

• 临床检验研究论著 •

健康妇女及宫颈癌患者 HPV 感染基因型分布的研究*

徐妍婷¹, 蔡为民², 耿建祥^{2△}, 范雪梅², 徐晓兰², 王宏景², 龙秀荣², 谭进², 赵雪²

(1. 苏州大学附属第一医院妇产科, 江苏苏州 215006; 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 比较自然人群女性宫颈正常细胞、宫颈上皮癌前病变(CINⅢ级)及宫颈癌组织中 HPV 的基因型别分布情况。**方法** 采用基因扩增结合基因芯片技术对 1 047 例自然人群女性宫颈正常细胞(正常组)、173 例宫颈上皮癌前病变(癌前病变组)及 133 例宫颈癌(宫颈癌组)组织标本进行 23 种 HPV 基因分型检测。**结果** 正常组、癌前病变组、宫颈癌组分别检出 HPV 感染者 109、159、121 例, 总 HPV 感染率分别为 10.41%(109/1 047)、91.91%(159/173)、90.98%(121/133)。**结论** 基因扩增结合基因芯片检测技术可应用于宫颈细胞和组织标本的 HPV 基因分型检测。**关键词:** 宫颈; 人乳头瘤病毒; 基因型; 芯片技术**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.007**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)22-3022-03

Study of the distribution of HPV infective genotypes in healthy women and cervical carcinoma patients*

Xu Yanting¹, Cai Weimin², Geng Jianxiang^{2△}, Fan Xuemei², Xu Xiaolan²,Wang Hongjing², Long Xiurong², Tan Jin², Zhao Xue²

(1. Department of Obstetricians and Gynecologists, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China; 2. Department of Pathology/HPV Collaboration of Jiangsu Province, Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To compare the genotype distribution of HPV in cervical cells of natural crowd and tissues of cervical intraepithelial neoplasia(CINⅢ grade) and cervical carcinomas patients. **Methods** PCR and gene-chip technology were utilized for the genotype detection of 23 kinds of HPV in cell specimens from 1 047 women of natural crowd (normal group) and tissue specimens from 173 cases of cervical intraepithelial neoplasia(precancerosis group) and 133 cases of patients with cervical carcinoma (cervical carcinoma group). **Results** There were 109, 159 and 121 cases of HPV positive specimens respectively in normal group, precancerosis group and cervical carcinoma group, and the HPV infection rates were 10.41%(109/1 047), 91.91%(159/173) and 90.98%(121/133), respectively. **Conclusion** PCR and gene-chip technology can be used to detect HPV genotypes in cervical cells and cervical tissues specimens.**Key words:**cervix uteri; human papilloma virus; genotypes; gene-chip technology

宫颈癌早期症状并不明显,其发展过程中又存在着较长的、可逆转的癌前病变期。一般从宫颈癌前病变发展到宫颈癌大约需要 10 年左右的时间。如果能够在宫颈癌前病变阶段进行医学干预治疗,宫颈癌的治愈率可达 98%。目前作为唯一病因学明确的癌症,宫颈癌是唯一可以通过早期筛查、早期发现、可防、可治的癌症。因此,宫颈癌筛查仍是目前宫颈癌防控的关键^[1-2]。由于不同型别的人乳头瘤病毒(HPV)的致病性不同,其预后也存在差异。因此,弄清我国女性自然人群及宫颈癌中的 HPV 感染率和基因型别的分布状况对宫颈癌的防治和疫苗的研发具有非常重要的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1~12 月在苏州大学附属第一医院妇产科体检的 1 047 例已婚女性的正常宫颈细胞标本(正常组)。研究对象年龄 23~56 岁,平均 41.84 岁;收集 2001 年 1 月至 2013 年 12 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及常熟市第一人民医院病理科病理组织学诊断的 133 例宫颈癌(宫颈癌组,其中 127 例鳞癌、6 例腺癌)和 173 例宫颈上皮非典型增生(CIN)Ⅲ级的

石蜡组织标本(癌前病变组)。宫颈癌患者年龄 28~87 岁,平均 50.19 岁;宫颈 CINⅢ级患者年龄 21~90 岁,平均 42.73 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 -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 (1)细胞标本:采用窥阴器或阴道扩张器充分暴露宫颈,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。(2)石蜡组织标本:先去除每例石蜡组织周边多余的石蜡,将其石蜡组织

