

• 论 著 •

外阴、阴道和宫颈尖锐湿疣组织中 HPV 感染的对比研究*

单慧敏¹, 施启丰², 耿建祥^{2△}, 仲玉英², 梅静², 龙秀荣², 夏林², 王宏景², 赵雪²
 (1. 江苏省大丰市人民医院病理科 224100; 2. 南京中医药大学第三附属医院病理科/
 江苏省 HPV 协作组, 南京 210001)

摘要:目的 研讨外阴、阴道和宫颈尖锐湿疣(CA)组织中乳头瘤病毒(HPV)感染型别的分布状况以及临床意义。方法 应用基因芯片结合 PCR 技术对 63 例外阴尖锐湿疣、61 例阴道尖锐湿疣和 65 例宫颈尖锐湿疣组织行 23 种 HPV 基因型检测,并分析患者的临床病理资料。结果 63 例外阴尖锐湿疣组织中检出 HPV 阳性者 56 例, HPV 感染率为 88.89%(56/63); 61 例阴道尖锐湿疣组织中检出 HPV 阳性者 55 例, HPV 感染率为 90.16%(55/61); 65 例宫颈尖锐湿疣组织中检出 HPV 阳性者 62 例, HPV 感染率为 95.39%(62/65)。结论 HPV 感染与外阴、阴道和宫颈尖锐湿疣的发病密切相关, HPV6 和 11 是主流型别, 以外阴尖锐湿疣最为常见。基因芯片结合 PCR 技术是适合应用于临床行 HPV 分型诊断的一种方法, 具有敏感性好、特异性高的特点。对女性外阴、阴道和宫颈尖锐湿疣的临床诊断、治疗及其疫苗的研究具有重要的意义。

关键词:尖锐湿疣; 乳头瘤病毒; 基因分型; 外阴; 阴道; 宫颈

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)16-2239-03

A comparative study of HPV infection in condyloma acuminata tissues of vulva, vagina and cervix*

SHAN Huimin¹, SHI Qifeng², GENG Jianxiang^{2△}, ZHONG Yuying², MEI Jing²,
 LONG Xiurong², XIA Lin², WANG Hongjing², ZHAO Xue²

(1. Department of Pathology, Dafeng Municipal People's Hospital, Dafeng, Jiangsu 224100, China; 2. Department of Pathology, Third Affiliated Hospital, Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To study the distribution status and clinical significance of human papillomavirus(HPV) infection genotypes in condyloma acuminata(CA) tissues of vulva, vagina and cervix. Methods The gene-chips combined with polymerase chain reaction (PCR) technology were utilized for detecting 23 kinds of HPV genotypes in tissue specimens from 63 cases of vulval CA, 61 cases of vaginal CA and 65 cases of cervical CA. Their clinical pathological data were analyzed. Results In 63 cases of vulval CA, 56 cases were HPV positive with the HPV infection rate of 88.89%(56/63), in 61 cases of vaginal CA, 55 cases were HPV positive with the HPV infection rate of 90.16%(55/61), and in 65 cases of cervical CA, 62 cases were HPV positive with the HPV infection rate of 95.39%(62/65). Conclusion HPV infection is closely related to the CA pathogenesis in vulva, vagina and cervix. HPV6 and HPV 11 are main stream genotypes, in which vulval CA is most common. The gene-chips combined with PCR technology is a method suitable for HPV typing diagnosis, and has the characteristics of good sensitivity and high specificity, which has an important significance for clinical diagnosis, treatment and vaccine study of CA in femal vulva, vagina and cervix.

Key words: condyloma acuminata; human papillomavirus; genotyping; vulva; vagina; cervix

乳头瘤病毒(HPV)感染在外阴病变中所起的作用与在阴道和宫颈的病变很相似。在外阴部, 这些病变包括湿疣性病变[尖锐湿疣(CA)和扁平湿疣]、外阴上皮内肿瘤形成(VIN)、浸润性鳞状细胞癌(包括尿道鳞状细胞癌)和疣状癌等。临床上, 鉴于上述疾病的自然病程和治疗方法的明显不同, 区分这些病变是非常重要的。对于这些疾病的诊断一定要行活组织病理检查, 以明确其病理诊断, 有利于临床妇产科医师对这类疾病的治疗及预后的判断。CA 多发生于皮肤皱褶处, 呈良性瘤样增生性病变。发生于肛门、外生殖器部位的, 又称肛门生殖器疣(AGW)。在女性, 外阴多灶发生, 或在外阴、肛周或外阴、阴道、宫颈联合发生^[1-3]。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 1~12 月在南京市中医院行宫颈活组织病理检查的 20 例病理诊断为轻度急、慢性且鳞状上皮基本正常的宫颈石蜡包埋组织作为对照组, 患者年龄 24~65 岁, 平均 37.05 岁。收集 1991 年 8 月至 2015 年 8 月在南京

