

·论 著·

HPV L1 壳蛋白在新疆汉族和维吾尔族 HPV 阳性妇女中的表达

赵丽霞¹, 耿文¹, 玛依努尔·尼亚孜^{1*}, 亚力坤·穆罕默德²

1. 新疆维吾尔自治区人民医院, 新疆 乌鲁木齐 830001; 2. 新疆医科大学附属肿瘤医院 新疆 乌鲁木齐 830001

摘要:目的 探讨新疆汉族、维吾尔族人乳头瘤病毒(HPV)阳性妇女宫颈脱落细胞中 HPV L1 壳蛋白的不同表达。方法 对 221 例 HPV 阳性的汉族妇女、178 例维吾尔族妇女采用液基细胞学检查,在宫颈脱落细胞标本中,检测 HPV L1 壳蛋白的不同表达。结果 汉族 HPV L1 壳蛋白在正常宫颈细胞(NILM)、非典型鳞状上皮细胞(ASC-US)、低度鳞状上皮内瘤变(LSIL)、高度鳞状上皮内瘤变(HSIL)和鳞状细胞癌(SCC)的阳性表达率分别为 39.19%、42.86%、64.71%、14.29%和 0, ≥LSIL 病变中,两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。维吾尔族阳性表达率分别为 33.33%、37.24%、53.66%、0 和 0,在 ASC-US、LSIL、HSIL 组中,两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$), HSIL、SCC 两组无表达。两民族中,同级别病变比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。在组织病理学诊断中,两民族同级别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。≥CINI 病变中,两民族均随病变加重 HPV L1 壳蛋白阳性率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 汉族、维吾尔族 HPV L1 壳蛋白在同级别病变中表达差异无统计学意义,在不同病变中其差异均随病变程度加重而降低。

关键词:液基细胞学; HPV L1 壳蛋白; 汉族; 维吾尔族

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2014)12-1423-04

Expression of HPV L1 capsid protein in cervical exfoliated cells from Han and Uygur nationality women with HPV infection in Xinjiang

ZHAO Li-xia¹, GENG Wen, MAYINUR·NYZ, YALIKUN·MHMD

1.Xinjiang Uighur Autonomous Regional People's Hospital, Urumq 830001, Xinjiang, P.R. China;

Corresponding author: Ma YNR·NYZ, E-mail: mynr68@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the expression of HPV L1 capsid protein in cervical exfoliated cells from Han and Uygur nationality women with HPV infection in Xinjiang. Methods The expression of HPV L1 capsid protein in cervical exfoliated cells from 221 Han and 178 Uygur women with HPV infection was detected by liquid based cytology. Results The expression rates of HPV L1 capsid protein in normal cervical cells (NILM), atypical phosphorus epithelial cells (ASC-US), low-grade squamous intraepithelial neoplasia (LSIL), highly squamous intraepithelial neoplasia (HSIL) and squamous cell carcinoma (SCC) in Han women were 39.19%, 42.86%, 64.71%, 14.29% and 0, respectively, revealed statistically significant differences between LSIL and HSIL, LSIL and SCC, HSIL and SCC groups ($P < 0.05$). The expression rates of HPV L1 capsid protein in NILM, ASC-US, LSIL, HSIL and SCC in Uygur women were 33.33%, 37.24%, 53.66%, 0 and 0, respectively also exhibited statistically significant differences ($P < 0.05$) between ASC-US and LSIL, ASC-US and HSIL, LSIL and HSIL groups, but without expression in HSIL and SCC groups. HPV L1 capsid protein was not expressed in two ethnic groups with the same level of the lesions ($P > 0.05$) by biopsy. The expression rate of HPV L1 capsid protein was reduced with the aggravation of the lesions (≥CINI) showing significant differences ($P < 0.05$) between the two nations. Conclusion The expression rate of HPV L1 capsid protein showed no statistical significance between Han and Uygur nationality women infected with HPV L1 at the same level of lesions and it was reduced with the increase of aggravation in different levels of lesions.

