

人乳头瘤病毒基因分型联合液基薄层细胞学检测在宫颈疾病检查中的意义

汤雯剑¹, 马艳侠^{2△} (1. 陕西省延长油田股份有限公司青化砭采油厂医务所, 陕西延安 716003; 2. 陕西中医学院附属医院, 陕西咸阳 712000)

【摘要】 目的 探讨该地区女性宫颈人乳头瘤病毒(HPV)感染状况及 HPV 分型联合液基薄层细胞学(TCT)检测的临床意义。**方法** 对 2012 年 12 月至 2014 年 1 月该院就诊的 2 816 例成年女性, 采集宫颈脱落细胞, 应用 HPV-PCR 反向斑点杂交技术检测其 HPV 基因亚型, 统计不同年龄段 HPV 感染情况, 其中 231 例临床疑似宫颈病变者同时行 TCT 检查及病理活检, 以病理诊断为金标准进行确诊。**结果** 2 816 例检出阳性 598 例, 感染率 21.24%, 高危亚型最多的为 16 型(5.82%), 低危亚型最多为 6 型(9.55%); 不同年龄段之间 HPV 感染率不同, 差异有统计学意义($\chi^2=17.21, P<0.01$), >60 岁者感染率最高, 30~39 岁感染率最低; 感染类型以单一感染为主, 多重感染比例最低; 231 例患者中宫颈疾病 89 例, HPV 检出率高于 TCT, 差异有统计学意义($\chi^2=16.06, P<0.01$), 两者联合检出率高于单独 TCT 或 HPV 检测, 差异均有统计学意义($\chi^2=22.04, P<0.01$; $\chi^2=4.17, P<0.05$)。**结论** HPV 基因分型联合 TCT 检测对宫颈疾病检测与宫颈癌筛查有重要临床价值。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 基因分型; 液基薄层细胞学

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.11.052 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)11-1618-02

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一, 是全球排名第 3 位的女性常见癌, 严重威胁女性健康^[1]。有研究表明人乳头瘤病毒(HPV)感染是导致宫颈癌前病变及宫颈癌的重要因素^[2-3]。HPV 基因分型检测是宫颈癌筛查中重复性较好的技术, 液基薄层细胞学检查(TCT)也是筛查宫颈癌的常用有效方法, 但两者的成本及效果各异^[4-5]。本研究按不同年龄段统计 HPV 感染情况, 并以病理活检为金标准分析与 TCT 联合应用的检测效果, 探讨 HPV 与 TCT 联合检测在宫颈疾病检测与宫颈癌筛查中的临床价值。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 12 月至 2014 年 1 月在陕西中医学院附属医院就诊及体检的成年女性 2 816 例, 年龄 20~80 岁, 平均年龄(39.86±9.58)岁。20~29 岁 510 例, 30~39 岁 734 例, 40~49 岁 780 例, 50~59 岁 487 例, >60 岁 305 例。对 231 例临床疑似宫颈病变患者同时行 TCT 检测和病理活检, 患者均非孕期, 且排除子宫切除、盆腔放疗等病史。所有患者均知情同意及自愿。

1.2 检测方法

1.2.1 HPV-DNA 基因分型检测 采用专用宫颈刷无菌条件采集脱落细胞, 置于专用样本收集管并及时送检。HPV-DNA 的提取、扩增、杂交、洗膜及显色等过程严格参照试剂说明书和仪器标准操作规程进行。检测 19 种亚型, 其中 16 种高危亚型(HR-HPV)依次为 16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、CP8304 型, 3 种低危亚型(LR-HPV)分别是 6、11、43 型。每批实验均同时设阴性对照和 HPV16 阳性对照, 实验结果有效条件为结果在控且“Globin”位点与“显色探针”均显色。

1.2.2 TCT 检测 选取非月经期且近 3 d 无阴道冲洗或用药, 使用专用取样刷于宫颈管鳞柱交界部的可疑病变区域采集标本, 将标本置于专门的液基细胞保存液, 及时行 TCT 检查,

巴氏染色后结果判读参照国际癌症协会推荐的 TBS(The Bethesda System)分级诊断标准, 对细胞改变的诊断包括: 良性细胞改变(NILM)、不明确意义的非典型鳞状上皮细胞(AS-CUS)、低度鳞状上皮内病变(LSIL)、高度鳞状上皮内病变(HSIL)、鳞状细胞癌(SCC)、腺癌。细胞学异常是 AS-CUS 及以上病变者。

