

• 临床检验研究论著 •

健康妇女及宫颈上皮癌瘤患者 HPV 感染基因型分布特征研究*

龙秀荣¹, 王志蕙², 耿建祥^{2△}, 朴正爱², 肖蔚², 万美珍², 王旭波², 兰建云², 张劲松²

(1. 南京市六合区人民医院病理科, 江苏南京 211500; 2. 南京中医药大学附属第三医院病理科 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

摘要:目的 探讨南京地区一般女性人群宫颈细胞、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中 23 种人乳头瘤病毒感染基因型别的分布情况及其临床意义。方法 采用基因扩增结合基因芯片技术对 1 000 例一般女性人群宫颈细胞、108 例宫颈上皮内瘤变及 62 例宫颈癌组织标本进行 23 种 HPV 基因型别的检测, 并对受检者进行相关资料分析。结果 1 000 例一般女性人群检出 HPV 感染者 106 例, 总的 HPV 感染率为 10.60%(106/1 000); 108 例宫颈上皮内瘤变患者检出 HPV 感染者 99 例, 总的 HPV 感染率为 91.67%(99/108); 62 例宫颈癌患者检出 HPV 感染者 52 例, 总的 HPV 感染率为 83.87%(52/62)。结论 基因扩增结合基因芯片检测技术可应用于宫颈细胞和组织标本, 一次可检测 23 种 HPV 基因型别, 特异性强, 敏感性高, 对中国女性宫颈 HPV 感染分子流行病学的调查、宫颈癌和癌前病变的防治及其疫苗的研究具有重要的意义。

关键词:细胞; 组织; 子宫颈; 乳头状瘤病毒科; 基因型; 遗传学技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)24-2958-02

A comparative study of HPV infective genotypes distribution in cells of normal cervix and tissues of cervical lesions*

Long Xiurong¹, Wang Zhihui², Geng Jianxiang^{2△}, Piao Zheng'ai², Xiao Wei²,

Wan Meizhen², Wang Xubo², Lan Jianyun², Zhang Jinsong²

(1. Department of Pathology, the People's Hospital of Liu He District of Nanjing, Nanjing, Jiangsu 211500, China;

2. HPV Collaboration of Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To compare the clinical distribution of 23 kinds of human papillomavirus genotypes in cells of normal cervix and tissues of cervical lesions and its clinical significance. **Methods** Polymerase chain reaction and gene-chips technology were utilized for the detection of 23 kinds of HPV genotypes in cells from 1000 cases of normal cervix, tissue specimens from 108 cases of cervical intraepithelial neoplasia(CIN) and from 62 cases of cervical cancers. And related materials of all subjects were analyzed. **Results** In 1 000 cases of normal cervix, total infection rate of HPV was 10.60%(106/1000); In 108 cases of CIN, total infection rate of HPV was 91.67%(99/108); In 62 cases of cervical cancers, total infection rate of HPV was 83.87%(52/62). **Conclusion** Gene chip technology can detect single and multiple HPV genotypes in cervical cell and tissue samples with high sensitivity and specificity. Detection of HPV genotypes could be used to understand the prevalence situation of HPV infection and further to supply reference for the research and development of HPV vaccine fit for different regions.

Key words: cells; tissues; cervix uteri; papillomaviridae; genotype; genetic techniques

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 人乳头瘤病毒 (HPV) 感染是关键和必要的致病因素。宫颈癌发病缓慢, 又存在着明确的癌前期病变, 即宫颈上皮内瘤变(CIN)^[1-4]。因其明确的致病因素和缓慢发病特点为研究者对致病型别的 HPV 感染动态观察和跟踪研究提供了宝贵的时机, 更有利于进一步弄清一般群体、癌前病变及宫颈癌女性中 HPV 的感染率及感染型别的差异性, 以便为宫颈癌的干预治疗及疫苗的研发提供数据资料和参考。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集 2011 年 2~12 月本院妇科门诊就诊且宫颈细胞学检查正常的 1 000 例已婚女性的宫颈细胞标本, 年龄 23~56 岁, 平均 41.84 岁; 收集 2006 年 3 月至 2012 年 5 月本院病理组织学诊断的 108 例宫颈上皮内瘤变(CIN I~III 级)的石蜡组织标本, 年龄 22~68 岁, 平均年龄 41.22 岁; 收集 1978 年 9 月至 2012 年 5 月本院病理组织学诊断的 62 例宫颈癌(其中鳞癌 54 例, 腺癌 8 例)的石蜡组织标本, 年龄 28~87