Key words: Liquid-based cytology; HPV L1 capsid protein; Han nationality; Uygur nationality

宫颈癌是妇女癌症中常见的恶性肿瘤,80%的新发病例和85%的死亡病例来自发展中国家^[1]。我国新发病例 12.19/10 万,新疆是我国宫颈癌高发区之一,维吾尔族女性发病率为 17/10 万^[2]。人乳头状瘤病毒(HPV)感染是发生宫颈癌的主要相关因素,HPV L1 是 HPV 的主要衣壳蛋白,主要见于感染病毒的复制期,只表达在 HPV DNA 复制过程中的病毒颗粒上,它的缺乏使机体不能有效的刺激免疫反应,产生免疫防

御,宫颈上皮内瘤变 I 级(Cervical intraepithelial neoplasia I, CIN1)细胞逃脱机体细胞免疫系统的监视及清除功能,进而持续存在或进展为癌。目前用宫颈液基细胞制片进行 HPV L1 壳蛋白的检测被认为可能是潜在的判断预后的标记物,国内外学者对妇女宫颈 HPV 感染患者中 HPV L1 壳蛋白的表达进行了很多研究,我们检测了 HPV L1 壳蛋白在新疆少数民族地区汉族和维吾尔族妇女宫颈病变中表达情况,结果报告

基金项目:国家自然科学基金(No.81160317)

作者简介:赵丽霞(1963~),女,本科,主任技师,研究方向:宫颈癌筛查。

*通讯作者:玛依努尔·尼亚孜, E-mail: mynr68@yahoo.com.cn

如下。

1 资料与方法

1.1 资料来源 标本来源于2012年1月~2013年1月在新疆维吾尔自治区人民医院妇产科门诊就诊的HPV检测阳性患者,其中汉族221例,年龄20~72岁,平均(43.10±9.73)岁、维吾尔族178例,年龄19~77岁,平均(43.88±11.05)岁。进行液基细胞学检查,对结果为NILM、ASC、LSIL、HSIL、SCC的涂片,再行HPV L1壳蛋白检测。排除标准:既往有宫颈癌或宫颈局部不明肿瘤史;目前正在妊娠或妊娠终止三个月内者;宫颈发育异常如双宫颈、先天性宫颈缺如者;具有宫颈局部切除史或放疗、化疗者;手术切除子宫者。

1.2 方法

1.2.1 HPV DNA检测 采用美国Digene公司的试剂盒,第二代杂交捕获法(Hybrid Capture II,HC2)进行定量检测,可同时检测13种主要的高危型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)和5种低危型HPV型别。高危型HPV感染的敏感度限定为1pg/mL,判定标准为检测样本的相对光单位/标准阳性对照(RLU/CO)≤1.0。

1.2.2 细胞学检查 采用AutoCyte PREP系统,即液基细胞学检测系统(Liquid-based cytologic test,LCT)进行检查。标本采集首先窥器暴露宫颈,用棉签拭去宫颈表面的粘液,用专用颈管刷收集子宫颈外口、宫颈管的脱落细胞,旋转5圈,细胞刷放置细胞保存液(SUREPATH™ preservative fluid)中,送本院妇产科研究室,经自动化细胞转移-梯度离心-细胞沉降及染色制片,专人阅片,薄层细胞涂片中细胞率平均>20%。宫颈上皮内病变采用Bethesda系统(TBS)分类标准^[5],分为未明确诊断的不典型鳞状细胞(Atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS);低度鳞状上皮细胞内病变(Low grade squamous intraepithelial, LSIL);高度鳞状上皮细胞内病变(High grade squamous intraepithelial, HSIL);鳞状细胞癌(Squamous cell carcinoma, SCC)。

1.2.3 HPV L1壳蛋白检测 将薄层液基细胞涂片在

二甲苯溶液中浸泡2h,取下盖玻片,采用CytoReact赛泰公司提供的细胞/组织HPV L1染色试剂盒进行操作,染色后直接用水性封片剂封片,室温暗盒放置,显微镜下阅片。该试剂盒能够识别宫颈涂片中HPV6、11、16、18、31、33、45、58型中的HPV L1壳蛋白。诊断标准为仅有一个被红染的细胞核即可诊断HPV L1呈阳性。

1.2.4 统计学方法 采用SPSS13.0统计学软件进行数据处理,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 汉族、维吾尔族妇女宫颈细胞学不同病变中HPV L1壳蛋白的表达 汉族宫颈液基细胞学标本中,HPV L1壳蛋白在NILM、ASC-US、LSIL、HSIL及SCC中的阳性率分别为39.19%(29/74)、42.86%(36/84)、64.71%(33/51)、14.29%(1/7)和0%(0/5)。在ASC-US、LSIL、HSIL和SCC组HPV L1壳蛋白表达率随着宫颈细胞学病变程度的加重HPV L1壳蛋白表达率呈下降趋势。维吾尔族中各组表达率分别为33.33%(19/57)、37.24%(22/59)、53.66%(22/41)、0%(0/8)和0%(0/13)。在ASC-US、LSIL、HSIL组中,HPV L1壳蛋白表达率呈下降趋势,这与汉族相同,在HSIL和SCC两组HPV L1壳蛋白均无表达。见表1。

