

视网膜母细胞瘤组织中 HPV-DNA 表达的研究

刘国颖¹, 杨华胜²

作者单位:¹(528200)中国广东省佛山市,南方医科大学附属南海医院眼科;²(510080)中国广东省广州市中山眼科中心眼病与眼肿瘤科

作者简介:刘国颖,硕士,主治医师,研究方向:眼肿瘤、眼眶病、青光眼。

通讯作者:刘国颖. liuguoying_dd@sina.com

收稿日期:2013-07-11 修回日期:2013-10-14

Expression of HPV-DNA in retinoblastoma tissues

Guo-Ying Liu¹, Hua-Sheng Yang²

¹Department of Ophthalmology, Nanhai Hospital of Southern Medical University, Foshan 528200, Guangdong Province, China;²Department of Orbitopathy and Eye Neoplasms, Zhongshan Ophthalmic Center, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Guo-Ying Liu. Department of Ophthalmology, Nanhai Hospital of Southern Medical University, Foshan 528200, Guangdong Province, China. liuguoying_dd@sina.com

Received:2013-07-11 Accepted:2013-10-14

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of HPV-DNA in retinoblastoma tumor samples in China, and to provide preliminary evidence for the role of HPV in sporadic retinoblastoma (RB).

• **METHODS:** Fresh tumor tissues from 22 children with sporadic RB were collected to detect the presence of HPV-DNA using polymerase chain reaction (PCR) and MY09/11 primers.

• **RESULTS:** HPV-DNA was present in 7/22 (32%) RB tumors. All the positive cases were sporadic unilateral RB (4 cases were male, 3 cases were female). Two bilateral RB cases were negative for HPV-DNA.

• **CONCLUSION:** The presence of HPV in RB tumors can be a pathogenic factor for sporadic RB. But its role and mechanism in carcinogenesis needs further research.

• **KEYWORDS:** retinoblastoma; human papilloma virus; pathogenic factors

Citation: Liu GY, Yang HS. Expression of HPV-DNA in retinoblastoma tissues. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13 (11):2185-2187

摘要

目的: 研究我国视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 中 HPV-DNA 表达情况,为进一步揭示 HPV 在散发性 RB 中作用提供初步依据。

方法: 收集 22 例散发性 RB 患者新鲜肿瘤组织标本,应用 PCR 方法及引物 MY09/11 检测肿瘤组织中 HPV-DNA 表达情况。

结果: 选取 22 例 RB 肿瘤标本中 7 例 HPV-DNA 阳性 (32%),均为单眼散发患者 (包括男 4 例,女 3 例),2 例双眼散发患者均为阴性。

结论: HPV 可能是我国散发性 RB 发病因素之一,但其明确作用及机制尚待进一步研究。

关键词: 视网膜母细胞瘤;人乳头瘤病毒;发病因素

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.11.06

引用: 刘国颖,杨华胜. 视网膜母细胞瘤组织中 HPV-DNA 表达的研究. *国际眼科杂志* 2013; 13(11):2185-2187

0 引言

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是小儿最常见的恶性肿瘤,常可致盲、致残和致命,其发病形式有两种——遗传性和非遗传性,约 30% ~ 45% 的 RB 患者为遗传性发病包括双眼发病患者及 10% ~ 15% 的单眼发病患者,其余病例为非遗传性发病^[1],其病因和发病机制尚未完全明确,尤其是非遗传性散发病例。近年来国外有研究表明 HPV 可能与散发性 RB 的发生有关^[2-7]。我们将对我国 RB 组织中 HPV 表达情况作初步阐述。

1 材料和方法

1.1 材料 标本取自中山眼科中心 2006-02/12 行眼球摘除术的 RB 患者 22 例,术后均经病理证实。年龄:3 月龄 ~ 7 岁,男 8 例,女 14 例,单眼发病 20 例,双眼发病 2 例,均无家族史。术后立即在无茵条件下取出新鲜肿瘤组织,按照 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 通用型引物 MY09/MY11 用于扩增粘膜型 HPV L1 片段的高保守区,5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3',5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' (混合碱基:M=A+C,R=A+G,W=A+T,Y=C+T),产物大小约 450bp^[3]。PCO4/GH20 用于扩增 β 球蛋白基因以验证模板质量,5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3',5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3',产物约 268bp^[3]。以上 2 对引物由上海生物工程技术服务公司合成。