* 基金项目:南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介:徐妍婷,女,住院医师,主要从事宫颈癌及癌前病变 HPV 感染基因型的研究。 △ 通讯作者,E-mail:dyc720@163.com。

切成 $4 \mu\text{m}$ 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, 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 (1) 细胞标本: 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, 弃去上清液, 保留管底的细胞, 随后加入裂解液 50 μL , 充分振荡混匀; (2) 石蜡组织标本: 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, 两者均在金属浴中加热 100 °C 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有无杂交信号来判断结果。

1.4 统计学处理 3 组宫颈正常细胞及宫颈病变组织 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 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 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

从 1 047 例宫颈细胞学检查正常的细胞标本(正常组)中检测出阳性 109 例, 其中一重感染 96 例, 多重感染 13 例(二重感染 11 例、三重感染 2 例); 从 173 例癌前病变组石蜡组织标本中检测出阳性者 159 例, 其中一重感染 95 例, 多重感染 64 例(二重感染 47 例、三重感染 12 例、四重感染 4 例、六重感染 1 例); 从 133 例宫颈癌组石蜡组织中检出阳性者 121 例, 其中一重感染 89 例, 多重感染 32 例(二重感染 26 例、三重感染 4 例、四重感染 1 例、五重感染 1 例)。自然女性群体的 109 例阳性感染者检出不同型别数合计 124 次; 宫颈癌前病变的 159 例阳性患者检出不同型别数合计 247 次; 宫颈癌的 121 例阳性患者检出不同型别数合计 162 次, 见表 1。自然女性群体与宫颈癌前病变和宫颈癌女性 HPV 感染率比较, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。而宫颈癌前病变和宫颈癌女性 HPV 感染率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 3 组宫颈 HPV 阳性者感染型别分布[n(%)]*

HPV 型别	正常组	癌前病变组	宫颈癌组
HPV6	1(0.81)	5(2.02)	0(0.00)
HPV11	2(1.61)	0(0.00)	2(1.24)
HPV16	12(9.68)	106(42.92)	92(56.79)
HPV18	7(5.65)	38(15.39)	25(15.43)
HPV31	5(4.03)	13(5.26)	5(3.09)
HPV33	8(6.45)	23(9.31)	13(8.03)
HPV35	5(4.03)	2(0.81)	0(0.00)
HPV39	2(1.61)	1(0.41)	1(0.62)
HPV42	3(2.42)	0(0.00)	1(0.62)
HPV43	28(22.58)	2(0.81)	3(1.85)
HPV45	2(1.61)	1(0.41)	3(1.85)
HPV51	3(2.42)	4(1.62)	0(0.00)
HPV52	10(8.07)	15(6.07)	2(1.24)
HPV53	6(4.84)	1(0.41)	1(0.62)
HPV56	7(5.65)	2(0.81)	2(1.24)

续表 1 3 组宫颈 HPV 阳性者感染型别分布[n(%)]*

HPV 型别	正常组	癌前病变组	宫颈癌组
HPV58	13(10.48)	23(9.31)	5(3.09)
HPV59	1(0.81)	3(1.22)	3(1.85)
HPV66	2(1.61)	2(0.81)	1(0.62)
HPV68	4(3.23)	2(0.81)	1(0.62)
HPV73	2(1.61)	1(0.41)	2(1.24)
HPV81	0(0.00)	1(0.41)	0(0.00)
HPV82	0(0.00)	2(0.81)	0(0.00)
HPV83	1(0.81)	0(0.00)	0(0.00)
总计	124(100.00)	247(100.00)	162(100.00)

* : 对多重感染者, 各型别的阳性率重复计算。

3 讨 论

宫颈癌是目前唯一病因学明确的癌症, 主要是由高危型 HPV 持续性感染所致。现已发现 200 多种型别的 HPV, 根据其致病性的差异, 将其分为高危型和低危型两大类^[3-5], 其中有 50 多种型别可感染人类的生殖道黏膜, 不同型别的 HPV 感染可导致不同的临床病变。检测 HPV 是目前筛查和预防宫颈癌的关键, HPV 的分型检测是处理宫颈癌变的重要依据。本文采用基因扩增结合基因芯片检测技术, 检测了 23 种常见 HPV 的基因, 并对其感染基因谱分布情况进行了比较和分析。

