

• 临床检验研究论著 •

# 宫颈癌组织中 HPV 感染基因型分布的比较研究\*

王宏景<sup>1</sup>, 龙秀荣<sup>2</sup>, 耿建祥<sup>2△</sup>, 王旭波<sup>2</sup>, 谭进<sup>2</sup>, 肖蔚<sup>2</sup>, 韩春荣<sup>2</sup>, 赵雪<sup>2</sup>, 王洪珍<sup>2</sup>

(1. 江苏省镇江市丹徒区人民医院病理科, 江苏镇江 212003;

2. 南京中医药大学附属第三医院病理科/江苏省 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

**摘要:**目的 比较宫颈上皮内瘤变和宫颈癌组织标本中人乳头瘤病毒(HPV)感染的基因型分布情况及其临床意义。方法 采用基因扩增结合基因芯片技术对 192 例宫颈上皮内瘤变和 85 例宫颈癌组织标本进行 23 种 HPV 基因分型检测, 并对受检者进行相关资料分析。结果 192 例宫颈上皮内瘤变 HPV 总阳性率为 82.29%(158/192), 一重感染阳性率为 46.88%(90/192), 多重感染阳性率为 35.42%(68/192); 85 例宫颈癌 HPV 总阳性率为 88.24%(75/85), 一重感染阳性率为 65.88%(56/85), 多重感染阳性率为 22.35%(19/85)。结论 基因扩增结合基因芯片检测技术可应用于宫颈病变的组织标本, 一次可检测 23 种 HPV 基因型别, 特异性强, 敏感性高, 对宫颈癌和癌前病变的防治及其疫苗的研究具有十分重要的意义。

**关键词:** 宫颈癌; 宫颈上皮内瘤变; 人乳头瘤病毒; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.011

文献标识码: A

文章编号:1673-4130(2014)05-0533-03

## Comparative study of HPV infective genotypes distribution in tissues of cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasias\*

Wang Hongjing<sup>1</sup>, Long Xiurong<sup>2</sup>, Geng Jianxiang<sup>2△</sup>, Wang Xubo<sup>2</sup>, Tan Jin<sup>2</sup>,Xiao Wei<sup>2</sup>, Han Chunrong<sup>2</sup>, Zhao Xue<sup>2</sup>, Wang Hongzhen<sup>2</sup>

(1. Department of Pathology, Dantu District People's Hospital, Zhenjiang, Jiangsu 212003, China;

2. Department of Pathology, Third Affiliated Hospital, Nanjing Traditional Chinese Medical University/

HPV Collaboration Group of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

**Abstract: Objective** To compare the genotypes distribution of human papillomavirus(HPV) infection in tissues of cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasias (CIN) and its clinical significance. **Methods** The polymerase chain reaction(PCR) and the gene-chips technique were utilized for the detection of 23 kinds of HPV genotypes in the tissue specimens from 192 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 85 cases of cervical cancers. And the related data of all subjects were analyzed. **Results** In 192 cases of CIN, the total positive rate of HPV was 82.29%(158/192), the positive rate of single genotype infection was 46.88%(90/192) and the positive rate of multiple genotypes infection was 35.42%(68/192); In 85 cases of cervical cancers, the total infection rate of HPV was 88.24%(75/85), the positive rate of single genotype infection was 65.88%(56/85) and the positive rate of multiple genotypes infection was 22.35%(19/85). **Conclusion** PCR combined with the gene-chips technique can be used in the detection of the tissue samples of cervical lesions, once detection can detect 23 kinds of HPV genotypes with high sensitivity and strong specificity, which has very important significance to the prevention and treatment of cervical cancer and precancerous lesions and the their vaccine research.

