

人乳头瘤病毒检测在宫颈癌防治中的临床意义

朱雪琼 石一复

〔作者简介〕 朱雪琼,妇产科教授,博士生导师。浙江省高层次人才,浙江省高校中青年学科带头人。为国际杂志 *International Journal of Biomedical Science (IJBS)* 和国内《国际妇产科学杂志》的编委。现主持国家自然科学基金、浙江省自然科学基金等项目 10 余项,主持完成浙江省自然科学基金在内的科研项目 8 项。近 5 年来以第一作者和(或)通讯作者发表论文 70 余篇,参编书籍 3 部。主持完成的《良恶性子宫肿瘤的鉴别以及肥大细胞局部募集的机制研究》和《子宫肿瘤差异蛋白质组的研究》分别获得浙江省科技进步三等奖、浙江省医药卫生科技二等奖。

宫颈癌是危及全球妇女健康的重要疾病,发病率仅次于乳腺癌,高居妇科恶性肿瘤的第 2 位,每年全球约有新发病例 50 万,死亡病例 25 万。大量流行病学调查和实验室研究数据证明,几乎所有宫颈癌病例(约 99.7%)与生殖道感染人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)有关^[1]。德国癌症研究中心的科学家 Zur Hausen 等^[2]因为发现人类 HPV 导致宫颈癌而获得 2008 年诺贝尔生理学/医学奖。在 Hausen 研究的基础上,高效的宫颈癌预防性疫苗相继上市,使宫颈癌有望成为人类第 1 个通过注射疫苗、进行筛查和早诊早治来预防并消灭的恶性肿瘤。

一、HPV 的分类和亚型

在已知的 100 多种不同类型的 HPV 中,大约有 40 种会感染生殖道,约 20 种与宫颈癌相关。由于 HPV 存在致病率差异,用 HPV 感染的预后作为评价 HPV 致病力指标^[3],将 HPV 分为 HPV 高危型(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73 和 82 等 15 种)、低危型(HPV 6、11、40、42、43、44、54、61、70、72、81 和 cp 6108 等 12 种)和疑似高危型(HPV 26、53、66)。低危型主要引起生殖道、肛周皮肤和阴道下部的外生性湿疣类病变、扁平湿疣类病变和宫颈上皮内瘤变 I (CIN I),诱发宫颈癌概率 < 5%;高危型引起 CIN II、CIN III 及宫颈癌的概率 > 90%。

HPV 的亚型分布有地区差异,HPV16 是宫颈癌患者最常见的 HPV 亚型,感染率为 45.9% ~ 62.6% (平均约 51%)。一项包括全球 25 个国家的多中心研究显示:3607 例宫颈癌患者 HPV DNA 的阳性检出

率为 96%,HPV16 亚型的感染率占有 HPV 阳性的 57.4%,15 种最常见的亚型依次为 HPV16、18、45、31、33、52、58、35、59、56、39、51、73、68 和 66。最近一项包括全球 38 个国家 10575 例宫颈癌患者的多中心研究显示^[5]:高危型 HPV 亚型中,宫颈癌中最常见的亚型为 HPV16、18、31、33、35、45、52、58。除 HPV16 亚型外,HPV18 亚型感染比例最高,占 12.6% ~ 25.7%,两型合并感染率平均为 71%。HPV16、18 和 45 亚型感染占宫颈腺癌的 94%。

不同国家、不同地区、不同职业 HPV 亚型不一,有些差异甚大。大部分地区的研究结果提示高危型 HPV 中 45、33 居 HPV16、18 之后,但在亚洲,HPV52、58 比率高于 HPV45、31、33,中国人以 HPV16、18、58、52、31 为主^[6]。HPV 亚型分析对预防和治疗宫颈癌前病变和宫颈癌均有实用的价值:①了解 HPV 感染的类型和比例,设计本地区范围内常见 HPV 亚型的基因芯片用于筛查诊断;②不同亚型引起宫颈病变的严重程度不同;③ HPV 多重亚型感染与子宫颈疾病的严重程度相关,但也有学者认为 HPV 多重感染与亚型有关,HPV16、18、33 常有双重感染;④不同亚型引起宫颈癌的类型也不一;⑤与治疗的效果相关:高危型 HPV 感染,尤其是感染 HPV58 和(或)18 的宫颈癌对放疗效果较差^[7];⑥感染高危型 HPV 子宫颈癌患者的预后较差,不同高危型 HPV 与宫颈癌的转移、复发相关;⑦指导治疗,根据常见的 HPV 感染亚型研制针对性的宫颈癌预防疫苗。

