

论著·临床研究

宫颈上皮内瘤变组织中 HPV 型别分布情况分析*

陈海涛¹, 兰建云¹, 翁国武², 耿建祥^{2△}, 黄华艺², 刘建华², 李海², 许淑霞², 余彬², 赵雪²
(1. 江苏省盐城市第一人民医院病理科, 江苏盐城 224005; 2. 南京中医药大学第三附属医院病理科, 江苏南京 210001)

摘要:目的 分析宫颈上皮内瘤变(CIN)组织中人乳头瘤病毒(HPV)型别分布情况及其临床意义。方法 从 CIN 组织中抽提 HPV DNA,使用基因芯片结合聚合酶链式反应技术,对 534 例 CIN 组织标本行 23 种 HPV 检测,其中 CIN I 级病变 157 例、CIN II 级病变 138 例及 CIN III 级病变 239 例,并对 HPV 感染者行型别分布状况的分析。结果 534 例 CIN 患者中检出 HPV 感染者 386 例,总的 HPV 检出率为 72.29%(386/534),其中 CIN I 级病变中总的 HPV 检出率为 42.68%(67/157),CIN II 级病变中总的 HPV 检出率为 65.94%(91/138)、CIN III 级病变中总的 HPV 检出率为 95.40%(228/239)。CIN 的程度与 HPV 检出率呈正相关。在 CIN III 级/原位癌病变中,16 型出现率最高 44.51%(154/346),随后是 18、52、58、33 和 31 型。结论 对女性行宫颈 HPV 分型检测,有利于临床医师对宫颈癌前病变进行诊治和观察,也有利于跟踪和随访高致瘤致癌性的 HPV 感染者。

关键词:宫颈; 上皮内瘤变; 人乳头瘤病毒; 基因分型; 芯片技术
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.22.015 **中图法分类号:**R711.74
文章编号:1673-4130(2018)22-2778-04 **文献标识码:**A

Analysis of HPV infection types distribution in tissues of cervical intraepithelial neoplasia*

CHEN Haitao¹, LAN Jianyun¹, WENG Guowu², GENG Jianxiang^{2△},
HUANG Huayi², LIU Jianhua², LI Hai², XU Shuxia², SHE Bin², ZHAO Xue²

(1. Department of Pathology, Yancheng City No. 1 People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224005, China; 2. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: **Objective** To compare the distribution states of human papilloma virus (HPV) genotypes in tissues of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and its clinical significance. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) and gene-chip technology were utilized for the detection of 23 kinds of genotypes in tissue specimens from 534 cases of cervical intraepithelial neoplasia, including 157 cases of CIN I grade, 138 cases of CIN II grade and 239 cases of CIN III grade. HPV genotypes distribution states of all subjects were analyzed. **Results** In 534 cases of cervical intraepithelial neoplasia, the total detection rate of HPV was 72.29% (386/534), the detection rate of HPV was 42.68% (67/157) in CIN I grades, the detection rate of HPV was 65.94% (91/138) in CIN II grades and the detection rate of HPV was 95.40% (228/239) in CIN III grades. The cervical lesion degree was positively related to the detection rates of HPV. The detection rate of HPV 16 type is the highest and the present frequency of 16 type infection is 44.51% (154/346) in CIN III grades, following types are 18, 52, 58, 33 and 31. **Conclusion** HPV typing detection will benefit clinical gynecologist to diagnose, treat and follow-up cervical precancerous lesion patients. The detection also benefits clinical physician on determining high-carcinogenic HPV infected persons and conducting tracking follow-up to the patients.

Key words: cervix; cervical intraepithelial neoplasia; human papilloma virus; genotyping; gene-chip technology

* 基金项目:江苏省南京市卫生和计划生育委员会中医专项资助项目(2009-92)。
作者简介:陈海涛,男,主治医师,主要从事宫颈病变 HPV 感染分型研究和病理诊断。△ 通信作者, E-mail: dyc720@163.com。
本文引用格式:陈海涛, 兰建云, 翁国武, 等. 宫颈上皮内瘤变组织中 HPV 型别分布情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(22): 2778-2781.

