

• 论 著 •

基因芯片检测人乳头瘤病毒基因分型在宫颈病变筛查中的临床应用价值

杜 琼¹, 刘 苑², 赵 滢³, 唐睿珠³, 蔡雪梅³, 徐秋月³, 刘子杰^{3△}, 王 磊⁴

(1. 云南昆钢医院检验科, 云南安宁 650302; 2. 昆明医科大学第一附属医院医学妇科, 昆明 650032;

3. 昆明医科大学第一附属医院医学检验科, 昆明 650032; 4. 北京博奥晶典生物技术有限公司 101111)

摘 要:目的 旨在分析基因芯片方法检测人乳头瘤病毒基因分型在宫颈病变筛查中的临床应用价值。方法 收集 2015 年 9 月至 2015 年 12 月昆明医科大学第一附属医院妇科门诊进行人乳头瘤病毒基因分型的 372 例标本, 包括 22 种基因型(含高危 18 种、低危 4 种), 同时进行薄层液基细胞学检查。结果 223 例检出人乳头瘤病毒基因, 检出率为 59.94%, 检出高危型 194 例(52.15%), 低危型 29 例(7.80%); 薄层液基细胞学筛查结果异常率(包括非典型增生、低度病变和高度病变)为 44.08%, 非典型增生为 22.88%, 低度病变检出率为 18.01%, 高度病变检出率为 5.10%。在宫颈病变表现出炎症以上病变时, 多重感染与宫颈病变程度具有显著相关性($P < 0.05$)。结论 人乳头瘤病毒基因分型检测对宫颈病变筛查有较高临床应用, 且与细胞学改变具有良好相关性, 进行人乳头瘤病毒基因分型检测有利于宫颈病变的早期筛查。

关键词:人乳头瘤病毒; 薄层液基细胞学; 宫颈病变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)23-3303-03

Clinical application value of gene chip for detecting HPV DNA genotype in cervical lesions screening

DU Qiong¹, LIU Yuan², ZHAO Ying³, TANG Ruizhu³, CAI Xuemei³, XU Qiuyue³, LIU Zijie^{3△}, WANG Lei⁴

(1. Department of Clinical Laboratory, Kungang Hospital, Anning, Yunnan 650302, China;

2. Department of Gynecology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China;

3. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming,

Yunnan 650032, China; 4. Beijing Boao Jingdian Biotechnology Co., Ltd., Beijing 101111, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical application value of gene chip method for detecting human papilloma virus (HPV) DNA genotype. **Methods** A total of 372 samples of HPV genotype in the gynecological outpatients department of our hospital from September to December 2015 were collected, including 22 kinds of genotype (18 types of high risk, 4 types of low risk), meanwhile all samples were performed thinprep cytologic test (TCT). **Results** In 372 samples, 223 cases of HPV gene were detected with the detection rate of 59.94%, 194 cases (52.15%) of high risk type and 194 cases (7.80%) of low risk type were detected; the abnormal rate of TCT was 44.08% (including atypical hyperplasia, low-grade and high-grade lesion), the atypical hyperplasia was 22.88%, the detection rate of high-grade lesion was 5.10% and which of low-grade lesion was 18.01%. In the cervical lesions showing the lesion beyond inflammation, multiple infection and cervical lesions had significant correlation ($P < 0.05$). **Conclusion** HPV genotyping has higher clinical application in the cervical lesion screening, moreover which has good correlation with the cytological change. Conducting HPV genotyping is beneficial to the early screening of cervical lesions.

Key words: human papilloma virus; thinprep cytologic test; cervical lesion

在世界范围内, 宫颈癌仍然是女性第二常见的恶性肿瘤, 其发病率逐年上升, 全世界每年新发病例数 49.3 万^[1]。其中 24 万人死于宫颈癌, 世界卫生组织和国际癌症研究所 (WHO/IARC) 早已明确人乳头瘤病毒 (HPV) 持续感染特别是高危型 HPV 持续感染是宫颈癌的主要病因, 因此 HPV 的检测, 成为了宫颈癌防治和筛查的重要技术手段, 尤其是 HPV-DNA 分型检测, 可以预防或减少宫颈癌的患病风险, 对宫颈癌的预防、早期发现与治疗有重要意义。薄层液基细胞学筛查技术 (TCT) 是基于细胞分类学对宫颈细胞进行分级、评估, 明确宫颈病变的程度及发展方向, 为临床治疗提供依据。本文将 HPV-DNA 分型检测技术与 TCT 相比较, 分析 HPV-DNA 分型与宫颈病变的相关性, 明确 HPV-DNA 分型的意义, 为宫颈病变的诊断提供更多、更有力的依据。目前, HPV 的常见检测方法有液态杂交 (HCII) 法、聚合酶链反应 (PCR) 法、基因测序法、基因芯片 (DNA 芯片) 法等。而液相杂交法对标本的病毒载量进行半定量。PCR 是以分子信标为探针的荧

