

• 临床研究 •

HPV 分型检测在惠州地区女性宫颈癌筛查中的价值分析*

钟继生, 毛毅影, 梁罕超, 杨桂春, 周福深
(惠州市第二妇幼保健院, 广东惠州 516001)

摘要:目的 探究分析人乳头瘤病毒(HPV)分型检测在惠州地区女性宫颈癌筛查中的应用价值。方法 选取 2016 年 4 月至 2017 年 6 月在惠州地区不同医院进行健康检查的 8 000 例女性患者作为研究对象,通过巴氏涂片细胞学检测、阴道镜检查及病理组织学检测等方法将其按宫颈病变的不同级别分为健康组、慢性宫颈炎组、宫颈上皮内瘤变(CIN) I 组、CIN II 组、CIN III 组以及宫颈癌组。所有受试者均采用凯普高危型 HPV(HR-HPV)核酸检测试剂盒进行 HPV 分型检测,并对结果进行统计学分析处理。结果 8 000 例女性共检出 1 361 例 HPV 感染者,HPV 感染率 17.01%,不同的年龄段感染率不同,HPV 的感染率随着年龄的增长逐渐升高,各年龄段之间感染率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);HR-HPV 感染阳性率随着宫颈病变的级别上升而逐渐增高,各组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 HPV 分型检测对宫颈癌的病变诊断具有极其重要的意义,可作为临床诊断宫颈癌的主要手段,值得进行广泛地推广应用。

关键词:人乳头瘤病毒; 分型; 宫颈癌; 防治

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)18-2605-03

宫颈癌是全世界仅次于乳腺癌致女性死亡的恶性肿瘤^[1-2],人乳头瘤病毒(HPV)感染是目前宫颈癌公认的最大因素^[3-4]。本研究对惠州地区 35~60 岁女性健康人群进行 HPV 分型检测,以确定是否感染 HPV,掌握本地区女性 HPV 感染情况,探索经济、简便、适宜本地区的宫颈癌筛查技术,进一步完善本地区健康女性宫颈癌筛查的体检模式,以达到降低宫颈癌的发生率及病死率。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 4 月至 2017 年 6 月在惠州地区不同医院进行健康检查的 8 000 例女性患者作为研究对象,年龄 35~60 岁,对 8 000 名女性进行宫颈细胞学检查以及 HPV 的分型检测,细胞学检查异常或 HPV 感染阳性的受试者进行阴道镜检查结合组织病理学检查^[5],并将检查结果按宫颈病变的结果分为健康组 6 258 例、慢性宫颈炎组 787 例、宫颈上皮内瘤变(CIN) I 组 468 例、CIN II 组 216 例、CIN III 组 187 例及宫颈癌组 84 例。所有研究对象均无宫颈上皮病变史以及盆腔放射治疗史,已排除妊娠期或检查前 24 h 有性生活的女性。本研究经过患者及其家属的知情同意以及医院相关部门的批准后实施。

1.2 检测方法

1.2.1 HPV 检测 将专用的宫颈刷置于宫颈口,轻轻搓动宫颈刷使其顺时针旋转 3~5 圈。慢慢取出宫颈刷,将其放入装有细胞保存液的标本管中。在管口处将多余的刷柄折断,将刷头留在样品管中,旋紧管盖,做好样品标识,然后使用由凯普公司研制开发的高危型 HPV(HR-HPV)核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法),即 HPV12+2 产品(可检测 14 种 HR-HPV 分型,包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 共 14 种 HR-HPV 分型),按照该试剂盒的使用要求采用荧光 PCR 法进行 HPV 分型检测。

1.2.2 宫颈细胞学检查 采用液基细胞学制片、巴氏染色进行宫颈细胞学检查,诊断标准均采用 TBS 分类法。

1.2.3 阴道镜检查 对于需要进行阴道镜检查的受试者,由医生以窥阴器暴露宫颈,用棉拭子将宫颈过多的分泌物擦去,然后在电子阴道镜下观察新旧鳞柱状细胞交界,寻找异常图

像,若发现异常图像,先观察评估病变,然后确定活检部位,并在相应部位取活检,将组织分瓶固定进行病理学检查。细胞学检查的标本采集与阴道镜检查之间的时间间隔应不宜过长^[6-7]。

1.3 观察指标 观察所有受试者的 HPV 的感染情况,HPV 筛查患者中不同年龄段中 HPV 感染情况,以及不同级别宫颈病变中 HR-HPV 的感染情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析,呈正态分布、方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两两比较采用 SNK- q 检验。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV 感染情况 8 000 例女性共检出 1 361 例 HPV 感染者,HPV 感染率为 17.01%,最为常见的高危感染型别依次为 HPV-16 型(408/1 361,29.98%)、HPV-58 型(284/1 361,20.87%)、HPV-52 型(267/1 361,19.62%)、HPV-53 型(146/1 361,10.73%)、HPV-33 型(119/1 361,8.74%)。

