

人乳头瘤病毒 16 型在宫颈上皮内瘤变和宫颈浸润癌中的感染状态*

朱 燕**, 杨英捷***, 宋鸿碧

(贵阳医学院附院 妇产科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV) 16 型在宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈浸润癌患者中的感染状态。方法: 分别采用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)方法及核酸分子快速导流杂交基因芯片技术(DNA flow-through hybridization gene chip technique, HybriMax)检测 30 例 CIN 和 33 例宫颈浸润癌患者的 HPV16 型感染状态。结果: IHC 技术中 63 例患者 HPV16 总感染率为 34.92% (22/63), CIN 33.33% (10/30), 宫颈浸润癌 36.36% (12/33); HybriMax 技术中 63 例患者 HPV16 总感染率为 28.57% (18/63), CIN 23.33% (7/30), 宫颈浸润癌 33.33% (11/33)。结论: 本组资料的 CIN 和宫颈浸润癌 HPV16 感染率低于其他地区的相关报道, 提示 CIN 和宫颈浸润癌的发生可能存在其他原因。

[关键词] 乳头状瘤病毒, 人; 宫颈上皮内瘤样病变; 宫颈肿瘤; 免疫组织化学

[中图分类号] R711.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)06-0554-04

Infection Status of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Cancer

ZHU Yan, YANG Yingjie, SONG Hongbi

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the infection status of human papillomavirus type 16 (HPV16) in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and invasive cervical cancer (ICC). **Methods:** Immunohistochemistry (IHC) and DNA flow-through hybridization gene chip technique (HybriMax) were used to detect HPV16 in 30 CIN cases and 33 ICC cases. **Results:** HPV16 infection rates in total 63 cases, CIN cases and ICC cases were 34.92% (22/63), 33.33% (10/30) and 36.36% (12/33) respectively tested with IHC. While these infection rates tested with HybriMax were 28.57% (18/63), 23.33% (7/30) and 33.33% (11/33) respectively. **Conclusions:** The HPV16 infection rates in CIN and ICC cases observed in this investigation are lower than those reported from other regions, suggesting that CIN and ICC in these patients may be caused by other factors.

[Key words] papillomavirus, human; cervical intraepithelial neoplasia; cervix neoplasms; immunohistochemistry

流行病学和生物学资料已经证明,人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)感染是宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)及宫

颈癌的主要病因^[1, 2]。研究发现 HPV16 为宫颈癌患者中最常见亚型^[3, 4], 超过 2/3 的宫颈癌与 HPV16 感染有关^[5]。国外报道的 HPV16 感染率

*[基金项目] 贵州省科技厅基金资助项目[黔科合 J 字(2007)2105 号]。

** 贵阳医学院 2006 级硕士研究生, 现工作单位贵阳市妇幼保健院儿童医院。

*** 通讯作者 E-mail: Yangyj166@yahoo.com.cn

约在 50% 左右^[3, 4], 国内大部分地区的报道多高于 70%^[6]。本文分别采用免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 方法及核酸分子快速导流杂交基因芯片技术 (DNA flow-through hybridization gene chip technique, HybriMax) 对贵州地区 63 例 CIN 和宫颈浸润癌组织进行检测, 以期了解 HPV16 的感染状态。

1 资料和方法

1.1 研究对象

2007 年 9 月~2008 年 3 月经病理明确诊断为 CIN 患者 30 例及宫颈浸润癌患者 33 例。CIN 患者年龄 19~61 岁, 平均 (36.73 ± 10.55 岁), 其中 CIN I 6 例、CIN II 6 例、CIN III 18 例; 宫颈浸润癌患者年龄 28~62 岁, 平均 (42.27 ± 8.32) 岁, 宫颈浸润癌患者病理类型均为鳞状细胞癌, I a 期 2 例, I b 期 1 例, II a 期 14 例, II b 期 12 例, III 期 4 例 (FIGO 2000)。

