

• 论 著 •

131 例女性宫颈腺癌 HPV 感染基因型分布^{*}

夏 林¹, 王宏景², 耿建祥^{2△}, 范雪梅², 王志蕙², 梅 静², 龙秀荣², 徐海燕², 赵 雪²
(1. 江苏省扬中市人民医院病理科, 江苏扬中 212200; 2. 南京中医药大学第三附属医院
病理科/江苏省 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

摘 要:目的 探讨女性宫颈腺癌组织中人乳头瘤病毒(HPV)感染基因谱的分布情况及其临床意义。方法 从 131 份女性宫颈腺癌组织标本中提取 23 种 HPV DNA, 使用聚合酶链式反应和反向点杂交相结合的基因芯片技术对宫颈腺癌组织行 23 种 HPV 型别的测定, 同时分析受检者的相关资料。结果 131 例女性的宫颈腺癌组织标本中检出 HPV 感染者 82 例, 总的 HPV 感染率为 62.60% (82/131), 其一型感染率为 33.59%, 一型中最主要感染型别是 HPV16 型(16.79%), 其次为 HPV18 型(13.74%)。阳性检出率多型 HPV 感染为 29.01%, 其中 HPV16+18 型和 HPV16+58 型, 分别占多型感染的 21.05% 和 7.90%, 是多型感染的主要型别。结论 一型 HPV16 型和 HPV18 型及多型 HPV16+18 型和 HPV16+58 型是女性宫颈腺癌组织的主要基因型, 此基因芯片检测技术可适用于宫颈组织标本, 一次可检测 23 种 HPV 基因型, 其特异性强, 敏感性高, 对中国女性宫颈腺癌 HPV 感染基因型分布的病因学研究具有重要的意义。

关键词:组织; 宫颈腺癌; 人乳头瘤病毒; 基因分型; 基因芯片技术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)09-1188-03

Distribution of HPV infection genotypes in 131 cases of cervical adenocarcinoma^{*}

Xia Lin¹, Wang Hongjing², Geng Jianxiang^{2△}, Fan Xuemei²,
Wang Zhihui², Mei Jing², Long Xiurong², Xu Haiyan², Zhao Xue²

(1. Department of Pathology, Yangzhong Municipal People's Hospital, Yangzhong, Jiangsu 212200, 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 investigate the distribution of human papillomavirus(HPV) genotypes profiles in cervical adenocarcinoma tissues and its clinical significance. **Methods** 23 kinds of HPV DNA were extracted from 131 cervical adenocarcinoma tissue samples and their genotyping was detected by the gene-chips technique of PCR combined with reverse dot blot, and the related materials of all subjects were analyzed. **Results** Among 131 cases of cervical adenocarcinoma tissue samples, there were 82 cases of HPV infection, the total HPV infection rate was 62.60% (82/131), the HPV infection rates of single types was 33.59%, in which the predominant types were HPV 16 type(16.79%), followed by HPV 18 type(13.74%). The infection rates of multiple HPV types was 29.01%, in which the HPV16+18 and HPV16+58 accounted for 21.05% and 7.90% of multiple HPV infection respectively, and were the main types of multiple HPV infection. **Conclusion** HPV16, 18 and HPV16+18, 16+58 are the main genotypes of female cervical adenocarcinoma tissues, this gene-chip technique can be suitable for cervical adenocarcinoma tissue samples. This gene-chip technique can detect 23 kinds of HPV genotypes simultaneously with strong specificity, high sensitivity and has an important significance for the etiology with high sensitivity and specificity, and might be important for the study of HPV genotypes distribution of cervical adenocarcinoma tissues among women.