HPV 主要通过性传播, 感染者通常没有症状。大量流行病学资料及研究已明确显示 HPV 持续性感染是宫颈癌发病的首要条件。HPV 阴性者几乎不会发生宫颈癌, 大部分 HPV 感染仅为一过性感染, 只有小部分 HPV 持续性感染才可能发展为 CIN 和宫颈癌^[1,6-8]。如果能对女性宫颈细胞和组织进行 HPV 分型检测, 将有助于有效识别宫颈癌高危人群, 对宫颈癌的防治和疫苗研发意义重大。

本研究结果表明, 1 047 例自然女性群体宫颈正常细胞(正常组)中一重感染率为 9.17% (96/1 047), 多重感染率为 1.24% (13/1 047); 173 例癌前病变组(CIN III 级)中一重感染率为 54.91% (95/173), 多重感染率为 36.99% (64/173); 133 例宫颈癌组中一重感染率为 66.92% (89/133), 多重感染率为 24.06% (32/133)。提示自然女性群体和宫颈癌患者都是以一重 HPV 感染为主, 多重感染占少数, 宫颈癌前病变患者与宫颈癌患者相比, HPV 多重感染率高出 0.54 倍, 与正常组比较高出 28.83 倍, 这种宫颈癌前病变组织中 HPV 多重感染高发生率的现象还有待于多中心大样本量的 HPV 基因分型研究进一步验证。随着宫颈癌筛查的普及, 临幊上发现越来越多的 CIN 病变。一般情况下, 有 32% 的 CIN III 级病变可自然消退, 有 14% 的 CIN III 级病变可能进展为浸润性宫颈癌^[1]。McCredie 等^[9]研究发现, 接受治疗的 CIN III 级病变患者的宫颈癌累积发生率显著低于未接受治疗者。因此, 对所有 CIN III 级病变患者都应给予干预性治疗, 否则任其发展, 浸润性宫颈癌发生的概率较高。高危型 HPV 检测可应用于分流细胞学检查结果为低度病变的妇女、宫颈癌或宫颈癌前病变患者治疗后的随访、阴道镜检查或组织病理学检查阴性患者的随访、单独或联合细胞学检查行宫颈癌前病变的初筛, 尤其对年龄在 35 岁以上的妇女更有意义^[1,10-12]。1 项涉及 38 个国家 8 977 个样本的研究显示, 宫颈癌患者的石蜡标本中, HPV 阳性率达 85%, 其中最常见的依次为 HPV16、18、31、33、35、45、52 和 58

型^[13]。本研究中,癌前病变组 HPV 阳性率达 91.91% (159/173),宫颈癌组 HPV 阳性率达 90.98% (121/133),均高于文献[13]的结果,这可能与检测方法差异或样本量差异有关。

癌前病变组中 8 种检出最多的 HPV 型别依次为 HPV16、18、33、58、52、31、51 和 59 型;宫颈癌组中检出最多的 8 种 HPV 型别依次为 HPV16、18、33、31、58、43、45 和 59 型。这 2 组间的型别分布有一定差异,宫颈癌组的 HPV 型别分布与文献[13]报道的结果也存在一定差异,这可能与 HPV 在宫颈癌组织中的感染具有地域和种族差异有关。2006 年 6 月,美国 FDA 正式批准 HPV 疫苗上市,用于宫颈癌的预防^[1,5]。而我国的 HPV 疫苗尚未获得批准。自然女性群体、宫颈癌前病变及宫颈癌患者 HPV 感染流行度和流行基因谱的大样本数据,将为我国 HPV 疫苗的研发提供科学依据。

临床研究发现 HPV16 和 HPV18 型阳性的宫颈癌患者较其他 HPV 型别阳性的宫颈癌患者的发病年龄平均年轻 5 岁^[1,10,12]。本研究中,癌前病变组和宫颈癌组中,HPV16 和 HPV18 都排序前二位,提示临床妇科医生对 HPV16 和 HPV18 感染的女性更应该做好追踪和随访工作。

综上所述,要重视宫颈癌早期筛查,及早对高危型 HPV 感染女性给予干预治疗,将有效降低宫颈癌的发病率^[14]。

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状瘤病毒基因的分型[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):817-818.
- [3] 张金浩,耿建祥,吴崑岗,等.结直肠肿瘤中人乳头瘤病毒感染的基因分析[J].医学研究生学报,2011,24(2):154-157.