1.2 标本采集和处理

1.2.1 IHC 技术 收集活检或手术病理诊断的组织学标本, 由病理科医师复习核对诊断, 选取合适石蜡包埋的蜡块进行切片备用。鼠 HPV16 单克隆抗体 (工作浓度 1:1 000) 购自美国 SANTA CRUZ 生物技术公司, 免疫组织化学检测试剂盒购自上海基因技术有限公司。所有组织标本经石蜡包埋切片, 连续切片 3~5 张, 厚度为 4 μm。切片要求完整、均匀。采用免疫组织化学染色方法 (二步法), 染色程序按试剂盒说明书进行。

1.2.2 HybriMax 技术 HPV 分型标本取样步骤和要求按宫颈细胞学取材常规进行, 标本放置保存液中, 送北京大学第一医院妇产科宫颈病变诊治中心 HPV 检测室。采用导流杂交技术^[7] 提取细胞 DNA, tPV PCIt 扩增, 核酸分子快速导流杂交。

1.3 结果判定

IHC 技术在显微镜下观察结果, 每次实验用已知 HPV16 感染患者的标本作为阳性对照, PBS 液代替一抗做阴性对照。CIN 病例观察并计数病毒感染挖空细胞, 宫颈浸润癌病例观察并计数肿瘤细胞, 以细胞核内出现清晰棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片随机选取 10 个高倍镜 (×40) 视野, 阳性结果根据阳性细胞所占的百分比进行判断: 阳性细胞数 < 5% 为阴性, ≥ 5% 为阳性。HybriMax 技术则根据杂交膜上着色位点进行分型。

1.4 统计方法

所有数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析。IHC 技术与 HybriMax 技术检测 HPV16 阳性率的差异用配对 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。两种方法检测结果符合情况使用一致性检验, 计算一致性指数 (Kappa 指数), Kappa 指数在 0.4~0.75 之间为一致性良好。

2 结果

2.1 HPV16 的感染状态

采用 IHC 技术, 63 例患者 HPV16 总感染率为 34.92% (22/63); CIN 33.33% (10/30), 其中 CIN I 16.67% (1/6), CIN II 33.33% (2/6), CIN III 38.89% (7/18); 宫颈浸润癌 36.36% (12/33), II a 期 35.71% (5/14), II b 期 58.33% (7/12)。而采用 HybriMax 技术, 63 例患者 HPV16 总感染率为 28.57% (18/63); CIN 23.33% (7/30), 其中 CIN II 16.67% (1/6), CIN III 33.33% (6/18); 宫颈浸润癌 33.33% (11/33), 其中 II a 期 42.86% (6/14), II b 期 33.33% (4/12), III 期 25.00% (1/4)。

2.2 两种检测技术的一致性

IHC 与 HybriMax 两种技术检测 CIN 中 HPV16 感染情况见表 1。两种技术检测 CIN 中 HPV16 感染率的比较, χ^2 值为 30.000, P 值为 0.453, 无显著性差异。两种技术的符合率是 76.67% (23/30), Kappa 指数为 0.432, 两种检测技术的一致性良好。IHC 与 HybriMax 两种技术检测宫颈浸润癌中 HPV16 感染情况见表 2。两种技术检测宫颈浸润癌中 HPV16 感染率的比较, χ^2 值为 33.000, P 值为 1.000, 无显著性差异。两种技术的符合率是 78.79% (26/33), Kappa 指数为 0.533, 两种检测技术的一致性良好。

表 1 IHC 与 HybriMax 两种技术检测 CIN HPV16 比较

Tab. 1 Comparison of HPV16 infection rates in CIN detected by IHC and HybriMax

HybriMax 技术	IHC 技术		合计
	阴性	阳性	
阴性	18	5	23
阳性	2	5	7
合计	20	10	30

表2 IHC 与 HybriMax 两种技术
检测宫颈浸润癌 HPV16 比较

Tab.2 Comparison of HPV16 infection rates in
ICC detected by IHC and HybriMax

HybriMax 技术	IHC 技术		合计
	阴性	阳性	
阴性	18	4	22
阳性	3	8	11
合计	21	12	33

2.3 两种检测技术的差异性

两种技术检测结果不一致的在 CIN 中的差异有 7 例, IHC 技术未检出而 HybriMax 技术检出的有 3 例, 均为 CIN III 患者; IHC 技术检出而 HybriMax 技术未检出的有 4 例, CIN I 1 例, CIN II 1 例, CIN III 2 例。两种技术检测结果不一致的在宫颈浸润癌中的差异有 7 例, IHC 技术未检出而 HybriMax 技术检出的有 3 例, II a 期 2 例, III 期 1 例; IHC 技术检出而 HybriMax 技术未检出的有 4 例, II a 期 1 例, II b 期 3 例。

