

• 临床检验研究论著 •

308 例宫颈癌组织中 HPV 感染基因型分布的对比研究

朱晓珏¹, 耿建祥^{2△}

(1. 江苏省张家港市第一人民医院检验科, 江苏张家港 215600; 2. 南京中医药大学附属第三医院病理科/江苏省 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

摘要:目的 比较宫颈上皮内瘤病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)组织标本中人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染的基因型分布情况及其临床意义。方法 采用聚合酶链式反应和基因芯片检测技术对 53 例 CIN I、67 例 CIN II 和 188 例 CIN III 病变组织标本进行 23 种 HPV 基因分型检测, 并对受检者进行相关资料分析。结果 53 例 CIN I 患者检出 HPV 感染者 29 例, 总的 HPV 感染率为 54.72%(29/53); 67 例 CIN II 患者检出 HPV 感染者 51 例, 总的 HPV 感染率为 76.12%(51/67); 188 例 CIN III 患者检出 HPV 感染者 175 例, 总的 HPV 感染率为 93.09%(175/188)。结论 CIN I、CIN II 和 CIN III 组织中总的 HPV 感染率存在着明显的差异性, 聚合酶链式反应与基因芯片检测技术可应用于宫颈组织标本检测, 一次可检测 23 种 HPV 基因型别, 对我国女性宫颈 HPV 感染的分子流行病学调查、宫颈肿瘤的防治及其疫苗研究具有非常重要的意义。

关键词:宫颈; 组织; 上皮内瘤变; 人乳头瘤病毒; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.23.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)23-3180-03

A comparative study of HPV infection genotypes distribution in 308 cases of cervical intraepithelial neoplasia tissues

Zhu Xiaojue¹, Geng Jianxiang^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Zhangjiagang Municipal First People's Hospital, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, China; 2. Department of Pathology, Third Affiliated Hospital, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine/HPV Collaboration Group of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To compare the distribution situation of human papillomavirus(HPV)genotypes in the tissue specimens of cervical intraepithelial neoplasia(CIN I, CIN II and CIN III) and its clinical significance. **Methods** The polymerase chain reaction (PCR) and gene-chips technology were utilized for detecting 23 kinds of HPV genotypes in the cervical tissue specimens from 53 cases of CIN I, 67 cases of CIN II and 188 cases of CIN III. And the related data of all subjects were analyzed. **Results** Among 53 cases of CIN I, 29 cases of HPV infection were detected with the total HPV infection rate of 54.72%; among 67 cases of CIN II, 51 cases of HPV infection were detected with the total HPV infection rate of 76.12%; among 188 cases of CIN III, 175 cases of HPV infection were detected with the total HPV infection rate of 93.09%. **Conclusion** The significant difference of the total HPV infection rate exists in the tissues of CIN I, CIN II and CIN III. PCR and the gene-chip technology can be applied in the detection of the cervical tissue specimens, 23 kinds of genotypes can be detected by once detection, which has very important significance to the molecular epidemiological survey of female cervical HPV infection, prevention and treatment of cervical cancer and the HPV vaccine research.

Key words: cervix; tissue; intraepithelial neoplasia; human papillomavirus; genotyping

宫颈癌患者早期没有明显的症状, 而且存在着一个较长的、可逆的癌前病变期, 又称之为宫颈上皮内瘤病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)期, 一般分为 CIN I、CIN II 和 CIN III 3 期。宫颈 HPV 感染大部分可以自然消退, 只有少数 HPV 持续性感染者可发展为 CIN, 从宫颈持续性 HPV 感染发展为浸润性宫颈癌大约需要 10 年左右的时间。这就给进行医学干预治疗留下了充足的时间, 如能在 CIN 病变期进行有效的干预治疗, 宫颈癌的治愈率可达 98%。目前, 宫颈癌作为唯一病因学明确的癌症, 是完全可以筛查、早期发现、彻底防治的癌症。因此, 宫颈癌筛查仍是现阶段预防宫颈癌的关键。本文以 23 种(human papillomavirus, HPV)作为感染源, 对宫颈鳞状上皮内瘤变组织中 HPV 感染率和基因型别的分布情况进行对比研究, 这将对宫颈癌的防治和疫苗的研发具有重大的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2006 年 1 月至 2013 年 12 月南京市中