光定量分析。基因测序法是对靶片段 DNA 分子的核苷酸排列顺序的测定。基因芯片法与标记的标本进行杂交, 通过检测杂交信号的强弱显示标本中靶分子的数量。本研究采用基因芯片技术对常见的 HPV 进行检测及基因分型。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 9 月至 2015 年 12 月在昆明医科大学第一附属医院妇科门诊进行 HPV 常规筛查的 372 例女性。年龄 21~77 岁, 中位数为 40 岁。分别对就诊患者进行 HPV-DNA 分型检测与 TCT 筛查。

1.2 HPV-DNA 分型检测 采用 HPV 微阵列芯片试剂盒 (博奥生物, 北京) 对 22 种 HPV-DNA 分型进行检测 (包括 18 种高危型: 16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82 型; 4 种低危型: 6、11、70、81 型)。采集宫颈脱落细胞并提取 DNA, 通过多重 PCR 扩增待测标本的目的基因片段, 将 PCR 产物与杂交液按一定比例混合后点入对应的基因芯片中进行杂交, 22 种 HPV-DNA 片段与基因芯片上的特异

性探针反应,再通过晶芯 LuxscanTM10K-B 微阵列芯片扫描仪(博奥生物,北京)读取结果,输出报告。

1.3 TCT 检测 用 TCT 取样器取宫颈分泌物置入保存液相应容器中,离心取沉淀、过滤后制成超薄涂片,经乙醚酒精固定、巴氏染色、用 Moticam 2206 显微镜镜检。细胞学诊断方法采用宫颈或阴道巴氏涂片细胞学诊断报告系统(TBS)分类法^[2]可分为:(1)无上皮内病变或恶性病变(NILM);(2)非典型鳞状细胞(ASC-US);(3)低度鳞状上皮内病变(LSIL);(4)高度鳞状上皮内病变(HSIL)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.00 统计软件进行分析,计数资料以行列表进行描述,组间比较采用 Fisher 精确概率计算,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPV-DNA 分型与 TCT 检测结果 HPV-DNA 分型检出 223 例(59.68%),22 个型别均有检出,主要以 16 型(36/223,16.14%)、52 型(35/223,15.70%)、51 型(18/223,8.07%)、18 型(15/223,6.73%)、33 型(14/223,6.28%)为主;TCT 检出阳性 164 例(44.08%)非典型增生(22.88%),低度病变检出率(18.01%),高度病变检出率(5.10%),其中高、低度病变共计 77 例,77 例患者中 HPV 检出以 16 型(21/77,27.27%)、18 型(10/77,12.99%)为主。见表 1、2。

表 1 HPV 与 TCT 检出结果[n(%)]		
HPV 型别	HPV 阳性	TCT 高度病变或低度病变
16 型	36(16.14)	21(27.27)
52 型	35(15.70)	7(9.09)
51 型	18(8.07)	3(3.90)
18 型	15(6.73)	10(12.99)
33 型	14(6.28)	4(5.19)
59 型	10(4.48)	2(2.60)
58 型	10(4.48)	5(6.49)
53 型	9(4.04)	3(3.90)
39 型	8(3.59)	0(0.00)
31 型	8(3.59)	4(5.19)
26 型	7(3.14)	3(3.90)
56 型	6(2.69)	2(2.60)
68 型	5(2.24)	2(2.60)
35 型	4(1.79)	1(1.30)
66 型	4(1.79)	0(0.00)
45 型	2(0.90)	1(1.30)
82 型	1(0.45)	0(0.00)
73 型	2(0.90)	2(2.60)
81 型	11(4.93)	5(6.49)
70 型	9(4.04)	1(1.30)
6 型	5(2.24)	0(0.00)
11 型	4(1.79)	1(1.30)
合计	223(100.00)	77(100.00)

2.2 HPV 分型检测与 TCT 的相关性 经 TCT 检测后结果为 NILM 208 例(56%)、ASC-US78 例(21%)、LSIL 为 67 例

(18%)、HSLM 19 例(5%)。TCT 与 HPV-DNA 分型检测具有良好的相关性,以 TCT 结果为金标准,HPV 检测对 ASC-US、LSIL 和 HSLM 病变的检测灵敏度分别为 74.36%、76.12%、89.47%。见表 3。校正年龄后,是否感染 HPV 与炎症病变仍具有较强相关性,而是否感染高危型与炎症病变无关,当出现低、高危病变时 HPV 低危或高危感染均具有显著相关性。见表 4。

