

• 基础实验研究论著 •

47 例宫颈腺癌中人乳头状瘤病毒感染基因分型的研究

邹琳¹, 兰建云^{2△}, 耿建祥², 王旭波², 李海², 张昶², 魏谨², 韩春荣², 赵雪²
(1. 江苏盐城市第一人民医院病理科, 江苏盐城 224006; 2. 江苏盐城市第一人民医院
病理科/江苏省 HPV 协作组, 江苏盐城 224006)

摘要:目的 人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的主要致病因子。该文旨在探讨宫颈腺癌中 23 种人乳头瘤病毒感染的基因型分布情况及其临床意义。方法 从盐城及南京地区 47 例宫颈腺癌及 100 例正常宫颈组织标本中提取 23 种 HPV DNA, 采用基因扩增结合基因芯片技术对其宫颈腺癌及正常组织进行 23 种 HPV 基因型别的检测, 并对其受检者进行相关资料分析。结果 47 例宫颈腺癌标本中 HPV 阳性者 44 例, 感染率为 93.6%(44/47); 其中 HPV16 和(或)HPV18 感染 40 例, 感染率为 85.1%(40/47); 单一型别 HPV 感染者 13 例, 感染率 27.7%(13/47), 其中 HPV16 型为 7 例, 占 14.9%(7/47), 是最主要的感染类型; 混合型感染 31 例, 占 66%(31/47), 其中 HPV16 型+18 型 6 例, 占混合型感染的 19.4%(6/31), 是混合型感染最主要的类型。结论 HPV 感染是宫颈腺癌发生的主要致病因素, HPV16 和 HPV18 感染是宫颈腺癌中最常见的类型; 基因扩增结合基因芯片检测技术是一种较为快速、可靠的适用于临床进行 HPV 分型检测诊断方法。

关键词: 宫颈腺癌; 人乳头瘤病毒; 基因分型; 基因芯片; 感染率

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0393-02

Study on human papillomavirus genotypes in 47 cervical adenocarcinoma patients

Zou Lin¹, Lan Jianyun^{2△}, Geng Jianxiang², Wang Xubo², Li Hai²,
Zhang Chang², Wei Jin², Han Chunrong², Zhao Xue²

(1. Department of Pathology, the First Peoples's Hospital of Yancheng City, Yancheng, Jiangsu 224006, China; 2. Department of Pathology, the First Peoples's Hospital of Yancheng City, HPV Collaboration of Jiangsu Province, Yancheng, Jiangsu 224006, China)

Abstract: **Objective** To research the intrubution of 23 genotypes of human papillomavirus(HPV) which was well known as the major cause of cervical cancer in human and its clinical significance in cervical adenocarcinoma. **Methods** HPV DNA was extracted from cervical tissue samples of 47 cervical adenocarcinoma patients, normal cervical tissue samples of 100 healthy people were collected at the same time. 23 types of HPV genotypes were detected by PCR and gene chips technique. **Results** The total HPV positive rate was 93.6%(44/47). The rate of HPV type 16 and/or HPV type 18 infection was 85.1%(40/47). The rate of single type HPV infection was 27.7%(13/47), in which HPV type 16 was predominant, with the infection rate of 14.9%(7/47). The rate of mixed-infection was 66%(31/47). There were 6 cases of mixed infection of HPV type 16 and HPV type 18, with the infection rate of 19.4%(6/31), which was the predominant mixed infection types. **Conclusion** HPV infection appears to be a major risk factor for cervical adenocarcinoma. The predominant genotypes were HPV type 16 and HPV type 18 in cervical adenocarcinoma. PCR combined with gene chip technique can detect multiple HPV genotypes in cervical tissue samples with high sensitivity and specificity, which is useful in the diagnosis of HPV genotype.

