

I 型单纯疱疹病毒 UL 30 基因片段在 口腔鳞状细胞癌中的分布

程 斌^{1,①} 李秉琦² 陈谦明² 罗 刚²

(1 中山医科大学口腔医学系; 广州, 510089; 2 华西医科大学口腔医学院; 成都, 610041)

摘 要 应用与单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I) UL30 基因片段杂交的寡核苷酸探针, 对 4 例未转移浸润癌、4 例转移浸润癌及其转移淋巴结组织进行原位杂交研究。结果发现: (1) 有 4 例未转移浸润癌、3 例转移浸润癌及其转移淋巴结组织杂交分别阳性, 但阳性率无显著性差异; (2) UL30 基因片段主要位于肿瘤上皮细胞胞浆; (3) UL30 基因片段在肿瘤浸润和转移的过程持续存留在肿瘤上皮细胞中; (4) 存在 HSV-I 基因片段的组织均无 HSV-I 增殖感染的形态学特征。提示 HSV-I 可能以特殊感染方式在口腔鳞状细胞癌的发生发展中起作用。

主题词 疱疹病毒 I 型, 人/遗传学; 口腔肿瘤/遗传学; 癌, 鳞状细胞/遗传学; 原位杂交; 基因, 病毒
中图分类号 R739.8

I 型单纯疱疹病毒(Herpes Simplex Virus I, HSV-I) 是感染口腔颌面部的主要病毒, 但与口腔鳞状细胞癌(简称鳞癌)发生的关系一直未得到明确。其主要原因是在 HSV-I 转化的传代细胞中, 未能检测到持续表达的基因片段和(或)抗原; 口腔鳞癌组织中也未能发现特定的 HSV-I 基因片段和(或)抗原^[1]。本研究应用原位杂交技术观察 HSV-I UL30 基因片段在口腔鳞癌及其转移灶中的分布, 希望有助于了解 HSV-I 在口腔鳞癌发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 标本选择

从存档蜡块中, 取未转移口腔鳞癌组织、已转移口腔鳞癌原发和转移淋巴结组织各 4 例, 共 12 例进行研究。标本选取标准为大小可保证达到迅速固定, 患者均未接受放疗、化疗、热疗等治疗, 手术或活检时无疱疹病毒感染的体征, 临床和病理资料齐全。所有标本均由两位工作 5 年以上的病理医生双盲法选入。简要的临床病理资料见表 1, 淋巴结情况同原发部位。

1.2 常规病理学观察

上述标本作 5 μm 切片, 经苏木素-伊红(HE)染色, 观察组织是否出现 HSV-I 增殖感染的形态特

征。

表 1 病例临床病理简况

病理诊断	例数	性 别		年 龄 (岁)	部 位		
		男	女		舌	唇	颊
未转移浸润癌	4	3	1	52~73	3	1	0
已转移浸润癌	4	4	0	30~50	2	0	2

1.3 原位杂交

1.3.1 分子探针 生物素标记 HSV-I 寡核苷酸探针购自 Maxim Biotech Inc., 序列为: 5'-TTT ACG TGC CTG CTG CGC CTG GCC GAC CAG AAG GGC TTT A-3'。该探针可与 HSV-I 基因组 UL30 基因(HSV-I 聚合酶基因)的同源序列杂交, 具有型的特异性。

1.3.2 主要试剂 原位杂交反应药盒购自 Life Technologies Inc., 蛋白酶 K 购自 Boehringer Mannheim 公司, 其余为国产分析纯试剂。

1.3.3 对照设立 ①系统对照: 采用 Life Technologies Inc. 提供的可与腺病毒同源序列杂交的寡核苷酸分子探针和相应的阳性切片。②阳性对照: 采用 Dako 提供的 HSV-I 感染阳性切片。③阴性对照: 孕妇妊娠期间无口腔、生殖道疱疹感染病史的引产胎儿口腔粘膜组织。④替代对照: 切片同阳性对照, 但用变性鲑精 DNA 取代探针。⑤空白对照: 切片同阳性对照, 但用 PBS 代替探针。