宫颈癌的发生是一种从量变到质变的病理过程,即从正常宫颈组织到宫颈上皮内瘤变(CIN),再到早期浸润性癌,最后发展到浸润性癌连续过程,大约需要 5~10 年的时间。宫颈癌的主要病因是高危型人乳头瘤病毒(HPV)持续性感染。如果女性患者能够在宫颈上皮内瘤变期,尽早查出高危型 HPV 感染,并结合宫颈细胞学检查和或宫颈 DNA 倍体检测,就可以检出更多的 CIN 患者^[1-4]。CIN 的治愈率接近 100%,因此,宫颈病变的早期诊断及治疗是非常重要的。本文分析不同级别的 CIN 组织中 HPV 感染型别分布与宫颈病变组织学诊断结果之间的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2004 年 1 月至 2017 年 9 月江苏省盐城市第一人民医院、南京市中医院、南京市六合区人民医院、徐州市中医院、镇江市丹徒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 534 例 CIN(CIN,包括 CIN I 级 157 例、CIN II 级 138 例及 CIN III 级 239 例)和 33 例宫颈炎症性病变的石蜡组织标本。CIN I 级患者年龄 23~71 岁,平均 43.17 岁,CIN II 级患者年龄 23~73 岁,平均 40.48 岁,CIN III 级患者年龄 21~90 岁,平均 39.90 岁。3 种级别发病高峰均在 40~49 岁年龄段(分别为 46/135、55/117 和 101/220)。同时取 2006 年 2—10 月在江苏省南京市中医院病理科病理组织学诊断为宫颈炎症的组织标本 33 例作为对照,年龄 24~65 岁,平均 38.03 岁。本研究通过南京市中医院伦理委员会批准(南京市中医院伦理委员会 2012NJL008)。复片由 2 位病理科主治医师以上的医生根据世界卫生组织(2003 年)妇科肿瘤组织学的分类标准进行,同时复习患者相关的临床病理资料。

1.2 仪器与试剂 AB Applied Biosystems 2720 型基因扩增仪(购自新加坡 Perkin Elmer 公司);eppendorf 5810 R 型高速冷冻离心机(德国 eppendorf 公司);BHC-1300 II A2 型生物安全柜(苏州市安泰空气技术有限公司);-20℃冰箱(青岛海尔有限公司)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。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集 每例石蜡组织先除去其多余的周边石蜡,再将每个蜡块组织切成厚度为 4 μm 的薄片,一般切 4~6 片,用小镊子将每个薄片夹起,夹入离心管内,每切 1 片石蜡薄片后,对使用过的刀片和镊子,用带有次氯酸钠溶液的棉球来回擦 3~4 次。

1.3.2 核酸的提取 将管内存放石蜡样片的管子拿出,向管中加裂解液体 150 μL,完全混匀后,将管子置于 100℃的金属浴内,温浴后 13 000 r/min 离心 10 min,离完后取管内溶液中部的核酸液体作检测。依照说明书操作指导完成实验全过程。

1.3.3 结果判定 实验完成后,观察每个膜片上不同位点显现出蓝色信号所在的位置,确定 HPV 的感染基因型,显现出 2 个及 2 个以上信号的定为混合性感染,如只有 1 个信号的提示单一性感染。

1.4 统计学处理 采用南京倍宁医疗器械有限公司提供的 HPV 分型统计软件对宫颈炎性病变及各级别 CIN 组织的 HPV 感染率及每个 HPV 型别的比例行对比分析,并使用 SPSS12.0 软件进行相关数据的统计学处理,不同组间及不同型别 HPV 感染率比较采用 χ^2 检验。对多型 HPV 感染者,各个型别单独计数。 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织标本中 HPV 感染基因型分布状况 33 例宫颈炎症的组织标本中检出 HPV 阳性者 4 例,总检出率为 12.12%(4/33),均为一型感染,未检出多型感染。157 例宫颈 CIN I 级病变组织中检出 HPV 阳性者 67 例,总检出率为 42.68%(67/157),一型感染 43 例,多型感染 24 例(其中二型感染 18 例,三型感染 4 例,四型感染 2 例)。138 例宫颈 CIN II 级病变组织中检出 HPV 阳性者 91 例,总检出率为 65.94%(91/138),其一型感染 53 例,多型感染 38 例(其中二型感染 28 例,三型感染 1 例,四型感染 7 例,六型感染 2 例)。239 例宫颈 CIN III 级病变组织中检出 HPV 阳性者 228 例,总检出率为 95.40%(228/239),其一型感染 144 例,多型感染 84 例(其中二型感染 61 例,三型感染 17 例,四型感染 4 例,六型感染 1 例,七型感染 1 例)。157 例 CIN I 级、138 例 CIN II 级和 239 例 CIN III 级病变组织中 HPV 出现情况,见表 1。