3 讨论

HPV 是一种无包膜的小 DNA 病毒, 具有很强的嗜鳞状上皮的特性, 现已证实 HPV 感染是 CIN 及宫颈癌的主要病因。目前用于检测 HPV 的方法主要分为传统检测方法和分子生物学技术, 前者包括细胞学检查、IHC 技术、ELISA 方法等, 后者包括 PCR 类检测方法、HybriMax 技术、杂交法类检测方法等。IHC 技术作为检测 HPV 的辅助检查手段, 其特异性及可信度已经得到肯定^[8]。HybriMax 技术检测 HPV 分型准确性高, 敏感性和特异性好^[9], 精确性和重复性几乎高达 100%^[10]。在本研究中, 分别采用 IHC 技术和 HybriMax 技术检测 CIN 和宫颈浸润癌中 HPV16 的感染率, 结果无显著性差异, 符合率分别为 76.67% (23/30) 和 78.79% (26/33), 说明两种检测方法有良好的一致性。由此看来, 两次检测结果相符, 可排除是实验误差导致的结果。两种技术检测结果不相符的患者多数为 CIN III 和宫颈浸润癌中晚期患者, 原因可能是 HPV 未形成完整的病毒衣壳或病毒处于休眠状态时, IHC 技术检测不会出现阳性表达, 而蜡块存放时间越长, 检出率也会相应降低; 采用 HybriMax 技术, 标本易受坏死组织、血液污染, 出现假阴性的结果; 样本量的不足也与结果不一致有很大的关系。

国内外多项研究显示, 随着宫颈病变级别的进展, HPV 感染依次递增^[11-13], 而且 HR-HPV 感染与宫颈癌密切相关, 其中 HPV16 的致癌性最明显, 也是最常见的感染亚型^[4, 14, 15], 大多数的宫颈癌都能检出 HPV16, 但是 HPV16 在不同种族和地域的宫颈癌患者中的感染状态存在差异性。HPV16 感染主要分布在我国北方^[16], 在维吾尔族宫颈癌中的感染率明显高于汉族^[17], 而且 HPV16 感染还与年龄、性行为、吸烟、尿路感染等因素有关^[18-21], 并非所有的 CIN 和宫颈癌患者都能检出 HPV16 或其他已知 HPV 亚型的感染, 国内外报道关于 HPV16 的感染率都高于 50%, 本次研究的感染率在 30% 左右, 明显低于文献报道^[6], 虽然本组研究的病例较少, 但仍反映了本地区的 HPV16 感染率偏低, 还需要大样本的研究。

4 参考文献

- [1] 郎景和. 迎接子宫颈癌预防的全球挑战与机遇[J]. 中华妇产科杂志, 2002(3):129-131.
- [2] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999(1):12-19.
- [3] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2003(1):63-73.
- [4] Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective [J]. Int J Cancer, 2004(2):278-285.
- [5] Franceschi S. The LARC commitment to cancer - prevention: The example of papillomavirus and cervical cancer [J]. Recent Results Cancer Res, 2005(166):277-297.
- [6] 苏锡康, 崔金环, 杨光, 等. 宫颈癌组织中人乳头瘤病毒基因分型的研究[J]. 医学临床研究, 2008(6):988-990.
- [7] 杨英捷, 赵健, 李雪倩, 等. 2285 例女性下生殖道人乳头状瘤病毒感染筛查结果分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006(6):444-445.
- [8] 范余娟, 彭芝兰, 牛小宇, 等. 宫颈癌及其癌前病变组织中 HPV16E6 蛋白的表达及意义[J]. 广西医科大学学报, 2005(5):686-687.
- [9] 赵健, 杨英捷, 廖秦平. 导流杂交基因芯片技术在人乳头状瘤病毒感染分型检测中的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006(12):1148-1151.