1.2.2 PCR 检测 通用型引物 PCR 体系包括 2.5U

TaqDNA 聚合酶,5 μ L 样品 DNA,引物 MY09/11 各 0.5 μ mol/L, dNTP 各 0.2mmol/L 和 PCR 缓冲液。扩增参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;变性 94 $^{\circ}$ C 45s,退火 52 $^{\circ}$ C 1min,延伸 72 $^{\circ}$ C 1min,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5min。 β 球蛋白基因引物 PC04 /GH20 体系包括 1.25U TaqDNA 聚合酶,5 μ L 样品 DNA,引物 PC04 /GH20 各 0.25 μ mol/L,dNTP 各 0.2mmol/L 和 PCR 缓冲液。取 10 μ LPCR 反应产物,在 20g/L 琼脂糖凝胶上电泳。紫外灯下判断结果并照相。阳性对照取自于 HeLa 细胞株。

2 结果

选取 22 例肿瘤标本 DNA 经 PCR 扩增后有 7 例得到 450bp 产物(图 1,2),内参 β 球蛋白基因扩增均可得到 268bp 产物,说明 DNA 模板质量和 PCR 反应体系稳定。所有 HPV-DNA 阳性标本均为单眼散发患者(包括男 4 例,女 3 例),2 例双眼散发患者均为阴性。

3 讨论

RB 发病机制尚不完全明确,研究发现 RB 发病与 RB1 基因突变有关。大约有 93% 遗传型和 87% 非遗传型 RB 患者发现有 RB1 基因突变。同时一个正常视网膜细胞需要经过 2 次基因突变才能形成肿瘤,也就是著名的“二次突变论”^[8]。但仍有 7% 遗传型和 13% 非遗传型 RB 患者并未发现任何 RB1 基因突变,这部分肿瘤可能存在其它致病机制,研究包括:(1) 癌基因和抑癌基因理论:RB 发生与多个癌基因和抑癌基因的异常改变有关,如 MDM2 基因过表达,p53 基因突变^[9,10]。(2) 肿瘤干细胞学说:肿瘤的发生来源于具有自我更新和分化能力的肿瘤干细胞,RB 发现有多种干细胞标志,如 ABCG2, MCM2, CD44, retinal progenitor markers, PROX1 and syntaxin 1A^[11,12]。(3) RB 的发生还可能与 RB 基因编码的 Rb 蛋白(pRb)密切相关。pRb 参与细胞周期调节,并能诱导细胞凋亡^[13]。pRb 蛋白是人乳头瘤病毒致癌作用的靶蛋白之一^[14]。

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV),是一种无胞膜的双链闭环 DNA 病毒,包括早期基因区(early gene,E)和晚期基因区(late gene,L)^[15]。迄今为止已鉴定出 100 多种型别,依其与恶性病变的关系分为低危型和高危型,低危型如 HPV6,HPV11,HPV44,HPV54,HPV61 等,高危型如 HPV16,HPV18,HPV31,HPV35,HPV45,HPV59,HPV68 等^[15]。研究证实,HPV 与许多上皮性肿瘤发生有关,如宫颈癌、外阴癌、肛周皮肤癌、口咽癌、喉癌等^[16]。近年来国外许多研究报道 RB 中也有表达 HPV,推测 HPV 可能与 RB 尤其是散发型 RB 发病有关^[2-7]。HPV 致癌机制方面研究提示 HPV 可能是 RB 致病因素之一:(1) Griep 等^[17]发现表达 HPV16,E6,E7 转基因小鼠可以产生 RB。(2) HPV E 基因区编码的 HPV E7 蛋白可通过基 N 末端的 CR2 区与 pRb 的口袋结构结合,且能与细胞周期蛋白竞争结合 pRb,使 pRb 失活,并释放核转录因子 E2F,使细胞进入 DNA 合成期,从而导致细胞永生^[14]。Anand 等^[6]在 HPV 阳性的 RB 组织中有 75% 不表达 pRb,二者呈显著相关。(3) HPV E 基因区