2.2 汉族、维吾尔族妇女宫颈不同组织病理学的HPV L1壳蛋白的表达 在组织病理学诊断中,汉族HPV L1壳蛋白的表达率分别为37.5(42/112)%、55.50(35/63)%、18.92(7/37)%、0(0/9)%;维吾尔族分别为32.86(23/70)、48.28(28/58)%、13.89(5/36)%、0(0/14)%。汉族和维吾尔族在≥CINI病变中HPV L1壳蛋白的表达率均随宫颈病变程度的加重而明显减少。汉族与维吾尔族同级别病变比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

2.3 399例宫颈脱落细胞中HPV L1壳蛋白与组织病理学对比分析 宫颈液基细胞学与组织病理学对照结果见表3。

表1 HPV L1蛋白在汉族和维吾尔族妇女宫颈细胞中的表达

Table 1 The expression of HPV L1 protein in cervical exfoliated cells Han and Uyghur nationality women

分组 Group	汉 Han nationality			维 uyghur ethnic		
	n	HPV L1(+)%	HPV L1(-)%	n	HPV L1(+)%	HPV L1(-)%
NILM	74	29 (39.19)	45 (60.81)	57	19 (33.33)	38 (66.67)
ASC-US	84	36 (42.86)	48 (57.14)	59	22 (37.24)	37 (62.71)
LSIL	51	33(64.71)	18 (35.29)	41	22 (53.66)	19 (46.34)
HSIL	7	1(14.29)	6 (85.71)	8	0	8 (100.00)
SCC	5	0	5 (100.00)	13	0	13 (100.00)
合计 Total	221	99 (44.80)	122 (55.20)	178	63 (35.39)	115 (64.61)

表2 汉族、维吾尔族妇女宫颈不同组织病理学的 HPV L1 壳蛋白的表达**Table 2 The expression of HPV L1 protein in cervical exfoliated cells from Han and Uyгур nationality women**

组织病理学诊断 Histopathological diagnosis	族别 Nationality	HPV(+)%	χ^2	P
正常或慢性宫颈炎 Normal or chronic cervicitis	维族 uyğur	32.86	0.404	0.525
	汉族 Han	37.5		
CINI	维族 Uyğur	48.28	0.641	0.423
	汉族 Han	55.50		
CINII 和 CINIII	维族 Uyğur	13.89	0.336	0.562
	汉族 Han	18.92		
SCC	维族 Uyğur	0	0.000	1.000
	汉族 Han	0		
合计 Total	维族 Uyğur	31.46	1.856	0.173
	汉族 Han	38.01		

表3 399例宫颈脱落细胞标本中细胞学与组织病理学诊断**Table 3 Cytology and histopathology diagnosis of cervical exfoliated cells from 399 specimens**

组织病理学诊断 Histopathological diagnosis	例数 No.case	细胞学诊断(n(%))Cytological diagnosis(n(%))				
		NILM	ASC-US	LSIL	HSIL	SCC
正常或慢性宫颈炎 Normal or chronic cervicitis	182	76(41.76)	97(53.30)	9(4.95)	0	0
CINI	121	35(28.93)	22(18.18)	62(51.24)	2(1.65)	
CINII 和 CINIII	73	15(20.55)	24(32.88)	23(31.51)	9(12.33)	2(2.74)
SCC	23	0	0	3(13.04)	4(17.39)	16(69.57)
合计 Total	399	126(31.58)	143(35.84)	97(24.31)	15(0.25)	18(4.51)

可等待和随访; L1壳蛋白阴性者, 预示 HPV 为非增值性感染或癌前病变, 有较高的恶性潜能, 建议尽快行阴道镜检查和组织病理学诊断。所以在液基细胞学标本上采用免疫化学检测 HPV L1 壳蛋白, 可作为 HPV 感染阳性病人的风险评估和预后判定的特异性临床生物标志物。

