

宫颈上皮内瘤变中 HPV 型别、负荷量的研究及 HPV58 型 L1 基因多态性分析

摘要

目的

探讨不同宫颈上皮内瘤病变 (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) 中人乳头瘤病毒 (Human Papillomaviruses, HPV) 基因型及 HPV58 L1 基因序列多态性分析。

探讨宫颈液基细胞学阴性的 HPV 感染与病毒负荷量、年龄因素及宫颈病变程度的关系。

方法

1. (1) 采用薄层液基细胞学 (LCT) 联合 HC2 检测 HPV-DNA 进行宫颈癌机会性筛查, 选取 LCT 及 HPV DNA 检测均为阳性, 且行宫颈锥形切除术后有明确组织病理学诊断者 121 例。宫颈上皮内瘤变 I 级 (CIN1) 35 例, 宫颈上皮内瘤变 II 级 (CIN2) 35 例, 宫颈上皮内瘤变 III 级 (CIN3) 51 例。(2) 行宫颈锥形切除术后将病变组织制成蜡块, 进行切片、制片。(3) 通过高通量和芯片捕获技术检测 121 例标本中感染 HPV 基因型, 并获得 HPV58 的 L1 基因序列。(4) 应用 DNASTar 软件对所得出的序列结果进行比较分析 L1 基因的多态性。

2. 2011 年 5 月至 2012 年 12 月在青岛大学医学院附属医院黄岛院区, 采用薄层液基细胞学 (LCT) 联合 HC2 检测 HPV-DNA 进行宫颈癌机会性筛查, 选取结果为 LCT 阴性、HPV 阳性患者 575 例, 全部行阴道镜下宫颈活检且有病理诊断。比较年龄、HPV 病毒负荷量及病变级别之间的关系。

结果

1. 121 例不同级别宫颈上皮内瘤变中, 检出 HPV 共 79 例, 阳性检出率是 (79/121) 65.29%。79 例 HPV 检出患者中, 58 例单一型别感染, 检出率是 (58/79) 73.42%, 21 例多重感染, 检出率是 (21/79) 26.58%。单一感染中, HPV16 检出率最高, 为 (31/58) 53.45%, 其次是 HPV58, 检出率为 (10/58) 17.24%。多重感染中, 以 HPV58 和 HPV16 的多重感染为主, 其中 10 例包含 HPV58, 检出率为 (10/21) 47.62%, 11 例包含 HPV16, 检出率为 (11/21) 52.38%。HPV58+HPV16 检出率最高, 为 (4/21) 19.05%, 其次是 HPV16+HPV33, 检出率为 (2/21) 9.52%。

2. 20 例 HPV58 阳性标本中, 全部测出 L1 基因序列, 存在 6 个突变位点, 分别是 nt6014、nt6325、nt6359、nt6411、nt6416、nt6433。其中 nt6014、nt6359 位



点变异导致所编码的氨基酸发生改变。且 nt6433 位点 A/G 突变存在于全部 20 例标本中，提示可能具有地域性特点。

3. 575 例患者中宫颈活检病理诊断宫颈浸润癌 1 例，CIN3、CIN2、CIN1 分别为 26 例、17 例、46 例，慢性宫颈炎 485 例。30-49 岁组 $\geq$ CIN3 的患病风险是 $\geq$ 50 岁组患者的 1.556 (0.357-6.776) 倍；HPV 病毒高负荷量组的患病风险是低负荷量组的 2.017 (0.760-5.350) 倍。30-49 岁年龄段组 HPV 病毒低、中、高负荷量者 $\geq$ CIN2 的患病率分别为 3.2%、8.4% 和 10.5% ($\chi^2=6.684$, $P=0.0009$)，差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。说明，在 30-49 岁年龄段， $\geq$ CIN2 发生率随着 HPV 病毒负荷量升高有上升趋势。

结论

1. 不同级别宫颈上皮内瘤变中 HPV 感染主要型别为 HPV16 型及 HPV58 型，其中 HPV58 型的 L1 基因存在多个突变位点。

2. 在 LCT 阴性、HPV 阳性患者中，30-49 岁年龄组高度病变患病率明显增加，且病毒负荷量越高，其患病率越高。由此提示，临床上 30-49 岁年龄段妇女，HPV 负荷量 $\geq$ 100RLU/CO，及时的阴道镜检查，发现可疑病变行宫颈活检，能够有效地进行宫颈病变及宫颈癌的尽早发现和及时治疗，预防病变进展。

硕士研究生：崔虹飞（妇产科）

指导教师：戴淑真 教授

【关键词】人乳头瘤病毒；宫颈病变；L1 基因；基因多态性；病毒负荷量

The study of the HPV types and virus load in cervical intraepithelial neoplasia and analysis of the mutations of HPV58 L1 gene

Abstract

Objective

1. To investigate the genotype of HPV in different cervical intraepithelial neoplasia lesions and the gene polymorphism of L1 gene of HPV58 type.

2. To discuss the relation of HPV load, the patients' age and cervical lesions in the patients who have a negative Liquid-Based Cytology and positive HPV.

Methods

1. (1)121 women with positive HPV and positive cytology, who were performed conization of cervix and histopathological diagnosis were analysed, including the CIN1 in 35 cases, CIN2 in 35 cases and CIN3 in 51 cases.(2) With the method of the paraffin sections, the diseased tissues in cervical conization were taken into slicing and slide preparation.(3) The high-throughput sequencing and chip capture technology were used to detect the genotype of HPV in the 121 cases, and to obtain the L1 gene sequence of HPV58.(4) Using the DNASTar to compare and analyse the sequence results and the L1 gene polymorphism of HPV58 type.

2. 575 women with positive HPV and negative cytology, who were performed colposcopic indicated biopsy and histopathological diagnosis in the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College between 2011.5 and 2012.12, were analysed.

Results

1. 79(65.29%) were positive for HPV in the 121 cases of different CIN. 58(73.42%) were infected with single type of HPV, and 21 (26.58%) with mixed type of HPV among the 79 HPV positive cases. Among the 58 infected with single type of HPV, HPV 16 (53.45%)was predominated, and followed by HPV 58(17.24%). Among the 21 infected with mixed type of HPV, HPV58 (47.62%) and HPV16 (52.38%) were the main genotypes. Moreover, HPV58+HPV16 (19.05%) was predominated, and followed by HPV16+HPV33 (9.52%).

2. In the 20 cases of HPV58, all of them were detected the L1 gene sequence . Sequencing analysis showed the single nucleotide polymorphism at 6 sites of L1 gene, nt6014、nt6325、nt6359、nt6411、nt6416、nt6433. Besides, nt6433 site A/G mutation exists in all 20 cases of specimens. The conclusion is the mutation was likely to have regional characteristics.

3. The histopathological diagnosis of the 575 women were 1 invasive cancer, 26 of CIN3, 17 of CIN2, 46 of CIN1 and 485 of chronic cervicitis. Between 30-49 age group and ≥ 50 age group, the odds ratio was 1.556(0.357-6.776),and between high HPV load group and low HPV load group was 2.017(0.760-5.350). In the 30-49 age group, the prevalence rate of $\geq$ CIN2 in low, median, high HPV load group was 3.2%,8.4%,10.5% ($\chi^2=6.684, P=0.0009$) respectively, and it showed a significant difference($P<0.001$).

Conclusion

1. The main HPV types are HPV16 and 58 in different levels of cervical intraepithelial neoplasia , and the L1 gene of HPV58 type has multiple mutations.

2. The prevalence rate of women with positive HPV and negative cytology, who are in the 30-49 age group increased significantly and the higher HPV load, the prevalence is higher. Consequently , HPV load and age of patients' determined whether to be performed colposcopy to improve the detection rate of the CIN and cervical cancer effectively.

Postgraduate student: Cui Hongfei(Obstetrics and Gynaecology)
Directed by Prof. Dai Shuzhen

[Key Words] Human papillomavirus ; Cervical lesions ; L1 gene ; Gene polymorphism; Virus load

目录

引言.....	1
第一部分宫颈上皮内瘤病变中 HPV 基因型及 HPV58L1 基因序列多态性分析...	3
第一章 材料与方法.....	3
1.1 标本收集.....	3
1.2 主要仪器和试剂.....	3
1.2.1 主要仪器.....	4
1.2.2 试剂.....	5
1.3 方法.....	5
1.3.1 主要试剂的配制.....	5
1.3.2 宫颈冷刀锥切术.....	5
1.3.3 标本蜡块、切片的制备及阅片.....	5
1.3.4 高通量基因测序和芯片捕获.....	5
1.3.4.1 蜡块组织 DNA 提取.....	5
1.3.4.2 基因组 DNA 打断.....	5
1.3.4.3 文库构建.....	5
1.3.4.4 芯片杂交, 捕获和洗脱.....	5
1.3.5 基因序列纯化及测序.....	6
1.3.6 统计学分析.....	6
第二章 结果.....	6
2.1 宫颈上皮内瘤变与 HPV 基因型.....	6
2.2 HPV58 L1 基因多态性.....	8
第三章 讨论.....	8
3.1 HPV 基因型别.....	8
3.2 HPV 病毒及 L1 基因.....	9
第四章 结论.....	11
第二部分 单纯 HPV 感染与负荷量、年龄及宫颈病变关系的研究.....	12
第一章 材料与方法.....	12
1.1 研究对象.....	12
1.2 分组.....	12
1.3 HPV DNA 检测.....	13
1.4 薄层液基细胞学检测.....	13
1.5 阴道镜下宫颈活检.....	13

1.6 统计学分析.....	13
第二章 结果.....	13
2.1 HPV 病毒负荷量与年龄的患病风险.....	13
2.2 30-49 岁年龄组 HPV 负荷量与 CIN 级别关系.....	13
2.3 HPV 病毒负荷量与年龄在慢性宫颈炎中的关系.....	14
第三章 讨论.....	16
3.1 HPV 负荷量与 CIN 级别的关系.....	16
3.2 年龄与 CIN 的关系.....	16
3.3 LCT 联合 HPV 检测筛查的诊断价值.....	17
第四章 结论.....	18
参考文献.....	19
综述.....	22
攻读学位期间的研究成果.....	31
致谢.....	32
学位论文独创性声明.....	33
学位论文知识产权权属说明.....	34

引言

宫颈癌是全球女性中，第三大常见的恶性肿瘤，仅 2008 年一年之中，就诊断出 529,000 例新发病例^[1]。在中国，宫颈癌每年的新发病例高达 13.15 万，在世界范围内的宫颈癌新发病例中占的 28.8% 之多，宫颈浸润癌的患病率居我国妇女恶性肿瘤第 1 位。宫颈癌从发病到发展为浸润癌需要很长的一段时间。这个发展为浸润癌的过程伴随着细胞学、组织病理学及基因等各方面的变化，宫颈上皮内瘤变是典型的宫颈浸润癌的癌前病变。这种先驱阶段通常不伴随明显症状，持续 10-20 年之久^[2]。人乳头瘤病毒（HPV）是引起宫颈癌及癌前病变最重要的独立因素^[3]。HPV 检测与细胞学方法联合应用进行宫颈癌的初筛已得到认可，不仅有效降低细胞学检查的假阴性率，亦为制定筛查间隔时间、决定是否进一步行阴道镜检查提供了重要依据。但是，随着宫颈病变筛查广泛开展以来，出现了大量 HPV 阳性而细胞学无异常改变的病例^[4]。

