

流式细胞术在高危16型和18型人乳头状瘤病毒感染诊断中的价值

胡小云 方红辉 曹国磊 范志能

【摘要】目的 探讨流式细胞术在高危16型、18型人乳头状瘤病毒(HPV)感染诊断中的临床价值。**方法** 选取2013年1月至2017年1月于深圳市人民医院筛查的200例女性作为研究对象,征得所有受试者知情同意后对其行流式细胞技术诊断和荧光定量聚合酶链式反应(FQ-PCR)诊断,比较两种方法的诊断价值。**结果** 两种诊断方法下正常者、宫颈上皮内瘤变(CIN) I期者16型和18型HPV E6蛋白阳性率差异无统计学意义(P 均 > 0.05);流式细胞技术诊断CIN II期、III期、宫颈癌者阳性率低于荧光PCR诊断,差异有统计学意义(P 均 < 0.001)。流式细胞技术诊断 \geq CIN II宫颈病变的敏感度、特异度和准确率分别为87.5% (35/40)、98.2% (157/160)和96.0% (192/200);荧光定量PCR诊断 \geq CIN II宫颈病变的敏感度、特异度和准确率分别为85.0% (34/40)、96.9% (155/160)和94.5% (189/200),差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** 流式细胞技术操作简便,可有效避免样品交叉感染所致的假阳性,提高HPV感染诊断的准确性。

【关键词】 高危性; 人乳头状瘤病毒; 流式细胞技术; 荧光聚合酶链式反应; 宫颈癌

Application value of flow cytometry in diagnosis of high risk type 16 and type 18 human papillomavirus

Hu Xiaoyun, Fang Honghui, Cao Guolei, Fan Zhineng. Department of Laboratory, People's Hospital of Shenzhen in Guangdong Province, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: Hu Xiaoyun, Email: gdy_122@163.com

【Abstract】Objective To investigate the diagnosis value of flow cytometry (FCM) in type 16 and type 18 of human papillomavirus (HPV) infection. **Methods** Total of 200 women screened in People's Hospital of Shenzhen from January 2013 to January 2017 were selected as the research objects, all the subjects were informed with the consent, and were diagnosed by FCM and fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). The diagnosis results of the above two methods were compared. **Results** There was no significant difference in the positive rates of E6 protein between type 16 and type 18 HPV among normal patients and patients in stage I with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (all $P > 0.05$). The positive rates of HPV detected by FCM in patients with CIN II, III and cervical cancer were lower than that of the diagnosis of FCM, with significant differences (all $P < 0.001$). The sensitivity, specific and accurate rates in the diagnosis of patients \geq CIN II cervical lesion degree detected by FCM were 87.5% (35/40), 98.2% (157/160) and 96.0% (192/200), respectively. The sensitivity, specific and accurate rates in the diagnosis of patients \geq CIN II cervical lesion degree detected by FQ-PCR were 85.0% (34/40), 96.9% (155/160) and 94.5% (189/200), respectively. There was no significant differences between the two diagnostic methods (all $P > 0.05$). **Conclusions** FCM is easy to operate, which could effectively avoid the false positive caused by cross-infection of samples and improve the diagnosis accuracy of HPV infection.

【Key words】 High risk; Human papilloma virus; Flow cytometry technology; Fluorescence polymerase chain reaction; Cervical cancer

宫颈癌是目前全球范围内女性常见的恶性肿瘤,每年新增病例超过47万且仍然处于上升态势,

现有流行性病学及生物学研究证实,人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)为该病症的重要诱因之一^[1]。高危性HPV感染下宫颈病变程度随之提高,就目前而言,已知的高危性HPV共有15种,其中尤以16型及18型风险最高,在所有宫颈癌患者中因上述两种病毒感染所致者高达70%以上^[2]。因

此,进行早期HPV检测并在癌前病变阶段予以积极的干预治疗将有助于阻断病情进一步恶化、降低病死率。随着分子生物学技术的快速发展,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测成为筛查HPV感染的重要手段,但目前尚少见流式细胞技术诊断HPV感染的报道。本研究采用前瞻性研究方法探讨流式细胞技术在16型、18型高危性HPV感染诊断中的价值,报道如下。

资料与方法

一、入组患者的一般资料

选取2013年1月至2017年1月于深圳市人民医院筛查的200例女性作为研究对象,年龄24~40岁,平均年龄为 (32.20 ± 1.20) 岁;婚姻史:已婚122例、未婚78例;所有研究对象均在知情同意情况下接受阴道镜检查并取得宫颈组织标本,经病理组织学检查明确诊断,其中健康或者慢性宫颈炎(正常)110例,宫颈上皮内瘤变(CIN) I期患者50例、CIN II期患者24例、CIN III期患者10例、宫颈癌患者6例。