表 2 TCT 检测结果(n)				
TCT 分级	n	高危型 HPV	低危型 HPV	HPV 阴性
NILM	208	54	15	139
ASC-US	78	53	5	20
LSIL	67	50	1	16
HSLM	19	17	0	2
合计	372	174	21	137

表 3 HPV 分型检测与 TCT 检测结果的相关性(n)					
HPV 分型	TCT 检测				合计
	NILM	ASC-US	LSIL	HSLM	
阴性	139	20	16	2	177
低危	15	5	1	0	21
高危	54	53	50	17	174
合计	208	78	67	19	372

表 4 校正年龄后分析 HPV 感染与 TCT 的相关性						
TCT	截距	标准误	P	优势比	优势比的 置信区间 95%	
					下限	上限
炎症						
截距	−1.634	0.592	0.006			
年龄	0.040	0.014	0.003	1.041	1.014	1.070
HPV 阴性	−2.012	0.316	0.000	0.134	0.072	0.248
HPV 低危型	−0.993	0.560	0.076	0.371	0.124	1.111
HPV 高危型	0					
低度病变						
截距	−0.947	0.611	0.121			
年龄	0.022	0.015	0.131	1.022	.993	1.052
HPV 阴性	−2.098	0.330	0.000	0.123	0.064	0.234
HPV 低危型	−2.577	1.053	0.014	0.076	0.010	0.598
HPV 高危型	0					
高度病变						
截距	−3.706	1.085	0.001			
年龄	0.061	0.024	0.010	1.063	1.014	1.114
HPV 阴性	−3.121	0.770	0.000	0.044	0.010	0.200
HPV 低危型	−20.335	0.000		0.000	0.000	0.000
HPV 高危型	0					

注:Fisher 计算值=88.19,P=0.00。

2.3 HPV 多重感染与宫颈病变的关系 HPV-DNA 分型检测结果显示,单一型 HPV 感染 167 例(85.20%),多重 HPV 感染 29 例(14.8%);多重 HPV 感染与宫颈病变程度差异无统计学意义($\chi^2=6.86, P>0.05$),但在炎症、低度和高度病变组间 HPV 多重感染与宫颈病变程度有明显相关性($\chi^2=6.28, P<0.05$)。见表 5。

TCT 检测	HPV		合计
	单一	混合	
炎症	53	6	59
低度	43	8	51
高度	11	6	17
合计	107	20	127

3 讨 论

有关宫颈癌前筛查的方法目前主要以 HPV-DNA 分子诊断和 TCT 为主^[3]。HPV-DNA 分子诊断是在分子微观领域,呈现是否受到 HPV 感染,并提示患者病毒感染的危险程度,从而指导临床医生对宫颈癌或癌前病变的高危患者进行针对性诊断和早期干预。而 TCT 检查是采用液基薄层细胞检查宫颈细胞病变情况,并进行分类诊断,同时还能发现部分宫颈病变前的微生物感染及液基拭子宫颈细胞的变化。

本研究运用 HPV-DNA 分型检测与薄层液基细胞学筛查技术对 372 例标本同时进行检测。结果显示 HPV-DNA 分型检测中,22 种型别(18 种高危、4 种低危)均有检出,为 HPV 的预防和治疗提供了依据,这也对宫颈病变的监测提供了预警。HPV-DNA 分型检测不仅能确定是否有感染,而且可以对病毒进行分型诊断,研究结果显示在宫颈发生低度病变和高度病变中 HPV-DNA 分型检测以高危型 16 型及 18 型占的比例最高,这一结果与其他研究结果一致^[4-5]。且在高度病变和低度病变中高危型检出率较高;而 TCT 检测结果显示,随着宫颈病变的加重,HPV 阴性结果下降明显。所以进行 HPV-DNA 分型检测是很有必要的。虽然 TCT 检测结果显示在细胞水平出现炎性以上病变的患者中,也有部分 HPV-DNA 分型检测结果为阴性,此时患者可能感染了 22 种型别以外的其他型别,但也可能是其他原因导致,虽 HPV 感染与宫颈癌的发生具有很强的相关性,但并不是唯一的因素,早婚、早育、流产、性生活紊乱等因素也会发生宫颈病变^[6-7]。在 TCT 结果为 NILM 的患者中仍有 33.17% HPV 检测结果为阳性,是因为 HPV 从感染到病变存在一定的时间性^[8]。患者受 HPV 感染时间较短,在细胞学水平变化尚未表现,而临床可针对 HPV-DNA 分型情况,评估患者的风险,从而制订有效的治疗方案。这也进一步明确了 HPV-DNA 分型检测在宫颈病变筛查中具有重要的作用和意义,也为 HPV 的预防和治疗提供早期的诊断依据。

