

• 临床研究 •

宫颈鳞状细胞癌组织中高危 HPV 感染型别的研究*

张东英¹, 赵 雪², 耿建祥^{2△}, 邓中平², 黄华艺², 唐玲丽², 秦 雪², 袁凯志², 黄淑华²
(1. 江苏省邳州市人民医院病理科, 江苏邳州 221300; 2. 南京中医药大学附属第三医院
病理科/江苏省 HPV 协作组, 南京 211102)

摘 要:目的 探讨宫颈鳞状细胞癌组织中高危人乳头瘤病毒(HR-HPV)感染型别的分布及其临床意义。方法 采用荧光定量基因扩增技术对 254 例宫颈鳞状细胞癌组织标本进行 15 种高危 HPV 基因分型检测, 并对受检者相关资料进行分析。结果 254 例宫颈鳞状细胞癌患者中检出 HPV 感染 247 例, 总的 HPV 感染率为 97.24%(247/254), 其中一型感染率为 81.10%(206/254), 多型感染率为 16.14%(41/254)。结论 宫颈鳞状细胞癌组织中 HPV 感染型别前七位出现频率数依次为 16、58、18、52、31、33、59 型, 这些型别是致宫颈鳞状细胞癌的主要型别, 16 型非常突出, 占总出现频率数的 58.64%(173/295)。HPV 分型检测有利于妇产科医师对宫颈鳞状细胞癌及其癌前病变患者的诊断、治疗和随访, 也有利于临床医师锁定高致癌型 HPV 感染者, 并对其感染者跟踪随访, 以便筛检出宫颈癌前病变患者, 值得在临床上推广。

关键词:宫颈; 鳞状细胞癌; 高危人乳头瘤病毒; 基因分型; 荧光定量技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.23.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)23-3312-03

宫颈癌是发展中国家最常见的妇科恶性肿瘤之一, 目前, 我国是世界上宫颈癌发病人数最多的国家, 每年新发患者约 13 万人, 死亡约 5 万人。发展中国家宫颈癌每年新发病人约占全球的 85%, 也是发展中国家女性发病率第二位的癌症^[1-4]。宫颈癌的发病率与女性宫颈癌筛查覆盖面、本国的经济发展水平及女性主动筛查的意识有着直接的关系。各国政府提供大面积的宫颈癌筛查是非常必要的, 尤其是对高患病风险年龄段的女性开展以宫颈癌病因学为主的大面积筛查是降低宫颈癌发病率的行之有效的办法。高危人乳头瘤病毒(HR-HPV)是导致女性宫颈癌发病的元凶, 简便快捷地检测 HR-HPV 是预防宫颈癌及癌前病变的最重要的方法之一。对 HR-HPV 行分型检测, 有利于临床妇科医师锁定高致癌型 HPV 感染者, 跟踪随访, 以便筛检出宫颈鳞状细胞癌前病变患者, 使得她们得到及时的治疗。因此, 探讨宫颈鳞状细胞癌组织中高危型高致病性 HPV 对宫颈鳞状细胞癌预防和治疗都具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2017 年 1 月江苏省邳州市人民医院、江苏省南京市中医院、江苏省兴化市人民医院、江苏省昆山市第一人民医院、江苏省盐城市第一人民医院、江苏省镇江市江苏大学附属医院、浙江省宁波市鄞州人民医院、河南省商城县人民医院、江苏省扬州市江都区洪泉医院病理科病理组织学诊断的 254 例宫颈鳞状细胞癌的石蜡组织标本, 宫颈鳞状细胞癌患者年龄 28~88 岁, 平均年龄 55.49 岁, 20~29 岁 1 例、30~39 岁 18 例、40~49 岁 74 例、50~59 岁 70 例、60~69 岁 59 例、70~79 岁 21 例、80~89 岁 11 例。由 2 位年资较高的主治以上的病理科医师按照 WHO(2014 年)组织学妇科肿瘤的分类标准进行复片, 并复习其临床病理资料。

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR 仪为美国 Life Technology 公司生产的 ABI7500 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(15 种高危型 HPV 依次为 16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68 型, 还包括 β -球蛋白作为内部质控), 由湖南省圣湘生物技术有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集 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 μ m 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, 每次切割间隙用次氯酸钠溶液擦刀片及镊子各 3 次。

