

论著·临床研究

宫颈正常细胞和不典型鳞状细胞中人乳头瘤病毒感染型别分布的分析*

蔡 辉¹, 沈 静¹, 俞 刚¹, 朱贤海², 耿建祥^{3△}, 梅 静³, 龙秀荣³, 喻朝霞³, 赵 雪³

(1. 江苏盛泽医院检验科, 江苏盛泽 215228; 2. 河南商城县人民医院病理科, 河南商城 465350;

3. 南京中医药大学第三附属医院病理科/江苏省 HPV 协作组, 南京 210001)

摘要:目的 分析女性宫颈正常细胞和不典型鳞状细胞(ASC-US)中人乳头瘤病毒(HPV)感染基因型分布及其临床意义,同时对 ASC-US 患者行宫颈病理组织学诊断分析。方法 1 000 例宫颈细胞学检查结果为正常的女性纳入对照组;宫颈细胞学诊断为 ASC-US 的女性 236 例纳入 ASC-US 组,所有研究对象均提取 23 种 HPV-DNA,采用基因扩增结合基因芯片技术进行基因分型检测,所有 ASC-US 患者行宫颈活检病理组织学诊断,并对受检者进行相关资料分析。结果 对照组中检出 HPV 感染者 106 例,总的 HPV 感染率为 10.6%,其中 1 型感染率为 9.3%,多型感染率为 1.3%;ASC-US 组中检出 HPV 感染者 139 例,总的 HPV 感染率为 58.9%,其中 1 型感染率为 38.1%,多型感染率为 20.8%。对照组与 ASC-US 组 HPV 总感染率、1 型感染率和多型感染率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。对照组中构成比居前 6 位的型别依次是 HPV43、16、58、33、52、18、42 型,ASC-US 组中构成比居前 6 位的型别依次是 HPV16、18、52、58、33、51、66 型。结论 基因芯片检测技术可用于宫颈细胞 HPV 分型检测,对宫颈 ASC-US 的进一步分流管理具有重要临床的意义,应引起妇科医师的高度关注。

关键词:人乳头瘤病毒; 基因分型; 基因芯片技术; 不典型鳞状细胞; 宫颈

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.004

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2018)03-0267-04

文献标识码:A

Analysis of HPV infection types distribution in normal cells and ASC-US in uterine cervix*

CAI Hui¹, SHEN Jing¹, YU Gang¹, ZHU Xianhai², GENG Jianxiang^{3△},

MEI Jing³, LONG Xiurong³, YU Zhaoxia³, ZHAO Xue³

(1. Department of Clinical laboratory, Jiangsu Shengze Hospital, Shengze, Jiangsu 215228, China;

2. Department of Pathology, Shangcheng County People's Hospital,

Shangcheng, Henan 465350, China; 3. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University/ HPV Collaboration of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To explore the clinical distribution and significant of 23 kinds of human papillomavirus(HPV) genotypes in normal cells and atypical squamous cells (ASC-US), meanwhile analysis result of cervical histological pathology diagnosis in cases of ASC-US. **Methods** A total of 1 000 women with normal cells specimens were recruited into control group, and 236 women with ASC-US were selected into the ASC-US group. Polymerase chain reaction (PCR) and gene-chips technology were utilized for the detection of 23 kinds of HPV genotypes, all cases of ASC-US diagnosis of cervical pathological histology. **Results** A total of 106 cases of HPV infection were detected in the control group, as the total HPV infection rate was 10.6%, in which the single genotypes infection rate was 9.3% and the multiple genotypes infection rate was 1.3%. A total of 139 cases of HPV infection were detected in ASC-US group, as the total HPV infection rate was 58.9%, in which the single genotypes infection rate was 38.1%, and the multiple genotypes infection rate was 20.8%. There were significant differences on the total HPV infection rate, the infection rates of type 1 and multiple geontypes between the control group and ASC-US group ($P<0.05$). The top six of constituent ratio in the control group were type 43, 16, 58, 33, 52, 18, 42, those in the ASC-US group were type 16, 18, 52, 58, 33, 51.

* 基金项目:江苏省南京市卫计委中医专项资助项目(2009-92)。

作者简介:蔡辉,男,主管技师,主要从事宫颈病变 HPV 感染分型研究。△ 通信作者, E-mail: dyc720@163.com。

本文引用格式:蔡辉,沈静,俞刚,等. 宫颈正常细胞和不典型鳞状细胞中人乳头瘤病毒感染型别分布的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(3): 267-270.

66. Conclusion PCR combined with the gene-chip technology could be used in the HPV genotypes detection in cervical cells, which has important clinical significance on the further distribution management of ASC-US, and should be draw great attention.