二、HPV 的检测

1. 细胞形态学检测:HPV 感染的特征性改变是出现了特异性的挖空细胞。随着宫颈病变的加重,挖空细胞由上皮表层到棘层,分布从散在到弥漫。

2. 核酸分子杂交:用于检测 HPV DNA 核酸分子杂交方法有斑点杂交法、原位过滤杂交法、核酸印迹法(southern blot)等。核酸印迹法适用于 HPV 分型和 HPV DNA 相对分子质量鉴定,灵敏度高,但操作程序较繁杂,需新鲜组织标本,不便于临床推广。原位杂交是通过非放射性探针在石蜡块组织切片上对特殊的核酸序列进行定位观察,特异性较高,但敏感性低,仅为 40% ~ 50%。大大降低了临床使用价值。

3. 杂交捕获二代系统(hybrid capture, HC II):联合应用了高效的液相杂交法和敏感的化学发光信号扩增系统。检测探针包括 13 种高危型 HPV DNA 亚型,即 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68,和 5 种低危型 HPV 即 6、11、42、43、44 型。灵敏度和特异性均较高,操作相对简便,条件要求低,是目前唯一通过美国食品和药物管理局(FDA)批准的可用于临床 HPV DNA 检测手段,特别适合于大规模的人群筛查。研究结果显示,HC II HPV DNA 检测在诊断 CINII 及以上病变中的敏感度为 97.8% ~ 100%,阴性预测值达到 99% ~ 100%。其缺点是仅能 HPV DNA 定量,不能分型。

4. 聚合酶链反应(PCR)检测:PCR 技术的敏感性高、特异性强。包括常规 PCR、原位 PCR 和实时荧光定量 PCR 检测等。不仅可以对早期诊断 HPV 感染,而且能对 HPV 快速分型,方法简便。但 PCR 检测主要针对 HPV6、11、16 和 18 亚型的感染,其他亚型感染则会漏诊。

5. 基因芯片技术:可同时区分同一样本中的多种亚型,并判断多重感染。最常见的是对 21 种 HPV 亚型进行检测,包括 13 种高危型(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68 型)、5 种低危型(HPV6、11、42、43 和 44 型)和 3 种中国人群常见亚型(53、66 和 cp8304 型)。也有包括 23 种 HPV 亚型的基因芯片包括 18 种高危型——HPV16、18、31、33、45、52、58 等和 5 种低危型——HPV6、11、42、43、44。敏感性明显高于细胞学检测和 PCR 方法。与杂交捕获二代系统相比较,敏感性和特异性相似,但基因芯片可确切分型。

6. 免疫组化链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法检测:用 SP 染色法检测宫颈癌组织、癌旁组织或淋巴结中 HPV16、18 早期蛋白 E6 抗体能够有效地发现组织中存在的 E6 蛋白,阳性标志为细胞核内出现棕黄色颗粒。研究表明,抗 HPV16 E6 单克隆抗体可直接定位于宫颈癌组织,对宫颈癌有较好的定向

