论著

文章编号:1000-5404(2010)12-1340-03

重庆市宫颈癌及宫颈上皮内瘤变患者中人乳头瘤病毒感染率及型别分布

王 冬[1],周 琦[1],唐 郢[1],肖 觉[2] (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所:妇瘤科[1],病理科[2])

[摘要] **目的** 研究浸润性子宫颈癌(infiltrative cervical cancer,ICC)及子宫颈上皮内瘤变(intraepithelial neoplasia,CIN)中人乳头瘤病毒(human papilomavirus,HPV)感染率及型别分布。**方法** 选取重庆市肿瘤医院组织病理学诊断为CINⅡ、CINⅢ级和宫颈鳞癌的组织标本58例作为研究对象,SPF10 LiPA25及HPV DNA酶免疫检测法(DNA enzyme immunoassay,DEIA)进行DNA的提取及扩增;采用线形探针反向杂交技术检测病变组织中HPV型别。**结果** 58例标本中有56例检测出HPV感染,HPV感染率96.55%,其中CINⅡ、CIN Ⅲ级和子宫颈癌中HPV感染的阳性率分别为100.00%、100.00%、95.00%。共检测出13种HPV型别,HPV16感染率最高(60.00%),其次为HPV18(7.69%)、HPV58(7.69%)和HPV31(4.62%)。宫颈鳞癌、CINⅢ、CINⅡ级HPV多重感染率分别为6.06%、26.31%、33.33%。41~50岁高危型HPV感染率最高(44.64%)。**结论** HPV16为重庆市最常见的HPV感染型别,HPV18、HPV58和HPV31也有较高感染率。

[关键词] 乳头状瘤病毒科;宫颈肿瘤;宫颈上皮内瘤样病变;人类
[中图法分类号] R372; R373.9; R737.33 [文献标志码] A

Human papilloma virus types distribution in patients with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia in Chongqing

Wang Dong[1], Zhou Qi[1], Tang Ying[1], Xiao Jue[2] ([1]Department of Gynecology Oncology, [2]Department of Pathology, Chongqing Cancer Institute, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the infection and distribution of human papilloma virus (HPV) types in patients with infiltrative cervical cancer (ICC) and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in Chongqing. **Methods** Fifty-eight cases diagnosed with ICC or CINⅡ to Ⅲ, which were confirmed by histopathology in the Tumor Hospital of Chongqing, were included in the analysis. DNA enzyme immunoassay (DEIA) and SPF10 LiPA25 (version 1) testing was used for DNA extraction and extension, and linear probe reverse hybridization to detect lesions HPV type. **Results** HPV infection were detected in 56 of 58 specimen, the positive rates of CINⅡ, CINⅢ and cervical cancer were 100.00%, 100.00% and 95.00% respectively. A total of 13 types were detected. HPV16 infection rate was up to 60.00%, followed by HPV18(7.69%), HPV58(7.69%), and HPV31(4.62%). **Conclusion** HPV16 is still the most common type in Chongqing. HPV18, HPV58 and HPV31 also has a high prevalence.

[**Key words**] papilloma virus; cervical intraepithelial neoplasia; human

Supported by the Uterine Cervical Cancer Foundation of Cancer Foundation of China (2007). Corresponding author: Zhou Qi, Tel: 86-23-65305443, E-mail: qizhou9128@163.com

近年来的研究表明高危型HPV感染被认为是子宫颈癌及子宫颈上皮内瘤变的主要原因[1]。HPV感染型别在不同地区、民族间有一定差异,这些地域分布的差异对于预测该地区不同型别HPV感染所致子宫颈癌的风险,开发有针对性的疫苗有很大意义。本研究检测浸润性子宫颈癌(infiltrative cervical cancer,ICC)及子宫颈上皮内瘤变(intraepithelial neoplasia,CIN)Ⅱ、Ⅲ级(CINⅡ、CINⅢ)组织中HPV型别,期望找到与重庆地区妇女子宫颈癌发病最密切的HPV型别,为开发有效的HPV疫苗预防子宫颈癌提供有效信息。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择重庆市肿瘤医院病理科2006-2007年间手术以及活检存档蜡块标本58例,其中ICC 33例,CINⅡ6例,CINⅢ19例。宫颈癌临床分期参照国际妇产科联盟1995年修订的标准:Ⅰ期8例、Ⅱ期13例、Ⅲ期12例。用于检测的蜡块标本均采用独立包装防止交叉污染。患者年龄30~62岁,平均43.53岁。ICC、CINⅡ、CINⅢ的最终诊断由重庆肿瘤医院、中国医学科学院肿瘤医院病理学家共同做出。患者均未接受过放化疗。在中国医学科学院肿瘤医院实验病理诊断室完成实验诊断,每一