**Key words:** cervical cancer; cervical intraepithelial neoplasia; human papillomavirus; genotyping

目前,宫颈癌仍是全世界范围内妇女第二位常见的恶性肿瘤。在一些发展中国家,宫颈癌是女性的头号死因。在我国某些农村地区,由于缺乏资金和医疗技术,宫颈癌是妇女的主要健康问题,在城市中,由于缺乏有组织的筛查计划和医疗知识,宫颈癌也是妇女面临的严重威胁。每年我国约有 3 万多名妇女死于宫颈癌,宫颈癌的防控形势依然严峻。现已确认宫颈癌的致病因子是人乳头瘤病毒(HPV)感染, HPV 基因检测是目前筛查和预防宫颈癌的关键问题之一,因此, HPV 的分型检测是处理宫颈病变的重要依据,也是筛查不可缺少的主要内容<sup>[1-2]</sup>。本文采用基因扩增结合基因芯片检测技术,以 23 种常见的 HPV 作为感染源,对江苏省内的 192 例女性宫颈上皮内瘤变和 85 例宫颈癌组织标本进行基因检测,并对其感染基因谱分布情况进行分析。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2006 年 1 月至 2013 年 4 月镇江市丹徒区人民医院、南京市中医院、徐州市中医院、南京市六合区人民医院病理科病理组织学诊断的 192 例宫颈上皮内瘤变(其中 CIN I 级 24 例、CIN II 级 44 例、CIN III 级 124 例)和 85 例宫颈鳞状细胞癌的石蜡组织标本,宫颈上皮内瘤变患者年龄 21~90 岁,平均年龄 41.97 岁;宫颈癌患者年龄 28~81 岁,平均年龄 49.68 岁。

**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一 20

\* 基金项目:南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介:王宏景,男,副主任医师,主要从事宫颈癌及癌前病变 HPV 感染基因分型的研究。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

℃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 取 192 例宫颈上皮内瘤变和 85 例宫颈鳞状细胞癌石蜡组织标本,每例石蜡组织标本先去除其病变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,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 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  $\chi^2$  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

对 192 例宫颈上皮内瘤变和 85 例宫颈癌石蜡组织标本进行 HPV 核酸快速杂交分型检测,从 192 例宫颈上皮内瘤变样本中检测出阳性者 158 例,一重感染 90 例,多重感染 68 例,其中 CIN I 级一重感染 8 例,二重感染 2 例,三重感染 2 例,四重感染 1 例;CIN II 级一重感染 11 例,二重感染 13 例,三重感染 1 例,四重感染 3 例,六重感染 2 例;CIN III 级一重感染 71 例,二重感染 29 例,三重感染 10 例,四重感染 4 例,六重感染 1 例;85 例宫颈癌样本中检测出阳性者 75 例,其中一重感染 56 例,二重感染 14 例,三重感染 3 例,四重感染 1 例,五重感染 1 例。宫颈癌组织中 HPV 感染基因型别的分布,见表 1。

表 1 宫颈癌组织中 HPV 感染基因型别的分布[n(%)]

型别	n	CIN I 级(n=24)	CIN II 级(n=44)	CIN III 级(n=124)	宫颈鳞癌(n=85)
HPV 16	151	5(20.83)	11(25.00)	75(60.48)	60(70.59)
HPV 18	64	5(20.83)	20(45.46)	28(22.58)	11(12.94)
HPV 33	38	4(16.67)	8(18.18)	16(12.90)	10(11.77)
HPV 31	23	1(4.17)	8(18.18)	11(8.87)	3(3.53)
HPV 45	4	0(0.00)	0(0.00)	1(0.81)	3(3.53)
HPV 11	5	1(4.17)	2(4.55)	0(0.00)	2(2.35)
HPV 52	15	0(0.00)	2(4.55)	11(8.87)	2(2.35)
HPV 56	4	0(0.00)	0(0.00)	2(1.61)	2(2.35)
HPV 58	29	3(12.50)	4(9.09)	20(16.13)	2(2.35)
HPV 73	3	0(0.00)	0(0.00)	1(0.81)	2(2.35)
HPV 59	6	1(4.17)	1(2.27)	3(2.42)	1(1.18)
HPV 66	5	0(0.00)	2(4.55)	2(1.61)	1(1.18)
HPV 43	5	1(4.17)	1(2.27)	2(1.61)	1(1.18)
HPV 42	2	0(0.00)	1(2.27)	0(0.00)	1(1.18)
HPV 53	2	0(0.00)	0(0.00)	1(1.61)	1(1.18)
HPV 6	7	1(4.17)	1(2.27)	5(4.03)	0(0.00)
HPV 35	1	0(0.00)	1(2.27)	0(0.00)	0(0.00)
HPV 68	3	0(0.00)	1(2.27)	2(1.61)	0(0.00)
HPV 81	2	0(0.00)	1(2.27)	1(0.81)	0(0.00)
HPV 阴性	44	11(45.83)	14(31.81)	9(7.26)	10(11.77)