本研究发现,校正年龄后,对于是否感染 HPV 与炎症病变仍具有较强相关性,而是否感染高危型与炎症病变无关,当出现低、高度病变时 HPV 低危或高危感染均具有显著相关性。在宫颈病变程度与 HPV 感染情况分析中,患者在受到 HPV 多重感染时,会加快宫颈病变的进程^[9]。如果 HPV-DNA 分型检测与 TCT 检测均是阴性患者,阴性预测值可达到 99%~100%^[10]。子宫病变评估风险率极低。

目前,HPV 常用检测技术中 HC II 能检测 13 种高危型 III、IV 病毒,灵敏度较好,重复性高,但仅限于半定量,且不能确定其具体的 HPV-DNA 亚型。另外,HC II 还存在交叉杂交的问题,易引起假阳性结果。PCR 技术能检测 14 种高危 HPV 亚型,灵敏度没有 HC II 高,但优势在于能进行 HPV-DNA 的定量和分型^[11]。测序法能检出所有病毒亚型,特别是对检测稀有型别和发现新的型别有着重要的作用,但不能检测多型、HPV 混合感染,只能检测优势扩增基因片段,将混合型判断为单一型。基因芯片技术一次可进行大量标本检测,能同时对 22 种 HPV 基因型进行快速分型,且可判断多重感染,以此看来基因芯片技术要比 HC II、PCR 技术、测序法更具优势。

综上所述,HPV-DNA 分型检测技术虽然只作为宫颈癌筛查的辅助手段,但在宫颈病变筛查中有着重要的指向性与相关性,指导意义突出;同时也反映出 TCT 的局限性。而 HPV-DNA 分型检测在临床实际应用中检测快速、分型准确合理、覆盖度高且所检型别与宫颈病变均有相关性,符合临床需求,对临床指导意义重大,因此 HPV-DNA 分型检测具有较高的临床应用价值和推广前景。

参考文献

[1] 刘汉中,杨继洲,肖兰,等. TCT 检查联合人乳头瘤病毒基因分型检测在宫颈癌筛查中的应用[J]. 实用临床医药杂志,2013,17(9):44-49.

[2] 赵澄泉,杨敏,赵恩锋. 妇科细胞病理学诊断与临床处理[M]. 北京:北京科学技术出版社,2011:8.

[3] 梁东霞,张彦娜. 宫颈癌与 HPV 关系的研究进展[J]. 实用癌症杂志,2010,2(2):202.

[4] 宗晓亮,申艳霞,贾治霞. 液基细胞学联合 HPV 基因分型检测在宫颈癌前病变筛查中的应用分析[J]. 现代诊断与治疗,2013,24(12):2743-2744.

[5] 刘东玲,梁小勤,刘瑶,等. 高危型 HPV16/18 感染在宫颈病变中的临床分析[J]. 广东医学,2008,29(4):625-626.

[6] 陈岳青,王一凤,陈文学,等. 宫颈液基细胞学及 HPV 基因分型检测在筛查宫颈病变中的应用[J]. 江西医药,2014,49(12):1555-1557.

[7] 章文静,陶萍萍,王运根,等. 女性生育史与生殖道 HPV 感染关系探讨[J]. 中国农村卫生事业管理,2011,31(9):967-969.

[8] 方捷迪,孙伟,杨巧蓉,等. 薄层液基细胞学与 HPV 基因检测在宫颈病变筛查中的对比研究[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(6):1209-1212.

[9] 韦冰. 液基细胞学和高危型 HPV-DNA 检测对宫颈癌前病变筛查的作用[J]. 河北医学,2007,13(7):778-781.

[10] 陈赣洪. 基因芯片技术检测 HPV 分型联合液基细胞学在宫颈癌前筛查中的应用[J]. 中国药物经济学,2014(2):24-25.

[11] 龚蕴贞,肖尚喜,俞慕华,等. 聚合酶链式反应—微孔板杂交技术检测人乳头瘤病毒[J]. 安徽医科大学学报,2000,35(3):168-170.