纳入标准:①无其他全身严重器质性疾病者;②临床依从性好者。

排除标准:①终末期肿瘤者;②妊娠期、哺乳期患者;③不同意此次研究方案或未签署知情同意书者。

二、检测指标及方法

1. 荧光定量PCR(FQ-PCR):采用棉拭子将200例受试者分泌物置于离心管中并向其滴入0.9%氯化钠溶液1.0 ml,经充分洗涤后彻底挤干并收集溶液,以高速(1 5000 r/min)离心10 min(离心半径 $r=10$ cm)后去除上清液^[3]。沉淀物中加入50 μ l脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)提取液,均匀吹打后置于100 $^{\circ}$ C沸水中水浴10 min,再次高速(1 5000 r/min)离心10 min(离心半径 $r=10$ cm)后收集样品上清液并与阳性校准品、临界阳性校准品各5 μ l充分混匀,分别置于不同反应管中并利用美国Thermo fisher公司生产的TaqMan型实时荧光定量PCR仪进行扩增^[4],所用的FQ-PCR试剂盒也购置于美国Thermo fisher公司;PCR反应体系见表1。

反应条件:首先50 $^{\circ}$ C条件下反应1 min,将温度升高至95 $^{\circ}$ C后将DNA链变性30 s,然后将反应温

度设置为56 $^{\circ}$ C至60 $^{\circ}$ C持续50 s,第三步将DNA链式聚合酶在72 $^{\circ}$ C的反应温度条件下反应30 s合成互补链,共进行了35个循环。PCR扩增反应结束后对结果进行研判。具体判定标准如下:37 < CT值 < 40为检测灰区,则重新进行检查,若复检两次及两次以上时结果中 ≥ 1 次的CT值 < 40为阳性,反之为阴性^[5]。

2. 流式细胞术:利用棉拭子对所有受试者脱落的宫颈上皮细胞进行采集和收集工作,利用Staining Buffer对宫颈上皮细胞进行清洗后涡旋重悬细胞^[6]。向其加入4%多聚甲醛100 μ l行固定处理,室温条件下孵育20 min,随后加入0.1%皂素0.5 ml,室温下3 000 r/min离心5 min,去除上清液^[7]。吸取0.1%皂素100 μ l重悬细胞并向其加入E6蛋白单抗荧光素标记物,继续孵育60 min后再次加入0.1%皂素0.5 ml,室温条件下离心5 min,去除上清液后采用适量流式染色Buffer重悬处理,利用美国BD公司生产的FACS Canto II流式细胞仪进行测定^[8],相应配套检测试剂均购自于美国BD公司。

三、观察指标

选取两种诊断方法在正常、CIN I期、CIN II期、CIN III期、宫颈癌中16型和18型HPV E6蛋白阳性率。对比流式细胞技术与FQ-PCR诊断 \geq CIN II宫颈病变的敏感度、特异度及诊断准确率。

四、统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计分析,HPV E6蛋白阳性率、两种检查方法诊断的敏感度、特异度以及准确率为计数资料,统计分析采用 χ^2 检验、Fisher确切概率检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、两种诊断方法检测16型和18型HPV E6蛋白

两种诊断方法下正常者、CIN I期者16型和18型HPV E6蛋白阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$);CIN II期、III期、宫颈癌者16型和18型HPV E6蛋白阳性率均显著高于正常,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

二、流式细胞技术与FQ-PCR诊断 \geq CIN II宫颈病变诊断效能

流式细胞技术诊断 \geq CIN II宫颈病变的敏感

度、特异度以及准确率分别为87.5% (35/40)、98.2% (157/160) 和96.0% (192/200); FQ-PCR诊断 \geq CIN II 宫颈病变的敏感度、特异度以及准确率分别为85.0% (34/40)、96.9% (155/160) 和94.5% (189/200), 差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 0.105$ 、0.513、0.497, $P = 0.745$ 、0.474、0.481), 见表3。