根据 HPV 致病力，将 HPV 病毒分为低危型（LR-HPV）和高危型（HR-HPV）。在已发现并报道的 200 多种 HPV 基因型、亚型及变异体^[5]中，大约有 15-20 种类型的 HPV 与癌症有关，其中 HPV16, 18, 52, 58 等型别引发宫颈癌的概率大约为 80%^[6-8]。地区性差异和不同程度的宫颈病变差异是 HPV 基因型分布具有的显著特点。Pavani 等^[9]的研究显示印度部分地区宫颈癌中，主要的 HR-HPV 分布为 HPV16, 18, 33, 35, 45, 52, 58, 59, 73（按由多到少的顺序）。在我国，HPV16 在宫颈鳞状细胞癌中最为常见，HPV58 仅次于 HPV16 排在第二位。石菊芳等^[10]对深圳市妇女进行了 HPV 感染的调查，结果显示不同地域 HPV 型别的差异。Marinko 等^[11]对瑞士地区的细胞病理学异常的患者进行 HPV 感染研究，结果显示，LSIL 中，最常见 HPV 基因型是 HPV16, 31, 58, 51, 52, 31, 56；HSIL 中，最常见的基因型是 HPV16, 18, 31, 52, 58。

宫颈癌及宫颈病变在预防和治疗上的困难重重，重要的原因之一就是 HPV 的地区性分布差异和不同程度宫颈病变间的差异。因地制宜地研究 HPV 基因型分布，研究不同级别宫颈病变中不同基因型间的互相影响，对将来预防、消除 HPV 感染，治疗宫颈癌及宫颈上皮内瘤变具有重要意义。

HPV 是二十面体对称结构，属于球形 DNA 病毒，包含小双股环状 DNA 病毒，无包膜。8 个开放阅读框架（ORF）和上游调控区组成 HPV 病毒的基因组，全长约 8000 bp。上游调控区在早期基因和晚期基因之间，所含的调控元件，在病毒的复制、转录等过程中起调控作用^[12]。开放阅读框架包括早期基因和晚期基因，晚基因包括 L1、L2，L1 基因编码 L1 蛋白，是 HPV 病毒的主要衣壳蛋白，L2 基因编码 L2 蛋白，是 HPV 病毒的次要衣壳蛋白。HPV L1 编码的 L1 蛋白是一种糖蛋白，其结构相对保

守，在侵入宿主体内后，作为主要的特异性抗原，引起机体的免疫反应。L1 蛋白具有自行组装病毒样颗粒的特性，这种病毒颗粒表面上存在中和表位，可以引起宿主产生细胞免疫^[13]。除此以外，还可以诱导产生中和抗体，用来制备 HPV 疫苗。现在的 Cervarix 二价 HPV16、18、31、33 及 45 型预防性疫苗，有效保护率在 90% 以上^[14]。预防性疫苗的主要成分是 L1，不同地区的 HPV L1 基因序列多态性决定了其编码的 L1 蛋白的多态性，不同型别 HPV 的感染需要针对性的疫苗进行预防。

本研究分为两个部分，第一部分旨在通过高通量基因测序及 L1 基因序列多态性研究，分析不同级别宫颈上皮内瘤变中主要感染型别，以及了解 HPV58 型 L1 基因序列与宫颈上皮内瘤变的关系，从而对主要 HPV 型别的疫苗引进和研制提供依据。第二部分旨在研究讨论细胞学正常而 HPV 阳性的不同级别宫颈病变与 HPV 病毒负荷量和年龄的关系，从而判断 HPV 病毒负荷量及年龄对单纯 HPV 阳性妇女在临床上的诊断价值，这对病情的诊断和治疗，以及病情变化的监测具有十分重要的意义。

第一部分 宫颈上皮内瘤病变中 HPV 基因型

及 HPV58 L1 基因序列多态性分析

宫颈癌是威胁广大女性生命健康的巨大杀手，随着各种宫颈癌筛查手段管理规范化，以及相应的细胞、组织病理学科地快速发展，使宫颈癌及癌前病变得到了及时发现和有效治疗。目前，近 200 余种型别的 HPV 被发现，其中有 15-20 种型别与肿瘤有关。流行病学分析表明，HPV16、58 感染在中国地区较为常见。本研究对 HPV 型别进行鉴定，并通过对 HPV58 L1 基因序列分析，了解 58 型 L1 基因序列特点，为 HPV 预防性疫苗的研究提供理论基础。

材料与方法

1.1 标本收集

2009 年 1 月至 2011 年 12 月在青岛大学医学院附属医院，采用薄层液基细胞学 (LCT) 联合 HC2 检测 HPV-DNA 进行宫颈癌机会性筛查，选取 LCT 及 HPV DNA 检测均阳性，且行宫颈锥形切除术后有明确组织病理学诊断者 121 例，年龄 23-69 岁。宫颈上皮内瘤变 I 级 (CIN1) 35 例，宫颈上皮内瘤变 II 级 (CIN2) 35 例，宫颈上皮内瘤变 III 级 (CIN3) 51 例。所有选定研究的患者均长期居住在青岛地区，都拥有完整临床资料，且所有病例既往无 CIN 病史及宫颈锥切病史，无全子宫切除和盆腔放疗病史。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 主要仪器

仪器名称	生产厂家
NanoDrop ND-8000	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
台式高速冷冻离心机	德国 Eppendorf
台式高速离心机 /5115D	德国 Eppendorf
PCR 扩增仪	Bio-Rad
水浴锅	北京方通达
掌式离心机	海门市麒麟医用
Thermomixer	Eppendorf 公司

荧光定量 PCR 仪	美国 ABI
Nanodrop	Invitrogen
数控干浴器	美国 Labnet AccuBlock
Agilent 2100	Agilent
Covaris 打碎仪	Covaris
Qubit Fluorometer	Invitrogen
NanoDrop 1000	美国 Thermo Fisher Scientific 公司

1.2.2 试剂

名称	厂商
DNA 聚合酶(2.5U)	天根生化科技(北京)有限公司
Complete PCR Reagent 试剂盒	美国 Sequenom 公司
iPLEX Gold Reagent 试剂盒	美国 Sequenom 公司
Spectro CHIP Arrays and Clean Resin 试剂盒	美国 Sequenom 公司
TaKaRa Ex Taq Hot Start Version	TaKaRa
DNA Purification kit 过柱纯 化试剂盒	QIAGEN
PCR Purification System 450ml kit	Agencourt
T4 Polynucleotide Kinase	Enzymatics
T4 DNA Polymerase	Enzymatics
Klenow Fragment	Enzymatics
dNTP Solution Set	Enzymatics
Klenow (3' -5' exo-)	Enzymatics
T4 DNA Ligase (Rapid)	Enzymatics
QIAquick PCR Purification Kit 回收纯化	QIAGEN
MiniElute PCR Purification Kit	QIAGEN
Ampure Beads	Beckman Coulter Genomics
10x Polynucleotide Kinase Buffer	Enzymatics
P1 block(1000uM)	Invitrogen
25 mM dATP	GE

常用试剂：二甲苯、甲醛、0.01M 柠檬酸盐缓冲液、0.1M 磷酸盐缓冲液 (PBS)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、苏木素复染剂、双氧水、蒸馏水等。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂的配制

(1) 75%乙醇：按体积比配制灭菌蒸馏水及无水乙醇。

(2) 1M Tris-HCl (pH7.5)：将 121.1g Tris 碱加入 800ml 蒸馏水中，用盐酸 (约需 60ml) 调 pH 值至 7.5，待溶液冷却至室温后加灭菌蒸馏水至 1L。

(3) 0.5M EDTA(pH8.0)：将 146.1g 无水 EDTA 加入 800ml 蒸馏水中，用 NaOH 颗粒 (约需 20g) 调 pH 值至 8.0，最后加灭菌蒸馏水至 1L。

(4) TE 缓冲液 (pH8.0)：终浓度 100mM Tris-Cl (pH8.0)，10mM EDTA (pH8.0)。配置 100ml TE：1M Tris-HCl，10ml，0.5M EDTA，2ml，加水至 100ml。

(5) 1.5M NaCl：称取 NaCl 87.66g，灭菌蒸馏水定容至 1L。

(6) DEPC 水：DEPC 1ml+灭菌蒸馏水 999ml。

1.3.2 宫颈冷刀锥切术。一般切除宽度应在病灶外 0.5cm，锥高延至颈管 2~2.5cm，切除鳞柱交界。

1.3.3 标本蜡块、切片的制备及阅片。锥切标本均行石蜡包埋、切片及染色，3 名病理科医生交叉阅片行病理诊断。

1.3.4 高通量基因测序和芯片捕获

1.3.4.1 蜡块组织 DNA 提取：使用石蜡组织 FFPE 样本 Magen 试剂盒提取 DNA，完全按照试剂盒要求完成实验操作。提取完成后使用 nanodrop 检测提取质量。

1.3.4.2 基因组 DNA 打断：取 2ug 样品，将体积补充到 100ul。用 microTube (6×16mm) 管在 Covaris S2 上将样品打断，保证打断后主带在 200bp-300bp。

1.3.4.3 文库构建：使用 Illumina 提供的建库方式，每个样品单独完成建库。用 T4 DNA Polymerase、Klenow DNA Polymerase 和 T4 PNK 将上一步打断产物的 5' 端和 3' 端修复成平末端；再进行 3' 端重新加“A”，之后末端带有“T”碱基的特殊接头被连入产物两端，再通过 10 个循环数的 PCR 将 8bp 的 index 序列加入到目的片段上去，磁珠纯化后即完成文库的制备。建好的文库用 Agilent 2100 检测，若片段主峰范围在 280bp - 500bp，则为合格文库。

1.3.4.4 芯片杂交，捕获和洗脱：每个文库取 500ng，将 6 个不同的文库 pooling 成一个总文库。每个总文库和 mygenostics 的 GenCap Reagent Kit 试剂进行杂交反应 22 个小时。杂交完成后按照试剂盒要求用 Myone beads C1 将探针富集洗脱，再经过 15 个 cycle 的 PCR 扩增进一步增加文库量。

1.3.5 基因序列纯化及测序服务由深圳华大基因研究院提供。利用 DNA、DNASIS 软件对所得出的序列结果进行比较分析 L1 基因的多态性。

1.3.6 统计学分析：采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。计数资料的组间比较采用 χ^2 检验。P<0.05，有统计学意义。