① 第一作者, 1964 年出生, 男, 博士, 讲师

1.3.4 实验过程 参照杂交药盒说明进行,简述如下:5 μm 切片载于硅化玻片(Dako)上;梯度脱蜡、脱水,室温风干;蛋白酶K(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)37 $^{\circ}\text{C}$ 消化10 min;4%多聚甲醛后固定1 min;梯度脱水,室温风干;加入探针,100 $^{\circ}\text{C}$ 共变性10 min,转入2 \times SSC湿盒42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜;0.2 \times SSC冲洗,加入阻断液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min;加工作结合液(working conjugate),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min,TBS冲洗;过37 $^{\circ}\text{C}$ 碱性底物缓冲液5 min,滴加BCIP/NBT显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 显色1.5~2 h;水洗,0.5%核固红复染,水洗,脱水,透明,封片。

1.3.5 结果判定 参照系统对照确认杂交反应正确无误后,根据对照切片结果,在排除背景染色等因素的基础上,实验切片上皮细胞核、胞浆或核浆出现紫蓝色杂交信号者为阳性细胞。

2 结果

2.1 病理学观察

所有口腔鳞癌原发及转移组织均未出现病毒包涵体、空泡性变、气球样变、上皮内疱等HSV-I增殖感染的形态学特征。

2.2 原位杂交研究

系统对照切片中,被腺病毒感染的Hela细胞胞核出现深紫蓝色杂交信号,说明本研究应用的检测系统和实验过程基本正确。阳性对照中,受HSV-I感染的肺泡上皮、巨噬细胞等细胞胞核、胞浆出现阳性杂交信号;其余对照切片均未发现杂交信号。

2.2.1 杂交阳性率 8例口腔鳞癌原发灶组织杂交结果见表2,转移部位结果同原发部位,可见UL30基因片段在未转移和转移鳞癌组织中分布情况类似。

表2 口腔鳞癌组织UL30基因片段检出情况

	阳性/检测 (例数)	阳性率(%)
未转移浸润癌	4/4	100
转移浸润癌	3/4	75

采用Fisher's精确算法,两组阳性率比较 $P \approx 1$

2.2.2 组织学特征 紫蓝色的杂交信号全部出现在上皮细胞中,并主要分布在胞浆,大部分杂交信号见于细胞长轴两端的胞浆,少数绕核弥散分布。杂交信号也可分布在胞核或胞核胞浆,但较为少见。由于总例数较少,未统计有这几种杂交信号分布的

细胞的比例(图1)。



图1 HSV-I UL30基因片段在上皮细胞内的分布
UL30阳性信号主要分布在胞浆中(如箭头所示),ISH \times 100

阳性细胞的分布,与鳞癌的分化、转移有关。分化程度高的鳞癌组织,阳性细胞主要排列在癌巢外周以及肿瘤细胞浸润的前沿,往往单层排列呈栅栏状;分化程度低时,阳性细胞基本散在分布。转移癌原发灶出现阳性细胞,其转移淋巴结也存在阳性细胞;相反,原发灶结果阴性,其转移淋巴结未见阳性细胞。癌旁上皮有时亦见杂交阳性细胞,多位于基底层、棘层(图2、图3)。