2.2 不同年龄段患者的 HPV 感染情况 不同的年龄段感染率不同,35~<40 岁为 14.06%,40~<45 岁为 15.32%,45~<50 岁为 23.10%,50~<55 岁为 31.80%,55~60 岁为 40.64%。数据显示,HPV 的感染率随着年龄的增长逐渐升高。各年龄段之间 HPV 感染率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同年龄段患者的 HPV 感染情况[n(%)]

年龄(岁)	n	HPV 感染
35~<40	3 207	451(14.06)
40~<45	3 394	520(15.32)
45~<50	853	197(23.10)
50~<55	327	104(31.80)
55~60	219	89(40.64)

* 基金项目:惠州市科技计划项目(20160806)。

2.3 不同级别宫颈病变中 HR-HPV 的感染结果 不同级别宫颈病变中 HR-HPV 的感染结果经统计,健康组、慢性宫颈炎组、CIN I 组、CIN II 组、CIN III 组以及宫颈癌组的 HR-HPV 感染阳性率分别为 6.34%、33.16%、61.75%、74.54%、90.37%、100.00%。HR-HPV 感染阳性率随着宫颈病变的级别上升而逐渐增高,各组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同级别宫颈病变中 HR-HPV 的感染结果

组别	n	HPV 感染例数(n)	HPV 感染阳性率(%)
健康组	6 258	397	6.34
慢性宫颈炎组	787	335	33.16
CIN I 组	468	289	61.75
CIN II 组	216	161	74.54
CIN III 组	187	169	90.37
宫颈癌组	84	84	100.00
χ^2			89.576
P			0.003

3 讨 论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤,据统计,我国每年约有 13 万的宫颈癌新发病例,约占全球范围内宫颈癌新发病例的 1/4。宫颈癌严重影响女性的生命安全和身心健康。宫颈癌早期患者及时接受治疗具有较高的治愈率,并且大多数的宫颈癌前病变均能在早期检查中被发现,因此有效的宫颈癌筛查方式对于提高宫颈癌的防治效果具有重要意义。传统宫颈癌筛查始于巴氏涂片的发明,即从女性的子宫颈部刮取少量的细胞,涂抹在载玻片上,然后在显微镜下检查,巴氏涂片是宫颈细胞学检查的最简单方法^[8-9]。现在较先进的宫颈细胞学检查是液基细胞学检查,宫颈拭子上的细胞在涂抹到载玻片之前先在细胞保存液中进行漂洗,液基细胞学检查也是如今最常用的细胞学检查方法^[10]。目前,惠州地区健康女性人群的宫颈癌筛查大部分仍采用醋酸试验和(或)宫颈脱落细胞形态学检查,操作繁琐,受影响因素较多^[11],检出率不理想。近年来,随着宫颈癌防治研究的不断深入和进步,不少学者发现 HPV 感染几乎是所有宫颈癌发生的必要条件,因而,HPV 检查在宫颈癌筛查诊断中起着至关重要的作用^[12]。当前推荐的宫颈癌筛查模式包括对每个女性进行宫颈细胞学检查和 HPV 检查,然后根据 HPV 检查和细胞学检查结果筛查出宫颈癌高风险的女性进行阴道镜检查,进而取可疑病变部位进行病理活检^[13]。

本研究中受试的 8 000 例女性中共检出 1 361 例 HPV 感染者,HPV 感染率为 17.01%,与广州、深圳地区的 HPV 感染相近。不同地区的 HPV 分型类别也存在地域性差异,在本次的惠州受试者中经 14 种 HR-HPV 分型检测,最为常见的分为 HPV-16 型(29.98%)、HPV-58 型(20.87%)、HPV-52 型(19.62%)、HPV-53 型(10.73%)、HPV-33 型(8.74%),此前也有研究报道,HPV-58 型和 HPV-52 型在南方地区的感染性要高于北方,与本研究结果相符,因此在宫颈癌及癌前病变的防治中应该充分考虑到 HPV 型别分布的地域性差异,研发针对地区性的 HPV 疫苗^[14]。本次研究结果显示,不同的年龄段感染率不同,HPV 的感染率随着年龄的增长逐渐升高,可能与 HPV 持续感染导致各种型别的 HPV 复合感染,以及老年妇女体内激素水平变化,机体免疫力下降,使得 HPV 易感性增