结果

2.1 宫颈上皮内瘤变与 HPV 基因型

如表 2.1 所示，121 例标本中，共检测出 79 例 HPV 阳性标本，阳性检出率为 (79/121) 65.29%。如图 2.1 所示，检出基因型共 13 种，包括 12 种 HR-HPV：16，18，31，33，39，45，51，52，56，58，59，66，以及 1 种 LR-HPV：HPV11。其中 HPV16 共 42 例，检出率最高，为 (42/79) 53.16%，其次是 HPV58，共 20 例，检出率为 (20/79) 25.32%。单一型别感染 58 例，多重感染（双重及以上）21 例，检出率分别为 (58/79) 73.42% 和 (21/79) 26.58%。CIN1、2、3 三组 HPV 检出率分别为 45.71%、60%、82.35%，三组之间两两比较，差异无统计学意义。而 HPV16 在三组中的检出率分别为 5.71%、20.00%、62.75%，两两比较，CIN1 和 CIN3，CIN2 和 CIN3 之间差异具有统计学意义 (P<0.001)，而 CIN2 和 CIN3 之间比较，差异无统计学意义。HPV58 在三组中的检出率分别为 14.26%，20.00%、15.69%，三组之间两两比较，差异不具有统计学意义。

表 2.1 宫颈上皮内瘤变与 HPV

HPV 型别	CIN1 (n=35)	CIN2 (n=35)	CIN3 (n=51)	合计 (n=121)
HPV16	1 (2.86)	5 (14.29)	25 (49.02)	31 (25.62)
HPV58	2 (5.71)	5 (14.29)	3 (5.88)	10 (8.26)
HPV33	1 (2.86)	1 (2.86)	2 (3.92)	4 (3.31)
HPV52	3 (8.57)	0	0	3 (2.48)
HPV56	2 (2.86)	1 (2.86)	0	3 (2.48)
HPV31	0	1 (2.86)	1 (1.96)	2 (1.65)
HPV66	1 (2.86)	1 (2.86)	1 (1.96)	3 (2.48)
HPV51	0	1 (2.86)	0	1 (0.83)
HPV11	0	0	0	0
HPV18	0	0	1 (1.96)	1 (0.83)
HPV39	0	0	0	0
HPV45	0	0	0	0
HPV59	0	0	0	0
HPV58+HPV16	0	0	4 (7.84)	4 (3.31)

结果

HPV16+HPV33	0	0	2(3.92)	2(1.65)
HPV11+HPV33	0	1(2.86)	0	1(0.83)
HPV16+HPV18	0	0	1(1.96)	1(0.83)
HPV16+HPV31	1(2.86)	0	0	1(0.83)
HPV16+HPV52	0	1(2.86)	0	1(0.83)
HPV18+HPV39	1(2.86)	0	0	1(0.83)
HPV18+HPV52	0	1(2.86)	0	1(0.83)
HPV58+HPV18	1(2.86)	0	0	1(0.83)
HPV58+HPV33	0	1(2.86)	0	1(0.83)
HPV58+HPV51A	1(2.86)	0	0	1(0.83)
HPV58+HPV52	1(2.86)	0	0	1(0.83)
HPV58+HPV66	0	1(2.86)	0	1(0.83)
HPV51+HPV31	0	0	1(1.96)	1(0.83)
HPV16+HPV18+HPV58	0	0	1(1.96)	1(0.83)
HPV16A+HPV45A+HPV66A	0	1(2.86)	1(1.96)	1(0.83)
HPV45A+HPV56A+HPV59A2	1(2.86)	0	0	1(0.83)
阴性	19(54.29)	14(40.00)	9(17.65)	42(34.71)
合计	35	35	51(17.65)	121(100)

注：单一型别顺序按照从多到少依次排列。单一型别与多重感染计数无重叠。

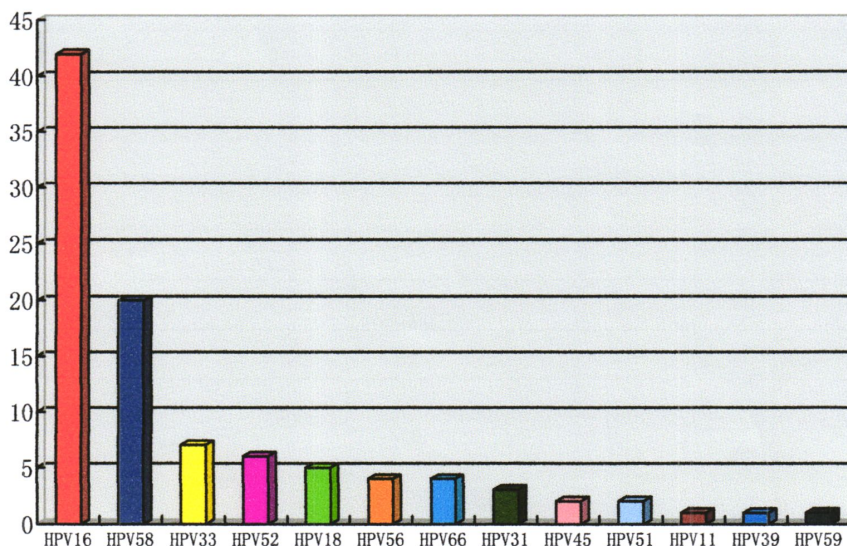


图 2.1 HPV 型别计数统计

注：图中每种型别 HPV 计数包含单一感染和双重感染交叉部分。

2. 2HPV58 L1 基因多态性

20 例 HPV58 L1 进行基因序列分析后, 存在 6 个变异位点, 分别是 nt6014、nt6325、nt6359、nt6411、nt6416、nt6433。其中 nt6014、nt6359 位点变异导致所编码的氨基酸发生改变。且 nt6433 位点 A/G 突变存在于全部 20 例标本中。(详见表 2.2) HPV58 L1 基因变异位点在 CIN1, 2, 3 三组中分布情况: 其中 nt6014 (A/C)、nt6359 (A/G) 在 CIN3 中的变异率与 CIN1 和 CIN2 两两比较, 差异不具有统计学意义。其余各位点的变异率在 CIN1、2、3 中差异无统计学意义。

表 2.2 宫颈上皮内瘤变中 HPV58 L1 基因多态性

HPV 型别	基因位点	变异位点	氨基酸变异	例数 (例) / 百分比 (%)
HPV58	6014	A/C	Leu / Phe	7 (35.00)
	6325	T/G	无 ^a	3 (15.00)
	6359	A/G	Ile / Met	5 (25.00)
	6411	T/C	无	1 (5.00)
	6416	A/G	无	3 (15.00)
	6433	T/C	无	20 (100)

注: a 表示位点变异引起的氨基酸变化为同义突变。

讨论

HPV 是宫颈上皮内瘤变发展过程中的始动因素。尽管女性频繁地暴露于 HPV 的危险因素中, 但最终发展为宫颈癌的比率仍极低。大多数低级别病变如 CIN1 不需要任何治疗, 只需定期复查观察病情变化, 最终自然转归。有研究显示, 患 CIN1 的妇女, 其转归率达 70-80%, 而青少年及 <25 岁的青年女性, 转归率超过 90%^[15-16]。相对而言, 高级别病变如 CIN3, 尤其是 CIN2, 并不是所有的都会持续发展, 称之为真正的癌前病变。尽管 HPV 能够加快癌前病变进展的速度, 但即使是高危型 HPV 感染, 进展为浸润性癌症的时间也需要 25-30 年^[17]。所以, 在宫颈上皮内瘤变期间有时间完成提高 HR-HPV 检出率, 预测病变进展风险和积极治疗的任务。

3. 1HPV 基因型别

分子生物学技术正在不断向前发展, 目前已发现并报道了超过 200 种的 HPV 基因型, 亚型和变异体^[18], 其中, 超过 20 种型别与生殖道感染有关。根据其致病力的大小, 分为高危型 (癌相关型, HR) 和低危型 (非癌相关型, LR) 两种, 低危型主要包括 HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, cp6108 等, 低危型主

要与生殖道肛周皮肤和阴道下部的外生性湿疣类病变、扁平湿疣类病变和 CIN1 等密切相关, 这些病变多可自行转归, 几乎见不到 LR-HPV 感染所致的 CIN3 或浸润性癌; 高危型主要为 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 等, 主要导致 CIN2、3 和癌的发生, 多不能自行转归, 病情进展多不能逆转^[19]。本研究结果显示, 检测出的 HPV79 例标本中, 只有 1 种低危型 HPV 感染, 即 HPV11, 且此标本为包含高危型 HPV33 的多重感染, 其余均为高危型 HPV 感染。这与国内外关于高危型和低危型 HPV 感染在不同级别宫颈上皮内瘤变的报道相似^[20-21]。

不同地区 HPV 的人群感染率不同, 所携带的型别不同, HPV16 和 18 是全球公认的浸润性宫颈癌中最常见的两种基因型。然而在我国, 1996 年中国医学科学院肿瘤研究所在全国范围进行宫颈癌筛查, 检测 HPV 型别结果, 感染率 53.5%, 其中最高为 HPV16(31.9%), 其次为 HPV58(7.6%)。这与本研究的结果基本一致。国内多个地区进行的 HPV 筛查结果均显示当地 HPV 感染的主要型别是 HPV16 型和 HPV58 型, 与欧美国家地区的主要型别 HPV16 型 HPV18 型不同^[22]。不同级别的宫颈上皮内瘤变所感染的 HPV 型别也存在差异性。从本研究的结果分析, 在 CIN1, 2, 3 三组中, 随着级别的增高, HPV16 型感染率逐渐增高。而 HPV58 型在三组间比较无差异。Adriana 等^[23]对坦桑尼亚地区的随访研究显示, 组织病理学中, 高级别病变 CIN2, 3 级的患者, 常见感染的类型是 HPV53, 58, 而低级别病变 CIN1 则是 HPV35, 45 常见。所有 CIN1 和 93% CIN2, 3 级患者均存在 18, 26, 35, 45, 51, 53, 56, 59 或 66 多重(包括两种和两种以上 HPV 型别)感染。而对照组和细胞学或活检正常的患者中, HPV 阳性率仅 14%, 阳性中多重感染率高达 90%, 且其基因型与 CIN 相同。

由此可见, 确定宫颈病变中感染的 HPV 型别不仅对诊断, 治疗和预后十分必要, 更重要的是 HPV 疫苗的研制需要 HPV 型别给予指导。全球范围内, 以不同地区、不同型别 HPV 感染为基础, 展开免疫预防行动。