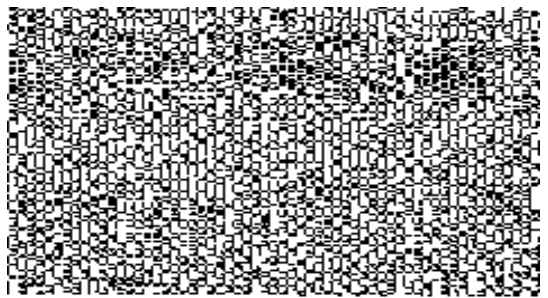


图2 HSV-I UL30基因片段在低分化口腔鳞癌中的分布
杂交阳性细胞散在分布,杂交信号可见于瘤巨细胞和分裂细胞,ISH \times 400



图3 HSV-I UL30基因片段在低分化口腔鳞癌转移淋巴组织的分布

可见杂交阳性的转移肿瘤上皮细胞散布于淋巴
胞中,ISH \times 100

3 讨论

由于 HSV-I 具有体外转化能力,其基因组上存在与转化有关的片段—形态转化区域 I (morphologic transforming region I, mtrI)^[1,2],实验性口腔癌模型显示 HSV-I 是共/协同致癌因子,因而 HSV-I 与口腔鳞癌发生的关系受到关注。了解口腔鳞癌组织中 HSV-I 基因及其产物的分布和表达,是研究 HSV-I 在口腔鳞癌发生发展中作用的重要内容。

Scully, Eglin 等^[3,4]用从感染动物分离到的 HSV-I 全长 DNA 作分子探针,在 47%~53% 口腔鳞癌组织中观察到存在与 DNA 互补的 RNA; Cox 等^[5]用 HSV-I BamHI-G 酶切片段作探针进行 Southern 杂交,部分鳞癌(1/8 例)组织存在相应的同源序列。由于宿主细胞 DNA 与 HSV-I DNA 间有一定的同源序列,而且 HSV-I 基因组 G+C 比例达 68.3%^[6],长片段的分子探针易于产生错配杂交。本研究首次应用寡核苷酸探针,发现部分口腔鳞癌及其转移淋巴结中存在 HSV-I 的 UL30 基因片段。

UL30 为位于 mtrI 的 HSV-I 聚合酶基因的片段。mtrI 是与 HSV-I 转化作用密切相关的,排列有 8 个编码蛋白基因片段的序列^[7]; Cox 等^[5]应用的 HSV-I BamHI-G 酶切片段也与 mtrI 部分重叠。虽然目前尚未阐明 HSV-I 聚合酶与其转化作用的关系,但这一结果至少说明口腔鳞癌及其转移灶中存在与 HSV-I 转化能力有关的基因序列,HSV-I 可能是口腔鳞癌重要的致病因子之一。

本研究进一步发现,在高分化鳞癌,存在 UL30 基因片段的阳性细胞主要在癌巢外周有规律分布,而在低分化鳞癌,阳性细胞则散在分布;而且 UL30 基因片段在转移淋巴结的分布情况与原发组织一致,这说明,HSV-I 基因片段在肿瘤细胞侵袭和转移过程中仍持续存留在上皮细胞。以前由于在 HSV 的转化细胞和宫颈癌组织中未能观察到特定的抗原或基因片段的持续表达或存留,而提出 HSV 以“打了就跑”(hit-and-run)的机理参与肿瘤的发生发展^[8]。本研究结果提示 HSV-I 可能以有别于“打了就跑”的方式在口腔鳞癌的发生发展中起作用。