市中医院妇产科手术的女性 CA 的石蜡组织标本, 其中 63 例为外阴 CA, 患者年龄 17~60 岁、平均 29.87 岁; 61 例为阴道 CA, 患者年龄 19~60 岁、平均 30.28 岁; 65 例为宫颈 CA, 患者年龄 19~71 岁、平均 29.34 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 5810 R 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。显色液须即用即配, 根据需要的浓度用蒸馏水调配。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集 所有外阴、阴道和宫颈石蜡组织标本: 先

* 基金项目: 江苏省南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。

作者简介: 单慧敏, 女, 副主任医师, 主要从事 HPV 感染相关性疾病的研究。△ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

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,然后在金属浴中加热 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 宫颈正常组织、外阴 CA、阴道 CA 及宫颈 CA 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 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

宫颈正常组织与外阴、阴道和宫颈 CA 组织的 HPV 阳性例数比较,差异均有统计学意义($\chi^2 = 44.89, 46.42, 59.94, P<0.01$),而外阴、阴道和宫颈 CA 之间 HPV 阳性例数比较,差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.05, 1.87, 1.29, P>0.05$)。

2.1 宫颈正常石蜡组织标本 HPV 检测结果 从 20 例宫颈正常石蜡组织标本中检测出 HPV 阳性 2 例,均为一重感染(均为 HPV6 型)。

2.2 外阴 CA 组织 HPV 检测结果 63 例外阴 CA 患者中阳性 56 例,总的 HPV 感染率为 88.89%(56/63)。其中一重 HPV 感染 35 例,占总 HPV 感染率的 55.56%(35/63);一重 HPV 感染中 HPV11 型 18 例,其阳性检出率为 28.57%(18/63),HPV11 型是最主要的感染型别,HPV6 型 14 例,其阳性检出率为 22.22%(14/63)。多重 HPV 感染 21 例,其中二重感染 13 例、三重感染 7 例、四重感染 1 例、六重感染 2 例,其 HPV 感染率为 33.33%(21/63);多重 HPV 感染中 HPV6+16 型、HPV6+52 型和 HPV11+31 型各 2 例,分别占多重感染的 3.17%(2/63),是多重感染的主要型别。63 例外阴 CA 患者 HPV 阳性检出不同型别数合计 92 次,其中低危型出现 61 次,高危型出现 31 次。见表 1。

2.3 阴道 CA 组织 HPV 检测结果 61 例阴道 CA 患者中阳性 55 例,总的 HPV 感染率为 90.16%(55/61)。其中一重 HPV 感染 35 例,占总 HPV 感染率的 57.38%(35/61),一重 HPV 感染中 HPV11 型 20 例,其阳性检出率为 32.79%(20/61),HPV11 型是最主要的感染型别,其次是 HPV6 型 13 例,其阳性检出率为 21.31%(13/61)。多重 HPV 感染 20 例,其中二重感染 14 例、三重感染 3 例、四重感染 2 例、五重感染 1 例,其 HPV 感染率为 32.79%(20/61);多重 HPV 感染中 HPV6+11 型 4 例,占多重感染的 6.56%(4/61),是多重感染的主要型别,其次是 HPV11+52 型 3 例,占多重感染的 4.92%(3/61)。61 例阴道 CA 患者 HPV 阳性检出不同型别数合计 85 次,其中低危型出现 62 次,高危型出现 23 次。见表 1。

2.4 宫颈 CA 组织 HPV 检测结果 65 例宫颈 CA 患者中阳性 62 例,总的 HPV 感染率为 95.39%(62/65)。其中一重 HPV 感染 46 例,占总 HPV 感染率的 70.77%(46/65),一重 HPV 感染中 HPV11 型 29 例,其阳性检出率为 44.62%(29/65),HPV11 型是最主要的感染型别,其次是 HPV6 型 14 例,其阳性检出率为 21.54%(14/65)。多重 HPV 感染 16 例,其

中二重感染 13 例、三重感染 3 例,其 HPV 感染率为 24.62%(16/65);多重 HPV 感染中,HPV6+11 型 4 例,占多重感染的 6.15%(4/65),是多重感染的主要型别,HPV11+18 型 2 例,占多重感染的 3.08%(2/65),是多重感染的其次型别。65 例宫颈 CA 患者 HPV 阳性检出不同型别数合计 81 次,其中低危型出现 65 次,高危型出现 16 次。见表 1。