选择性。

三、HPV DNA 检测的临床意义

1. 减少宫颈癌筛查中细胞学检查的假阴性结果:HPV 病毒感染到出现宫颈形态学改变的潜伏期比较长,最长达数年。HPV 感染后是否会导致宫颈形态学的改变,感染后多少时间会出现宫颈形态学的变化,目前尚无定论。在 30 岁以上的妇女中,传统的宫颈刮片诊断宫颈上皮内瘤变 II、III 的敏感性低,仅 50% ~ 60%,但特异性达 95%。单纯的液基细胞学检查,标本敏感性也仅在 61% ~ 95% 之间,特异性达 94% 左右。而 HPV 检测诊断宫颈上皮内瘤变 II、III 的敏感性达 95% ~ 100%,其特异性为 80% ~ 90%。HPV 检测的主要缺点是特异性低于宫颈细胞学检查,尤其是 30 岁以下的妇女。持续携带高危型 HPV 提示感染者处于发展为宫颈癌前病变的高度危险中。因此,联合宫颈细胞学检查与 HPV 检测,能够提高提高宫颈病变和宫颈癌的检出率。2003 年美国 FDA 批准对 30 岁以上妇女联合宫颈细胞学检查与 HPV 检测用于宫颈癌的筛查。HPV 检测的敏感性高但其特异性低,尤其是在年轻女性中 HPV 感染率较高而且往往为一过性,因此单独 HPV 检测作为宫颈癌筛查目前并不推荐。

2. 降低筛查费用,提高诊断的可信度。HPV 检测诊断宫颈上皮内瘤变 II、III 的阴性预测值接近 100%,因此,对于细胞学和 HPV 检查均阴性者,宫颈上皮内瘤变 II、III 发病率较低,可适当延长其筛查间隔。宫颈细胞学检查阴性而高危型 HPV 持续为阳性者,近两年发展为宫颈高度病变的风险度高,对此人群要定期随访,建议 6 个月时再次检查细胞学,12 个月时再次检查 HPV。美国癌症协会建议细胞学和 HPV 检查均阴性者,3 年后再做联合检测,连续 2 次细胞学和 HPV 检测正常,筛查间隔可延至 5 ~ 8 年^[8],由此降低的检查费用,包括宫颈细胞学复查、不必要的阴道镜检查、病理检查远远高于因采用 HPV 检测所增加的费用。

3. 对细胞学检查进行随访分流,减少阴道镜检查及病理活检率。无明确诊断意义的不典型鳞状上皮细胞(ASCUS)是最难决定对策的细胞学结果。其发病原因可能与炎症发生、刺激、宫内节育器有关,与刮片采取固定不好有关,可能存在癌前病变,可能有癌症存在等。据报道,细胞学检查为 ASCUS 者而行组织学检查中,5.3% ~ 11% 有高度癌前病变,约 0.1% 存在宫颈癌。对于细胞学检查结果为 ASCUS,专家

建议在随后的 2 年内,每间隔 6 个月重复细胞学检查 1 次,直至连续两次结果是“无上皮内病变或癌”为止;重复检查时,若细胞学为 ASCUS 或更为严重的细胞学异常,建议阴道镜检查 and 病理活检;阴道镜检查确诊无 CIN 者,在第 6 个月和第 12 个月时,重复细胞学检查。按照该指南,妇女需经常随诊,在复查中承受着严重的精神、心理及经济负担;因为重复细胞学检查为 ASCUS 而行阴道镜检查 and 病理活检者中,只有 10% ~ 20% 转变成 CIN III;另外,对于 ASCUS 的妇女,HPV 检测发现 CIN III 或宫颈癌较单纯重复细胞学检查有更高的敏感度和特异性,故美国阴道镜和宫颈病理学会(ASCCP)专家建议对于细胞学检查结果为 ASCUS,最好进行 HPV 检查,HPV DNA 阴性者,随访 12 个月时,重复细胞学检查;如果 HPV 阳性者,接受阴道镜评估;HPV 阳性,但是阴道镜检查确诊无 CIN 者,随访 12 个月时检测 HPV DNA。HPV 检测可用细胞学检查残余的标本,以减少 ASCUS 患者因为再次来医院取材而带来的麻烦。因此,HPV 检测对于难以鉴定的 ASCUS 是一种有效的科学的分流^[8]。它能有效地将宫颈高度病变从中检出,减少了阴道镜下活检明确宫颈癌前病变的次数,也减少了患者不必要的宫颈损伤和经济负担。

