

不同类型人乳头瘤病毒多重感染与宫颈病变的相关性研究*

温路生¹, 孟加榕¹, 唐忠辉^{2△}, 黄仲庆², 郭以河¹, 潘美心¹ (1. 中国人民解放军第一七五医院/厦门大学附属东南医院病理科, 福建漳州 363000; 2. 漳州卫生职业学院基础医学部, 福建漳州 363000)

【摘要】目的 探讨不同类型人乳头瘤病毒(HPV)多重感染与宫颈病变的相关性。**方法** 应用基因芯片技术对 200 例宫颈病变患者石蜡组织标本进行 24 种 HPV 基因型进行检测,以组织病理学诊断作为宫颈病变确诊的金标准为依据。**结果** 200 例标本中,HPV 总感染率为 51.50%(103/200),其中慢性宫颈炎、鳞状上皮内低度病变(CIN1)、鳞状上皮内高度病变(CIN3)和宫颈鳞状细胞癌的 HPV 感染率分别为 22/57(38.60%)、12/33(36.36%)、44/81(54.32%)、25/29(86.21%),与宫颈病变密切相关($P < 0.01$);不同宫颈病变中单一 HPV 感染率明显高于多重 HPV 感染率($P < 0.05$);高危型单一感染组 HPV 感染率与宫颈病变不相关($P > 0.05$),多重感染、高危型感染、高危型多重感染、低危型多重感染、高低混合型多重感染的各组 HPV 感染率在不同级别宫颈病变差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** HPV 感染率与宫颈病变的不同程度密切相关,持续高危型感染 HPV 和多重感染 HPV 是加重宫颈病变的重要因素。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 多重感染; 宫颈病变

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.15.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)15-2156-02

Relationship between different types of HPV multiple infection and cervical lesions* WEN Lu-sheng¹, MENG Jia-rong¹, TANG Zhong-hui^{2△}, HUANG Zhong-qing², GUO Yi-he¹, PAN Xian-xin¹ (1. Department of Pathology, 175th Hospital of PLA/Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China; 2. Faculty of Basic Medicine, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

【Abstract】Objective To explore the relationship between different types of human papillomavirus(HPV) multiple infection and cervical lesions. **Methods** The gene chip technology was applied to detect 24 types of HPV genotypes in the paraffin tissue specimens from 200 patients with cervical lesions, the histopathological diagnosis was used as the gold standard of cervical lesion diagnosis. **Results** In 200 specimens, the total infection rate of HPV was 51.50%(103/200), in which the HPV infection rates in chronic cervicitis, low-CIN1, high-CIN3 and squamous cell carcinoma were 22/57(38.60%), 12/33(36.36%), 44/81(54.32%) and 25/29(86.21%), respectively, and were correlated with the cervical lesions($P < 0.01$); In different cervical lesions, single HPV infection was significantly higher than multiple HPV infection($P < 0.05$); The HPV infection rate in the high-risk type single HPV infection group had no correlated with the cervical lesions($P > 0.05$). The HPV infection rates in the multiple infection, high-risk HPV infection, high-risk HPV multiple infection, low-risk HPV multiple infection, and high and low risk mixed HPV infection groups had statistically significant differences among different grades of cervical lesions($P < 0.05$). **Conclusion** The infection rate of HPV is correlated with the different degrees of cervical lesion. The persistent high-risk HPV infection and multiple HPV infection are the important factors for aggravating the cervical lesions.

【Key words】 human papillomavirus; multiple; cervical lesions

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,发病呈年轻化趋势。人乳头状瘤病毒(HPV)感染是宫颈上皮内瘤变(CIN)与宫颈癌的主要原因,一直是国内外学者研究焦点,HPV 感染的基因型与感染持续时间与宫颈癌的发生、发展及预后密切相关,HPV 多重感染是否增加和促进宫颈癌的发生,目前尚无统一意见。本研究采用基因芯片技术对手术切除宫颈石蜡组织进行 HPV 基因分型检测,同时对手术切除宫颈石蜡组织进行病理诊断,旨在了解漳州地区女性 HPV 感染在宫颈不同病变中

分布,探讨 HPV 感染类型在宫颈癌及癌前病变发生、发展中的作用,为该地区宫颈癌防治提供依据。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2014 年 9 月解放军第一七五医院宫颈病变患者石蜡组织标本 200 例,其中慢性宫颈炎 57 例、鳞状上皮内低度病变(CIN1)33 例、鳞状上皮内高度病变(CIN3)81 例、宫颈鳞状细胞癌(简称宫颈鳞癌)29 例,患者