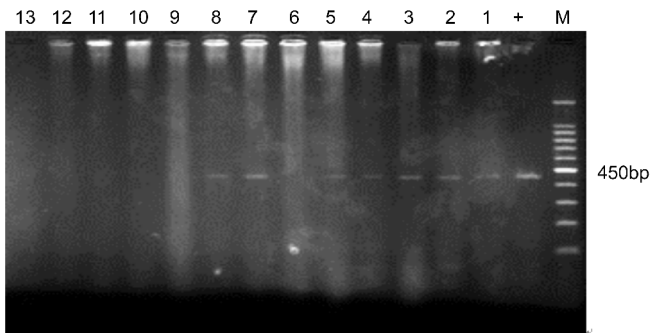


图 1 RB 组织中 HPV-DNA(450bp)的表达 1~13:分别代表 13 例样本;+:阳性对照(HeLa 细胞株);M:代表 DNA marker (1500bp, 1000bp, 900bp, 800bp, 700bp, 600bp, 500bp, 400bp, 300bp,200bp,100bp)。

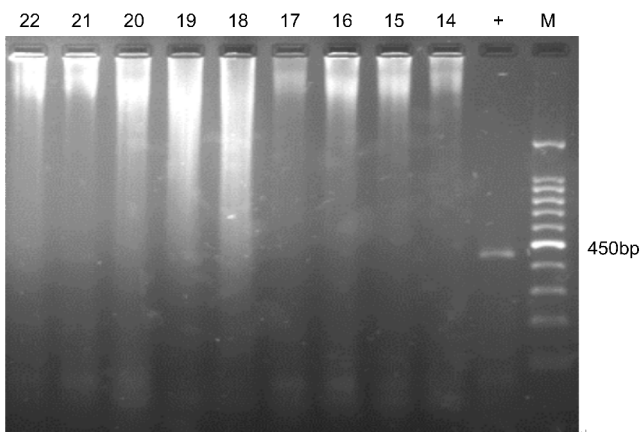


图 2 RB 组织中 HPV-DNA(450bp)的表达 14~22:分别代表 9 例样本;+:阳性对照(HeLa 细胞株);M:代表 DNA marker (1500bp, 1000bp, 900bp, 800bp, 700bp, 600bp, 500bp, 400bp, 300bp,200bp,100bp)。

编码的 HPV E6 蛋白可通过与 P53 和一种泛素连接酶 E6-AP 形成复合物,使 P53 泛素化分解而失去作用,从而阻滞 P53 所诱导的细胞周期停滞及凋亡^[14]。(4) Espinoza 等^[18]在 1 例双眼 RB 患者肿瘤组织中检出 HPV-6a 和 HPV L1 蛋白,并发现肿瘤组织中存在 10p 丢失,这在子宫颈癌患者及 HPV 转染的角质细胞也有类似的发现。

目前国外关于 HPV 与 RB 发病关系的研究,大多数报道均支持 HPV 可能为 RB 发病因素之一,在 RB 组织中 HPV 阳性率在 24%~82.3%,主要来自印度、巴西和墨西哥^[2-7]。但也有少数报道阳性率低,在 0~4.6%,包括北美、北印度和墨西哥地区^[19-21]。本研究首次报道我国 RB 组织中 HPV 的表达情况,阳性率为 35%。HPV 检出率不同与不同国家和地区有关,但也有同一地区检出率差别大,可能与检测方法以及检测标本有关。我们采用相对灵敏度较高的 PCR 方法以及引物 MY09/11,同时全部标本均为新鲜肿瘤组织,避免采用石蜡标本可能出现 DNA 降解而导致检出率低。我们检出所有 HPV-DNA 阳性者均为单眼散发患者,2 例双眼发病患者均为阴性,提示 HPV 可能与我国散发性 RB 发生有关,这与国外报道一致^[6,7]。