Key words: tissue; cervical adenocarcinoma; human papillomavirus; genotyping; gene-chip technology

目前, 全世界每年约有 52.9 万名妇女被确诊为宫颈癌, 每年约有 27.5 万人死于该病。据统计 83% 的宫颈癌患者分布于发展中国家, 宫颈癌已成为发展中国家女性癌症患者死亡率最高的恶性肿瘤。宫颈癌病因明确, 高危型人乳头瘤病毒(HPV)的持续性感染是引发宫颈腺癌及癌变的主要因素^[1-3]。自从巴氏细胞学检查在西方国家广泛使用以来, 宫颈鳞癌的发病率已经显著降低, 然而宫颈腺癌的发病率却明显上升, 同期的宫颈腺癌与宫颈鳞癌相比其预后更差。近年来, 中国宫颈腺癌发病率也呈现出逐渐增加的趋势。对中国宫颈鳞癌, 尤其是对宫颈腺癌的筛查就显得尤其重要。因此, 弄清楚大样本宫颈腺癌组织标本中 HPV 感染率和基因型的分布情况对宫颈癌的防治和疫苗的研制具有十分重要的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 1978 年 9 月至 2014 年 5 月江苏省扬中市人民医院、南京市中医院、常熟市第一人民医院、南京市六合区人民医院、南京市大厂医院、镇江市第一人民医院、镇江市丹徒区人民医院、徐州市中医院、盐城市第一人民医院、江苏省射阳县人民医院、安徽省当涂县人民医院、山东省临沂市肿瘤医院病理科病理组织学诊断的 131 例宫颈腺癌患者的石蜡组织标本, 宫颈腺癌患者年龄 21~80 岁, 平均 51.04 岁。20~29 岁 3 例、30~39 岁 12 例、40~49 岁 48 例、50~59 岁 42 例、60~69 岁 17 例、70~79 岁 7 例、80~89 岁 2 例。病理切片均由 2 位主治以上医师按照世界卫生组织(WHO)2003 年妇科肿瘤的组织学分类标准进行诊断。

^{*} 基金项目: 南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介: 夏林, 男, 副主任医师, 主要从事临床人乳头瘤病毒的研究工作。

[△] 通讯作者, E-mail: dyc720 @ 163.com。

1.2 仪器与试剂 AB Applied Biosystems 2720 型基因扩增仪(新加坡 Perkin Elmer 公司);Combi-H12 型分子杂交仪(韩国 Finepcr 公司);Eppendorf 5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);BSC2A2-1102(上海瑞仰净化装备公司);HPV 分型基因检测试剂盒(亚能生物技术深圳公司)。每次试验时需当时配制显色液,所要浓度用蒸馏水调配。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集 取 131 份女性宫颈腺癌石蜡组织标本,对宫颈腺癌石蜡组织切片,切片厚度为 4 μm,切 5~8 片。切后的石蜡组织切片用小镊子夹入小离心管内,如需再切石蜡组织时,要用含有次氯酸钠液的棉签来回擦刀片及小镊子各 2~4 次。

1.3.2 提取 DNA 将装有石蜡组织切片的待测小离心管(1.5 mL)取出,用移液器吸取 150 μL 的裂解液加入管内,放在振荡器上充分混匀,混匀后将小管放入 100 ℃ 的金属浴中约 10 min,随后 13 000 r/min 离心 10 min,离心后用移液器吸取中层 DNA 溶液待测。整个试验操作步骤按照说明书进行。

1.3.3 判定结果 (1)观察膜条时每例膜条上都应该在 PC 点显出蓝圆点;(2)除 PC 点外,阴性质控品不应该在其他点上出现蓝圆点;(3)除 PC 点外,阳性质控品应该在某位置上出现蓝圆点;(4)除 PC 点外,膜条上还有 23 个 HPV 型别位点,如杂交阳性时,用肉眼可观察到某位置上出现小蓝色圆点;(5)除 PC 点外,如观察到 1 个蓝色圆点为一型感染,看到 2 个蓝圆点为二型感染,同时显示 2 个以上的蓝圆点为多型感染。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件包进行统计学分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采取 χ² 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