讨 论

宫颈癌发病率居女性生殖道肿瘤的首位, 近年来其发病率逐年上升, 且呈年轻化趋势, 严重威胁女性的身心健康, 而早期筛查、诊断及治疗是降低宫颈癌患者病死率的重要途径^[6-9]。相关资料显示^[10-11], 高危型HPV持续性感染是宫颈癌发生、发展的主要因素, 90%以上宫颈鳞癌活检样本中可检测到HPV DNA。HPV感染分为病毒复制与病毒转化两个阶段: 病毒复制为HPV感染早期阶段, HPV L1壳蛋白为HPV的主要衣壳蛋白, HPV L1蛋白在复制过程中的病毒颗粒上表达; 病毒转化阶段是HPV L1壳蛋白将HPV DNA整合到细胞基因不稳定区及转录活跃区。美国妇产科医师学会 (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG) 发布的《宫颈癌筛查和预防实践指南》中指出, 女

性在开始有性生活时应积极进行宫颈癌筛查, 且HPV感染的女性应终生接受宫颈癌筛查; 年龄 < 30 岁的HPV感染者初次诊断时应接受宫颈细胞学检查, 若结果阴性则1年后行再行检查, 若连续3年检查结果正常则应每3年进行1次宫颈细胞学检查; 30岁以上HPV感染者可单独行细胞学检查或联合筛查, 根据筛查结果采取相应的随访检查措施^[13]。整个亚太地区HPV感染发病率呈现出显著升高态势, 宫颈病变筛查的重要性与日俱增。

高危16型和18型HPV E6癌蛋白可通过以下途径促进宫颈组织病变进程^[14-21]: ①与E6-AP、p53相结合并对后者形成降解以抑制癌细胞的凋亡。②增强端粒酶的活性, 促使宿主细胞处于永生化状态。③与多种炎性细胞因子相互作用来改变细胞微环境, 导致癌细胞能够逃脱免疫系统应答。所以检测高危16型和18型HPV E6癌蛋白含量有助于预测女性是否发生宫颈病变以及罹患宫颈癌的风险^[14]。本研究提示高危16型和18型HPV E6蛋白含量测定有助于宫颈疾病的诊断。有文献报道^[22-25], 流式细胞技术一方面能够提高诊断的敏感性, 另一方面则能

表1 PCR 反应体系

PCR反应体系	剂量
DNA模板	100 ng
10× PCR buffer	2.0 μ l
MgCl ₂ (25 mmol/L)	1.2 μ l
dNTPs (10 mol/L)	0.2 μ l
引物 (25 μ mol/L)	0.4 μ l
Taq酶	1 U
蒸馏水	20 μ l

表3 流式细胞技术和 FQ-PCR 诊断 \geq CIN II 宫颈病变诊断结果 (例)

诊断技术	病理诊断		合计
	阳性	阴性	
流式细胞技术			
阳性	35	3	38
阴性	5	157	162
合计	40	160	200
FQ-PCR			
阳性	34	5	39
阴性	6	155	161
合计	40	160	200

表2 两种诊断方法检测 16 型和 18 型 HPV 病毒 E6 蛋白阳性率 [例 (%)]

组别	例数	FQ-PCR		流式细胞技术		χ^2 值	P值
		16型	18型	16型	18型		
正常组	110	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.000	1.000
CIN I 期组	50	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1/50)	2 (1/50)	0.000	1.000
CIN II 期组	24	19 (79.2)	20 (83.3)	18 (75.0)	20 (83.3)	0.505	0.477
CIN III 期组	10	9 (90.0)	8 (80.0)	10 (100.0)	8 (80.0)	2.222	0.136
宫颈癌组	6	6 (100.0)	6 (100.0)	6 (100.0)	6 (100.0)	0.000	1.000
χ^2 值		165.6	165.0	156.9	159.0		
P值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		

够大幅降低因交叉感染所致的假阳性,促使诊断结果更加科学、可靠,这对宫颈癌的筛查技术发展可能是一个较大的突破。本研究提示两种方法均可用于 \geq CIN II 宫颈病变诊断,但流式细胞技术较FQ-PCR具有操作简便、耗时短以及花费少等优点,更适用于 \geq CIN II 宫颈病变的筛查。