1.2.3 宫颈病理活检 对宫颈可疑部位进行多点取材, 如无异常则取 3、6、9、12 点处, 将标本用甲醛固定后及时送检, 所有阅片诊断结果均由该院两位高年资病理诊断医师共同确定。活检异常结果分为轻度子宫颈上皮内瘤变(CIN I)、中度子宫颈上皮内瘤变(CIN II)、重度子宫颈上皮内瘤变(CIN III)、宫颈癌。其中 CIN I 即 TCT 标准中的 LSIL, CIN II 与 CIN III 即 TCT 标准中的 HSIL。

1.3 仪器与试剂 Biometra 系列定性 PCR 基因扩增仪(德国), DA8000 全自动分子杂交仪(广州达安), K30B 型干式恒温器(杭州奥盛), Bioaer AG0410062 型生物安全柜(广州达安), TG16-WS 型台式离心机(长沙湘仪)。HPV 基因分型检测试剂盒(广州达安), MCT-II 型液基薄层细胞制片分析系统(陕西高源)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 计数资料采用 χ^2 检验或 F 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验标准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV 感染率及感染亚型 2 816 例共检出 HPV 阳性 598 例, 感染率 21.24%。高危型感染亚型前 3 位是 16 型(5.82%)、52 型(2.95%)、58 型(2.27%), 其余按感染率由高到低依次为 53(1.56%)、51(1.24%)、39(1.14%)、CP8304(1.07%)、33(0.92%)、66(0.82%)、31(0.78%)、18(0.64%)、68(0.64%)、56(0.46%)、59(0.39%)、35(0.32%)、45(0.25%)。低危型感染率依次为 6 型(9.55%)、43 型(2.34%)、11 型(1.35%)。

△ 通讯作者, E-mail: zhmazhch81763@163.com。

2.2 不同年龄段 HPV 感染率及感染类型 不同年龄段之间 HPV 感染率差异有统计学意义($\chi^2=17.21, P<0.01$)。>60 岁感染率最高(32.18%),30~39 岁的感染率最低(19.24%),其余各组依次为 20~29 岁(26.09%)、50~59 岁(23.54%)、40~49 岁(19.51%)。598 例阳性患者中,单一感染 475 例(占 79.43%),双重感染共 97 例(占 16.22%),多重感染共 26 例(占 4.35%)。见图 1。

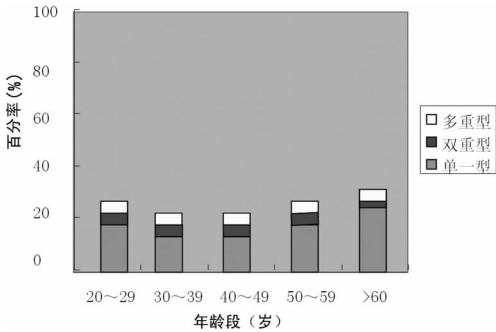


图 1 不同年龄段 HPV 感染率及感染类型

2.3 HPV 与 TCT 检测结果 231 例临床疑似宫颈病变者同时进行 HPV、TCT 及病理活检,病理活检诊断异常者 89 例,以病理活检诊断结果为金标准进行分组,其中 HPV 检测阳性者 59 例,TCT 检测阳性者 41 例,HPV 阳性率(66.29%)高于 TCT(46.07%),差异有统计学意义($\chi^2=16.06, P<0.01$),两者联合检测阳性者 65 例,阳性率高于单独行 TCT 检测,差异有统计学意义($\chi^2=22.04, P<0.01$),也高于单独行 HPV 检测,差异也有统计学意义($\chi^2=4.17, P<0.05$)。见表 1。

表 1 宫颈病变患者 HPV 与 TCT 检测结果比较[n(%)]

