

引用本文:蔡江义,崔旭,秦岭,等.高危型人乳头瘤病毒基因分型聚合酶链式反应检测技术在宫颈癌筛查中的应用分析[J].安徽医药,2021,25(9):1839-1842.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.033.

◇临床医学◇



高危型人乳头瘤病毒基因分型聚合酶链式反应检测技术在宫颈癌筛查中的应用分析

蔡江义¹,崔旭²,秦岭³,康媛媛⁴,白焕焕⁵

作者单位:¹西安航天医院病理科,陕西 西安 710000;²渭南市中心医院病理科,陕西 渭南 714000;

³西安凤城医院病理科,陕西 西安 710000;⁴靖边县人民医院病理科,陕西 榆林 719000;

⁵榆林市中医院病理科,陕西 榆林 719000

摘要: **目的** 探讨以聚合酶链式反应(PCR)为基础的高危型人乳头瘤病毒(HPV)分型检测在宫颈癌筛查中的应用和诊断价值。**方法** 选取2016年6月至2019年6月西安航天医院收治的疑似宫颈病变病人628例,分别采取高危型HPV分型PCR技术(HR-HPV DNA PCR),液基薄层细胞学检查(TCT)以及病理组织活检诊断,以病理活检作为诊断宫颈病变的“金标准”,分析高危型HPV感染与宫颈病变的关系以及高危型HPV分型检测技术在宫颈癌筛查中的应用价值。**结果** HR-HPV DNA PCR技术的灵敏度为91.76%,特异度为91.29%,阳性预测值为93.56%,阴性预测值为88.93%,符合率为91.56%,均显著优于TCT检测方法($P < 0.001$)。同时,对13种HPV亚型分析发现,16、18亚型与宫颈癌及癌前病变密切相关($P < 0.05$),33、52及58型次之($P < 0.05$)。而且,HPV的感染率随着年龄的增长而增长,>39~49岁病人HPV感染率为58.15%、>49~59岁病人为64.29%、>59岁病人为75.41%,均显著高于20~29岁的年轻病人的46.40%($P < 0.05$)。**结论** 高危型HPV持续感染是宫颈癌及癌前病变发生的关键因素,以PCR为基础的高危型HPV分型检测在宫颈癌筛查中具有较高的应用价值。

关键词: 乳头状瘤病毒感染; 核酸杂交; 宫颈癌; 癌前病变筛查; HR-HPV DNA PCR技术

Application analysis of HR-HPV DNA PCR detection technology in cervical cancer screening

CAI Jiangyi¹, CUI Xu², QIN Ling³, KANG Yuanyuan⁴, BAI Huanhuan⁵

Author Affiliations:¹Department of Pathology, Xi'an General Aerospace Hospital, Xi'an, Shaanxi 710000, China;

²Department of Pathology, Weinan Central Hospital, Weinan, Shaanxi 714000, China;

³Department of Pathology, Xi'an Fengcheng Hospital, Xi'an, Shaanxi 710000, China;

⁴Department of Pathology, Jingbian People's Hospital, Yulin, Shaanxi 719000, China;

⁵Department of Pathology, Yulin Traditional Chinese Medicine Hospital, Yulin, Shaanxi 719000, China

Abstract: **Objective** To investigate the application and diagnostic value of high-risk human papillomavirus (HPV) typing based on polymerase chain reaction (PCR) in the screening of cervical cancer and precancerous lesions. **Methods** A total of 628 patients with suspected cervical lesions admitted to Xi'an Aerospace General Hospital from June 2016 to June 2019 were selected. High-risk HPV typing PCR (HR-HPV DNA PCR), thinprep cytology test (TCT) and pathological biopsy were used for diagnosis, and pathological diagnosis was used as the "gold standard" for the diagnosis of cervical lesions. The relationship between high-risk HPV infection and cervical lesions was analyzed. **Results** The sensitivity of HR-HPV DNA PCR technology was 91.76%, the specificity was 91.29%, the positive predictive value was 93.56%, the negative predictive rate was 88.93%, and the coincidence rate was 91.56%, which were significantly better than those of the TCT detection method ($P < 0.001$). In addition, 13 HPV subtypes were found, 16 and 18 subtypes and cervix cancer and precancerous lesions were closely related ($P < 0.05$), followed by 33, 52 and 58 subtypes ($P < 0.05$). Moreover, the HPV infection rate increased with age. The HPV infection rate was 58.15% for patients aged >39-49 years, 64.29% for patients >49-59 years old, and 75.41% for patients >59 years old, which were significantly higher than 46.40% of young patients aged 20-29 ($P < 0.05$). **Conclusions** High-risk HPV infection is a key factor in the development of cervical cancer and precancerous lesions. High-risk HPV typing has a high value in the screening of cervical cancer and precancerous lesions.