- [10] Lee H K, Lee, M, Roh H W, et al. DNA chip evaluation as a diagnostic device [J]. *Current Applied Physics*, 2005(5):433-437.
- [11] Wright TC Jr, Denny L, Kuhn L, et al. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer [J]. *JAMA*, 2000(1):81-86.
- [12] 钱德英, 岑坚敏, 王丁, 等. 高危型人乳头状瘤病毒 DNA 检测与细胞学联合检查对子宫颈癌前病变筛查的研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2006(1):34-37.
- [13] Huang S, Afonina I, Beth AM, et al. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancer from Chinese women [J]. *Int J Cancer*, 1997(70):408-411.
- [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(3):327-331.
- [15] Del Mistro A, Salamanca HF, Trevisan R, et al. Human papillomavirus typing of invasive cervical cancers in Italy [J]. *Infect Agent Cancer*, 2006(1):9.
- [16] 李洁, 刘宝印. Zur Hausen S, et al. 中国妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒感染及其地理分布的调查 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1996(10):50-55.
- [17] 古扎丽努尔·阿不力孜, 彭芝兰, 刘珊玲, 等. HPV 及其亚型在四川西北地区汉族及新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中的差异表达 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004(5):408.
- [18] McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, et al. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005(5):1165-1170.
- [19] 陈凤, 曾转萍, 刘彬. 山西省阳城县妇女乳头瘤病毒感染危险因素分析 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2004(4):249-351.
- [20] Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002(6):464-474.
- [21] Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology [J]. *Int J Cancer*, 2001(3):412-420.

(2011-07-22 收稿, 2011-10-26 修回)

(上接第 553 页)

达, 增强肿瘤细胞对缺血的抵抗能力, 减少细胞死亡, 增强细胞的生存能力, 从而促进肿瘤的恶性演进。乳腺癌细胞周期蛋白 E 表达上调及其与雌激素保护作用的关系和信号机制还有待进一步研究阐明。

4 参考文献

- [1] Bagheri-Yarmand R, Nanos-Webb A, Biernacka A, et al. Cyclin E deregulation impairs mitotic progression through premature activation of Cdc25C [J]. *Cancer Res*, 2010(12):5085-5095.
- [2] Gray-Bablin J, Zalvide J, Fox MP, et al. Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996(26):15215-15220.
- [3] Wang XD, Rosales JL, Magliocco A, et al. Cyclin E in breast tumors is cleaved into its low molecular weight forms by calpain [J]. *Oncogene*, 2003(5):769-774.
- [4] Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2002(20):1566-1575.
- [5] Potemski P, Kusińska R, Pasz-Walczak G, et al. Prognostic relevance of cyclin E expression in operable breast cancer [J]. *Med Sci Monit*, 2009(2):MT34-40.
- [6] Liang Y, Gao H, Lin SY, et al. siRNA-based targeting of cyclin E overexpression inhibits breast cancer cell growth and suppresses tumor development in breast cancer mouse model [J]. *PLoS One*, 2010(9):e12860.
- [7] Cortez V, Mann M, Brann DW, et al. Extranuclear signaling by estrogen: role in breast cancer progression and metastasis [J]. *Minerva Ginecol*, 2010(6):573-783.
- [8] Libertini SJ, Robinson BS, Dhillon NK, et al. Cyclin E both regulates and is regulated by calpain 2, a protease associated with metastatic breast cancer phenotype [J]. *Cancer Res*, 2005(23):10700-10708.
- [9] 王旭东. 乳腺细胞周期蛋白 E 保持高分子量与钙激活中性蛋白酶稳态有关 [J]. *贵阳医学院学报*, 2004(2):126-128.

(2011-10-24 收稿, 2011-11-01 修回)