* 基金项目:福建省漳州市自然科学基金资助项目(ZZZ2012J21);中国人民解放军第一七五医院(厦门大学附属东南医院)青年苗圃基金项目(12Y014)。

作者简介:温路生,男,主治医师,本科,主要从事妇科疾病与肿瘤的预防及早期诊断方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:tzh6409@126.com。

年龄 18~73 岁,平均年龄(43±9)岁。

1.2 仪器与试剂 DNA 提取和检测人乳头瘤病毒分型试剂盒及等离子表面共振技术(SPR)HPV 基因分型检测仪购自金菩嘉公司。检测基因型包括 16 种高危型(HPV 16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,81)和 8 种低危型(HPV 6,11,40,42,43,44,54,70)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 用专用切片器厚 8 μm 连续切片(视组织大小)4~10 张,灭菌镊子取下放入 1.5 mL EP 管中;加入 200 μL 石蜡裂解液,95 °C 裂解 10 min;在石蜡凝固前以 12 000 r/min 离心 2 min;穿过石蜡层加入 10 μL 蛋白酶 K,混匀,56 °C 水浴过夜消化组织;第 2 天取出 EP 管 95 °C 10 min 灭活蛋白酶 K;在石蜡凝固前以 12 000 r/min 离心 3 min,分离石蜡层和 DNA 模板层;石蜡层下水层为 DNA 模板层用于 PCR。

1.3.2 PCR 扩增 HPV DNA 循环 每例样本取 DNA 5 μL 与 95 μL 试剂盒内的体系液加入 200 μL 的 EP 管中,混匀,PCR 反应循环程序按说明书进行。预温:50 °C,2 min;预变性:94 °C,4 min;扩增(28 循环):变性 94 °C,30 s,退火 48 °C,45 s,延伸 72 °C,20 s;扩增(25 循环):变性 94 °C,30 s,退火 65 °C,45 s,延伸 72 °C,20 s;冷却:4 °C。

1.3.3 检测 PCR 反应产物加入 60 μL 杂交缓冲液和 20 μL 的阳性 PCR 产物,混匀,95 °C 杂交 5 min,将 EP 换成软盖,按照仪器说明书步骤在 SPR 检测仪上对样本进行 HPV 基因分型检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计数资料采用百分率或例数表示,组间比较采用 χ² 检验。以 α=0.05 为检验水准,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPV 基因型检测结果 200 例宫颈病变患者检查结果

显示 HPV 阳性 103 例,感染率为 51.50%(103/200)。慢性宫颈炎、CIN1、CIN2 和宫颈鳞癌的 HPV 感染率分别为 22/57(38.60%)、12/33(36.36%)、44/81(54.32%)、25/29(86.21%),与宫颈病变密切相关(χ²=21.070,P=0.000)。随着慢性宫颈炎→CIN→宫颈癌的宫颈癌变升级,HPV 感染率呈明显的升高趋势,分别为 22/57(38.60%)、56/114(49.12%)、25/29(86.21%),差异有统计学意义(χ²=18.043,P=0.000),表明随着癌变程度加重,其 HPV 感染率逐渐升高,其感染程度也明显加重。

2.2 HPV 感染类型与宫颈病变的相关性 在不同宫颈病变中,单一感染组与多重感染组 HPV 感染率随着宫颈病变加重而增加,慢性宫颈炎、CIN1、CIN3、宫颈鳞癌的 HPV 感染率分别为 33.33%(19/57)、24.24%(8/33)、39.51%(32/81)、37.93%(11/29)、5.26%(3/57)、12.12%(4/33)、14.81%(12/81)、48.28%(14/29),差异有统计学意义(χ²=10.482,P=0.015),其中单一感染组差异无统计学意义(χ²=2.581,P=0.461),而多重感染组差异有统计学意义(χ²=27.103,P=0.000)。HPV 感染率最高在宫颈鳞癌中高危型感染组为 62.09%(18/29),高危型单一感染组或低危型单一感染组或低危型感染组,与宫颈病变的严重程度呈不相关(χ²=2.423,P=0.489;χ²=3.120,P=0.346;χ²=3.196,P=0.330),但高危型感染组与宫颈病变密切相关(χ²=10.230,P=0.017<0.05),说明持续高危型 HPV 感染会增加宫颈癌前病变和宫颈癌的发生。多重感染组、高危多重感染组、低危多重感染组、高低混合型多重感染组与宫颈病变呈密切相关(χ²=27.103,P=0.000;χ²=10.750,P=0.00;χ²=5.205,P=0.046;χ²=9.162,P=0.011),说明 HPV 多重感染在宫颈癌变过程中起促进作用,若患者出现持续感染,则危险性更大,更容易导致宫颈病变,增加宫颈癌的发生。见表 1。