Key words: human papillomavirus; genotype; gene-chip technology; atypical squamous cells; cervix

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,近年来其发病呈年轻化的趋势。由于近几十年来宫颈细胞学筛查的普遍应用,使宫颈癌及其癌前病变得早期发现和早期治疗,宫颈癌的发病率和病死率都有一定程度的下降^[1-4]。目前,我国病理细胞学诊断医师缺乏,且诊断水平参差不齐,加之中国人口基数庞大,采用宫颈细胞学检查来进行宫颈癌普筛较难实现。由于宫颈癌与高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染有关,结合中国国情,可考虑针对我国最常见的高危型 HPV 对育龄期妇女进行初筛,以便锁定少部分高危女性人群,同时高危型 HPV 也可对宫颈细胞学诊断为不典型鳞状细胞(ASC-US)患者进行临床分流,能有效地降低女性患者阴道镜受检率。本研究使用高、低危型 HPV 基因芯片检测技术,对 1 000 份宫颈正常细胞和 236 份宫颈 ASC-US 的细胞标本进行 23 种 HPV 基因分型检测,并进行 ASC-US 宫颈活检病理组织学诊断,并对其 HPV 基因型进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集南京中医药大学第三附属医院妇产科和体检中心 2010 年 10 月至 2013 年 10 月的 1 000 例宫颈细胞学检查结果为正常的女性纳入对照组,年龄 23~56 岁,平均(41.8±4.3)岁;其中 20~<30 岁 101 例,30~<40 岁 301 例,40~<50 岁 352 例,50~<60 岁 246 例。对照组均为宫颈细胞检查结果正常,同时进行了宫颈 HPV 分型检测的已婚女性,排除只做了一项检测或者检测结果异常的女性。收集宫颈细胞学诊断为 ASC-US 的女性 236 例纳入 ASC-US 组,年龄 22~90 岁,平均(42.9±5.7)岁;其中 20~<30 岁 21 例,30~<40 岁 71 例,40~<50 岁 82 例,50~<60 岁 54 例,60~<70 岁 4 例,70~<80 岁 2 例,80 岁和 90 岁及以上各 1 例。ASC-US 组均为宫颈细胞学检查诊断为 ASC-US,且同时做了宫颈 HPV 分型检测和宫颈活组织检查的已婚女性。细胞学和组织学病理诊断由两位经验丰富的病理主治以上医师阅片诊断,并复习其临床及病理资料。本研究获得了南京中医药大学第三附属医院伦理委员会的批准,并收到所有受检者的知情同意书。

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;YN-H16 型恒温杂交仪为亚能生物技术(深圳)有限公司生产;eppendorf 5810 R 型高速冷冻离心机为德国生产;BHC-1300 II A2 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;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 标本采集 采用扩阴器充分暴露宫颈,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,做好标本标签,保持采集管直立,放入-20℃冰箱保存待测。236 例 ASC-US 患者的宫颈石蜡组织标本,每例石蜡组织经常规病理切片(所有标本均经 10%甲醛固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色观察)。

1.3.2 DNA 的提取 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,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 两组研究对象的 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 SPSS 19.0 进行数据处理及统计学分析,计数资料以百分率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验或确切概率法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与 ASC-US 组各型 HPV 感染率及构成比比较 对照组 1 000 例检测者中 HPV 感染者 106 例,未感染者 894 例,HPV 总的感染率为 10.6%(106/1 000),1 型感染率为 9.3%(93/100),多型感染率为 1.3%(13/1000),多型感染中,2 型感染 11 例,3 型感染 2 例;ASC-US 组 236 例检测者中 HPV 感染者 139 例,未感染者 97 例,HPV 总的感染率为 58.9%(139/236),其中 1 型感染率为 38.1%(90/236),多型感染率为 20.8%(49/236),多型感染中,2 型感染 39 例,3 型感染 9 例,4 型感染 1 例。对照组与 ASC-US 组 HPV 总感染率、1 型感染率和多型感染率比较,差异均有统计学意义($\chi^2=280.3, 16.8, 16.8, P<0.05$)。

两组研究对象检出的各 HBV 型别所占构成比具

体见表 1, 对照组中构成比居前 6 位的型别依次是 HPV43、16、58、33、52、18、42 型, ASC-US 组中构成比居前 6 位的型别依次是 HPV16、18、52、58、33、51、66 型。见表 1。

ASC-US 组中 16、18、52 和 58 型构成比较, 差异均有统计学意义($\chi^2=9.2、16.5、17.8$); 18 型与 52 型、58 型构成比较, 52 型与 58 型比较, 差异均无统计学意义($\chi^2=1.20、1.60、0.03, P>0.05$)。ASC-US 组 HPV16、18、52、58 型构成比见表 2。

表 1 对照组与 ASC-US 组各型 HPV 构成比[n(%)]