1.3.2 DNA 的提取 将 600 μ L S1006 溶液 1 加入待测的石蜡组织片 1.5 mL 离心管中, 加热 95℃ 约 10 min 后, 冷却至 60℃, 加入 60 μ L 蛋白酶 K, 57℃ 孵育 30 min 后, 100℃ 加热 10 min 使蛋白酶 K 失活; 13 000 r/min 离心 15 min 后, 冷却硬固化上层石蜡, 吸取下层溶液 200 μ L 至新的 1.5 mL 离心管中, 再加入 600 μ L S1006 溶液 1, 混匀, 95℃ 加热 10 min 后, 加入 100 μ L 溶液 2, 50 μ L 的磁珠, 混匀, 静置 20 min 后, 上磁力架, 吸附 3 min, 弃废液; 加入 600 μ L 溶液 3 和 200 μ L 溶液 4, 混匀, 静置 1 min 后, 上磁力架, 吸附 3 min, 再次弃废液, 加入 50 μ L TE, 混匀, 静置 5 min 后, 上磁力架, 吸附 3 min, 回收所得溶液, 取 5 μ L 所得 DNA 液体, 上荧光定量 PCR 仪, 行 DNA 扩增, 扩增完成后, 读取每一份检测样本的循环阈值(CT)值, CT 值低于或小于 39 为阳性值(分 8 个检测管, 每管都有两个不同荧光标记物代表不同的高危型 HPV 型别)。

1.4 统计学处理 宫颈鳞状细胞癌组织 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 SPSS 13.0 对相关数据进行统计学处理, 计数资料采用百分率(%)表示, 比较采用 χ^2 检验或确切概率法。

2 结 果

254 例宫颈鳞状细胞癌组织中 HPV 阳性者 247 例, 总感染率为 97.24%(247/254)。其中一型感染者 206 例, 其感染

* 基金项目:江苏省南京市卫生和计划生育委员会中医专项资助项目(2009-92)。

△ 通信作者, E-mail: dyc720@163.com。

率为 81.10%(206/254);多型感染者 41 例,其感染率为 16.14%(41/254)其中二型感染者 35 例、三型感染者 5 例、四型感染者 1 例。宫颈鳞状细胞癌组织阳性感染者检出不同型别 HPV 数 295 次(对多重感染者,各型别的阳性率重复计算),均为高危型 HPV,除 35 型 HPV 未检出外,其他 14 种型别 HPV 均有检出,只是出现频率不同。高危型 HPV 出现频率依型别数字大小依次排列:16 型 173 次、18 型 26 次、31 型 15 次、33 型 7 次、39 型 2 次、45 型 1 次、51 型 2 次、52 型 18 次、53 型 3 次、56 型 4 次、58 型 31 次、59 型 7 次、66 型 2 次、68 型 4 次,总计 295 次。

3 讨 论

一般来说,与生殖道感染相关的 HPV 型别被分为与生殖道疣相关的低危型和与浸润性宫颈癌相关的高危型。但是,究竟有多少个型别可归为高危型,一直以来都没有统一的观点。被认为高危 HPV 型别的数量一般是 13 种到 19 种之间。由于 HPV 感染型别在全世界存在着地域的差异性,且各型别的出现比例也不尽相同^[5-7],因此,各国为高危 HPV 型别确定正确的划分标准是很有必要的。找出各个国家和地区最常见的高致癌性 HPV 型别及其出现比例,并开发出针对世界不同国家和地区高危 HPV 型别的筛查试剂,以便达到最佳的宫颈癌筛查目的。宫颈癌及癌前病变与 HR-HPV 持续感染密切相关。60%~70%的女性在其一生中都被感染过 HPV,大多数女性为一过性感染,通常在一年内消退,只有 5%~10%的 HR-HPV 感染可发展为持续性感染。感染了 HR-HPV 的女性发展为子宫颈上皮不典型增生和宫颈癌的风险比未感染 HR-HPV 的人群高 100 倍,几乎所有的宫颈鳞状细胞癌组织中都能检测到 HR-HPV DNA^[8-10]。换句话说,一个女性如果她没有感染 HR-HPV,那么她患宫颈鳞状细胞癌的可能性几乎为零。WHO(2003)女性生殖系统肿瘤分类中有大量实验数据表明,HR-HPV DNA 检测在宫颈癌的筛查中可发挥重要的作用,能有效地降低宫颈癌的发病率和病死率。由此可见,持续性的 HR-HPV 感染是宫颈低度上皮内瘤变持续或进展为宫颈高度上皮内瘤变的重要因素,因此,开展女性宫颈细胞 HR-HPV 监测和跟踪监测是十分必要的。

