

# 人乳头瘤病毒感染与太行山猕猴食管癌关系的初步探讨

赵进英\* 祝庆蕃 务孔俊\*\* 李新荣

(河南医科大学病理 郑州 450052)

**摘要** 用分子杂交、流式细胞光度分析、免疫组化(ABC法)及电镜等方法对两例太行山猕猴自发食管癌标本进行检测,结果发现:两者人乳头瘤病毒6,11,16及18型杂交均强阳性;免疫组化染色阴性;电镜下未发现典型病毒颗粒;流式分析表明,该肿瘤为非整倍体肿瘤,DNA含量及S期细胞峰较正常二倍体细胞明显升高。提示:人乳头瘤病毒感染与太行山猕猴食管癌的发生发展可能有密切关系。

**关键词** 人乳头瘤病毒 食管癌 太行山猕猴 斑点杂交 免疫组化 流动血细胞计数

乳头瘤病毒(Papilloma virus, PV)是一组DNA致癌病毒,可感染人和多种高等动物的鳞状上皮,引起疣状增生性病变<sup>[1,2]</sup>。近年研究还表明,人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus, HPV)与鳞状细胞癌的发生有密切关系<sup>[3,4]</sup>。本文用斑点杂交流式分析、ABC免疫酶染色及电镜等方法对两例太行山猕猴自发食管癌标本进行检测,以探讨HPV感染与太行山猕猴食管癌之间的可能联系。本文研究工作于1990年10月—1992年5月进行,现报告如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 标 本** 两例太行山猕猴生长于河南省境内太行山区,食管癌标本由河南师范大学生物系提供。病理证实均为食管高分化鳞状细胞癌。

## 1.2 方 法

**1.2.1 斑点杂交** 7微米( $\mu\text{m}$ )石蜡切片数张(组织块面积约为 $1\text{cm}^2$ )装入 $1.5\text{mL}$ 塑料离心管中,二甲苯脱蜡两次,无水酒精去除二甲苯,自然晾干后每管加入 $0.4\text{mol/L}$  NaOH 50微升( $\mu\text{l}$ ), $80^\circ\text{C}$ 水浴中1小时,离心,吸上清液 $5\mu\text{l}$ 点在硝酸纤维膜上。将杂交膜置 $80^\circ\text{C}$ 烤箱中2小时, $2\times\text{SSC}$ 漂洗杂交膜两次(室温下), $42^\circ\text{C}$ 水浴中预杂交24小时,加入经缺口

翻译标记的HPV6,11,16及18探针混合物(用 $\alpha\text{-}^{32}\text{PdCTP}$ 标记,探针比活性为 $5\times 10^6\text{c.p.m}/\mu\text{g}$  DNA), $42^\circ\text{C}$ 继续杂交48小时。 $0.1\times\text{SSC}$ , $0.1\%$  SDS室温下洗膜两次, $65^\circ\text{C}$ 洗膜三次,每次30分钟,护膜后加两张增感屏于 $-20^\circ\text{C}$ 低温冰箱中曝光5天,显影定影。

**1.2.2 流式细胞光度分析** (Flow Cytometry, FCM)  $40\mu\text{m}$ 石蜡切片3—5片,二甲苯脱蜡两次,每次24小时,弃除二甲苯后依次加入 $100\%$ 、 $95\%$ 、 $80\%$ 、 $70\%$ 、 $50\%$ 梯度酒精各 $5\text{ml}$ ,每步10分钟,弃酒精,加入蒸馏水5分钟后弃之。加入 $5\text{ml}$   $0.5\%$ 胃蛋白酶于 $37^\circ\text{C}$ 恒温水浴中消化30分钟,生理盐水终止消化,300目尼龙网过滤,收集细胞悬液。低速离心,沉淀,弃上清。将每份样品细胞数调至 $10^5$ 个/ $\text{ml}$ ,加鸡红细胞( $10^5$ 个/ $\text{ml}$ ) $0.05\text{ml}$ ,作内插标准。加EB染液(含溴化乙啶 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,RNA酶 $10\mu\text{l}/\text{ml}$ ,Triton-100  $1.0\%$ ) $1.0\text{ml}$ , $4^\circ\text{C}$ 冰箱中染色30分钟上机检测。计算DNA指数(DI)及细胞增殖周期各相对分布频率。

