

绵阳地区食管鳞癌患者人乳头瘤病毒感染及基因型别分析

谢 东, 罗一富(四川省绵阳市盐亭县人民医院检验科 621600)

【摘要】 目的 了解绵阳地区食管鳞癌感染与人乳头瘤病毒(HPV)的关系,探讨 HPV 在食管癌病因学中的作用。**方法** 收集食管组织标本 166 例(试验组为食管癌患者活检标本 114 例,对照组为食管良性疾病活检标本 52 例),提取组织标本 DNA,采用表面等离子共振法,检测组织标本 HPV 感染情况及感染 HPV 基因型别。**结果** 114 例食管癌组 HPV 检出率为 40.4%,对照组 HPV 检出率为 5.8%,HPV 感染基因型从高到底依次为 16、18、58、6、31、33、35、51、11 型,食管鳞癌感染 HPV 主要的基因型为 16(23/114)、18(10/114)型,在食管鳞癌 HPV 阳性病例中混合感染 10 例占 21.7%,16 型混合感染 7 例占 15.2%(7/46),18 型混合感染 3 例占 6.52%。**结论** 绵阳地区食管癌活检组织中有 HPV 存在,HPV 感染可能和绵阳地区食管癌的发生存在相关,可能是本地区食管鳞癌发病的危险因素之一。

【关键词】 食管鳞癌; 人乳头瘤病毒; 感染; 基因型别

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.22.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)22-3149-02

Analysis of human apiloma virus infection and its genotype in esophageal squamous cell carcinoma in Mianyang area XIE Dong, LUO Yi-fu (Department of Clinical Laboratory, Yanting County People's Hospital, Sichuan 621600, China)

【Abstract】 Objective To assess the association of human apiloma virus(HPV) infection with esophageal squamous cell carcinoma(EC),and elucidate the putative role of HPV infection in the etiology of esophageal carcinoma in mianyang area. **Methods** A total of 166 esophageal tissue samples were collected and extracted DNA, and 114 samples were esophageal cancer samples in study group, 52 samples were benign esophageal diseases biopsy specimens in control group. Surface Plasmon Resonance (SPR) technique was applied to detect HPV genotypes. **Results** A total of 46 case(40.4%) were HPV positive among 114 EC tissues, while 3 case(5.8%) were HPV positive among 52 controls. The most positive percentage of two subtypes infection of HPV was HPV16 and HPV18, followed by HPV58, 6, 31, 33, 35, 51, 11. Ten cases were infected with two or more than two subtypes. **Conclusion** The high rate of HPV in the esophageal carcinoma samples suggested that HPV infection might be an important etiologic factor in the development of esophageal cancer in Mianyang area.

【Key words】 esophageal squamous cell carcinoma; human apiloma virus; infection; genotype

食管癌是人类消化道常见肿瘤,其发生、发展涉及多因素、多阶段的复杂过程,但具体发病机制尚不明确^[1-2]。人乳头瘤病毒(HPV)是一类主要寄生于鳞状上皮层的 DNA 病毒,是第 1 个被确定为致瘤的病毒^[3]。有关 HPV 感染与食管鳞癌发生相关的研究正成为热点,本研究旨在调查绵阳地区食管鳞癌中的 HPV 感染状况及具体基因型别,探讨本地区 HPV 感染与食管鳞癌发生是否相关。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2010~2013 年食管癌住院患者 114 例作为试验组,其中男 71 例,女 43 例,年龄 43~71 岁,中位年龄 58 岁。病例纳入标准:(1)病例资料记录完整,且全部经病理组织学确诊为鳞状细胞性食管癌,其中高分化鳞癌 38 例,中分化鳞癌 47 例,低分化鳞癌 29 例;(2)初治患者,术前未接受任何化疗或放疗;(3)无合并其他部位的肿瘤。另选同期食管良性疾病患者 52 例作为对照组,其中男 28 例,女 24 例,年龄 38~68 岁,中位年龄 53 岁。食管黏膜大致正常 27 例,反流性食管炎 16 例,食管息肉 9 例。所有组织标本常规 10%甲醛固定,石蜡包埋。两组患者的性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 试剂与仪器 HPV 基因分型检测试剂盒(表面等离子共振法),W2600 型生物传感芯片阅读仪均为北京金菩嘉医疗科技有限公司产品;石蜡组织标本 DNA 提取试剂盒 TaKaRa Dexpat 为大连宝生物公司产品。