[基金项目] 中国癌症基金会子宫颈癌专项基金(2007)
[通信作者] 周 琦,电话:(023)65305443,E-mail: qizhou9128@163.com

个蜡块制作均由活检标本经中性 10% 福尔马林固定,脱水,包埋。显微镜下病变组织必须是长度≤2 cm,宽度≥2 mm。

1.2 方法

1.2.1 样本制作　按照"三明治"方法切片,具体操作:①第 1 张切片(4 μm/片)置于玻片上;②截断 2 ~ 4 蜡卷(8 μm/片),放入第 1 个旋盖小瓶中,用于 HPV 检测分型;③截断 5 ~ 7 蜡卷(8 μm/片),放入第 2 个旋盖小瓶中,用于 HPV 检测分型;④截断最后 1 张切片(4 μm/片)。同时,每隔 10 个样本切 1 个空白蜡块,每 20 个样本切 1 个阳性蜡卷;空白/阳性对照蜡块由荷兰 Delft 诊断实验室提供,用于实验中的对照。将第①和第④步中的组织切片经 HE 染色后进行病理学诊断,如果诊断结果一致,则将第②和③步中的蜡卷用于 HPV 检测分型。

1.2.2 SPF10 LiPA25 及 HPV 酶免疫检测(DEIA)法提取及扩增 DNA PCR 引物　HPV 病毒的 L1 开放读码区域用 PCR 的方法扩增,采用 SPF10 通用引物扩增。向装有组织切片的离心管中加入 1 mg/ml 蛋白酶 K(瑞士 ROCHE 公司)溶液 250 μl (70 ± 0.5)℃孵育 20 ~ 29 h,95 ℃加热块中孵育 10 min 使蛋白酶 K 灭活。取稀释后样本 10 μl (DEPC-水 90 μl + 10 μl 样本)至加有 40 μl HPV Master mix /管中(美国 Roche 公司)。试剂空白对照为蛋白酶 K,PCR 阴性对照为 10 μl DEPC 水,PCR 阳性对照为 10 μl (荷兰 Delft 诊断实验室)。短时离心 PCR 管,将 PCR 管放入 PCR 基因扩增仪(美国 ABI 公司),选用 50 μl 扩增体系,内含 10 μl 样本;40 μlPCR 混合剂,内含 10 mmol/L Tris-HCl (pH = 9.0)、50 mmol/L KCl、2.0 mmol/L $MgCl_2$、0.1% Triton X-100、0.01% 凝胶、200 μmol/L 脱氧核苷三磷酸、15 pmol 5 端标记的前向和反向引物、1.5 U 的 Ampli *Taq* Gold (美国应用生物系统公司)。扩增条件是:100 ℃水浴变性 10 min;94 ℃ 30 s,51 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,共 40 个循环;最后 72 ℃ 延长 5 min。

1.2.3 HPV DNA 检测及 HPV 基因分型　具体方法按照 HPV 分型检测试剂盒(荷兰 LaboBio-medical 公司)说明书严格操作。

2 结果

2.1 感染率

58 例中有 2 例未检出 HPV,HPV 感染率为 96.55%。其中,CIN Ⅱ、CIN Ⅲ 和 ICC 中 HPV 感染的阳性率分别为 100.00%、100.00%、95.00%。

2.2 HPV 型别感染情况

有 13 种 HPV 型别被检出,低危型 HPV 仅有 HPV6 和 HPV11 型,其余均为高危型 HPV。HPV 单一感染共 47 例,占 83.93%;多重感染共有 9 例,占 16.07%。13 种 HPV 感染次数共 65 次,高危型感染 62 次。常见的 HPV 型别为 HPV16 (60.00%)、HPV18 (7.69%)、HPV58 (7.69%) 和 HPV31 (4.62%),其中最常见的型别是 HPV16,它在单一感染中共 35 例,占 62.5%,在多重感染中共 4 例,占 7.14%。宫颈鳞癌中 HPV 多重感染率为 6.06% (2/33),CIN Ⅱ HPV 多重感染率为 33.33% (2/6),CIN Ⅲ HPV 多重感染率为 26.31% (5/19)。具体见表 1、2。

2.3 阳性样本年龄分布

依据年龄分为 30 ~ 40 岁、41 ~ 50 岁、51 ~ 60 岁和 > 60 岁 4 组。各年龄段低危型和高危型样本数、所占比例以及双重感染例数和比例见表 3。

表 1　HPV 型别在 ICC、CIN Ⅱ 和 CIN Ⅲ 中的分布(n = 56)