**1.2.3 免疫组化(ABC法)**  $4\mu\text{m}$ 石蜡切片, $60^\circ\text{C}$ 干燥4小时,常规脱蜡至水, $3\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 消除内源性过氧化物酶活力。用 $\text{pH}7.4$ 的PBS

\* 河南省眼科研究所 450003;

\*\* 武警河南总队医院

浸洗, 然后顺序滴加正常山羊血清 孵育 30 分钟, 1:100 兔抗牛乳头瘤病毒血清 (Dako 公司产品) 37°C, 孵育 60 分钟; 生物素标记的抗兔 IgG37°C, 孵育 30 分钟; 卵蛋白-生物素-酶复合物 (Vector 公司产品) 于 37°C, 孵育 30 分钟。每次孵育后都用 PBS(pH7.4) 浸洗 3 次, 每次 5 分钟, 洗去多余未结合的抗体。DAB 显色, 苏木素复染, 光镜观察结果。每次染色中, 作为阳性对照片的标本出现阳性, 而未加一抗的阴性对照片为阴性时, 该次染色有效。

**1.2.4 超微结构观察** 选出石蜡包埋块中需电镜检测的部位, 切出并修成长方形小条, 将小条置二甲苯中脱蜡 40 分钟, 二甲苯/环氧丙烷 (1:1) 中 10 分钟, 纯环氧丙烷 5 分钟 × 2 次, 0.01% 的亚甲兰溶液 (用纯酒精配制) 中染色 20 分钟, 环氧丙烷/混合树脂 (1:1) 中 30 分钟, 40°C 纯树脂中聚合 30 分钟。半薄切片定位, 超薄切片, 透射电镜观察。

## 2 结果

两例标本 HPV6, 11, 16 及 18 杂交均呈强阳性 (见图 1); 免疫组化及电镜检查阴性; DNA 倍体分析表明, 两例太行山猕猴食管癌均为非整倍体肿瘤, DNA 含量及 S 期细胞峰较正常二倍体细胞明显升高。S 期细胞频率为 20%—21% (本研究中用作对照的正常二倍体细胞 S 期细胞百分率为 8.9%) (见图 2, 3)。

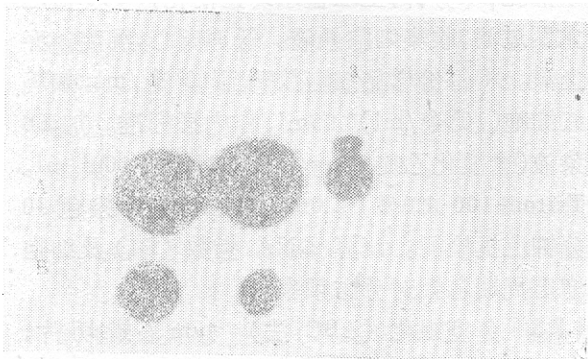


图 1 A<sub>1</sub>—A<sub>6</sub> 为阳性对照 (用 HPV6, 11, 16 及 18 混合物), 剂量 A<sub>1</sub>500pg, A<sub>2</sub>100pg, A<sub>3</sub>50pg; A<sub>5</sub>—A<sub>6</sub> 蒸馏水。B<sub>1</sub>—B<sub>2</sub> 为两例太行山猕猴食管癌标本 HPV 杂交结果, 呈强阳性反应。