1.3 方法

1.3.1 组织切片 DNA 提取 石蜡包埋组织常规切片,厚度 10 μm ,取切片 3 枚放入 1.5 mL 微量管,使用 TaKaRa 组织标本 DNA 提取试剂盒提取组织切片 DNA,试验过程严格按照试剂盒说明书执行。

1.3.2 HPV 检测及基因分型 采用金菩嘉 HPV 基因分型检测试剂盒(表面等离子共振法,SPR)检测 24 种 HPV 基因型(高危型 16 种:16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,81;低危型 8 种:6,11,40,42,43,44,54,70);提取的组织切片 DNA 使用聚合酶链反应(PCR)扩增 HPV 基因片段,然后将 PCR 产物与杂交液按一定比例混合后,注入 SPR 生物传感芯片阅读仪(W2600 型),使其流过表面包被有 24 种 HPV 基因型特异性探针的 SPR 生物传感芯片,与芯片表面 HPV 基因型特异探针反应,芯片阅读仪检测芯片上的杂交信号,数据通过软件分析后可直接判断结果,从而同时对 HPV 的 24 种基因型进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合偏态分布的数据,率的比较使用 χ^2 检验,相关分析使用 Spearman 等级相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组和试验组患者 HPV 感染率比较 试验组患者 HPV 检出率(40.4%)明显高于对照组(5.8%),差异有统计学

意义($P<0.01$),见表 1。

表 1 对照组和试验组患者 HPV 检出率比较(n 或%)				
组别	n	阳性	阴性	阳性率
对照组	52	3	49	5.8
试验组	114	46	68	40.4

2.2 不同分化程度食管癌 HPV 感染率的比较 食管鳞癌中 HPV 感染的阳性率在不同病理分级中的比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 HPV 感染与食管癌病理分级的关系(n 或%)				
病理分级	n	阳性	阴性	阳性率
高分化	37	13	24	35.1
中分化	48	22	26	45.8
低分化	29	11	18	37.9

2.3 研究对象中 HPV 基因分型检测结果 对 114 例食管鳞癌和 52 例对照共计 166 份组织标本进行了 HPV 基因分型检测,结果显示:HPV 感染基因型从高到底依次为 16、18、58、6、31、33、35、51、11 型,食管鳞癌感染 HPV 主要的基因型为 16 (23/114)、18(10/114)型,在食管鳞癌 HPV 阳性病例中混合感染 10 例占 21.7%,16 型混合感染 7 例占 15.2%(7/46),18 型混合感染 3 例占 6.52%。

3 讨 论

食管癌是人类消化道常见肿瘤,现有研究认为食管癌的发生和发展是一个涉及多因素、多阶段的复杂过程^[4],其确切的病因及发病机制尚不明了,1982 年 Syrjanen 对 60 例食管癌进行组织形态学观察,发现约 40%的食管扁平细胞癌病例中有 HPV 感染的特征性改变——湿疣状损伤,并且用免疫组织化学的方法证实了 1 例食管鳞癌中有 HPV 抗原的存在,提出食管癌可能与 HPV 感染有关,推测 HPV 可能是该癌症的危险因子,自此关于 HPV 与食道癌疾病相关性的研究逐渐成为热点^[5-8]。

