

论著 · 临床研究

宫颈 ASC-US、LSIL 和 HSIL 中 HPV 感染型别分布的研究*

梁月兰¹, 赵 雪², 耿建祥^{2△}, 兰建云², 喻朝霞², 夏思钧², 梅 静², 王宏景², 夏 林²
(1. 江苏省苏州市吴中人民医院检验科, 江苏苏州 215000; 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 分析女性宫颈未明确意义的非典型鳞状细胞(ASC-US)、低度鳞状上皮内病变(LSIL)和高度鳞状上皮内病变(HSIL)中人乳头瘤病毒(HPV)感染基因型分布及其临床意义,同时对 ASC-US、LSIL 和 HSIL 患者行宫颈病理组织学诊断分析。**方法** 采用基因扩增结合基因芯片技术对 236 例宫颈 ASC-US、36 例宫颈 LSIL 和 61 例宫颈 HSIL 标本进行 23 种 HPV 基因分型检测,所有 ASC-US、LSIL 和 HSIL 患者行宫颈活检病理组织学诊断,并对受检者进行相关资料分析。**结果** 236 例宫颈 ASC-US 中检出 HPV 感染者 139 例, HPV 总感染率为 58.90%(139/236),其中一型感染率为 38.14%(90/236),多型感染率为 20.76%(49/236); 36 例宫颈 LSIL 中检出 HPV 感染者 26 例, HPV 总感染率为 72.22%(26/36),其中一型感染率为 52.78%(19/36),多型感染率为 19.44%(7/36); 61 例宫颈 HSIL 中检出 HPV 感染者 58 例, HPV 总感染率为 95.08%(58/61),其中一型感染率为 68.85%(42/61),多型感染率为 26.23%(16/61)。宫颈 ASC-US 组和 LSIL 组与 HSIL 组 HPV 总感染率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** HPV 16、52、58 型是宫颈 ASC-US、LSIL 和 HSIL 患者中最主要的型别,基因芯片检测技术可用于宫颈细胞 HPV 分型检测,对宫颈 ASC-US 患者的进一步分流管理具有重要的临床意义,应引起妇科医师的高度关注。

关键词:宫颈; 非典型鳞状细胞; 低度鳞状上皮内病变; 高度鳞状上皮内病变; 人乳头瘤病毒
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.016 **中图法分类号:**R737.33
文章编号:1673-4130(2018)01-0059-04 **文献标识码:**A

Study on HPV infection types distribution in ASC-US, LSIL and HSIL of uterine cervix*
**LIANG Yuelan¹, ZHAO Xue², GENG Jianxiang^{2△}, LAN Jianyun², YU Zhaoxia²,
XIA Sijun², MEI Jing², WANG Honjing², XIA Lin²**
(1. Department of Clinical Laboratory, Wujiang Hospital, Suzhou, Jiangsu 215000, China; 2. Department
of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical
University/HPV Collaboration Group of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: **Objective** To analyze the genotypes distribution and clinical significance of human papillomavirus(HPV) infection in atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), low squamous intraepithelial lesion (LSIL) and high squamous intraepithelial lesion (HSIL) of uterine cervix, meanwhile to conduct the cervical histopathological diagnostic analysis in the patients with ASC-US, LSIL and HSIL. **Methods** The gene amplification technique (PCR) combined with gene-chips technology were adopted to conduct the 23 kinds of HPV genotype detection on 236 cases of cervical ASC-US, 36 cases of cervical LSIL and 61 cases of cervical HSIL specimens. All cases of ASC-US, LSIL and HSIL were performed the cervical biopsy histopathological diagnosis. And then the subjects related data were analyzed. **Results** Among 236 cases of cervical ASC-US specimens, 139 cases of HPV infection were detected with the total HPV infection rate 58.90%(139/236), in which the single genotypes infection rate was 38.14%(90/236) and the multiple genotypes infection rate was 20.76%(49/236); 26 cases of HPV infection were detected from 36 cases of cervical LSIL specimens with the total HPV infection rate of 72.22%(26/36), in which the single genotypes infection rate was 52.78%(19/36) and the multiple genotypes infection rate was 19.44%(7/36); 61 cases of HPV infection were detected from 58 cases of cervical HSIL specimens with the total HPV infection rate of 95.08%(58/61), in which the single genotypes infection rate was 68.85%(42/61) and the multiple genotypes infection rate was 26.23%(16/61). The total infection rates had statistically significantly differences among the cervical ASC-US