Key words: cervical adenocarcinoma; human papillomavirus; genotype; gene chip; infection rate

宫颈癌在中国女性生殖道恶性肿瘤中居第一位, 每年约有 2 万至 3 万女性死于宫颈癌, 严重威胁着妇女的健康。宫颈腺癌仅占宫颈癌的 5% 左右, 近年来报道宫颈腺癌的发病率有上升趋势, 从 5% 上升为 15.1%~18.5%, 甚至有高达 20%~30% 的报道^[1-3]。生物学研究表明, 宫颈癌的发生与人乳头瘤病毒(HPV)感染密切相关^[3-7], 后者是引起宫颈癌的明确致病因子。本文应用基因扩增芯片技术对 47 份宫颈腺癌组织进行 23 种 HPV 型别的检测, 并对其进行分析, 以探讨 23 种 HPV 型别在宫颈腺癌中的感染类型, 为宫颈腺癌的预防、治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组病例选取盐城市第一人民医院病理科及南京市中医院病理科 2004 年 1 月至 2012 年 6 月间手术切除的 47 例宫颈腺癌常规石蜡组织标本, 年龄 21~76 岁, 平均年龄为 49.4 岁。另取 100 例健康者宫颈常规石蜡组织标本作为

对照。病理切片均由 2 位以上高年资病理医师按 WHO 妇科肿瘤的组织学分类标准进行复阅。

1.2 仪器与试剂 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; 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 5810R 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。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 石蜡组织切片 先去除每例宫颈腺癌及宫颈正常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 μ L,充分振荡混匀,在金属浴中加热 100 $^{\circ}$ C 10 min,立即 13 000 r/min 离心 10 min 后,取中间层 DNA 溶液待用。

1.3.3 PCR 扩增 将 PCR 反应管(20 μ L)3 000 r/min 离心 4 s 后依次编号,分别加入 2 μ L 矿物油和已提取的 DNA 样品、空白对照、阳性对照各 5 μ L,反应体系总体积 27 μ L,3 000 r/min 离心 4 s,上机扩增。扩增条件为 50 $^{\circ}$ C 15 min;95 $^{\circ}$ C 10 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;42 $^{\circ}$ C 90 s;72 $^{\circ}$ C 30 s;共 40 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3.4 杂交、孵育和显色 取 15 mL 离心管,放入标有样本编号的膜条,加入 5~6 mL A 液($2\times$ SSC,0.1% SDS)及所有 27 μ L PCR 产物,拧紧管盖,将离心管放入沸水浴中变性 10 min(确保 A 液液面完全位于沸水浴液面之下),取出并立即放入 51 $^{\circ}$ C 杂交箱内杂交 1.5 h,同时取 50 mL 离心管,加入 50 mL B 液($0.5\times$ SSC,0.1% SDS),于杂交箱预热。取出膜条,转移至已预热的 B 液中,51 $^{\circ}$ C 轻摇洗涤 5 min,将膜条转移至孵育液(A 液:POD=2 000:1,4 张膜可用 6 μ L POD 配制成 12 mL 孵育液)中室温孵育 30 min,弃去孵育液,用 A 液室温轻摇洗涤 2 次,每次 5 min,再用 C 液(0.1 mol/L 柠檬酸钠)轻摇洗涤 2 min;显色液(C 液 19 mL, TMB 1 mL,30% H_2O_2 2 μ L)中显色至少 30 min;转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

1.4 统计学处理 以 50 岁为界限进行年龄分组,应用统计软件包 Stata7.0 对相关数据进行统计学处理,分类变量资料采用 χ^2 和 Fisher 确切概率分组进行检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结果判定 (1)实验后每张膜条在 PC 位点必须出现蓝色显示信号;(2)阴性质控品除 PC 位点出现蓝色显色信号外其余位点均不出现蓝色显色信号;(3)阳性质控品除 PC 位点出现蓝色显色信号外,必须在相应 HPV 基因型位点上出现蓝色显色信号;(4)每张膜条上除 PC 位点外有 23 种 HPV 型别(6、11、42、43、44、16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4 型)的杂交显色位点,除 PC 位点显色外,肉眼可观察 23 种 HPV 型别位点上呈现蓝色小圆点为阳性信号;(5)出现一个阳性信号为单一型别的感染,出现两个阳性信号为双型别的混合感染,出现两个以上的阳性信号为多型别的混合感染。