131 例女性宫颈腺癌患者中,23 种 HPV 基因分型检测阳性者 82 例,阴性者 49 例,HPV 感染率为 62.60%(82/131),其中一型 HPV 感染 44 例,占总 HPV 感染率的 33.59%(44/131);多型 HPV 感染 38 例,占总 HPV 感染率的 29.01%(38/131)。一型感染中 HPV16 型为 22 例,其阳性检出率为 16.79%(22/131),是最主要的型别;其次 HPV18 型为 18 例,其阳性检出率为 13.74%(18/131);多型 HPV 感染 38 例,其阳性检出率为 29.01%(38/131),其中 HPV16+18 型 8 例,占多型感染的 21.05%(8/38),是多型感染的主要型别,其次是 HPV16+58 型 3 例,占多型感染的 7.90%(3/38)。单一型感染依次为:16 型 22 例,18 型 18 例,45 型 3 例,66 型 1 例;二型感染依次为:16+18 型 8 例,16+58 型 3 例,6+16 型 1 例,16+43 型 1 例,18+31 型 1 例,18+45 型 1 例,18+52 型 1 例,18+59 型 1 例,33+58 型 1 例;三型感染 8 例;四型感染 5 例;五型感染 7 例。131 例宫颈腺癌 HPV 阳性患者检出不同型别数合计 159 次(高危型 156 次)。对多重感染者,各型别的阳性率重复计算。30~<40 岁、40~<50 岁、50~<60 岁和 60~69 岁 4 组 HPV 阳性患者数比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。131 例女性宫颈腺癌患者不同年龄段 HPV 型别感染情况,见表 1。

表 1 131 例女性宫颈腺癌患者不同年龄段 HPV 型别感染情况(<i>n</i>)					
HPV 型别	30~<40 岁	40~<50 岁	50~<60 岁	60~69 岁	合计
HPV 6	0	1	0	0	1
HPV 16	9	21	14	6	50

续表 1 131 例女性宫颈腺癌患者不同年龄段 HPV 型别感染情况(<i>n</i>)					
HPV 型别	30~<40 岁	40~<50 岁	50~<60 岁	60~69 岁	合计
HPV 18	5	19	15	6	45
HPV 31	2	5	5	3	15
HPV 33	3	5	2	2	12
HPV 35	0	1	1	0	2
HPV 43	0	0	1	1	2
HPV 45	0	3	1	0	4
HPV 51	0	1	0	0	1
HPV 52	1	2	2	3	8
HPV 53	0	1	0	0	1
HPV 58	2	2	4	0	8
HPV 59	0	0	1	0	1
HPV 66	0	0	1	0	1

3 讨 论

宫颈腺癌的发生率要明显低于宫颈鳞癌,早期的统计数据显宫颈腺癌约占宫颈癌的 5%~8%。然而,近几十年来宫颈腺性病变的发病率不断升高,有学者认为这是由于宫颈脱落细胞学筛查广泛的开展,使得宫颈鳞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^[1,4]。以往的流行病学研究认为宫颈腺癌与宫颈鳞癌具有不同的发病因素,然而近年来研究发现,宫颈腺癌与宫颈鳞癌具有相似的发病机制,这要归功于 HPV 与宫颈癌发生关系的确定,以及近年来 HPV 检测技术的不断改进^[5-6]。

自从西方国家采用巴氏细胞学筛查宫颈癌以来,宫颈鳞癌的发病率已明显降低,而宫颈腺癌的发病率呈现出上升的态势,从 20 世纪 70 年代至今,宫颈腺癌增加约两倍。如今美国女性中,浸润性宫颈癌中约有 20%~30% 是宫颈腺癌,增加的病例主要见于中年女性,平均年龄 40~50 岁,小于 30 岁的病例少见,但近年来小于 35 岁的宫颈癌患者中宫颈腺癌的发病率有所增加。大多数宫颈管腺癌患者都可以检测到 HPV 感染,尤其是 HPV16 和 18 型^[1,7]。宫颈腺癌的 5 年生存率取决于组织学分化程度,高、中、低分化对应的 5 年生存率分别为 92%、73% 和 66%。70%~80% 的病例可见异常阴道出血。细胞学筛查宫颈鳞癌的敏感性远高于宫颈管腺癌。因此,如何改进宫颈腺癌筛查的取样方法,提高宫颈腺癌筛查的检出率,是当前宫颈癌筛查中亟待解决的问题。