* 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)。
作者简介:梁月兰,女,技师,主要从事宫颈病变 HPV 感染分型研究。 △ 通信作者, E-mail: dyc720@163.com。
本文引用格式:梁月兰,赵雪,耿建祥,等. 宫颈 ASC-US、LSIL 和 HSIL 中 HPV 感染型别分布的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1):59-62.

group, LSIL group and HSIL group ($P < 0.05$). **Conclusion** HPV16, 52, 58 are the main types in the patients with cervical ASC-US, LSIL and HSIL. The gene-chip technology can be used in the HPV genotypes detection of cervical cells, which has an important clinical significance for further distribution management on ASC-US patients and should draw great attention of gynecologist.

Key words: uterine cervix; atypical squamous cells of undetermined significance; low squamous intra-epithelial lesion; high squamous intraepithelial lesion; human papillomavirus

宫颈癌变是一个由量变到质变的长期发展过程,即宫颈癌前病变是宫颈组织细胞向癌细胞量变的转化过程,其进一步发展则出现宫颈组织细胞癌变,如果能够在宫颈癌前病变阶段,得到及时的诊断和治疗,则宫颈组织细胞可恢复正常。因此,早期诊治宫颈癌前病变在临床上就显得极为重要^[1-4]。临床妇产科医师如能及时采取有效措施治疗早期宫颈癌前病变,其临床治愈率可接近 100%,进而使得宫颈癌患者病死率明显降低。高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌发病的主要原因,HPV 检测已成为宫颈癌防治中必不可少的筛查内容,高危型 HPV 检测能对宫颈细胞学诊断为未明确意义的非典型鳞状细胞(ASC-US)患者进行分流,可有效地降低女性患者阴道镜转诊率^[1-4]。本文使用高、低危型 HPV 基因芯片检测技术,以 23 种常见的 HPV 型别作为感染源,对 236 例宫颈 ASC-US、36 例宫颈低度鳞状上皮内病变(LSIL)和 61 例宫颈高度鳞状上皮内病变(HSIL)患者行 23 种 HPV 基因分型检测,所有患者都行宫颈活检病理组织学诊断,并对其 HPV 基因型进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集江苏省苏州市吴中人民医院和南京中医药大学第三附属医院妇产科和体检中心宫颈细胞学诊断为 ASC-US 组 236 例、LSIL 组 36 例和 HSIL 组 61 例女性细胞标本,共 333 例。ASC-US 组的女性中,年龄 22~90 岁,平均(42.91 ± 0.05)岁;LSIL 组的女性中,年龄 20~63 岁,平均(38.86 ± 0.05)岁;HSIL 组的女性中,年龄 26~66 岁,平均(42.05 ± 0.05)岁。所有受检者均行液基薄层细胞学检查和 HPV 基因分型检测,细胞学和组织学病理诊断由两位经验丰富的病理主治医师以上职称阅片诊断,并复习其临床及病理资料。

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 采用扩阴器充分暴露宫颈,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。236 例 ASC-US 患者的宫颈石蜡组织标本,每例石蜡组织经常规病理切片,所有标本均经 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色观察。

1.3.2 DNA 的提取 将宫颈刷头充分漂洗后,把洗脱液全部转移至 1.5 mL 离心管中,13 000 r/min 离心 10 min 后,弃上清液,保留管底的细胞。随后加入裂解液 50 μ L,充分振荡混匀,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 3 组宫颈细胞 HPV 感染率及各 HPV 型别的比例采用 HPV 分型统计软件进行分析,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 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