3.2 HPV 病毒及 L1 基因

HPV, 称人乳头瘤病毒, 是一类具有种属特异性的嗜上皮病毒, 病毒基因组分子量约为 5×10^6 , 是 7.9kb 的双链环状 DNA, 其中一条是有意链, 含有 3 个基因区: (1) 早期区 (Early region, E 区) 含有 8 个开放读码框架 (E1-E8), 编码与病毒复制、转录调控有关的蛋白和细胞转换蛋白 (E5、E6、E7)。其中 E6 和 E7 基因编码的 E6、E7 蛋白具有刺激细胞生长进而引起宫颈上皮细胞永生化的特点。(2) 晚期区 (Late region, L 区) 包含 2 个晚期读码框架, 编码 2 种衣壳蛋白, 主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2, 组装成 HPV 的衣壳。(3) 非转录区, 又名上游调控区 (URR), 含有 HPV DNA 的复制起点和基因表达所必需的调控元件。

用基因工程技术表达的 L1 (或 L1+L2) 蛋白可在相应宿主细胞中组装成病毒

颗粒 (virus-like partical, VLP)。HPV 感染宿主细胞后以游离状态引起细胞感染, 首先潜伏于基底细胞层, 其 DNA 作为独立的外源染色体游离于细胞核内, 自身复制 DNA 和 RNA, 转录合成蛋白质。HPV 的衣壳蛋白 L1 或 L1+L2 具有自我组装的特性。预防性疫苗主要通过诱导有效的体液免疫应答来抵抗 HPV 感染, 预防性疫苗以 HPV 晚期结构蛋白 L1、L2 诱导引发特异性抗体, 用基因工程技术表达的衣壳蛋白 L1 和 L2 可在宿主细胞中能组装成病毒外壳样结构, 即病毒样颗粒 (virus like particles, VLP), VLP 不含病毒核酸, 其空间构象及免疫原性与天然 HPV 颗粒相似, 抗原性强, 能有效诱导中和抗体^[24]。经由体液免疫应答反应, 使特异性抗体结合病毒包膜抗原, 破坏病毒进入宿主细胞, 是预防性疫苗预防感染的途径, 显然, 预防性 HPV 疫苗靶抗原是 HPV 的衣壳蛋白 L1、L2 及其结合物。L1 编码的 L1 衣壳蛋白通过与机体免疫细胞及免疫物质结合, 形成了免疫复合物, 免疫复合物通过激活自身免疫反应形成抗体, 进而杀死受病毒感染的细胞。研究证明, HPV 病毒的预防性疫苗能有效预防 HPV 感染^[25-26], 并能减少 70% 左右的宫颈癌发生^[27]。现阶段的预防性疫苗就是通过上述原理, 主动刺激人类免疫系统, 产生抗体, 抵御病毒。L1 基因位点的变异会造成相应编码区的氨基酸的改变, 从而引起抗原表位的改变, 最终导致宿主的免疫细胞不能识别和清除被 HPV 感染的细胞, 进而使病变发展。本研究结果 HPV58 L1 共有 6 处变异, 2 处变异相对应编码的氨基酸发生改变, 即 nt6014 (A/C)、nt6359 (A/G) 变异分别导致 Leu (亮氨酸) → Phe (苯丙氨酸), Ile (异亮氨酸) → Met (甲硫氨酸), 其余均为同义突变。结果与国内外报道的某些位点相同^[28-29]。其中 nt6433 位点 A/G 突变在全部 20 例 HPV58 感染中都存在, 提示此点可能是有地域性特点的变异, 但此位点变异属同义突变, 相应氨基酸并没有发生变化, 由于 HPV58 感染标本较少, 对于此点是否为青岛地区特有, 需要大样本研究证据支持。HPV58 型与 HPV16 L1 的基因同源性在 60% 以上, 这预示着 HPV58 和 HPV16 L1 引起的宿主机体的抗体存在交叉免疫结合反应的可能性。有相关研究证明, HPV16 L1 蛋白某些位点突变对重组蛋白表达量、组装病毒样颗粒影响很大^[30]。王丽娜^[31]等研究显示, 抗 HPV58 L1 抗体仅对 HPV58 显示出中和作用, 而不能抑制 HPV16 的感染活性。本研究 HPV58 L1 基因的位点变异对表达的 L1 蛋白的空间构象、亲水性, 以致免疫学活性是否具有影响, 仍需大量样本及进一步血清免疫学研究证实。

结论

本研究中不同级别宫颈上皮内瘤变中 HPV 感染主要型别为 HPV16 及 HPV58 型，HPV58 L1 基因存在多个突变位点，且在所有 HPV58 阳性标本中均存在其 L1 基因 nt6433 位点 A/G 突变，呈现地域性倾向。

第二部分 单纯 HPV 感染与负荷量、年龄及宫颈病变关系的研究

在中国，宫颈癌每年的新发病例高达 13.15 万，在世界范围内的宫颈癌新发病例中占的 28.8% 之多，宫颈浸润癌的患病率居我国妇女恶性肿瘤第 1 位。因而，运用准确高效的方法进行宫颈癌筛查十分重要。临床已证明人乳头状瘤病毒（HPV）感染是宫颈癌发生的先决必要引发条件^[32]。而 HPV 检测与细胞学方法联合应用进行宫颈癌的初筛已得到认可，不仅有效降低细胞学检查的假阴性率，亦为制定筛查间隔时间、决定是否进一步行阴道镜检查提供了重要依据。但是，随着宫颈病变筛查广泛开展以来，出现了大量 HPV 阳性而细胞学无异常改变的病例^[4]。本文旨在研究讨论细胞学正常而 HPV 阳性的不同级别宫颈病变与 HPV 病毒负荷量和年龄的关系，从而判断 HPV 病毒负荷量及年龄对单纯 HPV 阳性妇女的临床诊断价值，有效诊断治疗，控制疾病发展。

材料与方法

1.1 研究对象

选择 2011 年 5 月至 2012 年 12 月期间，在青岛大学医学院附属医院黄岛院区门诊接受宫颈液基细胞学检查联合 HPV 检测进行宫颈癌筛查的细胞学阴性、HPV 阳性且行阴道镜下活检有病理结果的患者 575 例，年龄 19-72 岁，平均年龄 (38.9 ± 8.6) 岁。420 例阴道镜检查为满意阴道镜，155 例为不满意阴道镜，575 例均于阴道镜下宫颈活检并获病理结果可供进行研究。所有选定研究的患者临床资料完整，既往无 CIN 病史及宫颈锥切病史，无全子宫切除和盆腔放疗病史。

1.2 分组

575 例患者全部行阴道镜下宫颈活检且有病理诊断。活检病理诊断为 $\geq$ CIN2 者行 LEEP 手术或宫颈冷刀锥切术，术后进行组织病理学诊断。若宫颈活检病理诊断结果不同于术后病理诊断结果，选取相对高级别诊断为最终病理诊断。组织学病理诊断分为慢性宫颈炎，CIN1，CIN2，CIN3 及宫颈癌。HPV 病毒负荷量根据 RLU / CO 值，分为低负荷量组 (RLU/CO 值 1-9.99)、中负荷量组 (RLU/CO 值 10-99.99) 及高负荷量组 (RLU/CO 值 ≥ 100)^[33]。按照宫颈癌与 CIN 好发年龄，划分为 <30 岁、30-49 岁、 ≥ 50 岁 3 组年龄段。

1.3 HPV DNA 检测

应用美国 Digene 公司第二代杂交捕获(HybridCapture II, HC2)技术及其 HR-HPV 检测试剂盒检测 HR-HPV DNA。此方法可以同时检测 13 种常见的 HR-HPV, 包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 66 型。阳性判读标准: 检测样本 ≥ 1.0 RLU/CO。

1.4 薄层液基细胞学检测

应用美国 thinprep 液基薄层细胞检测技术, 制成宫颈脱落细胞薄层涂片, 自动染色并封片后, 由 2 名经验细胞病理医生阅片, 根据 2001 年 TBS 分类法进行诊断。

1.5 阴道镜下宫颈活检

月经干净后 3-7 天, 并且 72h 内无阴道用药及性生活。用 5%醋酸棉球涂抹宫颈, 观察鳞柱交界区的形态、颜色及血管变化; 用 5%碘液涂抹后观察宫颈着色情况。在可疑病变部位行宫颈活检, 记录所有患者的临床症状、体征, 阴道镜满意与否及阴道镜图像。活检病例由经验病理学医生进行阅片, 做出最终诊断。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。计数资料比较采用 χ^2 检验, 两样本均数比较应用 t 检验。P<0.05, 具有统计学意义。

结果

2.1 HPV 病毒负荷量与年龄的患病风险

在选取的 575 样本中, <30 岁、30-49 岁、 ≥ 50 岁组分别为 67 例、450 例和 58 例。病理诊断: 宫颈浸润癌 1 例, CIN3 共 26 例, CIN2 共 17 例, CIN1 共 46 例, 慢性宫颈炎共 485 例。在 HPV 病毒负荷量与 $\geq$ CIN3 患病风险分析中, HPV 病毒高负荷量组 OR 值是 2.017 (95%CI 0.760-5.350), 中负荷量组 OR 值是 1.638 (95%CI 0.539-4.984); 30-49 岁组 $\geq$ CIN3 的患病风险是 1.556 (0.357-6.776); 不同 HPV 负荷量及年龄患宫颈病变的患病风险见表 1 和表 2。

2.2 30-49 岁年龄组 HPV 负荷量与 CIN 级别关系

表 3、表 4 结果显示,在宫颈病变高发年龄段,即 30-49 岁年龄组, $\geq$ CIN3 占总数的 81.5% (22/27),其中包括宫颈浸润癌 1 例,且此例患者 HPV 病毒负荷量 $\geq$ 100。分析 30-49 岁年龄段不同 HPV 病毒负荷量的 $\geq$ CIN3 患病率分别为 2.6%、5.6% 和 6.8% ($\chi^2=3.278$, $P=0.194$),三组间比较,差异无统计学意义; $\geq$ CIN2 分别 3.2%、8.4%和 10.5% ($\chi^2=6.684$, $P=0.0009$),差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。这说明,在 30-49 岁年龄段, $\geq$ CIN2 发生率随着 HPV 病毒负荷量升高有上升趋势。通过比较发现, HPV 病毒负荷量 $\geq$ 100 者在 $\geq$ CIN2 组高于 $<$ CIN2 者 ($\chi^2=3.696$, $P=0.04$),差异有统计学意义,而 HPV 病毒负荷量 RLU/CO 值 1-9.99 和 10-99.99 比较,差异不具有统计学意义 ($P=0.074$)。

2.3 HPV 病毒负荷量与年龄在慢性宫颈炎中的关系

在慢性宫颈炎中, <30 岁与 ≥ 30 岁年龄组的 HPV 病毒负荷量分别为 318.65 ± 495.18 和 309.89 ± 491.19 ($P>0.05$),两者相比较,差异无统计学意义 ($t=0.794$, $P=0.454$)。慢性宫颈炎组 HPV 病毒负荷量与年龄无关。