医院、张家港市第一人民医院、南京市六合区人民医院、江苏省常熟市第一人民医院、镇江市丹徒区人民医院、徐州市中医院病理组织学诊断的宫颈鳞状上皮内瘤病变 308 例的石蜡组织标本, 其中宫颈 CIN I 级病变 53 例, 最小年龄 24 岁, 最大年龄 60 岁, 平均年龄 43.26 岁; 宫颈 CIN II 级病变 67 例, 最小年龄 26 岁, 最大年龄 59 岁, 平均年龄 42.15 岁; 宫颈 CIN III 级病变 188 例, 最小年龄 21 岁, 最大年龄 90 岁, 平均年龄 43.15 岁。病理切片均由 2 位高年资主治医师按照 WHO 妇科肿瘤的组织学分类标准进行复阅。

1.2 仪器与试剂 基因扩增仪为美国生产的 ABI7500 实时定量 PCR 仪; 分子杂交仪为亚能生物技术有限公司生产的 YN-H16 型; 高速冷冻离心机为安徽中科中佳 KDC-140HR 型; 生物安全柜为印度尼西亚生产的 ESCO CLASS II BSC 型; 中科美菱生产的-400C 低温冰箱 DW-FL135 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 对 308 例 CIN 病变的组织标本，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 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 宫颈 CIN I、CIN II 和 CIN III 病变组织中 HPV 感染率及各 HPV 型别的比例采用 HPV 分型统计软件（由南京倍宁医疗器械有限公司提供）进行分析，对分析出来的相关数据，应用统计软件包 SPSS13.0 对相关数据进行统计学处理，百分率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法，显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

从 53 例宫颈 CIN I 级病变石蜡组织中检出阳性者 29 例，其中一重感染 20 例，多重感染 9 例（二重感染 6 例，三重感染 2 例，四重感染 1 例）；从 67 例宫颈 CIN II 级病变石蜡组织中检出阳性者 51 例，其中一重感染 24 例，多重感染 27 例（二重感染 18 例，三重感染 3 例，四重感染 4 例，六重感染 2 例）；从 188 例宫颈 CIN III 级病变石蜡组织中检出阳性者 175 例，其中一重感染 111 例，多重感染 64 例（二重感染 47 例，三重感染 12 例，四重感染 4 例，六重感染 1 例）。53 例宫颈 CIN I 级病变 HPV 阳性患者检出不同型别数合计 42 次（高危型 36 次）；67 例宫颈 CIN II 级病变 HPV 阳性患者检出不同型别数合计 97 次（高危型 88 次）；188 例宫颈 CIN III 级病变 HPV 阳性患者检出不同型别数合计 263 次（高危型 255 次），见表 1。宫颈 CIN I、CIN II 和 CIN III 病变组织之间总 HPV 感染率比较，经统计学处理 χ^2 值分别为 6.01、46.83 和 14.11， P 值都小于 0.05，提示宫颈 CIN I、CIN II 和 CIN III 病变组织之间 HPV 感染有显著性差异。

表 1 3 组宫颈 CIN 病变 HPV 感染者不同型别感染频率及百分率的比较[n(%)]

HPV 型别*	宫颈 CIN I	宫颈 CIN II	宫颈 CIN III
HPV 16	8(19.05)	17(17.53)	115(43.73)
HPV 18	9(21.43)	22(22.68)	38(14.45)
HPV 58	6(14.29)	8(8.25)	26(9.89)
HPV 33	5(11.91)	11(11.34)	25(9.51)
HPV 52	1(2.38)	8(8.25)	15(5.70)
HPV 31	1(2.38)	10(10.31)	14(5.32)
HPV 6	1(2.38)	1(1.03)	5(1.90)
HPV 51	0(0.00)	3(3.09)	4(1.52)
HPV 59	2(4.76)	1(1.03)	3(1.14)
HPV 82	0(0.00)	0(0.00)	3(1.14)
HPV 35	0(0.00)	3(3.09)	2(0.76)
HPV 43	3(7.14)	2(2.06)	2(0.76)
HPV 56	1(2.38)	1(1.03)	2(0.76)