(上接第 3021 页)

非发酵菌铜绿假单胞菌的检出数量逐年升高。铜绿假单胞菌的耐药机制比较复杂^[8]。本次监测结果显示,铜绿假单胞菌对喹诺酮类、碳青霉烯类抗菌药物以及阿米卡星保持着较好的敏感度,而对美罗培南的敏感率要低于亚胺培南,这可能与抗菌药物使用选择性压力有关。对于耐碳青霉烯类抗菌药物的铜绿假单胞菌,可选择氨基糖苷类、加酶抑制剂复合制剂、喹诺酮类等抗菌药物。头孢哌酮/舒巴坦的抗菌活性较强,可抑制 β -内酰胺酶同时可作用于青霉素结合蛋白^[9],可作为治疗铜绿假单胞菌感染的首选药物。阿米卡星的耐药率明显低于同类药物妥布霉素和庆大霉素,可用于治疗铜绿假单胞菌感染的联合用药。在头孢菌素类抗菌药物中,铜绿假单胞菌对头孢他啶和头孢吡肟仍有较高的敏感率。

糖肽类抗菌药物和利奈唑胺对革兰阳性球菌的活性较强,尚未发现对万古霉素和利奈唑胺耐药的葡萄球菌,但可检出对替考拉宁耐药的金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌。同时发现,除了利福平、米诺环素和氯霉素,金黄色葡萄球菌对绝大多数抗菌药物的敏感度明显高于凝固酶阴性葡萄球菌。

总之,细菌耐药监测是提高医疗质量、保障抗菌药物合理应用的基础,在尿路感染的治疗中,参考细菌耐药性资料选用抗菌药物极为重要。

参考文献

- [1] 甘龙杰,杨滨.尿路感染病原菌的分布及耐药新趋势[J].中国医

- [4] 李海,邓志勇,张阳,等.人乳头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] 邹琳,兰建云,耿建祥,等.47 例宫颈腺癌中人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.
- [7] 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.
- [8] 魏莲,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] McCredie MRE, Sharples KJ, Paul C, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3:a retrospective cohort study[J]. Lancet Oncol, 2008,9(5):425-434.
- [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.
- [11] 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.
- [12] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009,143(2):195-208.
- [13] 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(12):1789-1799.
- [14] 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.

(收稿日期:2014-03-28)

学感染学杂志,2013,23(6):1456-1458.

- [2] 朱德妹,汪复,胡付品,等.2010 年 CHINET 尿液标本中细菌的分布和耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2012,12(4):241-250.
- [3] 齐慧敏,吕媛,钱霞.卫生部全国细菌耐药监测网 2010 年女性尿标本细菌耐药监测[J].中国临床药理学杂志,2011,27(12):913-918.
- [4] 郑波,吕媛.卫生部全国细菌耐药监测网 2011 年男性尿标本来源细菌耐药监测[J].中国临床药理学杂志,2012,28(12):893-898.
- [5] 蒋杰.大肠埃希菌对喹诺酮类抗菌药耐药机制的研究近况[J].医学综述,2008,14(5):767-769.
- [6] 沈继录,朱德妹,吴卫红,等.革兰阴性杆菌碳青霉烯酶产生与细菌耐药性关系的研究[J].中华检验医学杂志,2008,31(4):408-414.
- [7] 李仲兴. VRE 感染的抗生素治疗[J].国外医药:抗生素分册,2004,25(3):113-119.
- [8] 何建方,沈翠芬,张晓祥,等.2002~2010 年医院临床分离铜绿假单胞菌的分布特征及耐药谱变迁[J].中华医院感染学杂志,2012,22(4):834-837.
- [9] Rafailidis PI, Ioannidou EN, Falagas ME. Ampicillin/sulbactam: current status in severe bacterial infections[J]. Drugs, 2007, 67(13):1829-1849.

(收稿日期:2014-02-18)