本研究结果表明:(1)以往的研究发现,98%的宫颈癌患者查出 HPV 感染,28.9%的宫颈癌患者感染了多种 HPV 基因型别^[1,6]。本文宫颈鳞状细胞癌组织总的 HPV 感染率为 97.24%(247/254),与 HPV 感染率(98%)接近,其中一型感染率为 81.10%(206/254),多型感染率为 16.14%(41/254),比 28.9%的多型感染率要低的多。一型与多型之比为 5.02:1,说明宫颈鳞状细胞癌是以一型感染占绝对优势的肿瘤,而多型感染只占少数。(2)本研究中宫颈鳞状细胞癌组织中 HPV 感染型别前五位出现频率数依次为 16、58、18、52、31 型,其出现频率数的 58.64%(173/295)、10.51%(31/295)、8.81%(26/295)、6.10%(18/295)、5.09%(15/295)。前三位型别比较,16 型与 58 型及 18 型比较(χ^2 值分别为 151.08 和 163.85, $P < 0.01$),差异有统计学意义,58 型与 18 型比较(χ^2 值为 0.49, $P > 0.05$),差异无统计学意义。说明不同的 HR-HPV 型别致癌性是有差异的,提示 16 型是致宫颈鳞状细胞癌最主要的型别,而 58 型排序第 2 位,超过了 18 型,临床妇产科医师应该将 58 型作为一线 HR-HPV 致瘤型别来看待。(3)感染 HR-HPV 16 型的女性更易患宫颈鳞状细胞癌,而感染 HR-HPV 18 型的女性更易患宫颈腺癌和腺鳞癌。本研究 16 型出现频率为 173 次,而 18 型出现频率为 26 次,两者出现频率之比为

6.65:1,王宏景等^[11]报告的 202 例宫颈腺癌组织中 16 型出现频率为 78 次,而 18 型出现频率为 71 次,两者出现频率之比为 1.10:1,说明 HR-HPV 16 型是致宫颈鳞状细胞癌的最主要的型别,而 HR-HPV 16 型和 18 型都是致宫颈腺癌最主流的型别,两高危型致癌频率非常接近。(4)从各年龄段 HR-HPV 感染率来看,20~29 岁为 100.00%(1/1)、30~39 岁为 100.00%(18/18)、40~49 岁为 98.65%(73/74)、50~59 岁为 95.71%(67/70)、60~69 岁为 98.31%(58/59)、70~79 岁为 95.24%(20/21)、80~89 岁为 90.91%(10/11),从 20 岁到 89 岁,HR-HPV 感染率呈现出逐渐下降的趋势,但在 60~69 岁 HR-HPV 感染率有一个抬升,随后随着年龄增加,HR-HPV 感染率逐步下降。为什么会出现各年龄段 HPV 感染率的差异性,还有待于大样本来揭示。(5)浸润性宫颈癌的发病年龄在 20 岁以前是很低的,20~50 岁增长较快,其后上升幅度变缓,我国浸润性宫颈癌发病年龄为 40~70 岁,发病高峰为 50~54 岁,以后逐渐下降^[1,12]。本研究中浸润性宫颈鳞状细胞癌发病年龄在 28~88 岁,发病高峰为 40~49 岁,以后逐渐下降。与我国宫颈癌发病高峰比较,其高峰明显前移,说明我国宫颈鳞状细胞癌发病年龄有所提前,应引起临床妇产科医师的密切关注。

综上所述,宫颈鳞状细胞癌是宫颈癌的一种最常见的病理类型,其发生率约占宫颈癌的 85%,阻止了宫颈鳞状细胞癌的发生,就能防控绝大多数宫颈癌,尤其是对 35 岁至 64 岁高发人群,采用液基细胞学结合 HR-HPV 分型检测来筛查宫颈鳞状细胞癌及其癌前病变,则可以互相补充,取长补短,这是目前较为完善的宫颈状细胞癌筛查方案,可以把筛查的漏诊率降到最低,有效提高检出率。HR-HPV 分型检测可使得临床妇产科医师在治疗、随访和预防宫颈状细胞癌前病变时做到有的放矢。可把 16、58、18 型 HR-HPV 作为一线高致癌性型别进行跟踪随访,有助于临床妇产科对此肿瘤患者进行精确治疗,这将惠及更多的宫颈鳞状细胞癌患者^[13-16]。

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] 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.
- [3] 邹琳,兰建云,耿建祥,等.47 例宫颈腺癌中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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.

[8] 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.

[9] 顾昕, 龙秀荣, 耿建祥, 等. 宫颈鳞状细胞癌组织人乳头瘤病毒分型研究的意义[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(23): 5140-5143.

[10] 龚培尧, 李海, 耿建祥, 等. 苏州地区妇女宫颈人乳头瘤病毒基因分型的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(23): 3127-3128.

[11] 王宏景, 夏林, 耿建祥. 宫颈腺癌组织中人乳头瘤病毒感染型别分布的研究[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(12): 1291-1294.

[12] 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, 临床研究 •

2014, 29(10): 1594-1596.