HSV-I 聚合酶是复制必需的关键酶,但本研究

所有的肿瘤组织上皮细胞均未见 HSV-I 增殖感染特征,而且 UL30 基因片段主要分布在胞浆中。目前发现,人类和实验动物的脑、皮肤、角膜可存在 HSV-I 基因片段而不出现增殖性损害,从而推测 HSV-I 可能有神经节外的潜伏部位^[9],但尚无资料证实口腔粘膜也是 HSV-I 神经节外潜伏部位。本研究结果是否提示口腔粘膜也是 HSV-I 节外潜伏部位,HSV-I 以特殊感染方式参与口腔鳞癌的发生发展值得进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Scully C. Oncogene tumor suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 1993, 22:337
- 2 Eizuru Y, Hyman RW, Kreider JW, *et al*. Detection of virus specific RNA in herpes simplex virus type 1-transformed hamster cell line. *JNCI*, 1983, 71:397
- 3 Scully C, Eglin RP, McGregor A, *et al*. Oral cancer: detection of RNA complementary to herpes simplex virus DNA. *J Dent Res*, 1982, 61:548
- 4 Eglin RP, Scully C, Lehner T, *et al*. Detection of RNA complementary to herpes simplex virus DNA in human oral squamous cell carcinoma. *Lancet*, 1983, ii:766
- 5 Cox MF, Maitland NJ, Scully C. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequence in normal potentially malignant and malignant oral mucosa. *Oral Oncol Eur J Cancer*, 1993, 29B:215
- 6 汪家禄,王龙妹.单纯疱疹病毒的分子生物学.见:闻玉梅主编.医学分子病毒学.北京:人民卫生出版社,1990.101~110
- 7 秦克锋,汪美先,姜绍璋.单纯疱疹病毒 I 型基因的序列及其编码蛋白.见:林万明主编.医学分子微生物学进展(第一集).北京:中国科学技术出版社,1992.529~535
- 8 Gollway DA, McDougall JK. The oncogenic potential of herpes simplex viruses; evidence for a hit-and-run mechanism. *Nature*, 1983, 302:21
- 9 Openshaw H, McNeill JL, Lin XH, *et al*. Herpes simplex virus DNA in normal corneas: Persistence without viral shedding from ganglia. *J Med Virol*, 1995, 46:75

(1996-12-26 收稿 1997-02-20 修回)

(下转第 207 页)

PROTECTIVE EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT OF SCUTELLARIA BAICALENSIS GEORGI ON RADIATION INJURY

Li Guowei Lei Suini Chen Kuntian Huang Xiaoyan

(Department of Radiation Oncology, Cancer Center
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Tests were conducted on mice to detect whether aqueous extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi (AESBG) is effective for protection against γ -ray irradiation. Intraperitoneal injection (ip) of the AESBG 0.7 g/kg and 1.4 g/kg in NIH male mice 10~20 minutes before 8.7~9.1 Gy whole body ^{60}Co irradiation increased the survival effects (the ratio of mean survival time in a treated group to that of the control in 30 days after irradiation) (1.44~2.18) and 30 days survival rate significantly in comparison with control mice. In case of ip of the AESBG 1.4 g/kg the spleen weight, WBC and PLT were all increased on 11th day after 4.7 Gy exposure. The results indicated that AESBG exhibited relatively good radioprotective effect against whole body lethal irradiation of mice.

Subject headings scutellaria baicalensis/therapeutic use; plant extracts/therapeutic use; radiation-protective agents/therapeutic use

(上接第194页)

THE DISTRIBUTION OF UL30 GENE FRAGMENT OF HERPES SIMPLEX VIRUS I IN HUMAN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Cheng Bin¹ Li Bingqi² Chen Qianming² Luo Gang²

(1 Faculty of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089

2 College of Stomatology, West China University of Medical Sciences)

The UL30 gene fragment of Herpes Simplex Virus I (HSV-I) was detected by in situ hybridization technique in four cases of invasive oral squamous cell carcinoma (SCC) without metastasis, four cases of invasive oral SCC with metastasis and their metastatic lymph node tissues. The results showed: (1) The UL30 gene fragment was distributed in four cases of oral SCC without metastasis, three cases of oral SCC with metastasis and their metastatic lymph node tissues ($P > 0.05$); (2) The UL30 gene fragment was located mainly in tumor epithelial cell cytoplasm; (3) The UL30 gene fragment retained persistently in epithelial cells during invasion and metastasis of SCC; (4) The tissues with positive hybridization signals did not show the morphologic features of HSV-I productive infection. The results implied that HSV-I may play special roles in oral cancer development by a unique form of infection.

Subject headings herpesvirus I, human/genetics; mouth neoplasms/genetics; carcinoma, squamous cell/genetics; in situ hybridization; genes, viral