岁, 平均 50.79 岁。

1.2 仪器与试剂 基因扩增仪为新加坡生产的 Gene Amp PCR system 2400 型; 分子杂交仪为江苏省兴化市分析仪器厂生产的 FYY-3 型; 高速冷冻离心机为德国生产的 eppendorf 5810R 型; 生物安全柜为江苏省苏州市安泰空气技术有限公司生产的 BHC-1300 II A2 型; 青岛海尔有限公司生产的 -20℃ 冰箱等。HPV 基因分型检测试剂盒, 由亚能生物技术(深圳)有限公司提供。显色液须新鲜配制, 使用时所需浓度加蒸馏水配制。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集及保存 (1) 细胞标本: 采用窥阴器或阴道扩张器充分暴露宫颈, 用棉拭子擦去宫颈口过多的分泌物, 将采样宫颈刷置于宫颈口, 顺时针旋转宫颈刷 4~5 圈, 慢慢抽出, 以获得足够的宫颈上皮细胞标本, 然后沿刷柄折痕处折断刷头, 将宫颈刷头部放入洗脱管中, 旋紧洗脱管盖, 做好标本标识, 保持采集管直立, 放入 -20℃ 冰箱保存待测。(2) 石蜡组

* 基金项目: 南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

织标本：先去除每例石蜡组织周边多余的石蜡，将其石蜡组织切成 4 μm 厚的切片，切 3~5 片石蜡组织即可。用专用的镊子轻轻夹取，放入小离心管中，切第 2 例石蜡组织前，用次氯酸钠溶液擦刀片及镊子各 3 次。

1.3.2 DNA 的提取 (1)细胞标本：将宫颈刷头充分漂洗后，把洗脱液全部转移至 1.5 mL 的离心管中，13 000 r/min 离心 10 min 后，弃去上清液，保留管底的细胞。随后加入裂解液 50 μL，充分振荡混匀；(2)石蜡组织标本：将切下的石蜡组织片放入 1.5 mL 离心管中，加入裂解液 150 μL，充分振荡混匀，两者均在金属浴中加热 100 ℃ 10 min，立即 13 000 r/min 离心 10 min 后，取中间层 DNA 溶液待用。PCR 扩增、杂交、孵育和显色按说明书进行规范操作。每份标本显色后根据杂交信号的有无，来判断结果。

1.4 统计学处理 应用统计软件包 SPSS13.0，对相关数据进行统计学处理，率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法。

2 结 果

从 1 000 例宫颈细胞学检查正常的样本中检测出阳性者 106 例，其中一重感染 93 例，多重感染 13 例(二重感染 11 例，三重感染 2 例)；从 108 例癌前期病变(CIN I ~ III 级)宫颈石蜡组织样本中检测出阳性者 99 例，其中一重感染 45 例，多重感染 54 例(二重感染 39 例，三重感染 8 例，四重感染 4 例，六重感染 3 例)；从 62 例宫颈癌石蜡组织中检测出阳性者 52 例，其中一重感染 36 例，多重感染 16 例(二重感染 10 例，三重感染 4 例，四重感染 1 例，五重感染 1 例)。一般女性群体的 106 例阳性患者检出不同型别例数合计 121 例；癌前期病变的 99 例阳性患者检出不同型别例数合计 181 例；宫颈癌的 52 例阳性患者检出不同型别例数合计 77 例，三类阳性患者不同型别例数总计 379 例，见表 1。本文一般女性人群与宫颈癌前病变和宫颈癌女性中 HPV 感染比较存在着较大的差异性，经统计学处理 χ^2 值分别为 424.82 和 247.49，P 值都小于 0.01，提示一般女性人群与宫颈癌前病变和宫颈癌女性 HPV 感染有显著性差异，有统计学意义。而宫颈癌前病变女性与宫颈癌女性 HPV 感染比较，经统计学处理 χ^2 值等于 2.41，P>0.05，两者比较 HPV 感染差异不显著，无统计学意义。