表 1 HPV 负荷量与宫颈病变的风险

分组	HPV 负荷量 (RLU/CO 值) /n(%)		
	<10	10-99.99	≥ 100
$<$ CIN3	191 (97.0)	136 (95.1)	221 (94.0)
$\geq$ CIN3	6 (3.0)	7 (4.9)	14 (6.0)
n	197	143	235

表 2 年龄与宫颈病变的风险

分组	年龄（岁）/n(%)		
	<30	30-49	≥50
<CIN3	65(97.0)	414(94.7)	56(96.6)
≥CIN3	2(3.0)	23(5.3)	2(3.4)
n	67	437	58

表 3 HPV 病毒负荷量、年龄与宫颈病变的关系（%）

年龄（岁）	HPV 负荷量 (RLU/CO 值)	例数	慢性宫颈 炎	CIN1	CIN2	CIN3	宫颈癌
<30	<10	17	17 (100)	0	0	0	0
	10-99.99	23	18 (78.4)	3 (13.0)	1 (4.3)	1 (4.3)	0
	≥100	27	22 (81.5)	3 (11.1)	1 (3.7)	1 (3.7)	0
30-49	<10	154	133 (86.4)	16 (10.4)	1 (0.6)	4 (2.6)	0
	10-99.99	107	91 (85.1)	7 (6.5)	3 (2.8)	6 (5.6)	0
	≥100	189	154 (81.6)	15 (7.9)	7 (3.7)	12 (6.3)	1 (0.5)
≥50	<10	26	20 (76.9)	2 (7.7)	2 (7.7)	2 (7.7)	0
	10-99.99	13	11 (84.6)	0	2 (15.4)	0	0
	≥100	19	19 (100)	0	0	0	0
合计		575	485	46	17	26	1

表 4 不同级别 CIN 与 HPV 病毒负荷量的关系

HPV 负荷量 (RLU/CO 值)	<CIN2	≥CIN2	合计
<10	188	9	197
10-99.99	130	13	143
≥100	213	22	235
合计	531	44	575

讨论

3.1 HPV 负荷量与 CIN 级别的关系

研究显示宫颈病变中 HPV 感染率与 HPV 病毒负荷量都明显高于慢性宫颈炎 ($P < 0.05$), 随着宫颈病变级别升高, HPV 病毒负荷量也增加^[34]。MunozN 研究同样指出, 随着 HPV 病毒负荷量的增高, 宫颈病变程度越高; 宫颈病变级别越高, 感染的 HPV 型别越多, HPV 病毒负荷量就越高^[35]。本研究数据显示, 对于 HPV 负荷量即 RLU/CO 值介于 10-99.99 之间和 RLU/CO 值 ≥ 100 的患者, $\geq \text{CIN}3$ 的 OR 值分别为 1.638 (95%CI 0.539-4.984) 和 2.017 (95%CI 0.760-5.350)。由此表明, 随着 HPV 病毒负荷量的持续增高, 发生浸润癌概率也随之增加, 即病变进展风险增大。这可能是解释在高级别病变中, 病毒负荷量较高的原因之一。由于本研究并无连续随访资料, 尚不能确定高 HPV 病毒负荷量是否持续存在。关于 HPV 负荷量和宫颈病变关系的研究, 也有不同文献报道^[36-37]。Howard 等的文献报道指出, HC2 检测的 HPV 病毒负荷量与宫颈病变严重程度无相关性, 高 HPV 病毒负荷量仅提示较强的传染性^[38]。结论不同的原因可能与取材的方法、部位及 HPV 导致宫颈癌的发病机制^[39]有关。由于 HC2 法为半定量方法, 即检测宫颈脱落的细胞中的 HPV, 受取材方法的影响较大。取材时应该先拭去宫颈表面分泌物与粘液, 才能较为准确地反应 HPV 病毒负荷量。HPV 病毒感染首先进入鳞-柱交界区 (即转化区) 基底细胞, 以游离状态移至表层细胞的过程中完成复制增殖, 少部分 HPV 感染持续存在, 整合入宿主基因中, 导致高级别病变甚至宫颈癌。因此, 在行 HPV 检测取材和阴道镜检查时, 是否能清晰完整地观察到转化区成为关键。

目前研究显示, 高 HPV 病毒负荷量, 特别是持续性高病毒负荷量, 对宫颈病变的发生和进展可能有一定促进作用。但绝大多数高 HPV 病毒负荷量患者并不进展为宫颈浸润癌, 需要进一步研究探讨。

3.2 年龄与 CIN 的关系

此次研究中, 30-49 岁组 $\geq \text{CIN}3$ 的患病风险是 ≥ 50 岁组患者的 1.556 (0.357-6.776) 倍, 而 ≥ 50 岁组与 < 30 岁组比较的 OR 小于 1.0, 说明这两个年龄段的患病风险无统计学意义。Ogilvie 等研究表明, ≥ 50 岁年龄组出现 HPV 感染升高趋势, 可能是由于此年龄段本身 HPV 的感染率较高, 估计与年老女性免疫力下降, 导致对感染的 HPV 清除能力下降有关^[40]。而本组数据 ≥ 50 岁年龄组及小于 30 岁年龄组例数偏少, 导致 OR 值可能存在偏差。

本研究中慢性宫颈炎组，年龄<30 岁 HPV 病毒负荷量与 30-49 年龄段患者无显著差异，其 HPV 病毒平均负荷量分别为 318.65 ± 495.18 和 309.89 ± 491.19 ($P > 0.05$)，表明慢性宫颈炎患者中 HPV 病毒负荷量与年龄无相关性。可能与样本采集、样本数量造成的误差有关。

3. 3LCT 联合 HPV 检测筛查的诊断价值

相对于 HPV 检测，LCT 更易受主客观因素影响，对 $\geq$ CIN2 筛查的敏感度较低。因此 HPV 检测对 LCT 是有效的补充分流。本次研究 575 例均为 LCT 阴性、HPV 阳性患者，其中病理诊断浸润癌 1 例、CIN3 共 26 例。根据美国阴道镜宫颈病理协会 (ASCCP) 指南，LCT 阴性而 HPV 阳性者，12 个月后复查 HPV 依然阳性，再给予阴道镜检查 and 宫颈活检，若患者依从性差，则这 27 例患者可能会延误诊断，因病变进展，失去最佳治疗的时机。最近更新的 NCCN 宫颈癌筛查指南为年龄 >30 岁，HPV 阳性而细胞学检查无异常者提供了选择：行 HPV16 或 HPV16/18 检测，结果阳性时行阴道镜检查，结果阴性时 1 年后复查细胞学和 HPV 检测；1 年后复查细胞学和 HPV 检测。本研究结果说明 HPV 负荷量与年龄因素对是否行阴道镜检查有临床诊断价值。

结论

在 LCT 阴性、HPV 阳性患者中，30-49 岁年龄组高度病变患病率明显增加，且病毒负荷量越高，其患病率越高。由此提示，临床上 30-49 岁年龄段妇女，HPV 负荷量 $\geq 100\text{RLU/CO}$ ，应进行阴道镜检查及宫颈活检，从而及早发现宫颈病变及宫颈癌，及时治疗，预防病变进展。随着宫颈筛查中 LCT 正常、HPV 阳性的患者逐渐增多，我们应结合患者 HPV 负荷量和年龄，指导临床进行阴道镜检查及宫颈活检，从而有效的提高诊断率，早诊断、早治疗。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C & Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon. Available from: France: International Agency for Research on Cancer, 2010 <http://globocan.iarc.fr>.
- [2] An introduction to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). In Sellors JW & Sankaranarayanan R (eds.). Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners manual 2003, pp. 13 - 20.
- [3] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12 - 19.
- [4] Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med*, 2009, 360:1385-1394.
- [5] Jung WW, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang HS, Lee DJ, Han IK. Strategies Against Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *J Microbiol* 2004; 42:255-266.
- [6] Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 525 - 541.
- [7] Sellors JW, Mahoney JB, Kaczorowski J et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. *Can Med Assoc J* 2000; 163: 503 - 508.
- [8] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342 - 350.
- [9] A Pavani Sowjanya. Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus (HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. *BMC Infectious Diseases* 2005;5:116.
- [10] 石菊芳, 吴瑞芳, 刘植华, 等. 深圳妇女 HPV 型别分布的横断面研究[J]. 中国医学科学院学报, 2006, 28(6): 832—836.
- [11] Marinko Dobec. Human Papillomavirus Infection Among Women With Cytological Abnormalities in Switzerland Investigated by an Automated Linear Array Genotyping Test. *Journal of Medical Virology* 2011;83(8):1370-6. doi: 10.1002/jmv.22126.
- [12] Conwgy MJ. Meyers C Replication and assembly of human papillomaviruses *J Dent Res*, 2009, 88(4): 307-317.
- [13] Berg M, Difatta J, Hoiezyk E, et al. Viable adenovirus vaccine prototypes: high-level production of a papillomavirus capsid antigen from the major late transcriptional unit. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2005. 102(12): 4590-4595.
- [14] Bronmall EM, Reynolds SM, Jacobson RM. Epidemiology, clinical manifestations and recent advances in vaccination against human papillomavirus. *Postgrad Med*, 2010, 122(2):121-129.
- [15] Cox JT, Schiffman M, Solomon D, & ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 1406 - 1412.
- [16] Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C et al. Rate of and risks for regression of

cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol* 2010; 116: 1373 - 1380.

[17] Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 315 - 324.

[18] Jung WW, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang HS, Lee DJ, Han IK: Strategies Against Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *J Microbiol* 2004, 42:255-266.

[19] 陈琪珍. HPV-DNA 检测及其在宫颈癌筛查中的临床价值. *中华现代妇产科杂志* 2005;2(7):600-603.

[20] Coutlee F, Ratnam S, Ramanakumar AV, Insinga RP, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Koushik A, Ferenczy A, Franco EL. Distribution of human papillomavirus genotypes in cervical epithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Canada. *J Med Virol* 2011;83:1034-1041.

[21] 武明辉. 2007-2008 年北京地区 25-54 岁已婚妇女高危型人乳头状瘤病毒感染的流行病学调查. *中华妇产科杂志* 2009;44(12):892-897.

[22] Duttagupta C, Sengupta S, Roy M, et al. Oncogenic human papillomavirus (HPV) infection and uterine cervical cancer: a screening strategy in the perspective of rural India[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2002, 11 (5) :447-456.

[23] Adriana C Vidal. Distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in Tanzanian women. *Infectious Agents and Cancer* 2011;6:20.

[24] Kanda T. Kondo k Development of 811 HPV vaccine for abroad spectrum of high-risk types[J]. *Hum Vaccin*, 2008, 5(1): 38—42.

[25] Schiller, J. T., X. Castellsague, L. L. Villa, and A. Hildesheim. 2008. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26(Suppl.):K53 - K61.

[26] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. *N Eng J Med*, 2003, 348(6): 518-527.

[27] Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial[J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(5): 271—278.