HPV 是一类主要寄生于鳞状上皮层的小分子 DNA 病毒,是第 1 个被确定为致肿瘤的病毒因素,HPV 与宫颈癌的密切关系已经得到验证,HPV 在食管癌以及其他肿瘤中的作用尚存在争议,但来自我国广东、河北等食管癌高发区的检测结果先后证实了这些地区的食管癌患者中存在相当普遍的 HPV 病毒感染。不同国家与地区研究报道的食管癌中 HPV 的检出率差异极大,从 0%~70%不等,在探讨食管癌中 HPV 检出率的巨大差异时,除了地理因素、环境因素及种族差异的影响外,所采用检测方法的敏感性、特异性及不同的方法学操作也不容忽视。在本研究中,采用 PCR 与表面等离子谐振芯片核酸杂交相结合的方法首次对绵阳地区 114 例食管鳞癌和 52 例食管良性疾病患者共计 166 份组织标本进行了 HPV 检测,SPR 是利用在金属膜/液面界面,由光的全反射引起的物理光学现象来分析分子间相互作用的技术,其无需任何放射性或荧光物质标记样品,能保持分子活性,并可避免由于标记问题产生的结果偏差,能实时、动态地监测生物分子相互作用的全过程,具有高特异性和高灵敏度,且重复性好。在 114 例食管癌中检出 HPV 阳性 46 例,检出率为 40.4%,明显高于对照组的检出率 5.8%(3/52),差异有统计学意义($P<0.05$)。提示在绵阳地区 HPV 的感染,同食管鳞癌发病存在相关,HPV 感染可能是本地区食管鳞癌发病的危险因素。

随着对 HPV 研究的不断深入,人们认识到一些特定的

HPV 型别与人体特定部位的病变有关,且不同疾病可由同一种或多种 HPV 型别引起^[10]。目前已发现的 HPV 类别超过 200 种,其中 120 多种基因型被鉴定,约 40 余种基因型可感染生殖道等黏膜上皮组织,根据其致癌性大小则可分为低危型(如 HPV-6、11、42、43 等)和高危型(如 HPV-16、18、58、35 等),低危型主要引起表皮细胞良性增生,而高危型 HPV 则与生殖道、皮肤、头和颈部以及喉部等的鳞状细胞恶变有关^[9-10]。在 HPV 与宫颈癌的众多研究中表明,HPV 在不同地区感染率和分型均有明显的差异,对 HPV 进行分型研究具有重要意义。本研究对绵阳地区食管鳞癌患者组织标本进行 HPV 检测的同时进行了 HPV 基因分型,结果显示:本组标本中 HPV 感染基因型从高到底依次为 16、18、58、6、31、33、35、51、11 型,食管鳞癌感染 HPV 主要的基因型为 16(23/114,20.2%)、18 (10/114,8.8%)型,在食管鳞癌 HPV 阳性病例中混合感染 10 例(21.7%),16 型混合感染 7 例(15.2%),18 型混合感染 3 例(6.52%),感染的主要亚型及感染方式与国际癌症研究协会报道相符合,HPV16/18 亚型可能为本地区 HPV 相关食管鳞癌发病的主要危险因素及主要的致癌因素。HPV 虽然与食管鳞状上皮恶化具一定相关性,但在本研究中其与食管癌病理分级不存在相关($P>0.05$)。

绵阳地区并不是传统意义上的食管癌高发区,但随着生活习惯、生存环境等等的改变,本地区食管癌的发病率及病死率已成上升态势,本研究提示 HPV 感染可能和绵阳地区食管癌的发生存在相关,可能是本地区食管鳞癌发病的危险因素之一,但尚不能反映整个地区食管癌中 HPV 的感染情况,最终确定本地区 HPV 感染与食管癌的关系,还需要进行大量的实验室基础研究和流行病学资料调查,对大规模健康人群及典型人群进行长期追踪随访,以期从环境、基因、病毒等多方面探讨 HPV 感染与食管鳞癌发生、发展的具体联系。

参考文献

[1] Cao F, Han H, Zhang F, et al. HPV infection in esophageal squamous cell carcinoma and its relationship to the prognosis of patients in northern China[J]. Sci World J, 2014, 12: 804738.