表 1 三类阳性感染者不同型别感染频率及百分率的比较[n(%)]*

HPV 型别	一般群体 阳性	癌前病变 阳性	宫颈癌 阳性
6	1(0.8)	5(2.8)	0(0.0)
11	2(1.7)	2(1.1)	2(2.6)
16	12(9.9)	64(35.4)	44(57.1)
18	7(5.8)	36(19.9)	10(13.0)
31	4(3.3)	18(10.0)	2(2.6)
33	10(8.3)	18(10.0)	6(7.8)
35	5(4.1)	1(0.6)	0(0.0)
39	2(1.7)	0(0.0)	0(0.0)
42	7(5.8)	1(0.6)	1(1.3)
43	23(19.0)	3(1.7)	2(2.6)
45	2(1.7)	1(0.6)	2(2.6)
51	3(2.5)	0(0.0)	0(0.0)
52	9(7.4)	8(4.4)	2(2.6)
53	6(5.0)	0(0.0)	1(1.3)
56	6(5.0)	1(0.6)	1(1.3)

续表 1 三类阳性感染者不同型别感染频率及百分率的比较[n(%)]*

HPV 型别	一般群体 阳性	癌前病变 阳性	宫颈癌 阳性
58	12(9.9)	16(8.8)	2(2.6)
59	1(0.8)	3(1.7)	0(0.0)
66	2(1.7)	2(1.1)	1(1.3)
68	4(3.3)	1(0.6)	0(0.0)
73	2(1.7)	1(0.6)	1(1.3)
83	1(0.8)	0(0.0)	0(0.0)
总计	121(100.2)	181(100.5)	77(100.0)

*：对多重感染者，各型别的阳性率重复计算。

3 讨 论

HPV 属乳头瘤病毒科，是一类特异感染人类上皮、黏膜的微小共价双链环状 DNA 病毒^[1-4]。人类是 HPV 的唯一宿主^[1]。分子流行病学调查显示，高危型 HPV 导致宫颈癌的概率约为 1.00%，而低危型 HPV 导致宫颈癌的概率仅为 0.10%^[5]。本研究选择了 23 种常见致癌型的 HPV 作为研究的感染源，采用高通量的分型检测技术对南京地区 1 170 例女性的宫颈细胞及组织石蜡标本进行了 23 种 HPV 基因分型的研究。