加以及 HPV 清除能力降低等因素有关。另外经统计不同级别宫颈病变中 HR-HPV 的感染结果,发现健康组、慢性宫颈炎组、CIN I 组、CIN II 组、CIN III 组以及宫颈癌组的 HR-HPV 感染阳性率分别为 6.34%、33.16%、61.75%、74.54%、90.37%、100.00%,HR-HPV 感染阳性率随着宫颈病变的级别上升而逐渐增高,各组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。这一结果提示,宫颈癌是一个从量变到质变,逐渐变化的病理过程,HPV 持续感染是癌前病变和宫颈癌发生的主要原因。细胞基因检测要早于细胞形态学变化,HPV 分型检测在高级别鳞状上皮内瘤变诊断上也具有较高的灵敏度和特异度^[15],可有效地增加宫颈病变的检出率,提前发现早期病变,降低宫颈癌的发生率及病死率,也可以用于患病风险的评估,指导患者的治疗管理以及多价 HPV 基因疫苗的研究,对于宫颈癌的早预防、早发现、早治疗具有重要作用。

综上所述,HPV 分型检测对宫颈癌的病变诊断具有极其重要的意义,可作为临床诊断宫颈癌的主要手段,值得进行广泛地推广应用。

参考文献

- [1] 王又又,向群英,余茜,等.宫颈癌高发区女性 HPV 感染及影响因素分析[J].中国公共卫生,2011,27(3):259-261.
- [2] 陈赛斐. HPV 在宫颈炎、宫颈癌前病变、宫颈癌中的检测及意义分析[J].中国妇幼保健,2011,26(15):2392-2393.
- [3] 徐晓英,汤春辉,薛晓玲.高危型 HPV、p16、COX-2 在宫颈癌中的表达及临床意义[J].重庆医学,2011,40(12):1199-1201.
- [4] 潘登华,何融泉,韦康来,等.人乳头状病毒 E6 蛋白与宫颈癌关系的研究进展[J].医学研究生学报,2014,27(11):1229-1232.
- [5] Thibaudeau E, Soulieres D, Fortin B, et al. HPV prevalence and prognostic value in a prospective cohort of 255 patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with chemoradiation therapy at Centre Hospitalier de l'Université de Montréal: a single-center experience[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(15 suppl): 5574.
- [6] 杨丽,何艳,马彩玲.人乳头瘤病毒疫苗预防宫颈癌及其相关感染有效性及安全性的 Meta 分析[J].中国全科医学,2015,18(12):1415-1424.
- [7] 谭清清. HPV 与 CIN、宫颈癌的关系探讨[J].中国现代医学杂志,2012,22(5):107-109.
- [8] 李丹,温玉芳,谢珊珊.人乳头状瘤病毒多重感染与宫颈癌患者病理特征的关系[J].中华医院感染学杂志,2015,25(24):5675-5677.
- [9] 贺国丽,吴秀荣,郑碧娟.宫颈癌与癌前病变中高危人乳头瘤病毒型别特征及差异分析[J].实用妇产科杂志,2016,32(6):459-461.
- [10] 何涛,孙宗立,袁红英,等.高危型人乳头状瘤病毒阳性患者支原体属感染与宫颈癌发生的相关性研究[J].中华医院感染学杂志,2014,24(9):2094-2095.
- [11] Martel M, Alemany L, Taberna M, et al. The role of HPV on the risk of second primary neoplasia in patients with oropharyngeal carcinoma[J]. Oral Oncol, 2017, 64(17):

37-43.

[12] 冯淑娟,王勇. 甘肃地区 164 例宫颈癌人乳头瘤病毒基因分型检测的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(9): 79.

[13] 胡滨,崔金全,邓克红,等. 宫颈癌组织高危型 HPV 感染与 HWAPL 蛋白表达的关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2014, 49(6): 862-865.

[14] 谭振华,廖子慧,陈雄毅,等. 肇庆地区育龄妇女人乳头瘤病毒(HPV)基因分型检测在宫颈癌筛查中的应用与分析[J]. 医学检验与临床, 2016, 27(9): 246-278.

[15] 李小欢,张春蕾,华正宇,等. 大连地区女性人乳头瘤病毒基因分型联合液基细胞学检测的临床应用[J]. 中国实验诊断学, 2014, 26(11): 1790-1792.

(收稿日期:2017-04-02 修回日期:2017-06-12)

血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平在类风湿关节炎诊疗中的临床应用研究

邹映东¹, 林云¹, 张兴宗¹, 周唯践¹, 杨雪松¹, 王玉明^{2△}

(1. 云南省中医医院, 昆明 650021; 2. 昆明医科大学第二附属医院, 昆明 650021)