本次研究中, 汉族与维吾尔族在 NILM 和 ASC-US; LSIL 和 HSIL; LSIL、HSIL 和 SCC 比较中, L1 蛋白的阳性率基本相同, 在前两组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 后一组中比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 这与 Yoshida^[7]报道相符。在维吾尔族中, HSIL 和 SCC 两组的阳性表达率均为 0, 这与汉族是否存在差异, 有待大样本量支持。在汉族与维吾尔族同级别比较中, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 说明两民族 L1 壳蛋白的阳性率均随宫颈病变的级别加重 (从 LSIL 进展到 SCC) 表达率逐渐降低, Griesser^[8]等报道, 低到中度不典型鳞状上皮病变中, L1 壳蛋白阴性病例比阳性病例更趋向于进展。肖巍^[9]等报道随着宫颈病变的进展 HPV L1 壳蛋白阳性率明显降低, 新疆维吾尔族妇女 (CINI: 48.28%; CINII 和 CINIII: 13.89%; SCC: 0) 与同地区汉族妇女 (CINI: 55.50%; CINII 和

3 讨论

HPV 病毒是由环状双链 DNA 及壳蛋白组成, 无包膜结构, 主要感染上皮和粘膜^[3], 高危型 HPV 致癌力最强。HPV 壳蛋白中, L1 壳蛋白占 80%, 是编码的主要壳蛋白, L1 壳蛋白在病毒复制期与感染的病毒颗粒一起表达, 而在 HPV 病毒持续感染期则无表达, 因此, L1 壳蛋白的表达提示机体处于无 HPV 复制的潜伏期感染。相反, L1 壳蛋白的表达缺失, 会使宫颈局部的免疫效应弱化, 异常增殖细胞得以生存并将致疾病进展^[4]。L1 壳蛋白主要在 CIN1 和 CIN2 中表达, 表达部位主要分布于异型增生鳞状上皮浅层细胞核内, 而基底细胞和棘细胞层及 CIN3 和鳞状细胞癌中未见表达^[5]。Griesser^[6]等研究认为在 LSIL/HSIL 患者中, L1 壳蛋白阳性者, 尤其在年轻妇女, 反映了 HPV 的增值性感染, 预示低度恶性潜能, 为避免过度治疗

CINIII: 18.92%; SCC: 0) 均与报道一致, 两民族比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在同级别比较中也无统计学意义 ($P>0.05$)。

研究表明 L1 壳蛋白主要在 LSIL 中大量表达, 在 HSIL 中极少出现, 宫颈癌细胞不产生 HPV L1 壳蛋白^[10], 新疆汉族妇女在 SCC 中无表达, 与预期相符, 而维吾尔族在 HSIL 和 SCC 中都未见表达, 其原因可能是与 HPV 分布的民族差异有关, 因为在新疆, 汉族与维吾尔族宫颈癌发病率存在很大差异, 特别是偏远的农村牧区维吾尔族宫颈癌的发病率比同一地区汉族妇女高 3~4 倍, 而高危型 HPV 的感染率为 7.25%^[11], 明显低于中国汉族女性 (12.1%)^[12]。HPV 感染率在新疆维吾尔族女性宫颈癌前病变中的分布趋势与中国其他地区和亚洲地区相似, 但同时具有自身的民族特征^[13]。因此, L1 壳蛋白在维吾尔族 HSIL 表达可能与汉族会有不同, 这还需要做进一步研究。

综上, 可以考虑采用液基细胞学、HPV 病毒学、L1 壳蛋白联合检查, 并对患者进行分流管理, 先行宫颈液基细胞学和 HPV 检查, 对于异常者, 特别是 HPV 阳性的妇女再行 L1 壳蛋白检测, HPV L1(+) 的患者提示预后较好, 宫颈病变进展可能性小, 建议行阴道镜

也是不同的,目前的研究表明 katG、inhA 基因突变是异烟肼耐药的主要原因,约占 80%以上^[6],因此本项研究选择突变频率较高,影响较大的 katG、inhA 进行相应检测。

针对这些目前已发现作用机制的耐药基因,众多外国专家采用 HRM 对其检测,取得了较好的结果。Ong^[7]、Ramirez^[8]、Choi 等^[9]、Chen^[10]等进行类似研究,利福平和异烟肼耐药检测均获得了较高的特异性与灵敏度,所以应用 HRM 技术检测结核菌耐药基因从而代替结核菌药敏实验是具有可行性的。但是必须承认的是结核菌耐药的耐药机制尚未完全清楚,仍有部分耐药菌株未发现已知突变,而且异烟肼耐药相关基因我们只进行了 katG、inhA 检测,有待继续提升的空间,而且结核菌细胞壁结构较为特殊,细菌 DNA 的提取效果有待改良,直接影响到 HRM 结果的判定,导致误判的发生。

本次实验应用 HRM 检测利福平相关 rpoB 基因和异烟肼相关 katG、inhA 基因,以结核菌药敏实验为金标准,展现了 HRM 检测结核菌耐药具有较高的特异性和灵敏度,可为后续研究并最终实现临床应用提供参考。

参考文献

[1] WHO. Global Tuberculosis Report 2012 [R]. Geneva, Switzerland: WHO

2012.