2.2 结果分析

2.2.1 HPV 总体感染情况 100 例正常宫颈组织中,23 种 HPV 基因分型检测阳性者为 8 例,阳性率为 8.00%(8/100);47 例宫颈腺癌患者中,23 种 HPV 基因分型检测阳性者 44 例,阴性者 3 例,阳性数占全部宫颈腺癌病例的 93.62%(44/47),与正常组织比较差异有显著性($P<0.01$),其中 HPV16 和(或)HPV18 感染 40 例,感染率为 85.11%(40/47);单一型别 HPV 感染 13 例,占全部腺癌病例的 27.66%(13/47);单一型别感染中 HPV16 型为 7 例,占 14.89%(7/47),是最主要的感染类型;其次 HPV18 型为 3 例,占全部宫颈腺癌病例的 6.38%(3/47);混合感染 31 例,占 65.96%(31/47),其中 HPV16 型+18 型 6 例,占混合感染的 19.36%(6/31),是混合感染最主要的类型;其次是 HPV16 型+18 型+31 型+33 型+58 型 3 例,占混合感染的 9.68%(3/31),HPV16 型+18 型+31 型+33 型+52 型 3 例,占混合感染的 9.68%(3/31)。其他型别的混合感染为 19 例,占混合感染的 61.29%(19/31)。

2.2.2 HPV 优势型别感染情况 在 44 例 HPV 阳性感染患者中,HPV16 和 HPV18 型为优势型别,感染 HPV16 型(单一

或混合感染)的患者 34 例,占全部宫颈腺癌病例的 72.34%(34/47),占全部阳性病例的 77.27%(34/44);感染 HPV18 型(单一或混合感染)的患者为 26 例,占全部宫颈腺癌病例的 55.32%(26/47),占全部阳性病例的 59.09%(26/44)。同时感染 HPV16 型和 HPV18 型的患者 20 例,占全部宫颈腺癌病例的 42.55%(20/47),占全部阳性病例的 45.46%(20/44)。

2.2.3 HPV 总体感染情况与患者年龄的关系 在 47 例宫颈腺癌标本中,共检出 HPV 感染阳性者 44 例,其中小于 50 岁者 24 例,大于或等于 50 岁者 20 例;在 3 例 HPV 感染阴性者中,其中小于 50 岁者 1 例,大于或等于 50 岁者 2 例;在不同年龄组中 HPV 感染阳性率差异无统计学意义($P=0.593$)。

3 讨 论

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤。在中国其发病率仅次于乳腺癌,全世界每年有 20 多万妇女死于宫颈癌。由于宫颈癌的发病人数逐年增加,近年来的研究显示,宫颈癌的发生与生殖道的病毒感染密切相关。HPV 是宫颈部位最常见的感染病毒,HPV 感染能够引起机体多种形式的损伤,宫颈感染 HPV 后病毒 DNA 能够同宫颈上皮细胞 DNA 整合,激发自身的免疫系统,对病毒进行清除,但同时也引发局部的上皮损伤,引起宿主细胞的增殖异常^[6],发生不典型增生直至癌变。

宫颈腺癌仅占宫颈癌的 5% 左右。此癌通常发源于子宫颈内膜的柱状上皮。肉眼观察,癌组织可突出于子宫颈外口,晚期可呈菜花状。镜下为一般腺癌结构。宫颈腺癌的临床表现与鳞状细胞癌基本相同,但其好发年龄较鳞状细胞癌年轻一些。值得注意的是年轻妇女宫颈癌患者中腺癌比例相当高,其中 35 岁以下年轻妇女的发病率上升较显著。有文献报道 31 例 20 岁以下的宫颈癌患者中 78% 为宫颈腺癌^[2]。