表 1 534 例 CIN 患者 HPV 感染型别分布情况比较[n(%)]

HPV 型别	CIN I 级病变 阳性出现频率	CIN II 级病变 阳性出现频率	CIN III 级病变 阳性出现频率
HPV 6	7(7.07)	2(1.32)	6(1.73)
HPV 11	1(1.01)	6(3.95)	2(0.58)
HPV 16	11(11.11)	22(14.47)	154(44.51)
HPV 18	16(16.16)	23(15.13)	45(13.01)
HPV 31	4(4.04)	15(9.87)	15(4.34)
HPV 33	6(6.06)	19(12.50)	29(8.38)
HPV 35	3(3.03)	5(3.29)	2(0.58)
HPV 39	3(3.03)	2(1.32)	0(0.00)
HPV 42	2(2.02)	2(1.32)	1(0.29)
HPV 43	9(9.09)	2(1.32)	4(1.16)
HPV 45	1(1.01)	1(0.66)	3(0.87)
HPV 51	1(1.01)	8(5.26)	7(2.02)
HPV 52	8(8.08)	17(11.18)	31(8.96)
HPV 53	4(4.04)	2(1.32)	1(0.29)

续表 1 534 例 CIN 患者 HPV 感染型别分布
情况比较[n(%)]

HPV 型别	CIN I 级病变 阳性出现频率	CIN II 级病变 阳性出现频率	CIN III 级病变 阳性出现频率
HPV 56	2(2.02)	2(1.32)	3(0.87)
HPV 58	11(11.11)	11(7.24)	30(8.67)
HPV 59	2(2.02)	4(2.63)	3(0.87)
HPV 66	2(2.02)	2(1.32)	2(0.58)
HPV 68	4(4.04)	4(2.63)	3(0.87)
HPV 73	0(0.00)	0(0.00)	1(0.29)
HPV 81	2(2.02)	2(1.32)	1(0.29)
HPV 82	0(0.00)	1(0.66)	3(0.87)
HPV 83	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
合计	99(100.00)	152(100.03)	346(100.03)

注:对多重感染者,各型别的阳性率重复计算

2.2 不同级别组织标本中 HPV 总检出率比较 宫颈炎症性病组 HPV 总检出率与 CIN I 级、CIN II 级和 CIN III 级 HPV 总检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2=10.88, 25.21, 160.32, P<0.01$); CIN I 级与 CIN II 级和 CIN III 级 HPV 总检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2=16.57, 138.62, P<0.01$); CIN II 级与 CIN III 级 HPV 总检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2=58.31, P<0.01$)。

2.3 不同级别组织标本中前 6 位 HPV 型别出现频率排序 CIN I 级病变组织中依次为 18、16、58、43、52、6 型; CIN II 级病变组织中依次为 18、16、33、52、31、58 型; CIN III 级病变组织中依次为 16、18、52、58、33、31 型。可见随着病变程度的增加,导致 HPV 感染型别的排序发生了变化。在 CIN II 级以上病变组织中 HPV 前 6 位出现型别一样,只是排序不一样,均为高危型 HPV。

3 讨 论

CIN 的自然病程说明 CIN 是浸润性宫颈鳞状细胞癌的癌前病变。HPV 是导致宫颈鳞状细胞癌发生、发展的必要因素。如果女性宫颈没有感染高危型 HPV,那么她们患宫颈鳞状细胞癌概率几乎为零^[1,5-7]。在宫颈癌前病变阶段,采用高危型 HPV 分型检测加液基细胞检查可使得 CIN 患者得到早诊、早治,以达到降低浸润性宫颈鳞状细胞癌发病率和病死率的目的。目前,我国宫颈癌的发病率尚未形成下降的拐点,最主要的原因是我国宫颈癌高发年龄段女性宫颈癌筛查的覆盖面还远远不够,HPV 检测对宫颈癌筛查以其高敏感性和近 100% 的阴性预测值,在宫颈癌筛查中的价值已无可非议^[8-9]。因此,采用高危型 HPV 检测技术作为宫颈癌初筛,是我国现阶段提高高发年龄段女性宫颈癌筛查的覆盖面,降低宫颈癌发病率的一种行之有效的手段,值得大力推广。