Key words: Papillomavirus infections; Nucleic acid hybridization; Cervical cancer; Precancerous lesions screening; HR-HPV DNA PCR technology

宫颈癌是严重威胁女性身心健康和生命安全的常见恶性肿瘤之一,仅次于乳腺癌。2018年,女性宫颈癌的发病率约占全球肿瘤病人的6.6%,约有50万的新增病例和20万的死亡病例,年轻女性的发病率也呈上升趋势^[1]。人乳头瘤病毒(HPV)是全世界最常见的性传播病毒,研究已经证实,几乎所有宫颈癌都是由高危型HPV持续感染引起的^[2-3]。随着人们对HPV各亚型与宫颈癌发病机制的深入研究,HPV分型检测技术在宫颈癌筛查中的作用越来越受到大家的关注,有研究学者提出将高危型HPV的分型检测作为宫颈癌的筛查方法之一^[4]。因此,本研究通过使用不同的筛查方法分析高危型HPV分型检测在宫颈癌筛查中的应用价值,为高危型HPV分型检测技术的应用提供临床依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2016年6月至2019年6月西安航天医院妇产科收治的疑似宫颈病变病人628例,年龄(38±8)岁,范围为21~64岁。纳入标准:符合美国癌症中心推荐的宫颈癌筛查指南^[5];无子宫切除;无急性生殖道炎症;1个月内无阴道用药。排除标准:合并患有其他系统的恶性疾病;妊娠期妇女;患有精神疾病。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,所有病人均知情同意并签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 HR-HPV DNA PCR检测 (1)取样:首先暴露病人的宫颈,用无菌生理盐水棉球洗去病人的宫颈分泌物,再用特制的采样刷置于宫颈口顺时针旋转5周,以采集足够宫颈脱落细胞,然后将宫颈刷置于预先放有1 mL洗脱液的无菌离心管中送检或暂放于4℃冰箱中保存待检。(2)检测方法:采用ABI公司生产的7500型荧光定量分析检测仪对高危型HPV进行分型检测,检测试剂盒购自上海之江生物有限公司,可检测包括HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59及68型在内的13种HPV亚型。(3)操作方法:严格按照试剂盒和仪器使用说明书进行规范操作。

1.2.2 液基薄层细胞(TCT)检测 样品采集方法同上,采用特制采样刷在宫颈口按同一方向旋转5~8圈,将刷取的宫颈细胞保存于细胞保存液中。使用美国TriPath Imaging公司生产的Prep 2000型自动制片染色机制成薄层细胞涂片,在显微镜下镜检观察。细胞学诊断标准采用2001年国际癌症协会推荐的子宫颈细胞学分类系统(TBS),镜检的结果分为5个层次,分别是未见上皮内病变或恶性病变(NILM)、不典型鳞状细胞(ASCH)、低度鳞状上皮内

病变(LSIL)、高度鳞状上皮内病变(HSIL)、宫颈癌^[6]。所有的TCT涂片结果均由两名专业的病理学医师进行独立阅片和诊断报告。

1.2.3 组织病理检查 将阴道镜下组织病理学诊断的最终结果视为宫颈病变的“金标准”。诊断标准参照第4版《WHO女性生殖器官肿瘤分类》,将诊断结果分为:正常或慢性子宫颈炎,宫颈上皮内瘤变(CIN)I级,CIN II级、CIN III级和宫颈癌^[7]。所有标本的病理诊断均由两名专业的病理学医师进行独立阅片和诊断报告。