通过我们的初步研究提示 HPV 可能与我国散发性

RB 发病有关。但要真正揭示 HPV 对 RB 作用还需要更大的样本,以及多中心多地区样本研究。同时目前还没有足够证据显示 HPV 可以感染正常视网膜细胞,因此需要进一步研究 HPV 眼部感染途径。

参考文献

- 1 吴中耀. 现代眼肿瘤眼眶病学. 北京:人民军医出版社 2002: 251-252
- 2 Palazzi MA, Yunes JA, Cardinali IA, *et al.* Detection of oncogenic human papillomavirus in sporadic retinoblastoma. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81(4):396-398
- 3 Orjuela M, Castaneda V, Ridaura C, *et al.* Presence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. *Clin Cancer Res* 2000;6(10):4010-4016
- 4 Montoya-Fuentes H, de la Paz Ramirez-Munoz M, Villar-Calvo V, *et al.* Identification of DNA sequences and viral proteins of 6 human papillomavirus types in retinoblastoma tissue. *Anticancer Res* 2003;23(3C):2853-2862
- 5 Shetty OA, Naresh KN, Banavali SD, *et al.* Evidence for the presence of high risk human papillomavirus in retinoblastoma tissue from nonfamilial retinoblastoma in developing countries. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58(2):185-190
- 6 Anand B, Ramesh C, Appaji L, *et al.* Revalence of high-risk human papillomavirus genotypes in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2011;95(7):1014-1018
- 7 Mohan A, Venkatesan N, Kandalm M, *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in retinoblastoma samples: a preliminary study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31(1):8-13
- 8 陈大年. 二十一世纪视网膜母细胞瘤研究:希望与挑战. 中华眼底病杂志 2007;23(5):310-313
- 9 申煌焯,张清炯,肖学珊,等. P53 和 MDM2 在 3 种 RP 小鼠视网膜中的表达. 眼科新进展 2002;22(5):301-304
- 10 张杰,孟瑞华,徐建森,等. PTEN 和 p53 在视网膜母细胞瘤中的

表达及临床意义. 眼科新进展 2008;28(10):754-757

- 11 Mohan A, Kandalam M, Ramkumar HL, *et al.* Stem cell markers: ABCG2 and MCM2 expression in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2006;90(7):889-893
- 12 Balla MM, Vemuganti GK, Kannabiran C, *et al.* Phenotypic characterization of retinoblastoma for the presence of putative cancer stem-like cell markers by flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(4):1506-1514
- 13 李雁,张军军. 视网膜母细胞瘤发病机制的分子生物学研究回顾与进展. 国际眼科杂志 2010;10(4):703-705
- 14 Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, *et al.* Human papillomavirus;E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(11):2006-2011
- 15 Scheurer ME, Tortolero - Luna G, Adler - Storthz K. Human papillomavirus infection; biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15(5):727-746
- 16 Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology* 2009;384(2):260-265
- 17 Griep A, Kraweek J, Lee D, *et al.* Mutiple genetic loci modify risk for retinoblastoma in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(13):2723-2732
- 18 Espinoza JP, Cardenas VJ, Luna CA, *et al.* Loss of 10p material in a child with human papillomavirus - positive disseminated bilateral retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;161(2):146-150
- 19 Antoneli CB, Ribeiro KB, Sredni ST, *et al.* Low prevalence of HPV in Brazilian children with retinoblastoma. *J Med Virol* 2011;83(1):115-118
- 20 Gillison ML, Chen R, Goshu E, *et al.* Human retinoblastoma is not caused by known pRb-inactivating human DNA tumor viruses. *Int J Cancer* 2007;120(7):1482-1490
- 21 Shukla S, Bharti AC, Mahata S, *et al.* Infection of human papillomaviruses in cancers of differet human organ sites. *Indian J Med Res* 2009;130(3):222-233