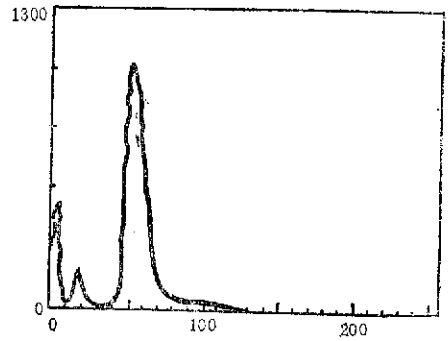


图 2 正常二倍体细胞 (淋巴结细胞) DNA 分布组方图

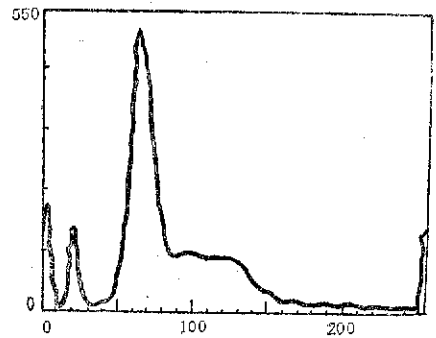


图 3 太行山猕猴食管癌细胞 DNA 分布组方图, 其 G<sub>2</sub>M 及 S 期细胞峰较正常二倍体细胞明显升高。

## 3 讨论

河南省是食管癌高发区, 地处太行山区的林县、辉县等地发病率尤高。常福聚<sup>[5]</sup>等用原位分子杂交法证实林县人食管癌标本中 43.1% 有 HPV6、11、16 及 18 感染。周健<sup>[6]</sup>等用斑点杂交法对该地区食管癌标本的检测结果表明, 其与 HPV 感染有密切关系。

调查结果表明<sup>[7]</sup>, 目前河南境内太行山区约有 30 群 (约 2000 余只) 猕猴。这里猕猴食管癌时有发生。由此, 我们考虑到猕猴食管癌的发生是否也与 HPV 感染有关。国内外尚未见这方面的报道。本研究结果表明, 两例猕猴食管癌标本 HPV 杂交均呈强阳性, 提示 HPV6, 11, 16 及 18 感染与猕猴食管癌的发生有密切关系。猕猴食管癌与该地区人食管癌的发生可能具有相同的病因及发病机制。

目前认为, HPV 感染起始于鳞状上皮的基底细胞。此类细胞分化程度较差, 具有不断

增殖分化成熟的能力<sup>[8,9]</sup>,在其分化成熟过程中,HPV也不断得以增殖并发育成为感染性病毒颗粒。同时,在此过程中,受 HPV 感染的影响,其中一部分细胞可能发生分化紊乱或失去分化能力,从而导致肿瘤的发生。在疣样病变及异型度较小的上皮病变中,存在 HPV 结构抗原及病毒颗粒,而在发育较差的病变上皮中,尽管存在 HPV DNA,但由于 HPV 结构抗原不表达,病毒不装配,故免疫组化及电镜检查阴性。

Evans 等(1983)<sup>[10]</sup>对人宫颈的正常上皮组织,湿疣感染组织及癌组织进行 DNA 倍体分析后提出,HPV 感染宫颈后,其基因整合入宫颈上皮细胞 DNA 中,致上皮异型增生, DNA 含量增多。HPV 感染伴上皮内肿瘤时,细胞常为非整倍体状态,并发现非整倍体病变要比二倍体或多倍体病变更易发生恶变。本研究对两例猕猴食管癌的 DNA 倍体分析表明,肿瘤为非整倍体, DNA 含量较正常二倍体明显升

高。G<sub>2</sub>M 及 S 期细胞增殖旺盛。推测可能系 HPV 感染猕猴食管上皮后,其基因整合入上皮细胞的 DNA 中,引起上皮异型增生,进而发展为癌。

综上所述,HPV 与太行山猕猴食管癌的发生可能具有密切关系。猕猴食管癌与该地区人食管癌的发生可能具有类似的发病机理。此发现对食管癌的病毒病因研究可能具有重要意义。

### 参 考 文 献

- 1 Chang FJ. *J Clin Pathol*, 1990, 43:269.
- 2 Gissmann L, et al. *Cancer Surv*, 1984, 3:161.
- 3 MaCance DJ. *Biochem Biophys Acta*, 1986, 823:195.
- 4 Zur Hausen. *Curr Top Microbiol*, 1977, 78:1.
- 5 Chang F, et al. *Int J Cancer*, 1990, 45:21.
- 6 周 健. 河南医科大学学报, 1987, 22: 1.
- 7 瞿文元. 河南师范大学学报, 1989, 62: 95.
- 8 Broker TR, M Botchan. *Cancer Cells*, 1986, 4:17.
- 9 Howley PM, et al. *Am J Med*, 1989, 85:155.
- 10 Evans AS, et al. *Anal Quant Cytol*, 1983, 5:112.