本研究结果表明,(1)131 份宫颈腺癌组织标本中总的 HPV 感染率为 62.60%(82/131),其中一型感染率为 33.59%(44/131),多型感染率为 29.01%(38/131)。提示宫颈腺癌患者中以一型 HPV 感染为主,多型感染为辅,一型感染与多型感染之比为 1:1.16,宫颈腺癌患者中虽以一型感染为主,但一型与多型感染之比非常接近,说明宫颈腺癌患者中多型感染增加非常明显,出现了较为少见的 5 型感染,值得去研究和分析。(2)高危型 HPV 检测在宫颈癌筛查中的意义在于:分流细胞学检查结果为低度病变的妇女(包括 ASC-US);宫颈癌或宫颈瘤变患者治疗后的随访;阴道镜检查或活检阴性患者的随访;单独或联合细胞学检查行宫颈腺癌前病变的初筛,尤其对年龄大于 35 岁的妇女更有意义^[1]。近年来,中国启动了宫颈癌筛查项目,每年对 35~64 岁的 1 000 万农村妇女进行宫颈癌筛查。本研究显示宫颈腺癌 35~64 岁的患者 106 例,占总人数的 80.92%(106/131),由此可见,宫颈腺癌中 35~64 岁的患者占宫颈腺癌患病总人数的绝大多数,中国对年龄 35~64 岁的妇女行宫颈癌及癌前病变的筛查就显得意义重大,如果筛

查措施都能落实到位,就可以保护超过 80% 以上的女性远离宫颈癌。(3)流行病学调查资料显示,95% 以上的宫颈癌是由高危型 HPV 感染引起的,其中 HPV16 是最主要的致病型别^[8-10]。本研究显示宫颈癌是以 HPV16 和 18 型为主,还检测到少数患者感染了其他高危型 HPV,低危型 HPV 在宫颈癌中检出了 HPV6、43 型,这两种低危型都是与高危型同时出现在混合感染中,本文暂没有发现低危型 HPV 单独致癌的病例。(4)文献^[11]显示,38 个国家 8 977 例宫颈癌患者的石蜡标本中,HPV DNA 阳性率达 85%,其中最常见依次为 HPV16、18、31、33、35、45、52 和 58 型,这 8 种型别占总阳性率的 91%。本文宫颈癌组织标本中总的 HPV DNA 阳性率为 62.60% (82/131),宫颈癌组织前 8 种最常见的高危型 HPV 依次为 16、18、31、33、52、58、45、35 型,这 8 种型别占 HPV 总出现频率的 90.57% (144/159),占 HPV 高危型出现频率的 97.44% (152/156)。与文献^[11]研究出现的型别相同,前 4 位排序相同,后 4 位排序不同,35 型后移 3 位,45 型后移 1 位,52 型前移 2 位,58 型也前移 2 位,这可能与 HPV 的感染在宫颈癌组织中存在地域、种族的差异性和检测的样本量不一样有关。(5)宫颈鳞癌和宫颈癌相关的 HPV 感染型别存在着一些差异性。大约 50% 的宫颈癌患者感染 HPV18 型,而宫颈鳞癌仅为 15%; HPV16 型和 18 型可能是宫颈癌最常见的 HPV 感染类型,而更多的 HPV 型别与宫颈鳞癌有关^[1,6-7]。本研究 HPV16 型总出现频率 33.96% (54/159),在高危型中出现频率 34.62% (54/156),HPV18 型总出现频率 28.93% (46/159),在高危型中出现频率 29.49% (46/156),HPV16 型出现频率比 HPV18 型略高。从年龄分组来看,16 型与 18 型之比,30~<40 岁之比为 1:1.8,40~<50 岁之比为 1:1.11,50~<60 岁之比为 0.93:1.60,60~69 岁之比为 1:1,研究结果提示随着患病年龄的增加,18 型感染也逐渐增加,在 50 岁之前的年龄组中 16 型感染多于 18 型,而在 50~<60 岁年龄组中 18 型略超过 16 型,60~69 岁年龄组中两型感染概率相等。宫颈癌组织中 18 型感染频率随着年龄增加而增加,但还有待于大样本的宫颈癌组织 HPV 基因分型研究进一步验证。(6)在宫颈癌组织高危型 HPV 检测中,存在高危型 HPV 检出率随着宫颈管腺癌患者年龄不同存在着差异性。40 岁以下宫颈管腺癌患者,高危型 HPV 阳性率接近 90%,这个比率和宫颈鳞癌高危型 HPV 近似;然而在 60 岁以上宫颈管腺癌的老年女性,高危型 HPV 阳性率只有 43%^[12-14]。本研究显示,30~<40 岁年龄组高危型 HPV 阳性率为 83.33% (10/12),40~<50 岁年龄组高危型 HPV 阳性率为 66.67% (32/48),50~<60 岁年龄组高危型 HPV 阳性率为 64.29% (27/42),60~69 岁年龄组高危型 HPV 阳性率为 52.94% (9/17)。本研究 40 岁以上年龄组高危型 HPV 阳性率比 40 岁以下宫颈管腺癌患者阳性检出率要低,这一高危型 HPV 阳性率随宫颈管腺癌患者年龄增加而降低的现象,还需要积累更多的宫颈管腺癌组织 HPV 分型检测数据进一步分析。