[28] Gabbott M, Cossart YE, Kan A, et al. Human papillomavirus and host variables as predictors of clinical course in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(12): 3098—3103.

[29] 田厚文, 韩立群, 任皎, 骆卫峰, 阮力. 人乳头瘤病毒 58 型 L1 壳蛋白在原核细胞中的高效表达及抗体制备. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15(4): 317-320.

[30] Touze A, El-Mehdaoui S, Sizaret PY. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system[J]. *J Virol*, 1998; 36(7): 2046-2051.

[31] 王丽娜, 宋文龄, 陈伟, 姜艳芳, 付艳. 人乳头瘤病毒 58 型衣壳蛋白的表达及其抗体制备[J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(4): 283-286.

- [32]Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999, 189:12-19.
- [33] Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet*, 2002, 360:228-229.
- [34]杨静, 罗军. 宫颈病变进展与高危型人乳头瘤病毒负荷量相关性研究. *实用预防医学*, 2010, 17(4):646-648.
- [35] Munoz N, Bosch Fx. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. *N Engl J Med*, 2007, 348(6):518-527.
- [36]岑坚敏, 钱德英, 曾仁海, 王丁, 林爱华, 赵杨, 舒焰红. 高危型人乳头病毒负荷量与宫颈癌及癌前病变的相关性研究. *中国实用妇科与产科杂志*, 2007, 23(7):533-535.
- [37] Abba MC, Mouron SA. Association of human papilloma virus viral load with HPV 16 and high-grade intraepithelial lesion[J]. *Int J Gynecol cancer*, 2008, 13(2):154-158.
- [38]Howard M, Sellors, Kaczorowski J. Optimizing the hybrid capture II human papillomavirus test to detect cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Obstet Gynecol*, 2002, 100(5 Pt 1):972.
- [39] Pett, M and N Coleman, Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol*, 2007, 212 (4):356-67.
- [40] Ogilvie GS, Niekerk DJ, Krajden M, et al. A randomized controlled trial of human papillomavirus (HPV) testing for cervical cancer screening: trial design and preliminary results (HPV FOCAL Trial). *BMC Cancer*, 2010, 10:111-120.

综述

人乳头瘤病毒与宫颈上皮内瘤变的研究新进展

【摘要】宫颈癌已然成为威胁广大女性生命健康的头号杀手，人乳头瘤病毒（HPV）被认为是引起宫颈浸润癌及癌前病变最重要的独立因素。随着各种宫颈癌筛查手段管理规范化，以及相应的细胞、组织病理学科及生物分子理论技术地快速发展，使宫颈癌及癌前病得到了及时发现和有效治疗，也更深入的对 HPV 基因特征和致癌机制进行研究。本文对宫颈病变与患者年龄、HPV 型别、HPV 负荷量，p16INK4a 表达，以 CIN 分流诊断为依据的治疗和复发以及疫苗的研究等新进展进行论述。

【关键词】宫颈肿瘤；宫颈上皮内瘤样病变；HPV；基因；p16INK4a；L1

【中图分类号】R737.33

【文献标识码】A

宫颈癌(cervical cancer)是发生于子宫颈鳞状上皮或腺上皮的一种癌肿，是全球第三大最常见癌症，占女性所有癌症的 8.8%^[1]。根据 WHO 发布的报告，发展中国家每年的宫颈癌新发病例，占世界的 75%~80%，根据 2010 年中国卫生部统计数据示：2009 年中国大陆前十位癌症患者的构成比中女性子宫颈癌占 4.7%，2009 年中国大陆前十位癌症发病率中，农村地区子宫颈癌发病率 5.6（十万分之一）。目前已经明确高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌的主要病因^[2]。这使宫颈癌和 HPV 的相关性研究迅速发展，全面防治宫颈癌的新任务便成了发展宫颈癌预防性疫苗的研制和筛查技术的提高。而我们所面临的问题是找出合理筛查宫颈癌的方法，明确不同地区的 HPV 感染型别，深入研究不同型别 HPV 感染、HPV 病毒负荷量与宫颈病变的关系，密切监测 HPV 在宫颈上皮内瘤变(Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN)术后随访、治疗之后复发等中的变化，积极进行一级预防和二级预防的工作，高效发挥疫苗的作用。

一、HPV 的分子生物学特征

HPV 是一类小双股环状 DNA 病毒，无包膜，呈二十面体对称结构，直径为 45~55nm。相对分子质量为 5×10^6 ，属乳多空病毒科 A 亚群，HPV 基因组有 8 个开放阅读框架(ORF)及非编码区即上游调控区组成，长约 8000 bp 左右^[3]。开放阅读框架可细分为早、晚期基因，早期基因编码 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7 蛋白，其中高危 HPV 编码的 E5、E6、E7 蛋白有致癌特性。晚基因编码 L1 蛋白和 L2 蛋白，L1 蛋白为主要衣壳蛋白，L2 蛋白为次要衣壳蛋白；上游调控区位于早期和晚期基因之间，包含启动子等调控元件，参与病毒复制、转录的调控^[3]。E6 蛋白能结合 P53 蛋白，与泛素连接酶 E6AP 形成三聚体复合物，使 P53 蛋白失去抑癌作用。E7 蛋白能调控

许多蛋白,如 p16 蛋白。p16INK4a 是一种抑癌基因,在 HPV 所致的宫颈癌中,由于 HPV E7 蛋白的作用,使 p16INK4a 失去负反馈抑制,其转录和翻译将相应提高而引起过度表达。而在晚基因编码的衣壳蛋白大量形成后,在细胞核内衣壳蛋白与 DNA 发生组装继而破坏细胞核,导致被 HPV 感染的细胞死亡。大多数 HPV 感染在 2 年内会自行清除,只有持续感染才有可能发展为宫颈癌,这是一个漫长的过程,一般 CIN 发展到浸润癌约需 10-25 年^[4]。

二、HPV 的基因型别

随着分子生物学技术的发展,不仅从宫颈病变组织中分离到 HPV,而且对 HPV DNA 进行了分型,目前已发现并报道了超过 200 种的 HPV 基因型,亚型和变异体^[5],其中大约 14 种基因型具有致癌作用^[6-7]。其中约 35 种型别与生殖道感染有关。根据其致病力的大小分为高危型(HR)和低危型(LR)两种,低危型主要包括 HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, cp6108 等,主要引起生殖道肛周皮肤和阴道下部的的外生性湿疣类病变、扁平湿疣类病变和低度子宫颈上皮内瘤样变(CIN1);高危型主要为 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 等,主要导致 CIN2、3 级和癌的发生。新的研究证明,宫颈癌的病因是多因素的,而与 HPV 感染关系密切,特别是 HR-HPV 感染是宫颈癌和癌前病变发生的必要条件^[8]。

不同地区 HPV 的人群感染率不同,所携带的型别不同,与宫颈癌相关的型别也不相同^[9],而 HPV16 和 18 是全球公认的浸润性宫颈癌中最常见的两种基因型,在发达和许多欠发达国家,都在进行针对 HR-HPV16 和 18 的预防性疫苗的效力评估,对于疫苗更深入的研究就有赖于对不同地区 HPV 基因型分布的认识^[10-12]。研究显示,亚洲地区,HPV58 感染率仅次于 HPV16, HPV58 感染率较 HPV45 等相比较^[13-14]。在我国,1996 年由中国医学科学院肿瘤研究所发起在全国 14 个省、市、自治区宫颈癌 HPV 感染型别的调查结果显示,HPV 总感染率 53.5%,其以 HPV16(31.9%)和 HPV58(7.6%)为最高。宫颈疾病的预防和治疗,HPV 疫苗的开发应用是以对不同地区 HPV 型别分布情况的研究为基础的。

不同病理类型的宫颈病变,其感染的 HPV 型别也有所不同。HPV16 与宫颈鳞癌关系最密切,HPV18 最易导致宫颈腺癌^[15]。Berlin Grace^[16]等研究发现,HR-HPV16 是导致宫颈癌的常见病毒,而 HPV18 的致癌作用的潜力更大。HPV16/18 型感染是宫颈癌的高危因素,不仅能反映癌组织的病理学类型,还能客观反映宫颈癌的恶性程度,对宫颈癌的预后起着一定作用,将可能成为评估患者预后的新指标。曾有报道称 HPV 阳性者的死亡风险是 HPV16 的 19 倍,但未见 HPV16 和 18 型阳性者间有差异。也有人对 100 例宫颈癌患者 20 个月的随访资料表明,HPV16 和 HPV18 阳性者治疗后的复发率分别为 16%、45%,我国学者研究发现,HPV16 和 18 型阳性者的 5 年生存

率分别是 73.1% 和 15.2%。

由此可见，确定宫颈病变中感染的 HPV 型别不仅对诊断，治疗和预后十分必要，更重要的是指导 HPV 疫苗的研制，全球范围内，以不同地区、不同型别 HPV 感染为基础，展开免疫预防行动。

三、HPV 病毒负荷量

随着 HPV 检测技术的发展，HC2 渐已成为宫颈病变筛查的主要手段之一。HC2 作为 HPV DNA 负荷量半定量的测定方法，虽然因其高度敏感性、可重复性、客观性、简单易操作和可接受性被广泛用于临床，但是 HC2 检测 HPV 病毒负荷量与宫颈病变严重程度之间的关系是有争议的。有些国内外相关学者进行的实验证明 HPV 的病毒负荷量与宫颈高度病变密切相关，随着病毒负荷量的增高宫颈病变程度也越高，宫颈病变程度越重^[17-20]。而近几年对 HPV 负荷量有了进一步的认识，所谓 HPV 负荷量，是表明 HPV 感染的状态和致病的“危险性”。一些研究显示 HPV 负荷量与宫颈病变可能并不完全平行，在高度鳞状细胞病变标本中，HPV 病毒含量可能低于一些处于 HPV 感染活跃期的低度鳞状细胞病变，甚至两者之间无明显相关性^[21-23]。相对于 HPV 负荷量预测宫颈病变进展的意义来说，更为重要的是 HPV 负荷量在临床中提示预后的作用，即宫颈病变在有效的治疗后，病毒负荷量应下降或消失，如果持续阳性或下降后又上升，提示病灶残留或病变复发^[20]。

四、HPV 感染的年龄相关性

HPV 感染有年龄相关性，根据研究报道，18-30 岁是 HPV 感染的高峰年龄段，而 30 岁之后的 HPV 感染率明显下降并趋于稳定，这可能与对 HPV 的获得性免疫有关。但是在一些西方国家也见到 50~55 岁的另一个感染高峰，Ogilvie 等^[24]研究显示两个感染高峰，国内亦有程娇影等^[25]的研究结果显示，高危型 HPV 感染率最高峰出现在 25~29 岁年龄组，在 55~59 岁率达到最低为 15.79%，之后又逐渐升高。妇女如果绝经前未能清除高危 HPV 感染，在绝经后更易进展为宫颈癌，这可能与绝经后激素水平的改变有关^[26]。