HPV 型别	对照组	ASC-US 组
6	1(0.83)	7(3.52)
11	2(1.65)	6(3.02)
16	12(9.92)	51(25.63)
18	7(5.79)	27(13.57)
31	4(3.31)	3(1.51)
33	10(8.27)	11(5.53)
35	5(4.13)	5(2.51)
39	2(1.65)	4(2.01)
42	7(5.79)	3(1.51)
43	23(19.01)	6(3.02)
45	2(1.65)	1(0.50)
51	3(2.48)	8(4.02)
52	9(7.44)	20(10.05)
53	6(4.96)	3(1.51)
56	6(4.96)	1(0.50)
58	12(9.92)	19(9.55)
59	1(0.83)	4(2.01)
66	2(1.65)	8(4.02)
68	4(3.31)	7(3.52)
73	2(1.65)	0(0.00)
81	0(0.00)	3(1.51)
82	0(0.00)	1(0.50)
83	1(0.83)	1(0.50)
合计	121(100.00)	199(100.02)

注: 对多型感染者, 各型别的阳性率重复计算

表 2 ASC-US 组 HPV16、18、52、58 型构成比[n(%)]

HPV 型别	炎症	CIN I 级	CIN II 级	CIN III 级	癌性病变
16 型	7(10.0)	9(11.0)	6(14.6)	26(66.7)	3(75.0)
18 型	9(12.9)	6(7.3)	5(12.2)	6(15.4)	1(25.0)
52 型	4(5.7)	3(3.7)	7(17.1)	5(12.9)	1(25.0)
58 型	4(5.7)	4(4.9)	4(9.8)	7(18.0)	0(0.0)

2.2 ASC-US 组中宫颈组织活检结果 ASC-US 组患者中, 炎症患者 70 例(29.7%)、CIN I 级患者 82 例(34.7%)、CIN II 级患者 41 例(17.4%)、CIN III 级患

者 39 例(16.5%)、癌性病变患者 4 例(1.7%)。宫颈组织活检中检出 HPV 阳性患者 139 例, 其中炎症 27 例(38.6%)、CIN I 级 39 例(47.6%)、CIN II 级 33 例(80.5%)、CIN III 级 36 例(92.3%)、癌性病变 4 例(100.0%)。

3 讨 论

近 20 多年来, 有关癌症病因学的研究发现某些特定 HPV 基因型的持续感染可导致宫颈癌, 即高危型 HPV 感染是宫颈癌发生和发展的必要因素。攻克宫颈癌是人类共同努力的目标。深入了解宫颈癌的发生机制必须对 HPV 相关知识有一个全面的了解, 以便对我国广大的病理科医师、妇产科医师和所有从事与此领域相关工作的其他医务人员提供有益的帮助。由于不同型别的 HPV 致病性存在着一定的差异性, HPV 分型检测对宫颈病理细胞学诊断的 ASC-US 病变分流, 以及对临床医师有效的区分宫颈癌患病的高危人群具有重要价值^[1,5]。因此, 弄清宫颈正常细胞及 ASC-US 中 HPV 感染率及型别分布状况对宫颈癌的防治具有重要的意义。

本研究对照组中检出 21 种 HPV 型别, ASC-US 组中检出 22 种 HPV 型别。对照组中 1 型感染者 93 例, 多型感染者 13 例, 感染之比为 7.15 : 1.00; ASC-US 组中 1 型感染者 90 例, 多型感染者 49 例, 感染之比为 1.84 : 1.00。ASC-US 组与对照组 1 型与多型 HPV 感染之比比较, 前者多型感染者明显增加, 应引起妇科医师的密切关注。

对照组和 ASC-US 组 HPV 感染构成比居前 6 位的比较, HPV 型别排序不同, 对照组出现 2 种低危型 HPV, 而 ASC-US 组均为高危型 HPV。两组研究对象中 16、18、33、52、58 型 HPV 均出现, 只是排序不同, 可见这 5 种型别的 HPV 是两组最为常见的型别, ASC-US 组中以 16 和 18 型占比最高, 紧随其后的是 52、58 型, 符合我国长三角地区女性宫颈癌以 16、18、58、52、33 型为主要型别的特点, 提示除 16 和 18 型外, 52、58 和 33 型具有中国地域特色^[6-7]。

ASC-US 组中病理组织学诊断为炎症患者和 CIN I 级患者占 64.41%, 而 CIN II 级以上病变患者占 35.59%, 说明病理细胞学诊断的宫颈 ASC-US 患者包含了组织学从炎症到癌性病变所有的病变状态, CIN I 级以下病变约占 2/3, 占绝大多数, 而 CIN II 级以上病变约占 1/3, 只占较少的部分, 应该引起临床病理科和妇产科医师的注意和重视。ASC-US 组中病理组织学诊断的患者从炎症组到癌性病变组中 HPV 感染率随着宫颈疾病程度的增加, 炎症组和 CIN I 级组中只有一半以下患者感染了 HPV, 临床上对 HPV 检测阳性者给予追踪随访, 可减轻一半以上的工作量, 也减少阴道镜患者的受检率^[8-10]。