表 1 外阴、阴道及宫颈 CA HPV 感染者不同型别感染频率及百分率的比较[n(%)]

HPV 型别	外阴 CA	阴道 CA	宫颈 CA
HPV6	29(31.52)	20(23.53)	23(28.40)
HPV11	26(28.26)	38(44.71)	41(50.62)
HPV16	6(6.52)	5(5.88)	4(4.94)
HPV18	0(0.00)	2(2.35)	3(3.70)
HPV31	5(5.44)	2(2.35)	0(0.00)
HPV33	3(3.26)	1(1.18)	2(2.47)
HPV35	1(1.09)	0(0.00)	0(0.00)
HPV39	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
HPV42	4(4.35)	2(2.35)	1(1.24)
HPV43	2(2.17)	2(2.35)	0(0.00)
HPV45	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
HPV51	1(1.09)	0(0.00)	1(1.24)
HPV52	5(5.44)	7(8.24)	2(2.47)
HPV53	1(1.09)	0(0.00)	2(2.47)
HPV56	1(1.09)	0(0.00)	1(1.24)
HPV58	2(2.17)	2(2.35)	0(0.00)
HPV59	0(0.00)	1(1.18)	0(0.00)
HPV66	0(0.00)	1(1.18)	0(0.00)
HPV68	2(2.17)	1(1.18)	1(1.24)
HPV73	1(1.09)	1(1.18)	0(0.00)
HPV81	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
HPV82	2(2.17)	0(0.00)	0(0.00)
HPV83	1(1.09)	0(0.00)	0(0.00)
总计	92(100.00)	85(100.00)	81(100.00)

注:对多重感染者,各型别的阳性率重复计算。

3 讨 论

HPV 是外阴、阴道和宫颈 CA 形成的必要因素,部分 HPV 型别可导致这些部位 CA 的瘤变和癌变^[1,3-4],现已引起病理科和妇产科医师的高度重视,尤其是含有高危型或伴有高危型 HPV 感染的 CA。因此,对外阴、阴道和宫颈 CA 组织行 HPV 分型检测意义重大。

湿疣是由 HPV 感染引起的性传播性疾病,通常是低危型,以 6 和 11 型为主,伴有少量的高危型^[1,5-6]。CA 是了解比较清楚的一型湿疣,大体特征为一个或多个隆起而质软的、大小不一的肿块。挖空细胞是诊断 CA 的重要依据,但不能作为唯一的依据,因为挖空细胞并非随时可表达,在病变的早期,挖空细胞尚未形成,而在病变的晚期,挖空细胞可能消退^[1,3,6]。因此,现阶段,女性生殖器 CA 的诊断采用的是临床病史、病理组织学加 HPV 分型检测三结合的诊断法。

本研究提示:(1)20 例正常宫颈组织中 HPV 阳性者 2 例。63 例外阴 CA 患者中阳性者 56 例。61 例阴道 CA 患者中阳性者 55 例。65 例宫颈 CA 患者中阳性者 62 例。宫颈正常组织与外阴、阴道和宫颈 CA 组织的 HPV 阳性人数比较,差异均有统计学意义($P<0.01$),而外阴、阴道和宫颈 CA 之间 HPV 阳性人数比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。(2)63 例外阴 CA 组织中一重(35 例)和多重(21 例)感染之比为 1.67 : 1;61 例阴道 CA 组织中一重(35 例)和多重(20 例)感染之比为

1.75 : 1; 65 例宫颈 CA 组织中一重(46 例)和多重(16 例)感染之比为 2.88 : 1。三者比较从外阴 CA, 到阴道 CA, 再到宫颈 CA, 其组织中一重 HPV 感染数与多重 HPV 感染数之比, 呈现出逐步升高的趋势, 这种现象是患者机体不同部位内外环境造成的, 还是原本就是这种感染状况, 还有待于大样本的研究。