病理诊断	n	TCT 阳性	HPV 阳性	TCT+HPV 阳性
CIN I	48	14(29.17)	28(58.33)	31(64.58)
CIN II	17	9(52.94)	11(64.71)	13(76.47)
CIN III	13	8(61.54)	9(69.23)	10(76.92)
宫颈癌	11	10(90.91)	11(100.00)	11(100.00)
总计	89	41(46.07)	59(66.29)	65(73.03)

3 讨 论

宫颈癌是一种严重威胁女性健康的恶性肿瘤,研究表明其发病率近年来仍在不断上升^[6]。HPV 是一种双链 DNA 病毒,内含 8 000 个碱基对,相对分子质量约为 5×10^3 ,而其持续感染是宫颈癌重要的致病因素之一,HPV16、18 亚型(尤其是 16 型)是导致宫颈癌的主要基因亚型,其致癌机制是通过致癌蛋白 E6 和 E7 与抑癌基因 p53 和 pRb 相结合,然后 E6 和 E7 分别抑制与灭活 p53 和 pRb 蛋白,造成宿主细胞周期紊乱和发生凋亡,并破坏正常增殖与凋亡的平衡性,使其增殖过度进而产生恶性转化^[7]。依据致癌可能性分为低危型和高危型,低危型(包括 6、11、42 等)主要引发良性病变(如尖锐湿疣等)和 CIN I,高危型(包括 16、18、31 等)主要导致 CIN II、CIN III 及宫颈癌,高危型中 53、CP8304 型是中国人特有的^[8]。高危型 HPV 反复持续性感染可导致宫颈发生由上皮内瘤样病变到原位癌,最终形成浸润癌,因此对其亚型的检测在宫颈病变预防和评估治疗中都有重要的临床价值,早期发现可及时干预治疗,避免病情进一步恶化,从而降低宫颈癌的发病率。PCR 反

向斑点杂交技术具有简便快速、敏感性高、特异性强等优势,广泛用于 HPV 基因分型检测。TCT 检查是采用薄层液基细胞学检测系统检测宫颈细胞并进行细胞学分类诊断,是目前国际上较先进的一种宫颈癌细胞学检查技术,比传统的宫颈刮片后行巴氏染色检查的检出率高,可为宫颈癌早期诊断和治疗提供明确的病理学依据^[5]。

本研究结果表明,该地区高危感染亚型中检出率前 3 位依次是 16、52、58 型,与其他地域的报道有差异^[9-10]。提示 HPV 亚型的分布具有一定的地域性,不同地区亚型感染模式各异,另外也可能是由于采用的检测技术不同,从而检测的型别范围有所不同。本组结果显示,不同年龄段之间 HPV 感染率差异有统计学意义($P<0.01$),>60 岁感染率最高,可能与本组研究对象分布在该年龄段例数较少或疾病发展等相关,20~29 岁阳性率也较高,30~49 岁感染例数最多,与研究对象分布在该年龄段例数较多有关,还可能由于该年龄段女性处于性活跃期和生育高峰期等。在感染类型中,单一基因型别感染率最高,多重基因型别感染率最低。有学者研究报道,HPV 多重感染率在宫颈癌患者中反而比健康者低,这是否由于 HPV 致病性发生改变所致,有待深入研究探讨^[11]。

本研究结果提示 TCT 在 CIN I 时检出率较低,可能和此方法的敏感性较低、诊断水平差异、诊断标准掌握不严格、制片质量等原因有关,会出现一定比例的假阴性或假阳性,由此也说明 TCT 诊断不可代替组织病理学诊断,尤其在宫颈病变初期,其诊断符合率较低,随着宫颈病变的程度增高,特别是到宫颈癌阶段,TCT 诊断率明显增加,提示对于 TCT 诊断为高度病变者更需引起重视。本研究结果显示,HPV 检测有着较高的检出率,其感染比细胞学异常出现更早,并且与联合检测效果更接近,对于宫颈癌及宫颈疾病病变者能起到有效的预警作用,其原因可能由于宫颈鳞状上皮病变与 HPV 感染更密切,因此对于宫颈疾病患者进行 HPV 亚型检测及流行病学分析研究,对宫颈癌早期预防具有重大意义^[12]。本研究还发现 TCT 与 HPV 检测联合,检测率有较大提高,提示在宫颈疾病筛查,特别是在 CIN I 级的宫颈早期病变时应联合检测 HPV 分型和 TCT,可更有效防止假阴性结果,降低漏诊率,从而显著提高宫颈病变的检出率与准确性^[13-14]。

此外,进行 HPV 与 TCT 检测时,若同时联合检测宫颈癌相关的血清肿瘤标志物(如鳞状细胞癌抗原、细胞角蛋白 19、人附睾蛋白 4 等)是否能更进一步提高宫颈病变检出率,还有待后续进一步研究分析。

参考文献

[1] Yee GP, de Souza P, Khachigian LM. Current and potential treatments for cervical cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(2): 205-206.