HPV 型别	单一感染(次)	多重感染(次)	合计(次)	感染率(%)
HPV 16	35	4	39	60.00
HPV18	3	2	5	7.69
HPV31	1	2	3	4.62
HPV33	1	1	2	3.08
HPV39	0	1	1	1.54
HPV51	1	1	2	3.08
HPV52	1	0	1	1.54
HPV58	3	2	5	7.69
HPV59	2	0	2	3.08
HPV66	0	1	1	1.54
HPV68	0	1	1	1.54
HPV6	0	2	2	3.08
HPV11	0	1	1	1.54

表 2　HPV 不同型别在多重感染中的分布(n = 56)

HPV 型别	占 HPV 阳性患者比例(%)
HPV16, HPV18	1(1.79)
HPV16, HPV31	2(3.57)
HPV16, HPV39	1(1.79)
HPV16, HPV58	1(1.79)
HPV31, HPV33	1(1.79)
HPV6, HPV68	1(1.79)
HPV18, HPV66, HPV6	1(1.79)
HPV51, HPV58, HPV11	1(1.79)

表 3　各年龄段 HPV 感染例数及比例[例(%)]

组别	低危型	高危型	单一感染	二重感染	三重感染
30 ~ 40 岁	3(5.36)	18(32.10)	15(26.79)	4(7.14)	2(3.57)
41 ~ 50 岁	0	25(44.64)	23(41.07)	2(3.57)	0
51 ~ 60 岁	0	8(14.29)	8(14.29)	0	0
> 60 岁	0	2(3.57)	1(1.80)	1(1.80)	0

3 讨论

流行病学及分子生物学的研究显示高危型 HPV 的持续感染是子宫颈癌及癌前病变发生的最重要的危险因素[2,3],故高危型 HPV 检测在妇女宫颈癌筛查中起重要作用。

近年大量研究证实 PCR 核酸杂交法检测 HPV 的灵敏度和特异度均显著高于传统检测方法,且应用特异性探针对 HPV 分型检测则是其最大的优势。本文采用线形探针反向杂交(INNO-LiPA)技术检测 CINⅡ,CIN Ⅲ 和宫颈癌中 HPV 感染的阳性率分别为 100%、100%、95%,明显高于文献[4]报道我国大陆北方浸润性子宫癌妇女的总 HPV 感染率 83.9%,分析主要原因可能为:①本研究采用的 INNO-LiPA HPV 基因分型技术可以检测至少 25 种不同亚型的 HPV,其中包括 14 种致癌型 HPV,该方法具有较高的敏感性和特异性。②本研究采用的是 SPF10 通用引物,而文献报道关于 HPV 型别的检测基本采用的是 MY09/11 降解引物或 GP5/6 通用引物,相关研究[5]报道 SPF10HPV 检出率高于其他 PCR 引物,而且已经证实 INNO LiPA

技术对 HPV 检测有良好的一致性。这是否是本研究 HPV 总感染率高的原因之一,尚有待进一步研究探讨。

子宫颈癌及癌前病变中 HPV 感染型别及比例在世界不同地域与民族间有所不同。尽管大部分地区 HPV16 和 HPV18 是主要高危型别,但其他型别所占比例有所不同。在非洲,HPV45 是第 3 大常见 HPV 型别[6];亚洲地区 HPV52、HPV58 所占比例要高于 HPV45、HPV31、HPV33 型[7];意大利肯塔利亚地区 HPV16 的比例是 51.5%,HPV56 为 29.7%[8],西班牙南部 232 例标本中,HPV16 型最常见,占 21.2%,其次为 HPV58、HPV51、HPV33、HPV31 型,值得注意的是 HPV18 型仅占 1.1%[9],在韩国 1 750 名妇女中,53 例感染 HPV58[10];有研究[11]报道美国 HPV 在宫颈癌、CINⅢ中的检出率分别为 98.5%(335/340)、97.2%(246/253),宫颈癌中 HPV16 占 64.5%,HPV18 占 20.3%,CINⅢ中 HPV16 占 72.8%,HPV18 占 6.1%;最近我国学者报道 HPV 在 CINⅡ~Ⅲ中的检出率分别为 97.6%、98.9%,其中 HPV16 占 76.7%,HPV18 占 7.8%,其次为 HPV31(3.2%)、HPV52(2.2%)、HPV58(2.2%)[12]。本研究表明 HPV16 在重庆地区子宫颈癌及癌前病变中是最常见的类型,占 60.00%,HPV18(7.69%)和 HPV58(7.69%)是第二常见类型,其次是 HPV31(4.62%)。本研究中 ICC、CINⅢ、CINⅡ HPV 多重感染率分别为 6.06%、26.31%、33.33%,与低、中度 CIN 相比,单一高危型 HPV 感染在 CINⅢ和 SCC 样本中的比例增加,在多重高危 HPV 感染中的比例平行下降,结果表明,检测多重 HPV 感染中的高危型,与检测单一高危型 HPV 感染相比,并不能更好的预测高级别宫颈瘤变,这一观点与其他作者的一些报道一致[13,14]。