目前发现的 HPV 类型有 200 多种,主要分为皮肤型和生殖道黏膜型;根据致病性,可以分为低危型和高危型,可以感染多种组织和器官。感染可以自然消退,也可以呈持续感染状态,甚至引起细胞异型增生和肿瘤。HPV 分高危、中危、低危 3 种,其中低危型包括 HPV6、11、42、43、44 等型别,常引起外生殖器湿疣等良性病变;高危型包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 等型别,与宫颈癌、宫颈上皮内高度病变及其他恶性肿瘤的发生相关,尤其是 HPV16 和 18 型^[5-10]。

来自 Li 等^[11]的研究报道,HPV 在宫颈腺癌中的阳性率为 76.4%,HPV 在宫颈腺癌中的分布与年龄有关,在年轻女性中 HPV 的阳性率较高^[12]。本研究中,47 例宫颈腺癌患者 HPV 总阳性率为 93.6%(44/47),HPV 感染阳性率在不同年龄组中的差异无统计学意义($P>0.05$),提示需要增加样本量,进一步研究宫颈腺癌患者中 HPV 阳性率与年龄的相关性。

目前,宫颈鳞状上皮细胞病变与 HPV 的关系已经明确,随着宫颈腺癌发病率的增加,HPV 与子宫颈腺癌的关系也越来越受到关注。本研究中,单一型的 HPV 感染占全部腺癌病例的 27.7%(13/47),最主要的感染类型为 HPV16 型,其次为 HPV18 型;混合型别 HPV 感染占全部腺癌病例的占 66%(31/47),其中 HPV16 型+18 型是混合型感染最主要的类型,占混合型感染的 19.4%(6/31)。以上结果表明:宫颈腺癌患者既有单一型别 HPV 感染,也有混合型别 HPV 感染;单一型别 HPV 感染以 HPV16 型为主,其次为 HPV18 型;混合感染以 HPV16 型+HPV18 型为主,其次是 HPV16 型+18 型+31 型+33 型+58 型 3 例,占混合感染的 9.7%(3/31),HPV16 型+18 型+31 型+33 型+52 型 3 例,占混合感染的 9.7%(3/31)。其他型别的混合感染为 19 例,占混合感染的 61.3%(19/31),44 例 HPV 阳性感染患者中,感染 HPV16(下转第 397 页)

展抗菌药物临床应用专项整治有关^[14]。TEM 型、SHV 型和 CTX-M 型 ESBLs 在本地区均有存在,并且出现有些菌株同时携带两种或两种以上耐药基因,进一步亚型分析尚需作进一步的序列分析和鉴定。

参考文献

[1] 崔雪萍,李连青,戎建荣,等.肺炎克雷伯菌产 ESBL 和 AmpC 酶菌株基因分型[J].中华检验医学杂志,2010,33(3)262-263.

[2] 陈贤云,夏春,薛莲.产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的分布及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(20)2397-2398.

[3] Spellberg B,Guidos R,Gilbert D,et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections;a call to action for the medical community from the infectious diseases society of america [J]. Clin Infect Dis, 2008,46(2):155-161.

[4] Quale JM, Landman D, Bradford PA, et al. Molecular epidemiology of a city wide outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection [J]. Clin Infect Dis, 2002,35(7):834-841.

[5] Patrick DJ, Sturm ET, Bochum M, et al. Prevalence, molecular characterization, and phenotypic confirmation of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* at the Radboud University Nijmegen Medical Centre in the Netherlands [J]. Microb Drug Resist, 2010,16(1):55-60.

[6] Pagani L, Perilli M, Migliavacca R, et al. Extended-spectrum TEM- and SHV- type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing outbreaks in intensive care units in Italy [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000,19(10):765-772.

[7] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M changing

the face of ESBLs in Europe [J]. Antimicrob Chemother, 2007,59(2):165-174.

[8] Pitout JD, Church DL, Gregson DB, et al. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary Health Region; emergence of CTX-M-15-producing isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(4):1281-1286.

[9] Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, et al. Investigation of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea [J]. Letters in Applied Microbiol, 2004,39(1):41-47.