五、宫颈上皮内瘤变 (CIN)

世界卫生组织将宫颈上皮内瘤变划分为三级，即 CIN1，CIN2，CIN3。现今普遍把 CIN1 归类为低级别的宫颈上皮内瘤变，而 CIN2 和 CIN3 归类为高级别的宫颈上皮内瘤变。Castle 等^[27]的研究证明 30-50% 的 CIN2 会自然消退，但这当中并不包括 HPV16+ 的 CIN2 和 CIN3。这表明 CIN2 虽然属于高级别的宫颈上皮内瘤变，其本身的转归和 CIN3 是有所区别的，包括治疗方法在内的许多方面都不能与 CIN3 完全等同。由于 CIN 并不是静止的状态而是一个动态的发展过程，如果不给予治疗，5-30% 经组织学证实的 CIN2-3 在一段时间之后就会发展浸润癌^[28]。所以，活检证实的 CIN2-3 通常会采用锥切进行治疗。锥切术是一种相对具有侵略性的治疗方法，可能会引起

一些副作用,其中包括一种严重的晚期并发症-宫颈机能不全^[29-30]。这就可能让一些妇女推迟怀孕的时间。随着怀孕年龄的增加,以及检测到 CIN2-3 的年龄的中值在 29 岁,宫颈机能不全出现的临床价值也随之增加。另外,CIN2 和 CIN3 的预后以及随诊,HPV 的清除率,病变的复发率都存在差异,这种差异可能直接导致疾病的进展。

因此,有效正确地识别 CIN,运用比锥切具有更小侵略性的疗法进行安全地治疗,减少过度治疗的发生;找到新的诊断和预测方法用以预测 CIN 的自然转归以及预后,以上这些是极其重要的。如何辨别 CIN 是继续进展,还是自然消退是一项巨大的挑战,专家对此的态度并不一致。由于 CIN 的进展或逆转并不是单一因素造成的,感染 HPV 的基因型、感染的持续时间、患者的自身免疫、患者的年龄等都会影响 CIN 的转归。因此很多学者赞同将 CIN2-3 视为一类进行治疗,尤其是对年龄 > 45 岁,无生育要求的患者,建议切除子宫。但是,KARIN FUCHS 等研究显示年轻 CIN2 患者(≤21 岁)的治疗方案需要重新考虑,他们建议此类患者先不必立即行切除治疗,重复的阴道镜检查及密切随访即可^[31]。因此,对于年轻且有保留生育要求的 CIN2 患者,是选择保守观察还是锥切治疗,这就需要行之有效的方法预测转归,避免过度治疗给患者造成的生理和心理上的压力^[31]。总之,CIN2 与 CIN3 的分流是有必要的。

组织病理学是 CIN 划分的关键依据,病理诊断则有赖于有经验的病理科医生的阅片技术以及高水平的质量控制,而这些都是客观的评价标准,易受主观影响。另外,CIN2 是一种不同的疾病组,常会被误归为 CIN1 或 CIN3,但 CIN2 与 CIN1、CIN3 的治疗和转归完全不同。关键是找到客观的标准应用于 CIN 的分流诊断。p16INK4a、CK2、L1 等无疑成为了客观标准的选择。人 p16 基因,又称多肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor MTS1),现被人类基因组组织(human genome organization, HUGO)正式命名为 CDKN2 (cyclin dependent kinase inhibitor 2)。该基因定位于人类染色体 9p21 位置,全长 8.5kb,由两个内含子和三个外显子组成,三个外显子共同编码一种分子量 15.8kb 的蛋白,简称 p16INK4a。p16INK4a 既即使细胞周期的有效调控者,又是抑制肿瘤细胞生长的关键因子,p16INK4a 和细胞周期素 D (cyclinD) 与细胞周期素依赖性激酶(CDK4)竞争性结合,p16INK4a 和 CDK4 结合后能特异性地抑制 CDK4 的活性。视网膜母细胞蛋白(Retinoblastoma, Rb)在控制真核细胞周期中起重要作用,低磷酸化的 Rb 与 E2F 转录因子结合,可阻止细胞由 G1 期进入 S 期。而 CDK4 可使 Rb 磷酸化,磷酸化的 Rb 蛋白结构发生变化,释放 E2F 转录因子,使基因表达水平上升,p16INK4a 表达增加。增加的 p16INK4a 又通过负反馈调节抑制 CDK4 的活性,使磷酸化的 Rb 蛋白减少,导致 E2F 转录因子释放减少,转录水平降低,从而抑制细胞增殖,即正常情况下,CDK4 ↑ → Rb 磷酸化 → E2F

释放→p16INK4a 表达↑→CDK4↓→Rb 低磷酸化→E2F 释放↓→p16INK4a 表达↓→CDK4↑处于动态平衡状态。而在 CIN 组织中这种平衡被打破,出现 p16INK4a 过度表达,原因是 HPV E7 癌蛋白在宫颈细胞内表达,竞争性抑制 CDK4 与 Rb 蛋白结合,使 Rb 蛋白失活,激活了 E2F 家族转录因子,基因转录水平上升,从而导致 p16INK4a 阳性表达。因为 p16INK4a 阳性表达和 CIN 进展有着高度相关性^[32],研究的重心便是将 p16INK4a 作为生物标记物应用到临床诊断中,其中 p16INK4a 免疫组化染色就是常用的测定方法之一。在克服了 p16INK4a 免疫组化技术的问题之后,p16INK4a 免疫组化染色逐渐在日常的病理诊断中起到了辅助作用,并提高了宫颈病变诊断的正确率,特别是诊断不明确 CIN2 病例^[33]。研究表明,鉴别诊断 CIN2 与 CIN3 可以与病理诊断有效结合。有足够证据显示,P16INK4a 免疫染色与细胞学或组织学异常的严重程度相关^[34-35]。现在普遍认为随着宫颈病变的加重,p16INK4a 染色逐渐增强,p16INK4a 染色不仅可以用于宫颈癌的早期诊断,其表达水平亦可以一定程度上提示疾病的预后^[36-37]。然而 p16INK4a 的表达是否与患者年龄,感染 HPV 型别等有关,p16INK4a 在 CIN 各级别中表达的不同是否具有可靠的诊断意义,则需要进一步探讨。

最新的研究证实 114 种可以区分 CIN2 和 CIN3 的蛋白中,细胞角蛋白 2 (Cytokeratin 2, CK2) 具有很高的辨识力,表明 CK2 在区分 CIN 中成为了分级标记物^[38]。CK2 在区分 CIN 级别的临床价值有关方面的文献报道较少,有望进一步研究讨论。

六、HPV L1 与疫苗的应用

HPV 病毒感染宿主后,是自然消退还是继续进展,与机体感染局部强大迅速的细胞免疫反应密切相关。机体的细胞免疫反应主要攻击 HPV 主要衣壳蛋白-L1 蛋白,当 HPV 侵入宿主后,宿主 T 细胞(CD4/CD8)及 MHC I/II (主要组织相容性复合体)与 L1 蛋白形成免疫复合物,激活机体的免疫连锁反应,高浓度的免疫抗体在感染局部生成,清除 HPV^[39-40]。如果宿主全身或局部免疫力降低,抑或 HPV L1 蛋白表达出现异常,造成全身或局部免疫逃逸,不能引起正常免疫应答、有效清除 HPV,则 HPV 病毒便会经过自身 DNA 复制、转录和蛋白的合成,大量繁殖,持续感染,致使病变进一步发展^[41]。

随着生物医学的进展 HPV 疫苗研制得到了长足的发展,现在 HPV 疫苗主要分为治疗性疫苗和预防性疫苗。其中预防性疫苗主要针对病毒的衣壳蛋白 L1 和 L2,其组装成的病毒样颗粒有类似病毒的天然构象,抗原性较好,可刺激机体发生体液免疫并产生保护性中和抗体^[41]。L1 基因相对保守,起主要作用。L2 基因变异较多,可产生交叉反应,L1 和 L2 联合疫苗可提高免疫效率。2009 年美国 FDA 已批准了 Gardasil 和 Cervar Gardasil 四价疫苗能有效地预防 HPV6、11、16 和 18 及 31 型

的感染。Cervarix 二价 HPV16、18、31、33 及 45 型有效，有效期为 6.4 年。无论是二价疫苗还是四价疫苗均证实有 90% 以上的保护率，且安全、有效，有较高的免疫原性^[42]。预防性疫苗对已发生感染或已病变的宫颈组织没有疗效，只能用于未感染人群。治疗性疫苗主要针对 HPV 病毒的 E6、E7 癌蛋白，可诱导特异性细胞免疫，是宫颈癌抗原特异性免疫治疗的靶目标，适用于已经出现 HPV 感染以及潜在感染的个体。单纯肽段免疫是治疗性疫苗的一种选择，HPV16 E7 脂肽能在进展期宫颈癌中诱导特异性细胞免疫，联合佐剂的使用能加强免疫反应。HPV 同型病毒之间以及不同型病毒之间的嵌合疫苗也进行了大量的基础研究，临床前研究已证实 HPV16 型 L1 病毒样颗粒融合 HPV16 型 L2、E7 和 E2 蛋白有一定的疗效^[43-44]。I、II 期临床证实 HPV16 和 18 型 E6、E7 嵌合疫苗在 CIN3 及宫颈癌患者中能诱导有效的细胞毒免疫反应，有望将来能进入市场^[45]。

七、问题与展望

随着宫颈癌筛查方法和治疗手段的不断进步，宫颈病变的预防、早期发现、诊断的工作逐渐成人们的焦点，但宫颈癌所具有的流行因素多样性及流行过程复杂性的特点，决定了要完成全面预防和彻底治愈宫颈癌的任务仍然十分艰巨。一方面，HPV 疫苗的研制为人们带来了希望，要对全球范围内的女性进行预防接种，确定不同地区不同型别的 HPV 感染，从而根据实际情况给予相应的疫苗预防是问题的关键所在。疫苗本身的安全性，有效性以及覆盖面就是一种挑战。另一方面，如何通过快速有效且经济适用地标记物来辅助诊断和区分各级别的宫颈上皮内瘤变及恶变，从而采取相应的治疗手段对疾病进行有效干预，做到既不会漏诊，延误病情；也不会过分治疗，对患者造成不必要的损伤，也需要更加深入的研究。对于已经治愈的患者，及时的随访是重点，要合理利用一些指标的变化来监测病情的进展，而这些指标就是日后研究的目标之一。

综上所述，HPV 感染的宫颈病变从筛查、“三阶梯”诊断、合理治疗到随诊、预后，需要一系列系统的特异性和敏感性都较好的方法，虽然很多方法仍在研究探索，但包括 L1, p16, CK2 等在内的许多标记物都已被发现并在证实过程中，未来它们在临床当中的应用将是一种突破，不仅迅速，也更为准确。现在的任务是结合临床进行下一步深入研究，尽早将新的技术应用于临床。一句话，预防，诊断，治疗三者关系密切，在未来的研究中应有效结合，一举攻克宫颈癌。