摘要:目的 探讨血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平在类风湿关节炎(RA)诊疗中的应用价值。方法 选用 RA 确诊病例 46 例(RA 组, 又分为高度活动组 24 例、低度活动组 22 例), 健康对照 20 例作为对照组, 采用 qPCR SYBR GREEN I 嵌合荧光染料法, 以 U6 为内参, 检测 RA 组和对照组血清 miR-146a-3p、miR-125a-3p 表达水平, 分析其与 RA 诊断和疾病活动度的相关性。结果 RA 组 miR-146a-3p 表达水平[0.015(0.005, 0.055)]与对照组[0.001(0.001, 0.002)]比较, 差异具有统计学意义($P=0.001$); RA 组血清 miR-155-5 表达[0.039(0.020, 0.079)]与对照组水平[0.008(0.005, 0.016)]比较, 差异具有统计学意义($P=0.001$)。RA 高度活动组血清 miR-146a-3p 表达[0.055(0.028, 0.138)]与低度活动组水平[0.006(0.003, 0.007)]比较, 差异具有统计学意义($P=0.001$); miR-155-5p 表达[0.070(0.055, 0.145)]与低度活动组水平[0.024(0.014, 0.033)]比较, 差异具有统计学意义($P=0.001$)。结论 RA 患者血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平明显高于对照组, RA 高度活动组血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平高于低度活动组患者, 可认为检测两种 miRNA 血清表达水平可作为 RA 诊断和疾病活动度观察指标。

关键词:血清 miRNA; 类风湿关节炎; 表达水平; 临床应用

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)18-2607-03

类风湿关节炎(RA)是以侵蚀性关节炎为主要表现, 关节滑膜慢性炎症以及关节进行性破坏、畸形为特征的自身免疫性疾病。该病起病隐匿、病因不明, 早期临床症状不典型, 晚期则可造成关节的不可逆改变。我国是 RA 高发国家, 该病严重威胁人民群众健康的同时, 给国家和患病家庭带来了沉重的经济负担^[1-2]。因此, 对于 RA 患者的早期诊断和积极的干预具有重要的意义^[3]。近年来, 与 RA 相关的 miRNAs 研究进展表明, miRNAs 在 RA 患者关节滑液、组织滑膜细胞和外周血异常表达, 与 RA 的发生、发展、预后关系密切^[4]。结合 RA 诊疗现状和 miRNAs 研究进展, 本研究采用 qPCR 方法检测 RA 患者血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平, 探讨其在 RA 的诊断和疾病活动性观察中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 6 月至 2016 年 2 月在云南省中医医院风湿科确诊的 RA 病例 46 例(平均年龄为 53 岁, 均排除合并有肿瘤、糖尿病及其他自身免疫性疾病)作为研究对象(RA 组), 医院健康体检者 20 例(平均年龄为 48 岁)作为对照(对照组, 入选标准为无 RA 相关的临床表现, 同时排除肿瘤、糖尿病、自身免疫性疾病及炎症性疾病)。依据类风湿关节炎疾病活动(DAS28)评分, 将 RA 病例进一步细分为高度活动组 24 例(DAS28 \geq 5.1 分)和低度活动组 22 例(DAS28 $<$ 5.1 分)。RA 组和对照组在性别、年龄构成上比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。该研究已获得医院伦理委员会同意。

1.2 仪器与试剂 仪器: TL988 四通道实时荧光定量分析

仪、LT-80 加热型干式金属浴恒温器、TG16-W 微量台式高速离心机、低速冷冻离心机、微量管离心机、XK 96-A 快速混匀器、移液器; 试剂: miRcute miRNA 提取分离试剂、miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂、miRcute miRNA 荧光定量检测试剂、上游引物: hsa-miR-146a-3p、hsa-miR-155-5p U6 RNA、无核酸酶水、氯仿、无水乙醇。

1.3 方法 实验方法采用 qPCR SYBR GREEN I 嵌合荧光染料法。样本采集: 用无抗凝剂真空管采集 RA 组和对照组空腹静脉血液 4 mL, 室温凝固, 4 000 r/min 低温离心 10 min, 用无 RNase 耗材留取血清; miRNA 提取: 用 miRcute miRNA 提取分离试剂、氯仿、无水乙醇进行血清 miRNA 提取、分离和富集; cDNA 合成: 将提取纯化的 miRNA 加入到 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂配制的实验体系中, 在 LT-80 加热型干式金属浴恒温器上进行 miRNA 3'末端加多聚 A 尾 poly(A), Oligo(dT)-universal tag 进行逆转录反应, 合成与 miRNA 对应的 cDNA; qPCR: 将合成的 cDNA 和上游引物加入到用 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂配制的反应体系中, 离心混匀, 在 TL988 四通道实时荧光定量分析仪上完成上机操作。qPCR 反应程序: 第一阶段, 94 °C 2 min, 1 个循环; 第二阶段, 94 °C 20 s、60 °C 34 s(退火、延伸、读取荧光值), 共 45 个循环; 第三阶段, 95 °C 15 s、60 °C 60 s、95 °C 15 s、40 °C 5 s 生成溶解曲线。实验结果以溶解曲线出现单峰作为实验特异性和有效性评价标准, 用 miRNA CT 值减去 U6 CT 值, 得到 Δ CT 值, 以 $2^{-\Delta$ CT 作为血清 miRNA 的表达水平。