本研究结果表明：(1)我国南京地区 1 000 例一般女性群体宫颈上皮细胞中一重感染率为 9.30%(93/1 000)，多重感染率为 1.30%(13/1 000)；108 例癌前病变中一重感染率为 41.67%(45/108)，多重感染率为 50.00%(54/108)；62 例宫颈癌中一重感染率为 58.07%(36/62)，多重感染率为 25.81%(16/62)。提示一般群体女性和宫颈癌患者都是以一重 HPV 感染为主，多重感染为辅，而癌前病变患者则以多重 HPV 感染为主，一重感染为辅，这种现象还有待于多中心大样本的基因研究进一步验证。(2)由于 HPV 各型别之间无交叉免疫保护作用，HPV 的重叠感染呈现多重化的趋势，目前，HPV 的重叠感染仍以二重和三重感染为主。HPV 重叠感染病毒载量高于 HPV 一重感染，癌变相关风险更大，是宫颈癌发生非常重要的一个危险因素，且致病力更强，病变发展更快，复发率更高^[5]。HPV 一重和多重感染的比例一般约为 3 : 1。本研究一般人群女性中 HPV 一重和多重感染的比例为 7.2 : 1，癌前病变中一重和多重感染的比例为 0.8 : 1，宫颈癌中一重和多重感染的比例为 2.3 : 1。这种 HPV 一重和多重感染的比例在宫颈癌发展的三个阶段呈现出由升到降，再由降到升的过程，说明在宫颈癌前病变阶段 HPV 多重感染所起的作用比一重感染的作用要大得多，且多重化的趋势在不断增加，尤其是 HPV 流行度较高的地区，这种多重化的趋势增加更为明显。这在本研究 HPV 协作组报告的苏州地区和深圳地区一般女性人群 HPV 感染中已有详细论述。(3)宫颈癌发病过程从 HPV 持续性感染到癌前病变再到宫颈癌存在着三个阶段，南京地区低危 43 型在一般人群女性中从感染率(19%)，降到癌前病变(1.7%)和宫颈癌(2.6%)，可见尽管 43 型在一般人群女性中感染率最高，随着宫颈病变的进展，43 型感染率明显下降，提示低危 43 型不是引起癌前病变和宫颈癌的优势型别。而南京地区高危 16 型在一般人群女性中从感染率(9.9%)，升到癌前病变(35.4%)和宫颈癌(57.1%)，16 型感染率随着宫颈病变的发展，也随着升高，提示高危 16 型是诱发宫颈癌前病变和宫颈癌最主要的型别，同时也要关注 18、(下转第 2962 页)

可能性增加^[7-8]。本研究分析显示不同性别 HCV 感染者自身抗体阳性率有显著差异,女性 HCV 感染者随着病情的加重和年龄增长,自身抗体的阳性率也明显增加,可能与丙型肝炎慢性化时间长、病情迁延有关。

甘肃兰州地区 HCV 基因型以 I b 型为主^[9],这与之前所做的研究结果相一致,作者通过检测发现 HCV 基因型与自身抗体比较差异无统计学意义, I b 型自身抗体阳性患者在年龄、性别方面比较均无明显相关性。但 I b 型 HCV 感染者自身抗体检出情况明显高与(21/54)其他基因型患者,且常出现多种自身抗体,这可能与基因型 I 型为难治性丙型肝炎及中和抗体的产生有一定的关系^[10]。其他基因型与自身抗体的关系还需做进一步研究。

本研究使用先进的 ELISA 定量试剂盒检测自身抗体,通过检测不同基因型患者抗病毒治疗前、中、后自身抗体的动态变化,发现基因 I a、I b 和 I c 患者在治疗中、后期部分自身抗体与治疗前相比差异有统计学意义($P < 0.05$);而基因 II a 型患者在治疗过程中及结束后自身抗体水平与治疗前相比均无明显差异,说明抗病毒治疗能够诱发自身抗体水平的升高,尤其是在抗病毒治疗 48 周时,可出现多种自身抗体阳性,但它只是一过性的现象,在抗病毒治疗疗程结束后,部分自身抗体可降低至治疗前的水平,并且差异有统计学意义。甚至某些自身抗体随着病情的好转而消失。通过动态监测发现 HCV 感染者自身抗体无论是抗病毒治疗前、治疗中还是结束后,自身抗体水平均未超过检测上限的 2 倍,但抗病毒治疗中,自身抗体可出现不同程度的升高,说明干扰素能够增强自身免疫反应,因此对与丙型肝炎合并自身免疫功能异常者要定期复查自身抗体。不同 HCV 感染者基因型自身抗体水平比较发现,基因 I 型患者在抗病毒治疗过程中更易出现自身抗体水平升高。因此对基因 I 型 HCV 感染者合并有自身抗体异常者,