表 1 HPV 感染类型与宫颈病变类型的关系(n)

感染类型	n	慢性宫颈炎(n=57)	CIN1(n=33)	CIN3(n=81)	宫颈鳞癌(n=29)	χ ²	P
单一感染	70	19	8	32	11	2.581	0.461
多重感染	33	3	4	12	14	27.103	0.000
高危型感染	83	16	12	37	18	10.230	0.017
高危型单一感染	62	15	8	28	11	2.423	0.489
高危型多重感染	21	1	4	9	7	10.750	0.009*
低危型感染	11	5	0	4	2	3.196	0.330*
低危型单一感染	8	4	0	4	0	3.120	0.346*
低危型多重感染	3	1	0	0	2	5.205	0.046*
高低混合型多重感染	9	1	0	3	5	9.162	0.011*

注:单一感染组与多重感染组比较,χ²=10.482,P=0.015;*为精确概率计算方法进行分析。

3 讨 论

HPV 是一组无包膜的小 DNA 病毒,具有嗜上皮性、高度组织和宿主特异性,可致人类皮肤和黏膜异常增生,引起多种良、恶性病变。宫颈病变是女性最常见的疾病之一,最严重者为宫颈癌。宫颈癌的发生是一个多因素、多阶段的较长而连续发展的过程,即慢性宫颈炎→CIN1→CIN3→宫颈癌。本研究发现宫颈病变患者总 HPV 感染率为 51.50%,慢性宫颈炎、

CIN1、CIN3 和宫颈鳞癌患者的 HPV 感染率分别为 38.60%、36.36%、54.32%、86.21%,与宫颈病变密切相关(P<0.01)。随着慢性宫颈炎→CIN→宫颈癌的宫颈癌变升级,HPV 感染率呈升高趋势,分别为 38.60%、49.12%、86.21%,差异有统计学意义(P<0.01),表明随着癌变程度加重,其 HPV 感染率逐渐升高,其感染程度也明显加重,与国内外文献报道相似,进一步论证了 HPV 感染与宫颈病变高度相关^[1-4]。(下转第 2160 页)

一致。虽然血培养中阳性菌所占比例有所上升,但尚未发现对替考拉宁和万古霉素耐药的菌株。

由于抗生素的广泛使用,使致病菌的耐药性变得较为普遍,特别是在革兰阴性菌中,对氨基苄西林及复方磺胺甲噁唑的耐药率高达 50.0% 以上。针对大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌产 ESBLs 株,对头孢他啶、头孢曲松、哌拉西林、头孢唑啉、头孢呋辛表现出较高的耐药率,对碳青霉烯类、四代头孢抗生素耐药率相对较低。革兰阳性菌对常用抗生素的耐药问题亦较严重,对红霉素、氨基苄西林、苯唑西林的耐药率相当高,至今未发现对万古霉素耐药的菌株。

对于怀疑真菌性败血症,由于酵母样真菌生长缓慢,往往忽视了后期血液培养瓶的观察,造成酵母样真菌生长漏检,故血培养阳性率不高。受现阶段实验室条件有限,未开展厌氧菌培养,不可避免出现厌氧菌漏检情况。在以后的工作中,应加强真菌和厌氧菌的鉴定。

血液细菌培养是临床诊断败血症的金标准,在血液中检出病原微生物对疾病早期治疗、预后判断有较高的临床指导意义。为了提高血培养的阳性检出率,临床医生可以更好地了解患者病情,应在抗生素使用前多部位采集,也可在感染局部的附近血管中采集,提高阳性率,并严格执行无菌操作,避免正常细菌污染,降低假阳性的发生,真正做到指导临床用药,提升治疗效果。

参考文献

[1] 王邦松,李庆新,王震龙. 院内感染败血症临床和菌谱耐药分析[J]. 温州医学院学报, 2000, 30(2): 149-151.

[2] Shadomy S, Chan EL. In vitro studies with cefotaxime: disk diffusion susceptibility tests[J]. J Clin Microbiol, 1982, 16(2): 213-217.