综上,流式细胞技术操作简便,能够有效避免样品交叉感染所致的假阳性以及提高检测HPV感染的准确性。

参 考 文 献

- [1] Venturas C, Umeh K. Health professional feedback on HPV vaccination roll-out in a developing country[J]. Vaccine,2017,5(2): 1142-1150.
- [2] 邴学香,陈铭.二次活检--宫颈锥切术在子宫颈病变诊治中的临床意义[J].西安交通大学学报(医学版),2017,5(1):108-112.
- [3] 张兆焕,胡光维,夏巍巍,等.喉乳头状瘤患儿人乳头状瘤病毒感染的免疫功能变化研究[J].中华医院感染学杂志,2017,5(3):671-674.
- [4] 杨一飞,高山,张庆,等.高危型人乳头状瘤病毒感染及P53蛋白与乳腺癌患者的关联性分析[J].中华医院感染学杂志,2017,7(3):518-520, 524.
- [5] 闫振宇,安玉英,张澍,等.高危型人乳头状瘤病毒感染检测与宫颈病变影响因素分析[J].中华医院感染学杂志,2016,15(1):161-163.
- [6] 袁征,李珍,孙彦珍,等.导流杂交基因芯片技术用于人乳头状瘤病毒感染分型的检测效果[J].中华医院感染学杂志,2016,14(3):552-553, 560.
- [7] 杨蓓雷,王军,肖洋.幼年型复发性呼吸道乳头状瘤病HPV型别测定和临床分析[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,22(9):730-732, 736.
- [8] 潘颖,盛华芳,康玲,等.高危型人乳头状瘤病毒感染与阴道菌群的相关性研究[J].第三军医大学学报,2016,11(13):1559-1564.
- [9] 乔友林,赵宇倩.宫颈癌的流行病学现状和预防[J].中华妇幼临床医学杂志,2015,11(2):141-147
- [10] Nicol AF, Golub JE, Silva JR, et al. An evaluation of p16^{INK4a} expression in cervical intraepithelial neoplasia specimens, including women with HIV-1[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz,2012,107(5):571-577.
- [11] 许剑利,徐克惠.高危型HPV检测及TCT检查在宫颈癌筛查中的应用分析[J].实用妇产科杂志,2014,30(12):946-949
- [12] 何鑫,陶绘丞,刘晨,等.医院机会性筛查人群HR-HPV感染的流行病学特征及与宫颈癌前病变的关系[J].首都医科大学学报,2015,36(2):219-225
- [13] The American College of obstetricians and Gynecologists. Cervical cancer screening and prevention[J]. Obstet Gynecol,2016,127(1):1-20
- [14] 刘爱胜,刘爱玲,罗秋平. PCR与膜芯片分型法检测女性生殖道HPV结果比较分析[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(2):16-17
- [15] 余剑琴,胡燕,周强勇,等.咪喹莫特对伴有高危型HPV感染的宫颈尖锐湿疣疗效及HPV DNA含量的影响[J].温州医科大学学报,2017,47(1):29-32, 36.
- [16] 秦雪梅. P16蛋白与人乳头瘤病毒分型检测在子宫颈液腺癌伴双侧卵巢转移中的诊断价值[J]. 检验医学与临床,2016,13(12):1724-1726.
- [17] 郑蓓佳,陈琪,顾华敏. 高危型人乳头状瘤病毒联合TCT检测在宫颈癌早期筛查中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(2):247-249
- [18] 周卉,张普宏,冯钢,等. 人类乳头状病毒基因分型对HPV E6/E7 mRNA表达的影响[J]. 皖南医学院学报,2016,35(5):426-428.
- [19] 毕晓芳,惠丽红. 人乳头瘤病毒分型在近期妇科门诊及体检患者中的感染状况分析[J/CD]. 实用妇科内分泌电子杂志,2016,3(6):114-114, 116.
- [20] 张姝,李永东,倪红霞. 宁波市子宫颈感染HPV型别分布和HPV16型E6, E7基因分析[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(10):1499-1502
- [21] 段山红,安瑞芳. HPV感染亚型分布及其与宫颈病变关系的研究[J]. 中国妇幼健康研究,2015,26(5):955-957, 958.
- [22] 关琳琳,孙娜,孙广滨,等. 喉鳞状细胞癌及癌前病变的HPV感染亚型分析及临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,22(17):1549-1552.
- [23] 董正蓉,李丹,王凯丽,等. 性病门诊500例男性就诊者HPV感染情况及基因分型分析[J]. 广东医学,2016,25(17):2637-2639.
- [24] 郭继强,韩亚萍,李芳,等. 流式细胞术三种染色方法检测体外纯化扩增的NK细胞的细胞毒作用比较[J]. 中国实验血液学杂志,2016,24(6):1691-1697
- [25] 王建红. 流式细胞技术在医学检验中的应用研究进展[J/CD]. 临床检验杂志(电子版),2017,6(1):149-150.

(收稿日期: 2017-10-11)

(本文编辑: 孙荣华)

胡小云,方红辉,曹国磊,等. 流式细胞术在高危16型和18型人乳头状瘤病毒感染诊断中的价值[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2018,12(3):268-271.