAAGCCACAAGCAA	100 bp
	D:TAGAGTACGAAGGTCCGTCG	
β-actin	U:GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	268 bp
	D:CAACTTCATCCACGTTCACC	



A. HPV-L1；B. HPV-16E6；C. HPV-18E6；D. HPV-E7；M. 600 bp marker; 1. 阳性对照;2. 阴性对照(water); 4、5、7. 阳性样本; 3、6. 阴性样本

图 1　喉癌中 HPV 的 PCR 结果

表 2　123 例喉癌中 HPV 检测阳性率

	靶基因	阳性病例	百分比
PCR	L1	94	76.42%
	16E6	67	54.47%
	16E7	72	58.54%
	18E6	52	42.28%
	18E7	60	48.78%
	31E7	13	10.57%
	33E7	10	8.13%
	45E7	9	7.32%
	52E7	15	12.20%
DNA 测序	6	14	11.38%
	11	15	12.20%
	26	3	2.44%
	54	6	4.88%
	58	4	3.25%
	73	2	1.63%
	84	4	3.25%

表 3　喉粘膜 HPV 检出率(%)

病理类型		总百分比(%)	正常粘膜	轻度增生	重度增生	癌前病变
n		123	72	11	16	24
PCR	L1	41(33.33)	14(19.44)	4(36.36)	9(56.25)	17(70.83)
	16E6	30(24.39)	8(11.11)	3(27.27)	7(43.75)	12(50.00)
	16E7	29(23.58)	7(9.72)	3(27.27)	7(43.75)	12(50.00)
	18E6	26(21.14)	7(9.72)	3(27.27)	6(37.50)	10(41.67)
	18E7	26(21.14)	7(9.72)	3(27.27)	6(37.50)	10(41.67)
	31E7	0	0	0	0	0
	33E7	1(0.81)	0	0	1(6.25)	0
	45E7	0	0	0	0	0
	52E7	2(1.63)	0	1(9.09)	0	1(4.17)
DNA 测序	6	13(10.57)	7(9.72)	1(9.09)	2(12.50)	3(12.50)
	11	15(12.20)	9(12.50)	1(9.09)	2(12.50)	3(12.50)
	54	8(6.50)	5(6.94)	0	1(6.25)	2(8.33)
	58	1(0.81)	0	0	1(6.25)	0
	84	2(1.63)	0	2(18.18)	0	0

技术与方法 文章编号：0253-3626(2009)12-1692-04

正交试验优选鼻炎凝胶剂中挥发油的包合工艺

卓玉娟，刘 新，马廉举，喻录容

（重庆医科大学药学院临床药学教研室、重庆医科大学药物工程中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：优选 β－环糊精包合鼻炎凝胶剂中挥发油的最佳工艺条件。方法：采用正交试验法，以包合物收率和挥发油的包合率作为考察指标，确定包合的最佳工艺条件；用显微镜观察法、薄层色谱法（Thin-layer chormatography，TLC）、紫外扫描法（Ultraviolet spectroscop，UV）和差示扫描热分析（Differential scanning calorimety，DSC）进行鉴别。结果：包合的最佳工艺条件为挥发油：β－环糊精（ml/g）为 1:8，包合温度为 80℃，包合时间为 1 h。结论：优选工艺方法简单，效率较高，适合工业化生产。

【关键词】鼻炎凝胶剂；挥发油；β－环糊精；正交试验；包合

【中国图书分类法分类号】R283.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-26

Optimizing the inclusion process of volatile oil in anti-rhinitis medicine through orthogonal experiment

ZHUO Yu-juan, et al

(*Departmetn Clinical pharmacy College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To optimize β-cyclodextrin inclusion process in the inclusion of volatile oil in anti-rhinitis gel. *Methods*: Orthogonal experiment was performed, and the inclusion process was evaluated with inclusion rate of volatile oil, recovery rate of inclusion compound as indexes. The findings were distinguished by microscopy, thin-layer chormatography (TLC), ultraviolet spectroscop (UV) and differential scanning calorimety (DSC). *Results*: The optimized inclusion condition was as follows. The rate of volatile oil to β-cyclodextrin was 1:8 (ml/g), the inclusion temperature was at 80℃ and inclusion time was 1 h. *Conclusion*: The optimized method was simple and efficient, and suitable for industrialized production.

【Key words】Anti-rhinitis gel; Volatile oil; β-cyclodextrin; Orthogonal experiment; Inclusion

作者介绍：卓玉娟（1979- ），女，硕士，

研究方向：中药制剂研究。

通讯作者：刘 新，男，教授，E-mail:liuxin8829@sina.com。

基金项目：重庆市教委自然科学基金资助（编号：KJ080309）。

123 例喉癌组织，确实存在 HPV 感染。PCR 和 DNA 测序结果让我们了解了重庆地区喉癌中 HPV 的感染情况。用 PCR 方法检测，L1 片段的检出率最高，16E6、E7 的检出率次之，18E6、E7 的检出率再次之。E6、E7 两者符合得很好。其它各特异型的检出率均较低，可能不是引起喉癌的主要的病毒性病因。

在喉癌中，用 HPV-16、-18 特异 E6/E7 引物和 L1 区设计的通用型引物所测得的阳性率均较高，从另一个侧面反映在喉癌中，HPV 的整合可能是一个比较普遍的现象。HPV-E6、E7 的 PCR 结果符合性很好，说明在整合过程中，E6、E7 常一起保留，与宫颈癌中 HPV-E6、E7 的文献报道一致[7-9]。

参 考 文 献

[1] Munger K, Howley P M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions [J]. Virus Res, 2002, 89(2): 213-228.

[2] Gonzalez S L, Stremlau M, He X, et al. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7 [J]. J Virol, 2001, 75(16): 7583-7591.

[3] Lehtinen M, Apter D, Dubin G, et al. Enrolement of 22000 adolescent women to cancer registry follow-up for long-term human papillomavirus vaccine efficacy: guarding against guessing[J]. Int J STD AIDS, 2006, 17(8): 517-521.

[4] McNicol P, Guijon F, Wayer S, et al. Expression of human papillomavirus type16 E6、E7 gene varies quantitatively in biopsy tissue from different grades of cervical intraepithelial neoplasia[J]. Clin Microbiol, 1995, 33(5): 1169-1173.

[5] Morgan D W, Abdullah V, Quiney R, et al. Human papilloma virus and carcinoma of the laryngopharynx[J]. Laryngol Otol, 1999, 105(4): 288-290.

[6] Shen Z Y, Xu L Y, Chen X H, et al. The genetic events of HPV-immortalized esophageal epithelium cells[J]. Int J Mol Med, 2001, 8(5): 537-542.

[7] Sashiyama H, Shino Y, Kawamata Y, et al. Immortalization of human esophageal keratinocytes by E6 and E7 of human papillomavirus type 16 [J]. Int J Oncol, 2001, 19(1): 97-103.

[8] 姜海蓉，彭方毅，刘 芳，等. HPV16-E7 基因的原核克隆及表达，[J]. 重庆医科大学学报，2009，35(9)：1215-1217.

[9] 姜海蓉，彭方毅，陈远翔，等. 原位杂交检测 HPV-16E6，-18E6 在喉癌组织中的表达 [J]. 免疫学杂志，2009，25(4)：442-446.

（责任编辑：关蕴良）