宫颈细胞学筛查在宫颈癌的预防工作中发挥了很好的作用, 以往的宫颈细胞学巴氏涂片和液基细胞

学筛检都存在着一定的漏检率(20%~40%),即使有经验的阴道镜临床医师,也存在着一定的假阴性率,如何最大限度地提高宫颈病变检出率,可采用 HPV 分型检测加宫颈细胞 DNA 倍体或 E6/E7mRNA 检测。对于 HPV 分型检测为 16、18、52 和 58 型的感染者,建议行阴道镜检查,即使阴道镜检查正常,也要定期复诊,以防漏掉宫颈癌和宫颈高级别病变的患者^[1,3]。

ASC-US 是宫颈细胞学诊断中的术语,涵盖了组织学从炎症到癌性病变,高危 HPV16 型在各级宫颈病变中从 CIN II 级病变开始增加,尤其 CIN III 级以上病变增加明显,16 型与 18、52、58 型构成比比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 18 型与 52、58 型比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。提示 HPV16 型是宫颈癌前病变一个重要的致病因子,对 ASC-US 诊断分流具有重要的作用,其次是 18、52 和 58 型。而高危 HPV18、52、58 型在各级宫颈病变中构成比差异不明显。因此,结合我国国情,应将 HPV16、18、52、58 型感染者作为转阴道镜检查的受检者^[1,11-13]。

综上所述,高危型 HPV 持续感染是宫颈癌发生最主要的原因。宫颈癌的发生是一个漫长的过程,若能在宫颈病变的早期进行筛查,就能有效地阻止宫颈癌变的发生和发展。宫颈癌筛查的目的是在女性无自觉症状时期,发现宫颈癌前病变,即在非癌时期及早进行临床诊治。宫颈细胞正常者 HPV 感染率明显低于 ASC-US 患者,尤其是高危型 HPV。因此,对病理细胞学诊断为宫颈 ASC-US 的患者,应首选 HPV 分型检测来分流管理,尤其是感染 HPV16 型患者,其次是 18、52、58 型患者,对这 4 种高危 HPV 感染者行阴道镜检查,必要时行宫颈活组织病理检查,这样可及时检出宫颈 CIN II 级以上病变,且可减少患者的就诊次数和失访率。将 HPV 分型检测应用于宫颈轻度细胞学异常的价值在于能减少近一半 ASC-US 患者宫颈活检有创检查,同时结合宫颈 DNA 倍体或 E6/E7mRNA 检测可最大限度地降低宫颈癌和癌前病变的漏诊率,提高检出率,这将造福于众多的宫颈病变患者^[14-16]。

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] 龙秀荣,王志蕙,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.
- [3] 许育绚,崔永胜,耿建祥,等.968 例宫颈细胞中人乳头瘤病毒 E6/7mRNA 基因分析[J].中国妇幼保健,2015,30(4):617-619.
- [4] 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.
- [5] HAI L, XUBO W, JIANXIANG G, et al. Clinical study of typing detection of human papillomavirus (HPV) infection with microarray from paraffinembedded specimens of cervical cancer and precursor lesions[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2015, 15(9):6423-6428.
- [6] 徐妍婷,蔡为民,耿建祥,等.健康妇女及宫颈癌瘤患者 HPV 感染基因型分布的研究[J].国际检验医学杂志,2014,5(22):3022-3024.
- [7] 蔡为民,王宏景,耿建祥,等.宫颈正常细胞和宫颈鳞状细胞癌、腺癌组织中 HPV 感染基因型的分布[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(8):854-857.
- [8] 顾昕,龙秀荣,耿建祥,等.宫颈鳞状细胞癌组织人乳头瘤病毒分型研究的意义[J].中国妇幼保健,2016,31(23):5140-5143.
- [9] 李庭芳,陈锐.宫颈癌临床流行病学概述[J].实用医院临床杂志,2005,2(2):19-22.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 朱晓珏,耿建祥.308 例宫颈瘤组织中 HPV 感染基因型分布的对比研究[J].国际检验医学杂志,2014,35(23):3180-3182.
- [13] 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.
- [14] MCCREDIE M R, SHARPLES K J, 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.
- [15] 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]. Journal of Infectious Diseases, 2010, 202(12):1789-1799.
- [16] 梅静,徐海燕,耿建祥,等.宫颈上皮内瘤变组织中人乳头瘤病毒感染基因型的分析[J].中国妇幼保健,2015,30(15):2333-2336.

(收稿日期:2017-07-23 修回日期:2017-09-29)