4. 作为宫颈癌前病变治疗后的随访指标。高度鳞状上皮内病变经锥切或宫颈电环切术后仍约有 5% ~ 15% 存在残余或复发。研究表明,术后检测 HPV DNA 可预测病变变化和复发的风险。治疗后 6 ~ 12 个月检测 HPV,如果阴性,提示病灶切除干净,复发的可能性很小,可减少随诊和阴道镜检查次数,同时可减轻患者的焦虑情绪;如果 HPV 持续阳性,提示有残余或复发的可能。术后 6 个月时采用高危型 HPV DNA 检测来预测残余或复发的准确度明显高于切除时切缘的状态和细胞学检查,也明显高于术前的 HPV 阳性^[9]。也有学者认为术后仍有术前同样型别的 HPV 持续感染,尤其是 HPV16、18,是残余或复发的危险因素^[10]。

高危型 HPV 病毒负荷量与 CIN 治疗后的转归密切相关。研究表明 CIN 患者局部手术后 HPV 负荷量明显下降以至转为阴性。锥切术前高危型 HPV 负荷量 $\geq 100\text{RLU/PC}$ 将会有较高的持续 HPV 感染,术后残余或者复发的危险性明显增高;术后高危型 HPV 负荷量如果仍 $> 100\text{RLU}$ 则提示了术后残余/复发。

5. 提示宫颈癌的转移和预后。早期宫颈癌

(I ~ IIA 期)术前 HPV18 阳性与术后的复发密切相关,也是评估子宫颈癌预后的一个独立的指标。大多学者认为:宫颈癌淋巴结转移者 HPV DNA 的阳性表达率明显高于无淋巴结转移者,因此对于宫颈癌患者的前哨淋巴结进行 HPV DNA 检测,可以发现淋巴结转移和复发风险的患者;尤其对于术后切除的淋巴结经常病理检查阴性者,建议辅助 HPV DNA 检测可以预示宫颈癌的亚临床转移。但是 Peedicayil 等经过对早期宫颈癌(IB 期)患者的术后随访,发现:盆腔淋巴结中 HPV DNA 的负荷量与宫颈活检组织中 HPV DNA 的负荷量呈正相关;即使淋巴结没有转移的患者,淋巴结中 HPV DNA 仍为阳性,认为盆腔淋巴结或血浆中 HPV DNA 并不能作为预测早期宫颈癌复发的指标。

参考文献

- 1 Peltecu G, Bari M, Lancu G, *et al.* Human papilloma virus and cervical preinvasive disease [J]. J Med Life, 2009, 2(4): 373 - 377
- 2 zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account [J]. Virology, 2009, 384(2): 260 - 265
- 3 Juckett G, Hartman - Adams H. Human papillomavirus: clinical manifestations and prevention [J]. Am Fam Physician, 2010, 82(10): 1209 - 1213
- 4 Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, *et al.* Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective [J]. Int J Cancer, 2004, 111(2): 278 - 285
- 5 de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study [J]. Lancet Oncol, 2010, 11(11): 1048 - 1056
- 6 Chen W, Zhang X, Molijn A, *et al.* Human papillomavirus type - distribution in cervical cancer in China: the importance of HPV 16 and 18 [J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(9): 1705 - 1713
- 7 Munagala R, Donà MG, Rai SN, *et al.* Significance of multiple HPV infection in cervical cancer patients and its impact on treatment response [J]. Int J Oncol, 2009, 34(1): 263 - 271
- 8 Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, *et al.* 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests [J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 197(4): 346 - 355
- 9 Leguevaque P, Motton S, Decharme A, *et al.* Predictors of recurrence in high-grade cervical lesions and a plan of management [J]. Eur J Surg Oncol, 2010, 36(11): 1073 - 1079
- 10 Kang WD, Oh MJ, Kim SM, *et al.* Significance of human papilloma-virus genotyping with high-grade cervical intraepithelial neoplasia treated by a loop electrosurgical excision procedure [J]. Am J Obstet Gynecol, 2010, 203(1): 72. e1 - 6

(收稿:2010-12-27)