[3] 杨敬芳,李继红,王鑫,等. 6 445 份血培养分离菌的分布特征及耐药谱型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(6): 575-577.

[4] 杨虹,李智,朱敏,等. 血培养病原菌的变迁及结果分析[J]. 同济大学学报:医学版, 2007, 28(5): 95-97.

[5] 时琰丽,鲁炳怀,朱凤霞. 2010~2012 年民航总医院血培养病原菌分布及其耐药性分析[J]. 实用医技杂志, 2013, 20(8): 829.

[6] 黄培胜. 血培养阳性率偏低原因的分析[J]. 中外医学杂志, 2010, 8(27): 72.

[7] 王娟,南志敏,杨柳. 影响血流感染中病原菌检出率的重要因素[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(9): 1149.

[8] 张风华,王大利. 血培养阳性标本病原菌分布及耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2008, 20(6): 412-415.

[9] 王进,梁军,肖永红. 2008 年 Mohnarin 血流感染病原菌构成及耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(16): 2399-2404.

[10] 王贺,徐英春,陈民钧. 细菌质粒介导的喹诺酮类抗菌药物耐药机制研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(5): 618.

(收稿日期:2015-02-26 修回日期:2015-04-28)

(上接第 2157 页)

女性生殖道 HPV 感染存在基因型单一感染与多重感染,但由于不同 HPV 基因型之间基本不存在交叉保持性抗体,容易造成 HPV 多重感染。HPV 多重感染是否促进宫颈癌的发生,目前存在争议,有学者认为多重感染可促进宫颈癌的发生,并加大治疗难度^[5]。本研究中,在 HPV 基因型单一感染中,无论是高危型 HPV 基因型单一感染或低危型 HPV 基因型单一感染,与宫颈病变的严重程度无明显相关性,说明仅单一 HPV 基因型感染在宫颈癌变过程中不是起关键作用,即使是高危型 HPV 基因型感染。HPV 多重感染占 HPV 感染患者 32.04%,无论是高危型 HPV 多重感染或低危型 HPV 多重感染或高低危险混合型多重感染,与宫颈病变的严重程度明显相关,且随着病变级别增加而增加,提示 HPV 多重感染与宫颈癌变的发生密切相关,结果与文献[6-9]报道一致,但与张元等^[10]报道相反。HPV 感染率最高在宫颈鳞癌中的高危型感染,且高危型 HPV 感染随着病变级别增加而增加,说明持续高危型 HPV 感染在宫颈癌变过程中起关键作用,促进宫颈癌的发生,提示 HPV 多重感染患者出现持续高危型 HPV 感染与的危险性更大,更容易导致宫颈癌变。

参考文献

[1] 张玉新,李维强,陈拉妮. HPV 感染与宫颈病变相关性的初步研究[J]. 中国医药指南, 2010, 8(30): 177-179.

[2] Lee EH, UmTH, Chi HS, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus infection in Korean women as determined by restriction fragment mass polymorphism

assay[J]. J Korean Med Sci, 2012, 27(9): 1091-1097.

[3] 毕蕙,赵健,陈锐,等. 人乳头瘤病毒感染亚型与宫颈上皮内瘤变的相关[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(5): 362-364.

[4] 吴兵,张崇移,李铭芬. 人乳头状瘤病毒与宫颈病变的相关性研究[J]. 中国医院感染学杂志, 2013, 10(23): 2377-2379.

[5] 宋丽君,陈春丽. HPV 基因分型检测与宫颈病变的相关性研究[J]. 医学检验, 2012, 27(3): 163-166.

[6] 周世媛,薄立伟,王艳丽,等. 人乳头瘤病毒基因型与宫颈病变关系的研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2012, 11(20): 765-768.

[7] 代红莹,张晓静. 重庆永川地区人乳头瘤病毒感染亚型、年龄分布及多重感染影响的研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(6): 619-621.

[8] 李娟,尹格平,陈铭,等. 多种 HPV 亚型检测在宫颈病变诊治中的意义[J]. 中国现妇幼保健, 2012, 27(2): 195-198.

[9] 何君梅,尹格. 21 种 HPV 亚型检测在宫颈病变诊断及预测中的价值[J]. 山东医药, 2010, 150(15): 35-36.

[10] 张元,钱小华,柴莉,等. 295 例宫颈病变患者 HPV 亚型多重感染与宫颈病变的关系[J]. 中国医药科学, 2013, 3(18): 7-15.

(收稿日期:2015-02-22 修回日期:2015-05-18)