本研究表明 30~50 岁高危型感染率最高,此年龄段为感染的高峰期,可能与机体免疫力下降有关。与林臻等[15]报道 265 例患者 HPV 感染高发年龄段在 30~50 岁相同,而 30~40 岁感染的情况最为复杂,既有单一感染,又有二重、三重感染,既有低危型感染,又有高危型感染,可能与生活习惯、性生活及性伴侣有关。因此该病预防、普查的重点年龄应该放在 30~50 岁。

由于 HPV 是导致子宫颈癌发生的主要因素,所以针对该病毒疫苗的研发对于预防子宫颈癌十分重要。目前已有默沙东和葛兰素史克两个公司成功研制预防宫颈癌Ⅱ价和Ⅳ价疫苗,并在全球多个国家注册应用于临床。两种疫苗对导致宫颈癌发生的人类最常见的致癌型乳头瘤病毒 HPV16 和 HPV18 感染有效。目前已有国家在积极研究针对不同地区的疫苗开发,因此,了解该地区的 HPV 型别分布特点将为针对此地区的疫苗开发提供有用的数据。本研究表明,重庆地区 HPV16 是最常见的致癌型 HPV,但 HPV18、HPV58 和 HPV31 也占有很高比例。这一地域分布的特点提示重庆地区伴有 HPV16、HPV18、HPV58 和 HPV31 宫颈感染的妇女发展成癌的概率较其他类型大大增加,同时也提示重庆地区用于宫颈癌有效预防的 HPV 疫苗除针对 HPV16、HPV18 外,还需要针对 HPV58 和 HPV31 等型别。

参考文献:

[1] Bosch F X, de-Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer: burden and assessment of causality [J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003, (31): 3-13.

[2] Cuschieri K S, Cubie H A, Whitley M W, *et al*. Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study[J]. J Clin Pathol, 2005, 58 (9): 946-950.

[3] 贾英, 周敏, 吴瑾, 等. 人乳头瘤病毒亚型在其感染相关疾病中检测的意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23): 2387-2389.

[4] 鲍彦平, 李霓, 王鹤, 等. 中国妇女子宫人乳头瘤病毒型别分布的 Meta 分析[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(10): 941-946.

[5] van-Hamont D, van-Ham M A, Bakkers J M, *et al*. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(9): 3122-3129.

[6] Clifford G M, Smith J S, Plummer M, *et al*. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2003, 88(1): 63-73.

[7] An H J, Cho N H, Lee S Y, *et al*. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus(HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method [J]. Cancer, 2003, 97(7): 1672-1680.

[8] Agodi A, Barchitta M, La-Rosa N, *et al*. Human papillomavirus infection: low-risk and high-risk genotypes in women in Catania, Sicily[J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19 (6): 1094-1098.

[9] Cobo F, Concha A, Ortiz M. Human papillomavirus (HPV) type distribution in females with abnormal cervical cytology. A correlation with histological study [J]. Open Virol J, 2009, 3: 60-66.

[10] Bae J H, Cheung J L, Lee S J, *et al*. Distribution of human papillomavirus type 58 variants in progression of cervical dysplasia in Korean women [J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(9): 1051-1054.

[11] Tang N, Huang S, Erickson B, *et al*. High-risk HPV detection and concurrent HPV 16 and 18 typing with Abbott RealTime High Risk HPV test [J]. J Clin Virol, 2009, 45(Suppl 1): S25-S28.

[12] Chen W, Zhang X, Molijn A, *et al*. Human papillomavirus type-distribution in cervical cancer in China: the importance of HPV 16 and 18[J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(9): 1705-1713.

[13] Gargiulo F, De-Francesco M A, Schreiber C, *et al*. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women [J]. Virus Res, 2007, 125 (2): 176-182.

[14] Stevens M P, Tabrizi S N, Quinn M A, *et al*. Human papillomavirus genotype prevalence in cervical biopsies from women diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in Melbourne, Australia [J]. Int J Gynecol Cancer , 2006, 16(3): 1017-1024.

[15] 林臻, 黄薇. 青年宫颈癌 265 例临床和病理特点分析[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(14): 1539-1540.

(**收稿**:2009-12-29;**修回**:2010-03-09)

(编辑 邓强庭)