本研究结果显示,从宫颈炎症性病变到宫颈低级别上皮内瘤变再到宫颈高级别上皮内瘤变,HPV 感染率逐渐上升,HPV 检出率从宫颈炎症性病变的 12.12% 到 CIN I 级的 42.68%,再到 CIN II 级的 65.94%,直至 CIN III 级的 95.40%。宫颈 3 种级别的 CIN 都是以一型 HPV 感染为主,多型 HPV 感染为辅。一型 HPV 与多型 HPV 感染之比, CIN I 级为 1.79 : 1、CIN II 级为 1.40 : 1 和 CIN III 级为 1.71 : 1,可见随着 CIN 程度的增加,其多型 HPV 感染人数并没有增加,提示多型 HPV 感染与 CIN 程度无明显相关性,多型 HPV 感染不会导致 CIN 发生率的增加。

据 IARC 统计,HPV16、18 型是世界范围内宫颈癌最常见的 HPV 感染型别,其感染率分别为 57.4% 和 16.6%,随后为 45、31、33、52、58 型^[10-11]。而我国宫颈癌中,HPV16、18、52、58、33、31 型感染率高于其他 HPV 型别,尤其是 HPV52、58 感染在我国南方地区比较常见^[12-13],但 45 型不常见。本研究结果提示, HPV 感染频率数前 6 位的型别依次是, CIN I 级为 18、16、58、43、52 和 6 型, CIN II 级为 18、16、33、52、31 和 58 型, CIN III 级为 16、18、52、58、33 和 31 型。提示随着 CIN 程度的增加, HPV 感染基因型别也随之发生一些变化, CIN I 级病变中出现 2 个低危型 HPV,即 43 型和 6 型,而 CIN II 级和 CIN III 级病变中没有出现低危型 HPV; HPV16 型从 CIN I 级和 CIN II 级都排序第 2 位,到 CIN III 级/原位癌排序第 1 位; HPV18 型从 CIN I 级和 CIN II 级都排序第 1 位,到 CIN III 级/原位癌均排序第 2 位;而 52 型和 58 两型始终排序在前 6 位,只是排序序位不同,到 CIN III 级/原位癌, 52 和 58 两型排序位居 3 和 4 位; 31 和 33 型,从 CIN II 级到 CIN III 级/原位癌均排序前 6 位; 33 型总是排在 31 型前。提示除 HPV16 和 18 型外, HPV52、58、33、31 型是我国南方女性宫颈高级别上皮内瘤变 HPV 感染较为常见的类型,尤其是 52 和 58 两型,应引起妇产科医生的高度关注,这些常见类型的 HPV 感染者也是转阴道镜检查以及密切随访的重点人员。

HPV16 型在 CIN I 级和 CIN II 级病变中排序第 2 位,在 CIN III 级/原位癌中排序升至第 1 位,其出现百分率从 11.11%,升至 14.47% 和 44.51%,提示,随着 CIN 程度的增加,其感染率逐步升高,尤其在 CIN III 级/原位癌中 HPV16 型感染出现百分率上升至 44.51%;而 HPV18 型在 CIN I 级和 CIN II 级中排序第 1 位,在宫颈 CIN III 级/原位癌排序第 2 位,其出现百分率从 16.16%,降至 15.13% 和 13.01%,提示随着 CIN 程度的增加,其感染率逐步下降,说明 HPV16 型感染是女性宫颈 CIN III 级/原位癌最主要的致瘤因子。因此,临床妇产科医师应把 HPV16 和 18 型感染的女性作为转阴道镜检查者,即使阴道镜检

查正常的 16 和 18 型感染者,也应是妇产科医师首选的随访和观察人群。国外已将 30 岁以上且感染 16 和 18 型 HPV 作为转阴道镜检查的标准^[10-11,14]。在我国南方,HPV31、33、52、58 型是次重要的致癌致瘤因子,结合我国国情,我国南方地区应该将 30 岁以上且感染了 HPV31、33、52、58 型的女性也纳入转阴道镜检查指标人群,尤其是液基细胞学或 DNA 倍体检查异常的女性,如阴道镜检查正常,也应该给予跟踪随访和观察。