ASC-US 组中 236 例检测者 HPV 感染者 139 例,未感染者 97 例,HPV 总感染率为 58.90%(139/236),其中一型感染率为 38.14%(90/236),多型感染率为 20.76%(49/236),多型感染中,二型感染 39 例,三型感染 9 例,四型感染 1 例;LSIL 组中 36 例检测者 HPV 感染者 26 例,未感染者 10 例,HPV 总感染率为 72.22%(26/36),其中一型感染率为 52.78%(19/36),多型感染率为 19.44%(7/36),多型感染中,二型感染 5 例,三型感染 2 例;HSIL 组中 61 例检测者 HPV 感染者 58 例,未感染者 3 例,HPV 总感染率为 95.08%(58/61),其中一型感染率为 68.85%(42/61),多型感染率为 26.23%(16/61),多型感染中,二型感染 8 例,三型感染 7 例,四型感染 1 例。ASC-US 组与 LSIL 组 HPV 总感染率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 2.32, P > 0.05$)。ASC-US 组宫颈组织活检中 HPV 感染率:炎症为 38.57%(27/70)、CIN I 级为 47.56%(39/82)、CIN II 级为 80.49%(33/41)、CIN III 级为 92.31%(36/39)、癌性病变为 100.00%(4/4)。ASC-US 组、LSIL 组与 HSIL 组 HPV 总感染率比较,差异有统计学意义(χ^2 分别为 28.42、10.19, $P < 0.05$)。3 组细胞中 23 种 HPV 感染基因型别阳性次数见表 1。ASC-US 组宫颈组织学诊断各类型病变中

HPV16、18、52、58 型出现频率见表 2。

表 1 3 组细胞中 23 种 HPV 感染基因型别阳性次数(n)			
HPV 型别	ASC-US 组	LSIL 组	HSIL 组
6	7	1	0
11	6	1	1
16	51	3	34
18	27	2	2
31	3	1	4
33	11	0	6
35	5	0	2
39	4	0	3
42	3	0	2
43	6	1	0
45	1	0	1
51	8	0	2
52	20	9	13
53	3	4	3
56	1	2	0
58	19	3	9
59	4	3	0
66	8	4	0
68	7	1	0
81	3	0	1
82	1	0	0
83	1	0	0
总数	199	35	83

注：对多型感染者，各型别的阳性率重复计算

表 2 ASC-US 组宫颈组织学诊断的不同 HPV 型别出现频率[n(%)]					
HPV 型别	炎症	CIN I 级	CIN II 级	CIN III 级	癌性病变
16 型	7(10.00)	9(10.98)	6(14.63)	26(66.67)	3(75.00)
18 型	9(12.86)	6(7.32)	5(12.20)	7(17.95)	1(25.00)
52 型	4(5.71)	3(3.66)	7(17.07)	5(12.85)	1(25.00)
58 型	4(5.71)	4(4.88)	4(9.76)	7(17.95)	0(0.00)

3 讨 论

宫颈癌的发生是一个长期的过程,若能在宫颈病变的早期进行筛查,就能阻止宫颈癌变的发生和发展。宫颈癌筛查的重点,是在患者无自觉症状时期,发现宫颈癌前病变,在非宫颈癌时期及早进行临床诊治,从而预防和阻止宫颈癌变的发生。宫颈癌筛查的重要意义在于可预防、早发现、早治疗。目前,宫颈癌筛查是通过细胞学检查来发现和避免女性发展成为宫颈癌,所以女性要定期检查宫颈细胞,对 30 岁以上的女性要加查 HPV。宫颈癌与 HPV 感染密切相关,女性感染 HPV 后,如机体不能自我清除感染的 HPV,就会造成持续性 HPV 感染,可能会发展为宫颈癌^[5-7]。宫颈癌的发生一般都经过宫颈癌前病变-宫颈上皮内瘤病变(CIN)期,如在这一时期,通过细胞学筛查和 HPV 检测发现异常,及时诊断和治疗,可把宫颈癌阻断在宫颈癌前病变期,使得宫颈癌的发病率和病死率出现双下降的趋势。