3 讨 论

HPV 感染是宫颈癌的主要的致病因素,目前已发现了 200 多种不同类型的 HPV,根据 HPV 致病性的差异性,将其分为高危型和低危型两大类<sup>[3-5]</sup>,其中有 54 种类型可感染生殖道黏膜,不同型别的 HPV 感染可导致不同的临床病变。宫颈癌发病缓慢,又存在着明确的癌前期病变,即宫颈上皮内瘤变(CIN),从持续性 HPV 感染到癌前病变再到宫颈癌其过程需数年至十多年时间,因此,及早发现持续性高危型 HPV 感染和早期治疗 CIN 患者以阻断宫颈癌的发生,是医学预防和研究的重点。同时弄清我国各地宫颈癌及其癌前病变的 HPV 感染率和基因型别的分布情况对宫颈癌的防治和疫苗的研发

具有重要的意义。

当前,HPV 感染率呈现出不断上升的趋势,宫颈癌已成为世界上性传播病原体所致的最广泛的流行病之一。由于不同地区和不同种族人群对 HPV 各个型别的易感性不同,不同的 HPV 型别对不同种族人群致癌性的强弱也存在着差异性。所以说,对宫颈癌及其癌前病变进行 HPV 分型检测有利于宫颈病变防控及其疫苗的研究<sup>[6-8]</sup>。世界卫生组织指出在所有癌症中,宫颈癌占发展中国家妇女全部癌症死亡的 11%,早期发现和治愈具有巨大的潜力,尤其降低发展中国家女性宫颈癌的死亡率是国际社会的共同责任。

本研究结果表明:(1)192 例宫颈上皮内瘤变和 85 例宫颈

癌组织中即有单一型别的 HPV 感染,也有混合型别的 HPV 感染,以一重感染为主,多重感染为辅,说明宫颈癌及其上皮内瘤变中一重感染类型较丰富,而多重感染呈现出不断增加的趋势,出现了较为少见的六重感染,值得分析和研究;(2)宫颈上皮内瘤变中一重(90 例)和多重(67 例)感染之比为 1.34 : 1,宫颈癌中一重(56 例)和多重(19)感染之比为 2.95:1,和国内女性宫颈病变一重和多重 HPV 感染之比 3 : 1 较接近,而宫颈上皮内瘤变中多重感染的增加超过了一重感染的增加,宫颈上皮内瘤变中 HPV 感染多重化的趋势在不断上升,应值得去研究和关注;(3)宫颈癌组织中一重型别 HPV 感染前 5 位的分别是 16 型 49.41% (42/85),18 型 3.53% (3/85),31、33、52 型均为 2.35% (2/85),宫颈上皮内瘤变组织中前 5 位的分别是 16 型 23.44% (45/192),18 型 6.25% (12/192),33 型 5.73% (11/192),58 型 4.69% (9/192),52 型 2.60% (5/192),两组比较宫颈癌组织中出现了 31 型,而宫颈组织中出现了 58 型,都是以 16 和 18 型为主,说明 16 和 18 型是重要的致癌致瘤因子,16 型致癌致瘤作用也不一样,且致癌作用比致瘤的比例大 1 倍以上,可见 16 型是目前全世界最主要的致癌致瘤因子,是重点检测和跟踪检测的型别<sup>[9-10]</sup>。(4)宫颈上皮内瘤变中,CIN I 级 HPV 总感染率为 54.17% (13/24),CIN II 级 HPV 总感染率为 68.18% (30/44),CIN III 级 HPV 总感染率为 92.74% (115/124),从 CIN I 级到 CIN II 级再到 CIN III 级 HPV 感染率的变化来看,其感染率呈现出逐渐升高的现象,说明随着宫颈 CIN 病变的逐渐加重 HPV 感染率随之升高,可见高危型 HPV 感染是宫颈瘤变进展的主要诱发因子。(5)CIN I 级与 CIN II 级比较, $\chi^2$  值为 1.31, $P > 0.05$ ,CIN III 级与宫颈癌比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.31, P > 0.05$ );而 CIN I 级或 CIN II 级与 CIN III 级或宫颈癌比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.70 \sim 25.60, P < 0.01$ )。这说明高危型 HPV 感染在 CIN III 级和宫颈癌的发生、发展过程中起到了关键的必要作用。(6)从 HPV 高危型感染出现频率来看,宫颈癌前 8 位的依次是 16、18、33、31、45、52、56、58、73 型,而宫颈上皮内瘤变依次为 16、18、33、58、31、52、59、66 型。我国在研制 HPV 疫苗时,如能包括 16、18、31、33、52、58 型,可增加其疫苗的覆盖面,以便最大限度地保护绝大多数女性免受这些常见型别的 HPV 感染而诱发宫颈癌及宫颈上皮内瘤变。(7)宫颈癌的发病过程存在着从持续性的 HPV 感染到癌前病变再到宫颈癌三个阶段,弄清我国各地女性这三个阶段 HPV 的感染率及优势型别,尤其是宫颈癌组织中 HPV 的感染率及优势型别非常重要,这将给我国宫颈癌的防控以及疫苗的研发提供循证医学依据。如果能够在持续性的 HPV 感染至癌前病变阶段对 HPV 进行干预治疗,尤其是中医药的干预治疗是医务工作者面临的重要课题。(8)2006 年 6 月,美国 FDA 正式批准 HPV 疫苗上市,用于宫颈癌的预防,这是世界上第一个肿瘤疫苗,也是人类抗癌斗争的里程碑<sup>[1,5,7]</sup>。目前全球已有 100 多个国家获准使用宫颈癌预防性疫苗,主要为二价疫苗(HPV16、18 型)和四价疫苗(HPV6、11、16、18 型),我国的 HPV 疫苗尚未获得批准,中国的 HPV 疫苗正在研发中。我国医务工作者以及流行病学研究者应尽快拿出中国各民族、各地区一般人群、宫颈癌及宫颈上皮内瘤变 HPV 感染流行度和流行基因谱的大样本数据,以便为后 HPV 疫苗时代提供非常重要的对比的标杆,同时也为后 HPV 疫苗时代 HPV(16 及 18 型)流行趋势的预测、HPV 疫苗