1.3 评价指标 HR-HPV DNA PCR检测根据标准的计算方法,将结果中RLU/CO>1视为阳性。TCT检测中将病变程度为ASCH及以上视为阳性。组织病理检查结果将病变程度为CIN I级及以上视为阳性。以组织病理检查结果作为“金标准”,计算和比较HR-HPV DNA PCR检测和TCT检测两种方法的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和符合率等。

1.4 统计学方法 采用SPSS 20.0软件对实验数据进行统计学分析,用百分比表示计数资料,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理检测结果 对628例疑似子宫颈病变病人进行病理组织检测,结果发现正常或炎症的病人有264例,子宫颈鳞状上皮异常的病人364例,其中CIN I级117例,CIN II级128例,CIN III级81例,宫颈癌38例,阳性率为57.96%。

2.2 高危型HPV分型检测结果 高危型HPV分型检测出阳性病例357例,与病理诊断结果对比发现,真阳性为334例,检出率为53.18%(334/628)。见表1。

表1 疑似子宫颈病变628例高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)分型检测结果/例

HR-HPV	病理诊断					合计
	正常或炎症	CIN I	CIN II	CIN III	宫颈癌	
阴性	241	20	7	3	0	271
阳性	23	97	121	78	38	357
合计	264	117	128	81	38	628

注:CIN为宫颈上皮内瘤变。

2.3 TCT筛查结果 TCT检测出阳性病例387例,与病理诊断结果对比发现,真阳性病例244例,其中ASCH病人73例,LSIL病人82例,HSIL病人57例,宫颈癌病人32例,检出率为38.85%(244/628)。见表2。

2.4 高危型HPV分型检测和TCT诊断效能比较

表2 疑似宫颈病变628例TCT筛查结果/例

TCT	病理诊断					合计
	正常或炎症	CIN I	CIN II	CIN III	宫颈癌	
阴性	121	44	46	24	6	241
阳性	143	73	82	57	32	387
合计	264	117	128	81	38	628

注:TCT为液基薄层细胞,CIN为宫颈上皮内瘤变。

高危型HPV分型检测在宫颈癌及癌前病变筛查中的灵敏度,特异度,阳性预测值,阴性预测值,符合率均显著高于TCT检测方法($P < 0.001$)。见表3。

2.5 高危型HPV各亚型与宫颈癌及癌前病变的相关性 将13种HPV亚型与宫颈癌及癌前病变进行相关性回归分析,结果表明,16、18型HPV在宫颈癌病变中的感染率最高,33、52及58型HPV也与宫颈癌的发生密切相关($P < 0.05$)。见表4。

表4 高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)各亚型与宫颈癌及癌前病变的相关性分析

基因分型	Wald值	P值	OR值	95%CI
16	1.968	0.021	10.265	5.179~22.728
18	1.643	0.023	7.548	4.432~18.863
31	0.864	0.086	1.236	0.798~5.341
33	1.521	0.035	5.874	2.384~10.654
35	0.945	0.075	1.914	0.327~4.765
39	0.835	0.083	1.631	0.963~5.349
45	1.051	0.094	1.492	0.845~6.216
51	0.926	0.097	1.781	0.384~2.697
52	1.583	0.035	5.691	2.726~10.845
56	1.147	0.079	1.547	0.463~3.249
58	1.734	0.027	6.864	3.715~15.465

2.6 比较不同年龄阶段HPV感染情况 在接受检测的628例病人中,有357例病人出现高危型HPV感染,总感染率为56.85%。通过比较发现病人的HPV感染率随年龄的增长而增长,而且40岁及以上病人的HPV感染率显著高于20~29岁的年轻病人($P < 0.05$)。见表5。

3 讨论

宫颈癌是发展中国家最常见的妇科癌症之一。在我国女性常见的恶性肿瘤中,宫颈癌发病率也仅次于乳腺癌,每年有超过13万的新增宫颈癌病例和5.3万的死亡人数^[8]。近年来,宫颈癌的发病率有逐

表5 疑似宫颈病变628例不同年龄阶段人乳头瘤病毒(HPV)感染情况的比较/例(%)

年龄	例数	HPV阳性
20~29岁	125	58(46.40)
>29~39岁	146	74(50.68)
>39~49岁	184	107(58.15) ^①
>49~59岁	112	72(64.29) ^②
>59岁	61	46(75.41) ^③
χ^2 值		4.137
P值		0.006