[10] Jia LY, Jann TW, Tsai LL, et al. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum β -lactamases production [J]. Microbiol Immunol Infect, 2009,42(3):310-316.

[11] 熊自忠,朱德妹,张婴元,等.临床分离的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中超广谱 β -内酰胺酶的检测 [J]. 中华医学杂志, 2002,82(21):1476-1479.

[12] 施锦杰,丁媛媛,李永明.大肠埃希菌 ESBLs 的携带情况及药敏分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(1):53-54.

[13] 张志坚,张傅山,张钦宪,等.大肠埃希菌产超广谱 β -内酰胺酶基因型与其耐药性 [J]. 郑州大学学报:医学版, 2010,45(5):738-740.

[14] 王细宏,罗飞,陈靖.池州地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产超广谱 β -内酰胺酶的基因型分布 [J]. 安徽医学, 2011,32(9):1313-1315.

(收稿日期:2012-09-23)

(上接第 394 页)

型(单一或混合感染)的患者占全部腺癌病例的 72.3%(34/47),占全部阳性病例的 77.2%(34/44);感染 HPV18 型(单一或混合感染)的患者占全部腺癌病例的 55.3%(26/47),占全部阳性病例的 59.1%(26/44)。同时感染 HPV16 型和 HPV18 型的患者占全部宫颈腺癌病例的 42.6%(20/47),占全部阳性病例的 45.5%(20/44)。以上结果提示,HPV16 型和 HPV18 型为宫颈腺癌患者感染优势型别,与宫颈癌的发生、发展密切相关。

近几十年来宫颈腺癌的发病率不断升高,有人认为这是因为宫颈脱落细胞学筛查的广泛开展,使得子宫颈鳞状细胞癌得以早期发现和早期治疗,从而造成了宫颈腺癌的发病率相对升高。但也有研究表明宫颈腺癌发病的绝对数量确实一直在不断增加。本研究描述了 HPV 在 47 例宫颈腺癌中的基因型别分布,HPV16 型和 HPV18 型为优势型别。因此,研究者可以通过基因芯片检测技术对宫颈疾病进行广泛筛查,对高危型阳性患者进一步实施阴道镜检查以及必要的病理活检,从而有效地预防和治疗宫颈癌患者。

参考文献

[1] 严粉琴,耿建祥,肖蔚,等.已婚女性宫颈上皮细胞中人乳头瘤病毒基因分型 2 000 例分析 [J]. 实用妇产科杂志, 2012,28(5):390-393.

[2] 孙信,薛敏,邓新粮.宫腔镜诊断宫颈腺癌 4 例临床分析 [J]. 中国医科大学学报, 2010,39(1):71-72.

[3] 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.

[4] 张金浩,耿建祥,吴崑岚,等.结直肠肿瘤中 HPV 感染的基因分析 [J]. 医学研究生学报, 2011,24(2):391-393.

[5] 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.

[6] 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):817-820.

[7] 唐永发,耿建祥,张金浩,等.196 例肛门及肛管尖锐湿疣病变中 HPV 感染的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2012,33(11):1303-1304,1307.

[8] 王建英,范明明,吴效科,等.人乳头状瘤病毒感染及端粒酶 hTERT 表达与宫颈癌关系的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2008,21(12):1321-1324.

[9] 何桂蓉,刘秋芹,龚文波,等.双色荧光定量快速分型、定量高危型人乳头状瘤病毒 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007,27(8):762-765.

[10] 王鲁平.人乳头状瘤病毒感染与子宫颈病变关系的研究进展及应对策略 [J]. 诊断病理学杂志, 2007,14(2):86-89.

[11] Li J, Zhang D, Zhang Y, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in women with cervical cancer or high-grade precancerous lesions in Chengdu, western China [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2011,112(1):131-134.

[12] Lan HY, Twu NF, Chen PC, et al. The relationship between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in relation to age of patients with cervical adenocarcinoma [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2009,48(3):370-374.

(收稿日期:2012-09-23)