的改进,甚至政府部门对公共卫生政策的决策提供重要的数据资料 and 参考。

总之,宫颈癌的预防和筛查显然不只是医生的行为,更是政府的行为,它是一个系统工程,应根据情况尽可能进行至少是区域性的筛查。宫颈癌发病关键在于 HPV 感染这一基本因素,以及 HPV 能否被消除,是否会促成宫颈癌。由于 HPV 感染属于性传播性疾病,可在两性之间互相传播。所以,应该给女孩和男孩都接种宫颈癌疫苗,对性活跃期的女性和男性行 HPV 检测,对 HPV 阳性的女性和男性给予及时管理和治疗,并在性事时采用安全套等措施,这样可降低男性和女性的 HPV 感染率,宫颈癌及其他 HPV 感染相关肿瘤的发病率也会随之下降<sup>[4,11-12]</sup>。就宫颈癌的防治而言,因其病因明确,发病缓慢,又存在着明显的癌前期病变,这就为医务人员采用干预治疗提供了宝贵的时机,如能够在持续性高危型 HPV 感染阶段进行有效的干预治疗和癌前期病变得到早诊早治,宫颈癌将会成为人类第一个可进行有效预防的恶性肿瘤,这将造福于广大女性患者<sup>[1,13]</sup>。

#### 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瘤病毒基因的分型[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):817-818,820.
- [3] 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.
- [4] 李海,邓志勇,张阳,等.人乳头状瘤病毒在阴茎鳞癌组织中的表达及意义[J].现代实用医学,2010,22(9):1037-1038.
- [5] 郎景和.妇科肿瘤临床诊治的挑战与对策[J].中国癌症防治杂志,2012,4(1):1-4.
- [6] 任晓慧,耿建祥,李海,等.某市 2 109 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.
- [7] 林仲秋,卢淮武.子宫恶性肿瘤诊治研究—子宫颈癌[J].国际妇产科学杂志,2012,39(4):322-326.
- [8] 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.
- [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] 龙秀荣,王志蕙,耿建祥,等.健康妇女及宫颈上皮癌患者 HPV 感染基因型分布特征研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(24):2958-2959,2962.
- [11] Zhao R, Zhang WY, Wu MH, et al. Human papillomavirus infection in Beijing, People's Republic of China: a population-based study[J]. Br J Cancer, 2009, 101(9):1635-1640.
- [12] Etienney I, Vuong S, Si-Mohamed A, et al. Value of cytologic Papanicolaou smears and polymerase chain reaction screening for human papillomavirus DNA in detecting anal intraepithelial neoplasia: comparison with histology of a surgical sample [J]. Cancer, 2012, 118(24):6031-6038.
- [13] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses [J]. Virus Res, 2009, 143(2):195-208.