宫颈细胞学 Bethesda 系统(简称 TBS 系统)是用

于宫颈或阴道巴氏涂片细胞学诊断的报告系统。现使用的是 TBS-2001 报告系统。TBS 系统问世以来即被世界许多国家接受和使用。ASC-US 诊断术语中包括了炎性病变、LSIL、HSIL、癌性病变。宫颈 ASC-US 是细胞学诊断中最常见的宫颈异常细胞学形态,约占 5%。值得注意的是,宫颈 ASC-US 在我国病理科好似“垃圾桶”,凡是诊断不清者都置于其中,如何追踪这部分患者,制定最佳的治疗方案现存在着争议和疑问。因此,采用 HPV 分型检测作为宫颈 ASC-US 诊断的分流指标,有利于有效地检出宫颈高级别病变,对宫颈癌的防控具有重要的意义^[1,8]。

本研究 236 例宫颈 ASC-US 组中检出 22 种 HPV 型别、36 例宫颈 LSIL 组中检出 13 种 HPV 型别和 61 例宫颈 HSIL 组中检出 14 种 HPV 型别。提示各组中均以一型 HPV 感染为主,多型 HPV 感染为辅,宫颈 ASC-US 组中一型感染者(90 例)和多型感染者(49 例),感染之比为 1.84 : 1.00;宫颈 LSIL 组中一型感染者(19 例)和多型感染者(7 例),感染之比为 2.71 : 1.00;宫颈 HSIL 组中一型感染者(42 例)和多型感染者(16 例),感染之比为 2.63 : 1.00。一型与多型 HPV 感染之比结果说明宫颈 ASC-US 组与后两组比较,其多型感染者增加明显,后两组比较多型感染者非常接近,说明多型感染并非随着宫颈病变程度的增加而增加,应引起妇科医师的密切关注。ASC-US 组中 HPV 感染出现频率前 6 位依次是 16、18、52、58、33、51 和 66 型;LSIL 组中 HPV 感染出现频率前 6 位依次是 52、53、66、16、58、59 型;HSIL 组中 16、52、58、33、31、39 和 53 型。各组 HPV 型别排序除 ASC-US 组和 HSIL 组 16 型排名第一外,其他型别排序均不同,均未出现低危型 HPV,均为高危型 HPV。16、52、58 型在 3 组中均出现,只是排序不同,可见这 3 种型别的 HPV 是 3 组最为常见的型别,宫颈 ASC-US 组中以 16 和 18 型占优,紧随其后的是 52、58 型,宫颈 LSIL 组和宫颈 HSIL 组中以 16、52、58 型为主。这符合我国长三角地区女性宫颈癌以 16、18、58、52、33 型为主要型别,也提示 52 和 58 型具有中国地域特色^[9-11]。病理细胞学诊断的宫颈 ASC-US 患者包含了组织学从炎症到癌性病变所有的病变,CIN I 级以下的病变约占 2/3,占绝大多数,而 CIN II 级以上的病变约占 1/3,只占较少的部分,目前,临床上对 CIN I 级患者进行随访观察,而对 CIN II 级和 CIN III 级病变采用相同的治疗方式,应引起妇产科医师对宫颈 ASC-US 诊断 1/3 患者的重视和关注。ASC-US 组宫颈组织活检中 HPV 感染率:炎症为 38.57%、CINI级为 47.56%、CINII级为80.49%、CIN III级为 92.31%、癌性病变为 100.00%。从炎症到癌性病变中 HPV 感染率随着宫颈疾病程度的增加,炎症和 CIN I 级中只有一半以下患者感染了 HPV,CIN II 级以上 HPV 感染率超过 80.00%,因此加做 HPV 检测,可减少 ASC-US 转阴道镜检的患者。宫颈 ASC-US 是宫颈细胞学诊断中的术语,涵盖了组织学