[2] Liyanage SS, Rahman B, Ridda I, et al. The aetiological role of human papillomavirus in oesophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2013, 8 (7): e69238.

[3] Haeri H, Mardany O, Asadi-Amoli F, et al. Human papilloma virus and esophageal squamous cell carcinoma[J]. Acta Med Iran. 2013, 51(4): 242-245.

[4] Yahyapour Y, Shamsi-Shahrabadi M, Mahmoudi M, et al. High-risk and low-risk human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma at Mazandaran, Northern Iran[J]. Pathol Oncol Res, 2013, 19(3): 385-391.

[5] Dabrowski A, Kwasniewski W, Skoczylas T, et al. Incidence of human papilloma virus in esophageal squamous cell carcinoma in patients from the Lublin region [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(40): 5739-5744.

[6] Liyanage SS, Segelov E, Garland SM, et al. Role of human papillomaviruses in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2013, 9(1): 12-28.

[7] Yahyapour Y, Shamsi-Shahrabadi M, (下转第 3152 页)

用新波生物 AT2000 时间分辨免疫荧光分析仪及配套原厂试剂盒进行 ELISA 检测^[5]。

1.3 检测结果判定 ELISA 判断标准为 HBsAb、HBsAg、HBeAg 的结果均为患者的血清标本 A 值/阴性对照,平均 A 值小于 2.1 可判断为阴性,平均 A 值大于或等于 2.1 可判断为阳性;HBeAb(COV)=(阳性对照平均 OD 值+阴性对照平均 A 值)/2,COV≤A 值为阴性,COV>A 值为阳性。HBcAb 判定按照 1:20 的比例将血清稀释,COV=0.5×阴性对照平均 A 值,标本 COV≤A 值为阴性,标本 COV>A 值为阳性。TRFIA 法判断标准为 HBsAb 参考值 0~10 mIU/nd,HBsAg 的参考值为 0~0.5 ng/mL,HBeAg 参考值 0~0.03 ncu/mL,HBcAb 参考值 0~0.1 ncu/mL,HBeAb 参考值 0~1.5 ncu/mL,超过以上参考值即可诊断为阳性。一致性的强弱程度按照 Koch 和 Landis 以 κ 系数的大小划分区段来判断,极差为 κ<0,微弱为 0≤κ≤0.2;弱为 0.2<κ≤0.4;中度为 0.4<κ≤0.6;高度为 0.6<κ≤0.8;极强为 0.8<κ≤1.0。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行处理,计数资料以率表示,比较采用 χ² 检验,用 μ 检验排除抽样误差的影响。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

采用 TRFIA 方法检测 HBV 血清标志物 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的阳性率为 47.1%、41.1%、44.4%、58.9%、48.9%,采用 ELISA 法检测的阳性率分别为 48.3%、42.2%、42.2%、57.8%、52.2%,两组阳性率差异无统计学意义(P>0.05);κ 值范围为 0.68~0.83,其中 HBsAb 最高而 HBeAb 最低,μ 值范围为 8.97~17.98,其中 HBsAb 最高而 HBeAb 最低。两种方法检测 5 个指标的效率表现出极强或高度一致性,差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1。

表 1 ELISA 和 TRFIA 两种方法检测 HBV 血清标志物的结果比较情况

HBV 血清标志物	TRFIA	ELISA		κ	μ	一致性
		阳性	阴性			
HBsAb	阳性	68	6	0.83	17.98	极强
	阴性	8	98			
HBsAg	阳性	78	4	0.69	14.18	高度
	阴性	6	86			
HBeAg	阳性	68	12	0.76	14.89	高度
	阴性	8	92			
HBcAb	阳性	84	4	0.72	12.86	高度
	阴性	10	82			
HBeAb	阳性	96	10	0.68	8.97	高度
	阴性	8	66			