[2] Jablonowska D, Marszalek A, Bodnar M. Tobacco smoking, HPV infection and changes in cervix[J]. Przegl Lek, 2012, 69(45): 740-743.

[3] Konno R. Screening of uterine cervical neoplasms and HPV vaccine[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2013, 40(15): 165-169.

[4] 许颖, 马毓梅, 张杰英, 等. 人乳头瘤病毒的研究进展[J]. 河北医药, 2013, 35(12): 1884-1885. (下转第 1621 页)

究妊娠晚期女性凝血功能的变化情况,从而有效地预防和诊断其出血性疾病和血栓性疾病。根据有关报道,在妊娠晚期,胎盘和胎膜含有大量使胎盘表面血液迅速发生凝固的组织凝血活酶,这些物质可以起到一定的自身保护作用^[7-8]。同时纤溶活性急速增强,导致纤维蛋白降解产物也同时增加,致使血液呈现高凝状态^[9]。血液高凝是妊娠晚期的一种生理现象,也是产后止血的重要机制,但是高凝状态又可引起妊娠高血压综合征、胎盘早剥、DIC、产后血栓、早产、死胎等多种产科并发症^[5,10]。

PT、APTT、TT 和 FIB 是评价机体止血功能、凝血系统病变和术前筛查凝血性疾病的重要指标^[11]。为了探讨妊娠晚期女性的凝血功能,本研究选择健康非妊娠女性作为健康对照进行比对。本组实验结果表明,大部分妊娠晚期女性的 PT、APTT 和 TT 与健康对照组无明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$),但有 9 例(7.8%)孕妇的 TT 升高。所有妊娠晚期女性的 FIB 都显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),并且也高于参考值范围,与相关文献报道一致,对于 TT 升高的妊娠晚期女性,要预防产后血栓的形成^[5]。FIB 是一种糖蛋白,由肝脏分泌,是纤维蛋白的前体物质和凝血活化的标志物^[6]。FIB 的升高会导致血液呈现高凝状态,既有利于产后止血,又可能会形成血栓风险。本组妊娠晚期女性的 FIB 都显著高于参考值范围,表明其在妊娠过程中机体的纤溶指标发生改变,血液处于高凝状态,临床在处理妊娠晚期女性时,要充分发挥凝血功能的监测作用,将 FIB 值控制在适当的范围。

因此,本研究结果对于妊娠晚期女性在预防和诊断血栓性疾病以及产后出血的治疗有着重要的临床意义。

参考文献

[1] 陈云书,王淑侠,张翠芹.妊娠晚期妇女凝血功能及 D-二聚体检测临床意义探讨[J].实用临床医药杂志,2013,17(11):151-152.

[2] 胡豫,郭涛.口服避孕药应用所致的凝血异常及其防治[J].临床内科杂志,2008,25(6):368-369.

[3] 叶艺萍,魏明.晚期孕妇血浆 D-二聚体和纤维蛋白原水平的检测及临床意义[J].江西医学院学报,2006,46(5):160-161.

[4] 郑曦,肖唯.妊娠晚期妇女凝血四项及 D-二聚体检测分析[J].微循环学杂志,2012,22(2):77-78.

[5] 孙彦,刘永顶,刘路成.孕产妇凝血功能检测的临床意义[J].实用医技杂志,2005,12(6):1573-1574.

[6] 宋月华.孕妇不同妊娠期凝血项目检查的临床价值探讨[J].甘肃科技,2014,30(8):137-138.

[7] 张爱民,常艳敏,苏秀香.临产孕妇凝血功能的变化及其临床意义[J].国际检验医学杂志,2013,34(22):3076-3077.