注:①与20~29岁年龄段相比, $\chi^2 = 4.131, P = 0.042$ 。②与20~29岁年龄段相比, $\chi^2 = 7.631, P = 0.006$ 。③与20~29岁年龄段相比, $\chi^2 = 14.100, P < 0.001$ 。

渐上升的趋势,这可能由于各种原因如不安全性行为,初次性交年龄提前,不使用避孕套以及HIV免疫抑制导致的HPV感染有关^[9-10]。在过去研究中发现,几乎所有的宫颈癌都是由特定类型的HPV感染引起的。目前已分离的HPV亚型达100多种,其中最常见的是高危型HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59以及68型^[11]。尽管通过对不同HPV亚型的研究已经开发出了能够预防宫颈癌的HPV疫苗,但由于HPV疫苗不能预防既定感染,也不能预防所有类型的HPV,同时,考虑到发展中国家经济和疫苗普及率等因素,预防和筛查HPV感染仍是防治宫颈癌的主要策略^[12]。

目前,宫颈癌及癌前病变筛查诊断主要有3种方法,即子宫颈细胞学检查,阴道镜检查及组织病理学检查^[13]。TCT法与传统的宫颈刮片巴氏涂片相比,排除了血液、黏液和炎症等因素的干扰,明显提高了标本的质量及宫颈异常细胞检出率。但由于TCT制片及镜检过程都需要凭借专业操作人员的经验,因此,人为因素的干预可能会导致TCT检测结果与病理检测结果的不一致。另外,宫颈癌及癌前病变是多中心的局灶性病变,不同部位病变程度可能不一致,取材不同亦会导致诊断结果的差异性。

宫颈癌是目前唯一确定病因的恶性肿瘤,在HPV慢性感染早期,宫颈癌的发生发展缓慢,多数宫颈癌始终处于不典型增生状态,多数情况下,癌前病变可稳定存在7~10年^[14-15]。研究表明,在宫颈癌及癌前病变早期无病症状态时,即可检测到HPV

表3 疑似宫颈病变628例高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)分型检测和液基薄层细胞(TCT)诊断效能比较/(n/N)

方法	例数	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	符合率
HR-HPV	628	91.76(334/364)	91.29(241/264)	93.56(334/357)	88.93(241/271)	91.56(575/628)
TCT	628	67.03(244/364)	45.83(121/264)	63.05(244/387)	50.21(121/241)	58.12(365/628)
χ^2 值		68.01	126.5	99.71	92.34	186.5
P值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

的感染,而随着病程的不断进展,不同阶段的宫颈癌前病变中 HPV 的病毒载量也会发生改变^[16]。随着科学技术的不断进步,高灵敏度和高特异度的 HPV 分型诊断试剂及相关仪器被发明。2003 年,HC2 检测获得 FDA 批准,它是一种定量检测 HPV 亚型的核酸杂交检测方法,确定了 13 种高危 HPV 类型的存在^[17]。2009 年批准的高危型 HPV 分型检测除了检测到 HC2 检测到的 13 种亚型外,还可检测到 HPV-66 等其他亚型。高危型 HPV 分型检测技术在预防和诊断 HPV 感染的子宫颈癌及癌前病变中扮演着越来越重要的作用。

我们的研究表明,组织病理学检测出 628 例就诊病人中有 364 例发生宫颈癌及癌前病变,阳性率为 57.96%。将病理诊断结果视为“金标准”发现,高危型 HPV 分型法检测出真阳性病人 334 例,检出率为 53.18%,显著高于 TCT 法的 38.85%。然后我们通过比较 TCT 法和高危型 HPV 分型检测的诊断效能,发现高危型 HPV 分型检测在宫颈癌及癌前病变筛查中的灵敏度,特异度,阳性预测值,阴性预测值,符合率均显著高于 TCT 检测方法($P < 0.001$)。这由于两种检测方法的原理不同,TCT 通过检测当前宫颈脱落细胞的病理状态,而 HPV 分型检测从基因组上检测宫颈细胞中 HPV 的分型及病毒载量^[18]。研究表明,15 种高危型 HPV 是导致宫颈癌发生的主要因素,包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73 和 82,其中 16 型和 18 型是致癌性最强的病毒菌株,导致超过 75% 的宫颈癌病例和大多数其他生殖器癌症^[19]。我们的研究结果也发现 16、18 型 HPV 感染与宫颈癌的发生发展密切相关,33、52 及 58 型 HPV 次之。接下来,我们研究了不同年龄阶段 HPV 感染情况,由于年龄的增长,人体的免疫力不断降低,对病毒的抵抗力和抑制力显著下降,我们发现随着年龄的增长,HPV 感染率也逐渐升高。