续表 1 3 组宫颈 CIN 病变 HPV 感染者不同型别感染频率及百分率的比较[n(%)]

HPV 型别*	宫颈 CIN I	宫颈 CIN II	宫颈 CIN III
HPV 66	1(2.38)	3(3.09)	2(0.76)
HPV 68	1(2.38)	1(1.03)	2(0.76)
HPV 39	0(0.00)	0(0.00)	1(0.38)
HPV 45	1(2.38)	0(0.00)	1(0.38)
HPV 53	0(0.00)	0(0.00)	1(0.38)
HPV 73	0(0.00)	0(0.00)	1(0.38)
HPV 81	0(0.00)	2(2.06)	1(0.38)
HPV 11	2(4.76)	2(2.06)	0(0.00)
HPV 42	0(0.00)	1(1.03)	0(0.00)
HPV 44	0(0.00)	1(1.03)	0(0.00)
总计	42(100.00)	97(100.00)	263(100.00)

*：对多重感染者，各型别的阳性率重复计算。

3 讨论

HPV 感染是宫颈癌瘤的主要的致病因素，目前已发现了 200 多种不同类型的 HPV，根据 HPV 致病性的差异性，将其分为高危型和低危型两大类，其中感染生殖道黏膜有 50 多种类型，同一种疾病可由某一种 HPV 型别或多种 HPV 型别引起，某一种 HPV 型别或多种 HPV 型别也可引起不同的疾病^[1,3-4]。随着我国城市中宫颈癌筛查的普及，浸润性宫颈鳞状细胞癌的发病率有所下降，但近年来，宫颈上皮内瘤病变（CIN）的发病率逐步增加，并有年轻化的趋势。因此，对我国 CIN 组织标本进行 HPV 基因检测，了解其基因谱分布情况及其规律，对我国宫颈癌的防控意义重大。

HPV 已被认为是宫颈癌的主要致病因素，以至于人们把高危型 HPV 作为预测女性患 CIN 风险的标志物。传统的宫颈细胞学筛查存在着一定比例的假阴性率，通常达 20%，甚至更高，以致造成对宫颈 CIN 病变和宫颈癌的漏片诊断。基因芯片检测技术对高危型 HPV 检测的阴性预测值达 95% 以上，人为干扰因素最小，可有效地降低或消除由于宫颈细胞学检查假阴性所造成的漏诊。当高危型 HPV 检测阳性而细胞学检查正常的妇女，不能被认为是假阳性，再次阅时可发现其中有 5%~7% 的人有细胞学形态异常。有研究资料显示，从这一组人群中 10% 在 4 年内发展成为 CIN III 病变，由此可见，高危型 HPV 分型检测可有效预测 CIN 的发病风险，同时又可极大地减少细胞学检查的假阴性结果^[1,5-6]。

本研究结果表明：（1）宫颈 CIN I、CIN II 和 CIN III 病变患者中单一型 HPV 感染率分别是 37.74%（20/53）、35.82%（24/67）和 59.04%（111/188），多重感染率分别是 16.98%（9/53）、40.30%（27/67）和 34.04%（64/188），提示宫颈 CIN I、CIN II 和 CIN III 病变患者是以一重 HPV 感染为主，多重感染为辅，CIN II 病变组多重感染比 CIN I 和 CIN III 病变组明显增加，说明宫颈瘤变患者中一重感染类型较丰富，而多重感染呈现出不断增加的趋势，出现了较为少见的六重感染及 CIN II 病变组多重感染比例明显增加的情况，值得我们分析和研究。（2）HPV 感染是诱发 CIN 发病的重要因素，只有少数持续性 HPV 感染可能会发展成为 CIN，最终引发宫颈癌。有报道宫颈 CIN I、CIN II 和 CIN III 病变患者中 HPV 检出率分别是 57.99%、78.38% 和 85.71%，本研究宫颈 CIN I、CIN II 和 CIN III 病变患者中 HPV 阳性率分别是 54.72%、76.12% 和