[8] 李健茹,刘光明,陈世豪.临产孕妇 D-二聚体凝血四项的变化及其临床意义[J].中国医学检验杂志,2010,11(5):231-232.

[9] Borschneck C,Dreyfus M,Bridey F,et al. Assay of products of fibrin and fibrinogen degradation in disseminated intravascular coagulations[J]. Evaluation of a New Technique Press Med,1995,81(24):799-802.

[10] 丁虹,朱付凡.妊娠期血液高凝状态与产科并发症[J].中华妇产科杂志,2003,38(10):643-646.

[11] 王涵.临产孕妇产前及产后凝血功能检测及其临床意义[J].标记免疫分析与临床,2010,17(4):233-235.

[1] 陈云书,王淑侠,张翠芹.妊娠晚期妇女凝血功能及 D-二聚体检测临床意义探讨[J].实用临床医药杂志,2013,17(11):151-152.

[5] Wang JL, Yang YZ, Dong WW, et al. Application of human papillomavirus in screening for cervical cancer and precancerous lesions[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(5):2979-2982.

[6] 李东川,肖正华,陈宇宁,等.某地区宫颈癌患者 HPV 流行病学调查[J].检验医学与临床,2013,11(17):2423-2424.

[7] Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, et al. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies[J]. Prev Med, 2011, 53(16):12-21.

[8] Garbuglia AR, Carletti F, Minosse C, et al. Genetic variability in E6 and E7 genes of human papillomavirus-16, -18, -31 and -33 from HIV-1-positive women in Italy[J]. New Microbiol, 2007, 30(11):377-382.

[9] 孙一帆,银联立,杨异,等.柳州地区下生殖道感染女性患者人类乳头瘤病毒检测结果分析[J].检验医学与临床,2013,10(11):1439-1440.

[10] 史娅萍,朱宇宁,周丽琴,等.人乳头瘤病毒基因型在宫颈

疾病中的分布特点[J].中华检验医学杂志,2007,30(9):1009-1012.

[11] Lin H, Moh JS, Ou YC, et al. A simple method for the detection and genotyping of high-risk human papillomavirus using seminested polymerase chain reaction and reverse hybridization[J]. Gynecol Oncol, 2005, 96(1):84-91.

[12] 张建国,周杨杨,程建平,等.宫颈癌及上皮内瘤变患者人乳头瘤病毒 DNA 检测及型别分布研究[J].现代检验医学杂志,2010,25(1):70-71.

[13] Galarowicz B, Jach R, Kidzińska J, et al. The role of mR-NA E6/E7 HPV high oncogenic risk expression in colposcopy of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [J]. Przegl Lek, 2012, 69(8):651-657.

[14] Pruski D, Fraszczak J, Iwaniec K, et al. Assessment of frequency of regression and progression of mild cervical neoplasia-LGSIL in women with positive high-risk HPV DNA test result[J]. Ginek Pol, 2012, 83(10):572-575.

(收稿日期:2014-12-20 修回日期:2015-02-15)

(上接第 1619 页)

疾病中的分布特点[J].中华检验医学杂志,2007,30(9):1009-1012.

[11] Lin H, Moh JS, Ou YC, et al. A simple method for the detection and genotyping of high-risk human papillomavirus using seminested polymerase chain reaction and reverse hybridization[J]. Gynecol Oncol, 2005, 96(1):84-91.

[12] 张建国,周杨杨,程建平,等.宫颈癌及上皮内瘤变患者人乳头瘤病毒 DNA 检测及型别分布研究[J].现代检验医学杂志,2010,25(1):70-71.

[13] Galarowicz B, Jach R, Kidzińska J, et al. The role of mR-NA E6/E7 HPV high oncogenic risk expression in colposcopy of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [J]. Przegl Lek, 2012, 69(8):651-657.

[14] Pruski D, Fraszczak J, Iwaniec K, et al. Assessment of frequency of regression and progression of mild cervical neoplasia-LGSIL in women with positive high-risk HPV DNA test result[J]. Ginek Pol, 2012, 83(10):572-575.

(收稿日期:2014-12-15 修回日期:2015-02-20)