综上所述,高危型 HPV 分型检测优于 TCT 法,应用高危型 HPV 分型检测不仅对当前宫颈病变的诊断具有指导意义,而且与单独的细胞学相比更好地预测了未来 5~10 年宫颈癌变前的发展,对宫颈癌预防和治疗具有重要意义,值得在临床中做进一步推广。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] 易黎. 妇科门诊妇女 HPV 感染状况及其影响因素研究[J]. 安

徽医药, 2014, 18(4):653-656.

- [3] CASTELLSAGUÉ X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer [J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(3 Suppl 2):S4-7.
- [4] WENTZENSEN N, ARBYN M. HPV-based cervical cancer screening- facts, fiction, and misperceptions [J]. Prev Med, 2017, 98(5):33-35.
- [5] DIVINE LM, HUH WK. Tertiary prevention of cervical cancer [J]. Clin Obstet Gynecol, 2014, 57(2):316-324.
- [6] CHATTERJEE T, GILL SS, RAC R. Standardization of cervical/vaginal cytopathology reporting: the bethesda system (TBS) for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses [J]. Med J Armed Forces India, 2000, 56(1):45-49.
- [7] 沈丹华, 陈定宝. 解读第 4 版 WHO 女性生殖器官肿瘤分类中的变化 [J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(9):717-720.
- [8] DI J, RUTHERFORD S, CHU C. Review of the cervical cancer burden and population-based cervical cancer screening in China [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(17):7401-7407.
- [9] KESSLER TA. Cervical cancer: prevention and early detection [J]. Semin Oncol Nurs, 2017, 33(2):172-183.
- [10] CAMARGO M, RÍO-OSPINA LDEL, SOTO-DE LEÓN SC, et al. Association of HIV status with infection by multiple HPV types [J]. Trop Med Int Health, 2018, 23(11):1259-1268.
- [11] HARPER DM, DEMARS LR. HPV vaccines - A review of the first decade [J]. Gynecol Oncol, 2017, 146(1):196-204.
- [12] HUCHKO MJ, SNEDEN J, SAWAYA G, et al. Accuracy of visual inspection with acetic acid to detect cervical cancer precursors among HIV-infected women in Kenya [J]. Int J Cancer, 2015, 136(2):392-398.
- [13] FANG J, ZHANG H, JIN S. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy [J]. Tumour Biol, 2014, 35(6):5083-5093.
- [14] BASHAW AA, LEGGATT GR, CHANDRA J, et al. Modulation of antigen presenting cell functions during chronic HPV infection [J]. Papillomavirus Res, 2017, 4(5):58-65.
- [15] YOU WZ, LI SC, DU R, et al. Epidemiological study of highrisk human papillomavirus infection in subjects with abnormal cytological findings in cervical cancer screening [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1):412-418.
- [16] HUANG SH, TANG N, MAK WB, et al. Principles and analytical performance of abbot realtime high risk HPV test [J]. J Clin Virol, 2009, 45(suppl 1):S13-S17.
- [17] LIU Y, ZHANG L, ZHAO G, et al. The clinical research of Thin-prep Cytology Test (TCT) combined with HPV-DNA detection in screening cervical cancer [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017, 63(2):92-95.
- [18] LILLSUNDE LARSSON G, HELENIUS G. Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45? - a short report [J]. Cell Oncol (Dordr), 2017, 40(5):521-527.
- [19] PEREZ S, ZIMET GD, TATAR O, et al. Human papillomavirus vaccines: successes and future challenges [J]. Drugs, 2018, 78(14):1385-1396.

(收稿日期:2019-11-14,修回日期:2019-12-05)