93.09%, 宫颈 CIN I、CIN II 病变 HPV 感染率比前者稍低, CIN III 病变比前者要高得多, 这可能与检测的方法、试剂及检测 HPV 的型别数有关。(3) 从 HPV 感染的生物学角度来看, 低度病变(CIN I) 仅仅是 HPV 感染黏膜后的形态学表现, 此时的 HPV 并没有导致宿主细胞的遗传学变化, 应该严密随访, 观察机体是否能够在 1~2 年内将 HPV 清除。临床上一一般采用随访的方法来治疗 CIN I 患者, 建议诊断后的第 6 个月和第 12 个月重复细胞学检查, 或于第 12 个月行高危 HPV DNA 检测。如果重复细胞学检查结果为无明确诊断意义的非典型鳞状上皮细胞(ASCUS) 及以上病变, 或高危 HPV DNA 阳性, 则进一步行阴道镜检查。多数 CIN I 病变会在 2 年内自然消退, HPV 也自然清除, 复发的病例均为 HPV 高危型持续性阳性者。因此, 对于 HPV 高危型持续性阳性的 CIN I 病变患者应警惕其进展为高度 CIN 病变。(4) 流行病学调查资料显示, 高危型 HPV 导致宫颈癌的几率约为 1%, 而低危型 HPV 导致宫颈癌的几率仅为 0.1%, 95% 以上的宫颈癌是由高危型 HPV 感染引起的, 其中 HPV16 是最主要的致病型别^[5,8,10]。本研究显示宫颈 CIN I、CIN II 病变中 HPV 感染 18 型比 16 型出现频率稍多, 而 CIN III 病变中 HPV 感染 16 型比 18 型出现频率明显增多, 提示随着宫颈 CIN 病变级别的增高 HPV16 型感染频率呈现出不断增加趋势, 以致在宫颈 CIN III 病变和宫颈鳞癌中 HPV16 型成为最主要的致癌致瘤型别, 从宫颈 CIN I 到 CIN III 病变都是以 HPV16 和 18 型为主, 还检测到少数患者感染了其他高危型 HPV, 低危型 HPV 在宫颈 CIN I 到 CIN III 病变中检出了 HPV6、11、42、43、44、81 型, 这些低危型 HPV 或与高危型 HPV 同时出现在混合感染中, 或单独致瘤。CIN I 病变检出了 1 例 43 型 HPV, 占此感染率的 1.89%(1/53), CIN II 病变检出了 1 例 11 型和 1 例 81 型 HPV, 占此感染率的 2.99%(2/67), CIN III 病变出现 2 例 6 型 HPV, 占此感染率的 1.06%(2/188), 提示从宫颈 CIN I 到 CIN III 病变 HPV 感染绝大多数人都是高危型 HPV, 只有极少数是低危型 HPV。因此, 在防控宫颈癌瘤时, 主要控制高危型 HPV 同时兼顾低危型 HPV。(5) 由于 HPV 型别众多, 关注和检测感染人类并诱发人体癌症的高危型 HPV 尤为重要, 特别是 HPV16 和 HPV18 型。临床研究发现 HPV16 和 HPV18 型阳性的女性 CIN I 患者在 2 年内发展为 CIN III 的概率分别是其他高危型 HPV 的 3 倍和 2 倍。HPV16 型阳性的 CIN II 和 CIN III 患者发病年龄较其他基因型患者更年轻化, HPV16 和 HPV18 型阳性较其他基因型的宫颈癌患者的发病年龄平均年轻 5 岁^[1,11,13]。本研究中宫颈 CIN I 组 HPV16 和 HPV18 型出现频率为 40.48%, 宫颈 CIN II 组 HPV16 和 HPV18 型出现频率为 40.21%, 宫颈 CIN III 组 HPV16 和 HPV18 型出现频率为 58.18%, 3 组的女性患者 HPV16 和 HPV18 型出现频率都排序前 2 位。前 2 组 HPV16 和 HPV18 两型感染频率都超过 40.00% 以上, 而 CIN III 组出现频率为 58.18%, 占半数以上。提示随着 CIN 病变级别的增加 HPV16 和 HPV18 型出现频率也随之增加。所以说临床妇科及体检科医生对 30 岁以上 HPV16 和 HPV18 型感染的女性更应该做好密切追踪和随访工作。