我国宫颈鳞状细胞癌的好发年龄在 40~70 岁,其发病高峰在 50~54 岁,其后发病率逐步降低^[1,15-16]。本研究结果表明,CIN I 级发病高峰在 40~49 岁(46/135),CIN II 级发病峰在 40~49 岁(55/117),CIN III 级/原位癌发病高峰在 40~49 岁(101/220),无论 CIN I 级,还是 CIN II 级和 CIN III 级/原位癌,其发病高峰年龄都小于宫颈鳞状细胞癌高峰年龄,符合 CIN 发展为宫颈鳞状细胞癌进程,大约需要 5~10 年的时间。CIN HPV 感染高峰年龄段都在 40~49 岁。提示临床妇产科医生尤其要重视 40~49 岁年龄段且感染 HPV16、18、52、58、33、31 型的 CIN 患者的诊断和治疗。

在 CIN 的自然病程中,其上皮内瘤变自然返转率 CIN I 级为 57%、CIN II 级为 43%、CIN III 级/原位癌为 32%,而发展到浸润性宫颈鳞状细胞癌 CIN I 级为 1%、CIN II 级为 5%、CIN III 级/原位癌大于 12%^[1,14],也就是说宫颈 CIN 级别越低,其上皮内瘤变自然返转率就越高,发展到浸润性宫颈鳞状细胞癌概率就越低。尽管目前临床上对 CIN II 级和 CIN III 级/原位癌病变均采用微创手术方式治疗,但是随着精准医疗在全球各国的开展,肿瘤的精准预防和治疗得到了高度的重视。因 CIN 的程度不同,其自然返转率和癌变转化比不同,同时不同 CIN HPV 感染型别也存在着差异性,这就要求临床病理科医生对 CIN 组织行精准分级诊断,同时参考患者的发病年龄(易发病年龄段人群)及 HPV 感染型别(高致瘤致癌型别)等资料,给妇产科医生对不同级别 CIN 患者其宫颈病变转归和进展的风险评估作出正确的预判,有利于临床医生对高致瘤、致癌型 HPV 感染者进行跟踪和随访,也有利于 CIN 药物干预治疗疗效的评估,这将造福于更多的宫颈疾病患者^[14-17]。

4 结 论

对女性行宫颈 HPV 分型检测,有利于临床医生对宫颈癌前病变进行诊治和观察,也有利于跟踪和随访高致瘤致癌性的 HPV 感染者。

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] 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.
 [3] 范雪梅,徐薇,耿建祥,等.879 例女性宫颈液基细胞学检查与 DNA 定量分析法的对比研究[J].国际检验医学杂志,2014,35(23):3165-3168.
 [4] 王春兰,仲玉英,耿建祥,等.967 例女性宫颈细胞 DNA 定量检测的临床研究[J].中国妇幼保健,2015,30(29):4959-4962.
 [5] 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.
 [6] 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.
 [7] 严粉琴,耿建祥,肖蔚,等.已婚女性宫颈上皮细胞中人乳头瘤病毒基因分型 2000 例分析[J].实用妇产科杂志,2012,28(5):390-393.
 [8] 耿建祥,黄华艺,刘建华,等.HPV 感染疾病相关问题专家共识(2017)[J].医学研究生学报,2017,30(12):1238-1241.
 [9] 刘建华,王萍.高危型 HPV 感染导致宫颈癌发生的风险评估[J].医学研究生学报,2017,30(12):1233-1237.
 [10] 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.
 [11] 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]. JNanosci Nanotechnol, 2015, 15(9):6423-6428.
 [12] 周莹,谭春艳,梁亮,等.广西地区 HPV 感染及其基因型分析[J].医学研究生学报,2017,30(12):1250-1255.
 [13] 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,2014,35(22):3022-3024.
 [14] 夏林,王宏景,耿建祥,等.华东地区宫颈鳞状细胞癌组织 HPV 感染基因型数据库建立的意义[J].诊断病理学杂志,2017,24(1):7-10.
 [15] 姜锦贵,夏林,耿建祥,等.HPV 感染基因型与宫颈鳞癌致癌性关系的多中心回顾性研究[J].中国妇幼保健,2017,32(6):1141-1144.
 [16] 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.
 [17] 朱小珏,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.