3 讨 论

有关资料表明,全球现在已有约 3 亿人患有乙肝,我国大约有 0.93 亿人携带 HBV^[6]。慢性肝炎患者主要表现为疲乏、肝区不适、肝大、食欲减退、面色暗黄、蜘蛛痣等;重症肝炎的主要临床表现为黄疸迅速加深、肝脏进行性缩小、患者计算能力下降、精神异常、嗜睡,出现少尿、无尿、血尿等现象。

临床实验室检测 HBV 血清标志物的方法很多,其中以 ELISA 最为常见,TRFIA 也逐渐应用与临床,本研究采用 ELISA 和 TRFIA 两种方法检测 HBsAb、HBsAg、HBeAg、HBcAb、HBeAb 5 项指标,通过检测结果可发现 TRFIA 和 ELISA 两种方法检测 5 种 HBV 血清标志物的结果阳性率表现出极强或高度一致性,其中两种方法检测血清 HBsAb 指标表现为极强一致性,其他 4 项指标表现为高度一致。虽然两种方法间未发现明显差异,但 ELISA 在检测 HBsAg 指标上出现 6 例漏检,说明此方法的敏感性稍低,所以临床在诊断可能发生病毒变异或处于病毒复制期的患者应结合 DNA、HBV 和 YMDD 的基因检测结果进行综合分析,以利于明确诊断^[7-8]。

总之,在应用 TRFIA、ELISA 对乙肝血清标志物进行检测时,其结果会保持高度的一致性,这便于结果互认。

参考文献

[1] 崔凡,邵晓敏.时间分辨免疫荧光法检测 HBV 血清标志物的对比分析[J].医学检验与临床,2012,23(3):18-20.
[2] 刘涛,王彦朝.不同方法学检测乙型肝炎肝炎血清标志物结果评价[J].中国医药指南,2013,11(8):121-122.
[3] 朱丽坤.不同方法学检测乙型肝炎血清标志物结果的评价分析[J].按摩与康复医学:中旬刊,2011,2(10):22.
[4] 张登灿.时间分辨免疫荧光技术检测 3 项血清指标的临床应用[J].检验医学与临床,2011,8(14):1769-1771.
[5] 吉飞跃,钱开成.确证 TRFIA 检测乙肝病毒表面抗体结果的研究[J].标记免疫分析与临床,2011,18(1):33-35.
[6] 李先莉.时间分辨免疫荧光技术在乙型肝炎病毒标志物测定中的应用[J].检验医学与临床,2012,9(5):602-603.
[7] Thompson AJ, Nguyen T, Iser D. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers; disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. [J]. Hepatology, 2010, 51(6): 1933-1944.
[8] 陈兴文.前 S2 抗原、HBV 血清标志物与 HBV-DNA 检测结果的相关性探讨[J].检验医学与临床,2009,6(12): 959-960.

(收稿日期:2013-11-25 修回日期:2014-04-12)

(上接第 3150 页)

Mahmoudi M, et al. Evaluation of human papilloma virus infection in patients with esophageal squamous cell carcinoma from the Caspian Sea area, north of Iran[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(4): 1261-1266.
[8] Abdirad A, Eram N, Behzadi AH, et al. Human papillomavirus detected in esophageal squamous cell carcinoma in Iran[J]. Eur J Intern Med, 2012, 23(2): 59-62.
[9] Antonsson A, Nancarrow DJ, Brown IS, et al. High-risk

human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(8): 2080-2087.
[10] Chen MH, Chang PM, Li WY, et al. High incidence of oral squamous cell carcinoma independent of HPV infection after allogeneic hematopoietic SCT in Taiwan[J]. Bone Marrow Transplant, 2011, 46(4): 567-572.

(收稿日期:2014-02-10 修回日期:2014-05-16)