[13] 朱小珏, 耿建祥. 308 例宫颈瘤组织中 HPV 感染基因型分布的对比研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23): 3180-3182.

[14] 徐妍婷, 蔡为民, 耿建祥, 等. 健康妇女及宫颈癌瘤患者 HPV 感染基因型分布的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(22): 3022-3024.

[15] 梅静, 徐海燕, 耿建祥, 等. 宫颈上皮内瘤变组织中人乳头瘤病毒感染基因型的分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(15): 2333-2336.

[16] 许育绚, 崔永胜, 耿建祥, 等. 968 例宫颈细胞中人乳头瘤病毒 E6/7mRNA 基因分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(4): 617-619.

(收稿日期: 2017-06-18 修回日期: 2017-08-24)

新生儿的末梢血与静脉血在血常规检验结果的比较分析*

葛高霞¹, 张美娟², 黎青^{2△}

(1. 江苏省妇幼保健院检验科, 江苏南京 210036; 2. 南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏南京 210029)

摘要:目的 比较分析新生儿末梢血与静脉血的血常规检验结果的差异, 为临床新生儿血常规检验的标准化操作提供理论和实验依据。方法 选取在我院出生的健康足月新生儿 100 例, 同时采集末梢血和静脉血在全自动血细胞分析仪上进行检测, 并对检测结果中白细胞计数(WBC)、中性粒细胞计数(NE)、淋巴细胞计数(LY)、单核细胞计数(MO)、嗜酸性粒细胞计数(E0)、嗜碱性粒细胞计数(BA)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白含量(HGB)、红细胞压积(HCT)、血小板计数(PLT)10 项主要指标进行统计分析。结果 新生儿末梢血与静脉血的 WBC、NE、RBC、HGB、HCT 和 PLT 6 项指标平均水平差异具有统计学意义($P < 0.05$); LY、MO、EO、BA4 项指标平均水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 新生儿末梢血并不能完全反映循环系统血液的整体情况, 因此临床遇到结果存疑时, 建议进行静脉采血复查, 以免造成误诊。

关键词:新生儿; 末梢血; 静脉血; 血常规检验

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 23. 034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)23-3314-03

血常规检查是临床检验最基本的常规手段之一, 可以辅助诊断疾病, 为临床诊疗提供重要依据^[1-2], 但如何正确的采集和处理血常规标本是获得可靠检验结果的关键步骤^[3]。目前临床上血常规血液标本的采集方式有末梢血和静脉血采集两种^[4], 但对于新生儿还是以末梢血检测为主, 有时也会用静脉血检测。由于新生儿群体比较特殊, 器官系统发育尚未完全成熟, 身体调控能力差, 新生儿期血象常伴有特殊生理变化, 同时检验结果还会受采集部位、标本存放时间及脐带不同处理等因素的影响, 因此会导致新生儿末梢血与静脉血检测结果可能产生差异, 给临床医生带来困惑。本文为了探讨两者相关差异, 对本院 100 例新生儿分别采集末梢血和静脉血进行血常规检查, 并对结果进行比较分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 7 月至 2016 年 12 月在本院出生的健康足月新生儿 100 例, 所有的婴儿出生时 Apgar 评分均为 10 分, 80% 为顺产, 20% 为剖腹产, 单胎, 其中男婴 54 例, 女婴 46 例, 年龄 0.5 h~7 d, 出生时体质量 2 800~3 800 g, 排除

各类原发性血液病及感染。母亲在妊娠期间无高血压、糖尿病、血液病。胎儿在妊娠期间正常发育, 体检及各项指标检查无异常。

1.2 方法 用真空采集法采集新生儿颈静脉血 2 mL 置于 EDTA-K₂ 抗凝管中, 同时用皮肤采集法采集受检者末梢血 40 μ L 加入至含 EDTA-K₂ 抗凝剂的塑料管内, 标本在 2 h 内完成检测。应用 SYSMEX XS-500i 血液全自动分析仪(日本希森美康)及其配套试剂检测血细胞水平, 按照实验室标准操作程序进行仪器的定期维护和保养, 每日用高、中、低三个浓度质控品进行室内质控, 其结果全部在控后再进行血标本的常规检测。血常规研究项目主要包括: 白细胞计数(WBC)、中性粒细胞计数(NE)、淋巴细胞计数(LY)、单核细胞计数(MO)、嗜酸性粒细胞计数(E0)、嗜碱性粒细胞计数(BA)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白含量(HGB)、红细胞压积(HCT)、血小板计数(PLT)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用配对样本 t 检验, 以 $P <$

* 基金项目: 江苏省卫生和计划生育委员会科研课题(Y2015065)。

△ 通信作者, E-mail: 13951952848@163. com。