(3) 从外阴、阴道和宫颈 CA 组织 HPV 感染分类来看, 56 例外阴 CA HPV 感染者中, 低危型 36 例, 低高危型 18 例, 高危 2 例; 55 例阴道 CA HPV 感染者中, 低危型 40 例, 低高危型 14 例, 高危型 1 例; 62 例宫颈 CA HPV 感染者中, 低危型 48 例, 低高危型 10 例, 高危型 4 例。三组比较 HPV 感染都表现出从低危型到低高危型及高危型依次降低的现象, 提示外阴、阴道和宫颈 CA 都是以低危型为主, 低高危型和高危型为辅的感染模式。(4) 从外阴、阴道和宫颈 CA 组织的高、低危型 HPV 感染出现率来看, 56 例外阴 CA HPV 感染者中, 低危型出现 61 次, 高危型出现 31 次, 低高危感染之比为 1.97 : 1; 55 例阴道 CA HPV 感染者中, 低危型出现 62 次, 高危型出现 23 次, 低高危感染之比为 2.70 : 1; 62 例宫颈 CA HPV 感染者中, 低危型出现 65 次, 高危型出现 16 次, 低高危感染之比为 4.06 : 1。三组 HPV 感染频率比较都表现出低危型出现频率远多于高危型出现频率的状况, 外阴、阴道和宫颈 CA 组织 HPV 感染, 从女性生殖道由外向内, 其病变的低高危型感染率之比随之增加, 这是一种 HPV 感染的常态, 还是女性生殖道内环境的使然, 值得进行深入研究。(5) 2006 年 6 月始, 西方国家率先使用了以预防为目的的 HPV 疫苗来预防宫颈肿瘤^[1,7-9], 如使用这种预防性疫苗(HPV 6、11、16、18 型预防性四价疫苗)可起保护作用。本文外阴 CA 62.50%(35/56)的患者(单一型感染者 32 例, 多型感染者 3 例)、阴道 CA 72.73%(40/55)的患者(单一型感染者 33 例, 多型感染者 7 例)、宫颈 CA 85.48%(53/62)的患者(单一型感染者 44 例, 多型感染者 9 例)的女性可免遭这 4 型低高危 HPV 感染而诱发生殖道的 CA, 过半的女性生殖道 CA 患者可从中获益。(6) 外阴、阴道和宫颈均可发生鳞状上皮内病变。鳞状上皮内病变可单独发生, 也可在 CA 病变中发生。CA 合并外阴、阴道和宫颈上皮内病变(VIN、VaIN 和 CIN), 尤其合并 CIN I 级和 CIN I-II 级更为常见。现已证实, 外阴、阴道和宫颈的鳞状上皮癌的发生与 16 和 18 型 HPV 感染最为密切^[1,10-12]。因此, 对患有外阴、阴道和宫颈 CA 的患者, 妇产科医师一定要给患者行 CA 病变的活组织检查, 一可明确诊断, 二可及时发现有无伴有癌瘤情况, 同时也要行 CA 组织 HPV 分型检测, 对 HPV16 型和 HPV18 型的患者即使活组织检查正常, 也要给予定期随访。

总之, 女性生殖道 CA 是一类性传播性疾病, 致病因子是 HPV, 降低其发病率要做到预防和治疗相结合^[13-16]。预防女性生殖道 CA 的最好办法是尽早发现和治疗患者及其性伴侣, 对高发年龄段的群体进行卫生宣传和教育, 并管控不良性行为, 提倡广泛使用阴茎套以及男性和女性接种四价 HPV(6、11、16、18 型)预防性疫苗。这样多管齐下, 防治并举, 可最大限度地降低女性生殖道 CA 的发生率、瘤变率和癌变率, 可造福于广大女性患者。

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.

[3] 张金浩, 耿建祥, 樊志敏, 等. 肛管及肛门区尖锐湿疣组织中人乳头瘤病毒基因类型的研究[J]. 医学研究生学报, 2011, 24(11): 1129-1132.

[4] 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.

[5] 龙秀荣, 王志蕙, 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.

[6] 张金浩, 耿建祥, 樊志敏, 等. 257 例肛管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.

[7] 蔡为民, 王宏景, 耿建祥, 等. 宫颈正常细胞和宫颈鳞癌、腺癌组织中 HPV 感染基因型的分布[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(8): 854-857.

[8] 冷秀兰, 范雪梅, 耿建祥, 等. 宫颈鳞癌及腺癌组织中 HPV 感染基因型分布的比较研究[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(10): 1594-1596.

[9] 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.

[10] Bruni L, Diaz M, Castellsague X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings[J]. J Infect Dis, 2010, 202: 1789-1799.

[11] 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.

[12] Hai L, Xubo W, Jianxiang G, et al. Clinical study of styping detection of human papillomavirus (HPV) infection with microarray from paraffinembedded specimens of cervical cancer and precursor lesions[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2015, 15(9): 6423-6428.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 许育绚, 崔永胜, 耿建祥, 等. 968 例宫颈细胞中人乳头瘤病毒 E6/E7mRNA 基因分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(4): 617-619.

(收稿日期: 2016-03-25 修回日期: 2016-06-22)