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤, 其发生存在着一个有癌前病变逐步演变为浸润性宫颈癌的连续的病理过程。宫颈癌的癌前病变为 CIN, 现分为 CIN I、CIN II、CIN III。CIN 病变发展过程在临床上表现为 3 种状态: 部分 CIN 病变自然消退或逆转为较低级别的 CIN; 部分 CIN 病变保持不变; 另外一部

分则进展为更高级别的 CIN 病变, 甚至发展为浸润性宫颈癌。目前全世界妇科医师几乎都在用手术的方式对 CIN II 以上的病变进行干预治疗, 治疗的结果是 CIN 病灶切除了, 但病灶周围的 HPV 往往依然还存在。由于宫颈癌病因学明确, 药物的超早期干预治疗是未来宫颈癌瘤治疗的发展方向。因此, 了解 HPV 导致 CIN 病变及其 CIN 病变自然转归的关系, 将成为临床妇科医师判断宫颈病变发生风险、进行 CIN 个性化治疗及降低宫颈癌发病率的重要环节^[1,5,16]。

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] 董云灿, 耿建祥, 张劲松, 等. 1 722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒基因的分型[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(7): 817-818, 820.
- [3] 张金浩, 耿建祥, 吴崑崙, 等. 结直肠肿瘤中人乳头瘤病毒感染的基因分析[J]. 医学研究生学报, 2011, 24(2): 154-157.
- [4] 张金浩, 耿建祥, 樊志敏, 等. 257 例肛门及肛管尖锐湿疣组织 HPV 感染的基因分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(5): 520-523.
- [5] 邹琳, 兰建云, 耿建祥, 等. 47 例宫颈腺癌中人乳头瘤病毒感染基因分型的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(4): 393-394, 397.
- [6] 林小娟, 赵霞. 人乳头瘤病毒感染与宫颈上皮内瘤变[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(3): 167-170.
- [7] 任晓惠, 耿建祥, 李海, 等. 某市 2109 例女性宫颈细胞中 HPV 基因型别的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(13): 1542-1544.
- [8] 龙秀荣, 王志惠, 耿建祥, 等. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(24): 2958-2959, 2962.
- [9] 魏谨, 耿建祥, 朴正爱, 等. 已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒感染的基因分型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(23): 5202-5205.
- [10] 吴令英, 安菊生. 宫颈上皮内瘤变的诊治[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(3): 170-172.
- [11] Bruni L, Diaz M, Castellsague X, et al. Cervical human papilloma-virus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings[J]. J Infect Dis, 2010, 202(16): 1789-1799.
- [12] 张佳立, 邵红艺, 张江宇, 等. HPV 多重感染与宫颈癌及癌前病变发生、发展的关系研究[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(23): 3270-3274.
- [13] De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(11): 1048-1056.
- [14] Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(5): 315-324.
- [15] Lo KW, Wong YF, Chan MK, et al. Prevalence of human papillo-mavirus in cervical cancer: a multicenter study in china[J]. Int J Cancer, 2002, 100(3): 327-331.
- [16] 王宏景, 刘忠伦, 耿建祥, 等. 苏州两医院女性宫颈 HPV 感染基因型别的对比研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(4): 404-406.