- [2] 杨辉,张国良,张明霞,等.某地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药相关基因突变特征分析[J].重庆医学,2012,41(34):3591-3593.
- [3] Riska PF, Jacobs WR, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis [J]. Int. J. Tuber. Lung Dis, 2000, 4(2):S4-10.
- [4] 杨辉,张国良,张明霞.高分辨率熔解曲线技术在结核耐药检测中的应用进展[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):830-832.
- [5] 陈明亭.全球结核病控制和患者治疗耐药/广泛耐药结核病高负担国家部长级会议在京召开[J].中国防痨杂志,2009,31(5):320.
- [6] 俞学锋,钟利.结核分枝杆菌耐药机制研究进展[J].西南军医,2010,12(1):125-127.
- [7] Ong DCT, Yam WC, Siu GK, et al. Rapid detection of Rifampicin and Isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis by high resolution melting analysis [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1047-1054.
- [8] Ramirez MV, Cowart KC, Campbel PJ, et al. Rapid Detection of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Use of Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11):4003-4009.
- [9] Choi GE, Lee SM, Yi JY, et al. High-Resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11):3893-3898.
- [10] Chen XY, Kong F, Wang Q, et al. Rapid Detection of Isoniazid, Rifampin and Ofloxacin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates Using High Resolution Melting Analysis [J]. J. Clin. Microbiol. 2011, 49(8):3025-3035.

收稿日期:2014-09-12 编辑:符式刚

(上接第 1425 页)

检查或密切随诊;HPV L1(-)则预示其恶性转化可能性大,预后较差,需尽快行阴道镜下组织病理学检查。

总之,新疆是宫颈癌的高发区,对高发原因深入探讨,有利于制定更加合理的检查方案。检测 L1 壳蛋白预测宫颈病变及其预后,可以探索更加合理的筛查流程,对患者进行最佳的分流管理,降低宫颈癌的发病率。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Lihui-Wei. Cervical cancer prevention and control, has a long way [J]. Chin J Obstet Gynecol, April 2013, 48(4): 549-557.
- [3] Stole MH. Human papilloma viruses and cervical neoplasia A model for carcinogenesis [J]. Int J Gynecol Pathol, 2000, 19(8): 16-28.
- [4] 郝敏,卞美璐.人乳头瘤病毒 L1 蛋白功能及其临床应用 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(5): 352-355.
- [5] 李俐,黄文斌,黄悦,等.子宫颈病变中 HPV L1 蛋白和 P16 的表达 [J]. 临床与实验病理学杂志 [J]. 2009, 25(6): 576-579.
- [6] 玛依努尔·尼亚孜,阿米娜·沙吾提,李丽,等.肉眼观察法联合电子阴道镜检查在宫颈癌筛查中的应用 [J]. 中国肿瘤, 2010, 19(3): 207-

209.

- [7] Yoshida T, Sano T, Kanuma T, et al. Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions [J]. Cancer, 2008, 11(2): 83-88.
- [8] Griesser H, Sander H, Hilfrich R, et al. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia [J]. Anal Quant Cytol Histol, 2004, 26(5): 241-245.
- [9] 肖巍,卞美璐,马莉,等.子宫颈液基细胞学检查异常的涂片中人乳头瘤病毒 L1 蛋白的表达及其意义 [J]. 中华妇产科杂志, 2008, 44(12): 43-48.
- [10] Bimer P, Bachtiary B, Dreier B, et al. Signal-amplified colorimetric in situ hybridization for assessment of human papillomavirus in infection in cervical lesions [J]. Mod Pathol, 2001, 14(6): 702-709.
- [11] 李丽,玛依努尔·尼亚孜,陈凤,等.新疆维吾尔族女性 HPV 感染状况及其分布特征研究 [J]. 癌症进展, 2010, 8(2): 114-119.
- [12] 李霓,代敏.中国女性人乳头瘤病毒感染的多中心横断面研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2008, 12(5): 411.
- [13] 玛依努尔·尼亚孜,李丽,陈凤,等.新疆维吾尔族女性人乳头瘤病毒感染与宫颈癌相关性的流行病学调查 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(4): 322-325.

收稿日期:2014-05-30 编辑:崔宜庆