从炎症到癌性病变,从表 2 中可见,高危 HPV 16 型在各级宫颈病变中从 CIN II 级病变开始增加,尤其 CIN III 级以上病变增加明显。而高危 HPV 18、52、58 型在各级宫颈病变中从 CIN II 级以上病变开始增加,其增加的幅度并不明显。30 岁女性且高危 HPV 16 和 18 型感染者作为需转阴道镜检查的话,结合中国国情也应该把高危 HPV 52、58 型感染作为转阴道镜检查的指标。宫颈细胞学筛查表明宫颈 ASC-US 组中 HPV 总感染率为 58.90% (139/236)、宫颈 LSIL 组中 HPV 总感染率为 72.22% (26/36)、宫颈 HSIL 组中 HPV 总感染率为 95.08% (58/61),可见随着宫颈病变程度的增加,HPV 总感染率也随着增加,HPV 感染与宫颈病变程度呈正相关。在宫颈癌的防治工作中宫颈细胞学检查有 20%~40% 漏检率,阴道镜也存在着约 30% 的假阴性率,临床医师要最大限度的提高宫颈病变的检出率,在行 HPV 分型检测的同时加做宫颈细胞 DNA 倍体或 E6/E7 mRNA 检测,如细胞学检查正常和(或)阴道镜检查正常,且 HPV 检测阳性并伴有 DNA 倍体或 E6/E7 mRNA 检测异常,尤其是高危 16、18、52、58 型 HPV 感染的患者,一定要行阴道镜检查,即使阴道镜检查正常,也要定期复诊,以防漏掉宫颈癌和宫颈高级别病变的患者^[12-14]。

总之,宫颈 ASC-US 诊断包括了宫颈从炎性病变到癌性病变的所有病变,临床妇产科医师可以通过 HPV 分型检测来进行分流管理,宫颈 LSIL 逆转为正常组织的可能性较高,单纯用形态学来进行 CIN 的等级分类并不能有效地反映其病变发展为浸润性宫颈癌的风险,可采用 HPV 分型检测来分流患者。对宫颈 ASC-US 和 LSIL 的患者行高危型 HPV 检测,尤其是高危 HPV 16、18、52、58 型患者,如有条件可考虑行宫颈 DNA 倍体或 E6/E7 mRNA 检测,对这 4 型高危 HPV 感染者应行阴道镜检查,必要时行宫颈活组织病理检查,这样可及时检出宫颈 CIN II 级以上病变,且可减少患者的就诊次数和失访率。目前,临床 CIN 的诊断依靠宫颈 HPV、细胞学、阴道镜和组织病理学这四阶梯技术进行综合判断。因此,将 HPV 分型检测应用于宫颈轻度细胞学异常的价值是减少近一半 ASC-US 患者宫颈活检有创检查,同时结合宫颈 DNA 倍体或 E6/E7 mRNA 检测可最大限度地降低宫颈癌和癌前病变的漏诊率,提高检出率,这将造福于广大的宫颈病变患者^[14-16]。

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] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] LI H, WANG X B, GENG J X, et al. Clinical study of typing 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.
- [7] 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.
- [8] 梁晓东,蔡为民,耿建祥,等. 宫颈正常细胞与 ASC-US 中 HPV 感染型别的对比研究[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(13):1699-1701.
- [9] GONG P Y, WANG Z H, GENG J X, et al. Comparative study on detection and typing of human papillomavirus (HPV) infection with microarray using paraffin-nembedded specimens from cervical squamous cell carcinoma and precursor lesions[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2017, 17(2):990-997.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [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,2014,29(10):1594-1596.
- [13] 范雪梅,徐薇,耿建祥,等. 879 例女性宫颈液基细胞学检查与 DNA 定量分析的对比研究[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(23):3165-3168.
- [14] 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.
- [15] GU X, LONG XR, YU Z X, et al. An analytical description of distributions of HPV genotypes patients with cervical precancerous lesions and squamous cell carcinoma in Zhejiang and Jiangsu area[J]. Int J Clin Exp Med, 2017, 10(4):6987-6993.
- [16] 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.

(收稿日期:2017-06-20 修回日期:2017-09-29)