应慎重选择抗病毒治疗方案,临床医生在治疗中,应根据患者自身抗体水平情况,实施个体化治疗方案。

参考文献

[1] 张春明,牛广华,钱铸山. 丙型肝炎病毒感染血清中自身抗体检测结果分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2006, 22(2):107-108.
 [2] 陈智,潘修成. 丙型肝炎与自身免疫性疾病[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(3):236-237.
 [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6):324-329.
 [4] 孙南雄,范晓峰. 丙型肝炎病毒 Simmonds 基因分型法酶切分型的研究[J]. 江苏医药, 1999, 25(7):481-483.
 [5] 李颖,徐鑫,刘沛,等. 慢性丙型肝炎患者自身抗体检测的临床意义[J]. 肝脏, 2007, 1(12):17-19.
 [6] Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease[J]. J Autoimmune Dis, 2004, 1(1):2.
 [7] Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, et al. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study[J]. Hepatology, 1994, 19(4):841-848.
 [8] Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis[J]. J Hepatology, 2000, 32(Suppl 1):181-197.
 [9] 李玲,王坤,涂学亮,等. 丙型肝炎孕妇血清中自身抗体的检测与分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 6(8):700-702.
 [10] 李蕴伽,魏来,王文冰,等. 自身免疫性肝炎临床、免疫学及病理学特征分析 142 例[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(36):3534-3538.

(收稿日期:2012-06-19)

(上接第 2959 页)

31、33、52、58 型的流行度和变化趋势。(4)本研究表明宫颈 HPV 感染三个阶段前 9 位分别依次为:一般群体女性 43 型 23 例(19%)、16 和 58 型各 12 例(9.9%)、33 型 10 例(8.3%)、52 型 9 例(7.4%)、18 和 42 型各 7 例(5.8%)、53 和 56 型各 6 例(5.0%);癌前病变 16 型 64 例(35.4%)、18 型 36 例(19.9%)、31 和 33 型各 18 例(10.0%)、58 型 16 例(8.8%)、52 型 8 例(4.4%)、6 型 5 例(2.8%)、43 和 59 型各 3 例(1.7%);宫颈癌 16 型 44 例(57.1%)、18 型 10 例(13.0%)、33 型 6 例(7.8%)、11、31、43、45、52、58 型各 2 例(2.6%)。三个阶段宫颈 HPV 感染低危型总感染率为 34.5%,而高危型总感染率为 229.8%,提示癌前病变和宫颈癌以高危型为主(90.2%和 88.3%),低危型只占很少的比例(4.5%和 5.2%)。

总之,宫颈癌是一种可预防的疾病,只有宫颈癌的预防措施落实到位,才能真正地将发展中国家宫颈癌的发病率和死亡率降下来,造福于广大的发展中国家妇女^[6-10]。

参考文献

[1] 耿建祥,王旭波. 人乳头瘤病毒检测及其临床应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:381-427.
 [2] 兰建云,邵伟伟,袁苏娟,等. 外耳道乳头状瘤中的人乳头瘤病毒检测及其临床意义[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(4):391-393.

[3] 张金浩,耿建祥,吴崑崑,等. 结直肠肿瘤中 HPV 感染的基因分析[J]. 医学研究生学报, 2011, 24(2):154-157.
 [4] 李海,邓志勇,张阳,等. 人乳头瘤病毒在阴茎鳞癌组织中的表达及意义[J]. 现代实用医学, 2010, 22(9):1037-1038.
 [5] 严粉琴,耿建祥,肖蔚,等. 已婚女性宫颈上皮细胞中人乳头状瘤病毒基因分型 2 000 例分析[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(5):390-393.
 [6] Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions[J]. Vaccine, 2008, 26(1):17-28.
 [7] Zhao R, Zhang WY, Wu MH, et al. Human papillomavirus infection in Beijing, People's Republic of China: a population-based study[J]. Br J Cancer, 2009, 101(9):1635-1640.
 [8] Jiang P, Liu J, Zeng X, et al. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 197(2):174-178.
 [9] 郎景和. 妇科肿瘤临床诊治的挑战与对策[J]. 中国癌症防治杂志, 2012, 4(1):1-4.
 [10] McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2):195-208.

(收稿日期:2012-07-23)