宫颈癌是宫颈癌的一种特殊、少见的病理组织学类型。近年来,宫颈癌发病率在宫颈癌中所占比例逐年上升,发病年龄呈现出年轻化的趋势。与宫颈鳞癌相比,宫颈癌的生物学行为存在着一定的特殊性,治疗存在着一定的差异性。尤其要重视宫颈腺癌早期的诊断,包括改进取材和诊断技术等方面。早期宫颈腺癌患者应尽可能给予手术切除,一些肿瘤较大的早期患者,可先通过给予新辅助化疗后再接受手术治疗。对

中晚期患者应行放化疗同步进行以提高疗效,必要时也可在放疗后给予补充巩固化疗。而对于复发或远处转移的患者,个性化治疗显得更为重要。总之,同期宫颈腺癌的预后比宫颈鳞癌差,因此,宫颈腺癌的早期诊断是提高其治愈率的关键所在。现阶段,应改进宫颈腺癌的取材技术,采用更加合理的宫颈癌筛查法,最大限度地检出早期宫颈腺癌,这样宫颈鳞癌及宫颈腺癌将会成为有效防治的癌症,这将普惠于众多的女性患者^[15-16]。

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] 董云灿,耿建祥,张劲松,等.1722 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,樊志敏,等.肛管及肛门区尖锐湿疣组织中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.
- [4] 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.
- [5] 张金浩,耿建祥,樊志敏,等.257 例肛管及肛管尖锐湿疣组织 HPV 感染的基因分析[J].临床与实验病理学杂志,2013,29(5):520-523.
- [6] 吴海静,石宇,张国楠.子宫颈腺癌的临床研究进展[J].中华妇产科杂志,2011,46(7):554-558.
- [7] 李清.宫颈腺癌的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2012,39(4):330-333.
- [8] 任晓慧,耿建祥,李海,等.某市 2109 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical Cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(11):1048-1056.
- [13] An HJ, Kim KR, Kim IS, et al. Prevalence of human papillomavirus DNA in various histological subtypes of cervical adenocarcinoma: a population-based study[J]. Mod Pathol, 2005, 18(4):528-534.
- [14] Lo KW, Wong YF, Chan MK, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical Cancer: a multicenter study in China[J]. Int J Cancer, 2002, 100(3):327-331.
- [15] 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.
- [16] 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.