参考文献

- [1]Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2008, 127:2893-2917.
- [2]Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer world- wide[J]. *J Pathol*, 1999, 189(1): 12-19.
- [3]Conwgy MJ, Meyers C Replication and assembly of human papillomaviruses *J Dent Res*, 2009, 88(4): 307-317
- [4]Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH: Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis* 2009, 9:119.
- [5]Jung WW, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang HS, Lee DJ, Han IK: Strategies Against Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *J Microbiol* 2004, 42:255-266.
- [6]Tjalma WAA, Arbyn M, Paavonen J, Van Waes TR, Bogers JJ: Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2004, 14:751-761.
- [7]Baseman JG, Koutsky LA: The epidemiology of human papillomavirus infections. Review. *J Clin Virol* 2005, 32(Suppl):S16-S24.
- [8]Mansouri A, Zhang Q, Ridgway LD, et al. Cisplatin resistance in an ovarian carcinoma is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation[J]. *Oncol Res*, 2003, 13(6-10):399-404.
- [9]Munoz N, Bosch F, X. Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(06):518-527
- [10]Coutlee F, Ratnam S, Ramanakumar AV, Insinga RP, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Koushik A, Ferenczy A, Franco EL: Distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Canada. *J Med Virol* 2011, 83:1034-1041.
- [11]Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM: A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the Unites States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, 17:1611-11622.
- [12]Sigurdsson K, Taddeo FJ, Benediktsdottir KR, Olafsdottir K, Sigvaldason H, Oddsson K, Rafnar T: HPV genotypes in CIN 2-3 lesions and cervical cancer: a population-based study. *Int J Cancer* 2007, 121:2682-2687.
- [13]Bao YP, Li N, Smith JS, et al. Human papillomavirus type distribu-tion in women from Asia: a meta-analysis [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18(1):71-79.
- [14]Clifford GM, Franceschi S, Diaz M, et al. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases[J]. *Vaccine*, 2006, 24 (Suppl 3):S26-34.
- [15]Bulk S, Berkhof J, Bulkman NW. Preferential risk of HPV16 for squamous cell

carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands[J]. Br J Cancer, 2006, 94(1):171-175.

[16]Berlin Grace VM. HPV type 18 is more oneopotent than HPV16 in uterine cervical carcinogenesis although HPV16 is the prevalent type in Chennai[J]. Indian J Cancer, 2009, 46(3):203-207.

[17]Munoz N, Bosch Fx. Epidemiologic classmcaton of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl JMed, 2007, 348(6):518-527.

[18]张凌,刘志红,王纯,吴瑞芳,杜辉,李鹃,周艳秋. 年龄与HPV载量对细胞学阴性宫颈上皮内瘤变的辅助诊断价值. 中国妇产科临床杂志, 2011, 12(4):256-260.

[19]Abba MC;Mouron SA. Association of human papillomavirus viral load with HPV 16 and high-grade intraepithelial lesion[J]. Int J Gynecol Cancer, 2003, 13(2):154-158.

[20]Sherman ME;Wang SS;Wheeler CM. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3:dominant impact of surrounding low-grade lesions [J]. Cancer Biomarkers Prev, 2003, 12(10):1038-1044.

[21]AbbaMC, Mouron SA. Association of human papilloma virus viral load with HPV 16 and high-grade intraepithelial lesion[J]. Int J Gynecol cancer, 2008, 13(2):154-158.

[22]吴佳皓, 吴丹, 王弓力, 李柱南. 高危型人乳头瘤病毒负荷量与各级宫颈病变的关系. 中国临床医学, 2009, 16(3):410-412.

[23]Howard M, Sellors, Kaczorowsli J. Optimizing the hybrid capture II human papillomavirus test to detect cerrical in-traepit helial neoplasia [J]. Obstet Gynecol, 2002, 100(5 Pt 1):972.

[24]Ogilvie GS;Niekerk DJ;Krajden M, et al . A randomized controlled trial of human papillomavirus(HPV) testing for cervical cancer screening:trial design and preliminary results(HPV FOCAL Trial). BCM Cancer, 2010, 10:111-120.

[25]程娇影, 卞美璐, 马莉, 等. HPV 感染年龄与高度宫颈上皮内瘤变的关系. 中国妇产科临床杂志, 2011, 12(2): 119-121.

[26]SyrjananK, Kulmala SM, Shabalova I, etal. Epidemiological, clinical and viral determinants of increased prevalence of high- risk human papillomavirus(HPV) infections in elderly women. Eur J Gynaecol Oncol, 2008, 29(2): 114-122.

[27]Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for Frequent Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia-Grade 2. Gynecology Obstet Gynecol Survey 2009;64:306-8.

[28]McCredie MR, Paul C, Sharples KJ, Baranyai J, Medley G, Skegg DC, Jones RW: Consequences in women of participating in a study of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia 3. Aust N Z J Obstet Gynaecol 2010, 50:363-370.

[29]Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E: Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. Lancet 2006, 367:489-498.

[30]Sadler L, Saftlas A, Wang W, Exeter M, Whittaker J, McCowan L: Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. JAMA 2004, 291:2100-2106.

- [31]FUCHS K, WEITZEN S, LILY WU B S, et al. Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 in Adolescent and Young Women[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2007, 20(5):269.
- [32]Miriam Reuschenbach, Andreas Clad, Christina von Knebel Doeberitz et al. Performance of p16INK4a -cytology, HPV mRNA, and HPV DNA testing to identify high-grade cervical dysplasia in women with abnormal screening results. Gynecologic Oncology 2010(119) :98 - 105.
- [33]Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Clin Pathol 2010;133:395 - 406.
- [34]Hillfrich R, Hariri J. Prognostic relevance of human papillomavirus L1 capsid protein detection with mild and moderate dysplastic lesions of the cervix uterin combination with p16 biomarker[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2008, 30:78 - 82.
- [35]Mary T, Galgano MD, Philip E, et al. Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies[J]. Am J Surg Pathol, 2010, 34(8):1077 - 1087.
- [36]Ann E. Walts MD, Shikha Bose MD. p16, Ki-67, and BD ProEx™ C immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Human Pathology, 2009(40):957 - 964.
- [37]Pinto AP, Schlecht NF, Woo TYC, Crum CP, Cibas ES. Biomarker (ProEx™)C, p16(INK4A), and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. Mod Pathol 2008;21:1067-74.
- [38]Uleberg KE, Munk AC, Brede C, Gudlaugsson E, van Diermen B, Skaland I, Malpica A, Janssen EA, Hjelle A, Baak JP. Discrimination of grade 2 and 3 cervical intraepithelial neoplasia by means of analysis of water soluble proteins recovered from cervical biopsies. Proteome Sci. 2011 Jun 28;9:36.
- [39]Tomomi Yoshida. Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and P16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions[J]. Cancer Cytopathol, 2008, 114:83-88.
- [40]Melsheimer P. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA[J]. Acta Cytol, 2003, 47:124-128.
- [41]Guido R, Schiffman M, Solomon D, et al. Postcolposcopy management strategies for women referred with low-grade squamous intra-epithelial lesion or human papillomavirus DNA positive atypical squamous cells of undermined significance: a two-year prospective study[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 188(6):1401-1405.
- [42]Bronmall EM, Reynolds SM, Jacobson RM. Epidemiology, clinical manifestations and recent advances in vaccination against human papillomavirus. Postgrad Med, 2010, 122(2):121-129.
- [43]Konno R. Prevention of cervical cancer by HPV vaccine. Gan To Kagaku Ryoho, 2010, 37(2):236-239.
- [44]Yoshikawa H. Progress and challenges on HPV vaccination. Uirusu, 2009, 59(2):243-248.
- [45]Lin K, Doolan K, Hung CF, et al. Perspectives for preventive and therapeutic

HPV vaccines. J Formos Med Assoc, 2010, 109(1):4-2.

攻读学位期间的研究成果

崔虹飞, 戴淑真, 王畅等. 单纯 HPV 感染与负荷量、年龄及宫颈病变关系的研究[J]. 青岛大学医学院学报, 2013, (已定稿).

致谢

值此论文完成之际，谨向三年来辛勤培育我并且给予我无私关怀的导师戴淑真教授致以深深的敬意和衷心的感谢。本课题的研究及论文撰写在我的导师戴淑真教授的关怀和悉心指导下完成。感谢导师戴淑真教授在我就读研究生期间，在学习上的生活上给予我的无微不至的关怀及指导。她严谨的治学态度，精益求精的工作作风，深深地感染和激励着我；她宽以待人的高尚品德，对医学工作的热忱专注，是我终身学习的榜样。

感谢青岛大学医学院附属医院、青岛宫颈病重点实验室为本实验的顺利进行提供研究条件；感谢病理科的孙玲玲老师、孙显路老师，妇科化验室的刘丽芝老师、徐海沧老师以及阴道镜室的丁朝霞老师在标本收集、资料统计整理等方面给予热心的帮助和精心的指导；感谢姚勤老师、车艳辞老师、李明霞老师、牛兆园老师，初慧君老师，吕腾老师等对我的支持和帮助。

感谢所有给予我支持和帮助的老师、同学，感谢王丽师姐、杨红娟师姐，感谢徐晓燕及李灿同学，感谢我的师妹耿颖春、徐倩和刘宁，你们是论文撰写的重要参与者，也提供给我很好的建议。

感谢一直以来默默关心、支持我的家人，是你们的爱和关心使得我的学业得以顺利完成。

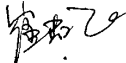
最后，再次向所有关心和支持我工作的各位领导、老师及同学们致以深深的敬意，你们崇高的敬业精神，严谨的治学态度，刚正不阿的做人风格令我钦佩，将使我永生难忘，终身受用。

向答辩委员会的各位专家教授表示衷心的感谢！

学位论文独创性声明

本人声明，所呈交的学位论文系本人在导师指导下独立完成的研究成果。文中依法引用他人的成果，均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担由此引发的一切责任和后果。

论文作者签名：

日期：2013年5月15日

学位论文知识产权权属声明

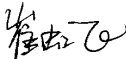
本人在导师指导下所完成的学位论文及相关的职务作品，知识产权归属学校。学校享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为青岛大学。

本学位论文属于：

保密 ☐，在 年解密后适用于本声明。

不保密 ☒。

(请在以上方框内打“√”)

论文作者签名：

日期：2013年5月15日

导师签名：

日期：2013年5月15日

(本声明的版权归青岛大学所有，未经许可，任何单位及任何个人不得擅自使用)

HPV基因分析在宫颈上皮内瘤变中的作用和意义

作者: [崔虹飞](#)
学位授予单位: [青岛大学](#)

引用本文格式: [崔虹飞](#) [HPV基因分析在宫颈上皮内瘤变中的作用和意义](#)[学位论文]硕士 2013