

· 现场调查 ·

人乳头状瘤病毒 DNA 载量与 子宫颈病变的关系

赵方辉 马俊飞 乔友林 戎寿德 李凌 章文华

【摘要】 目的 研究妇女生殖道感染高危型人乳头状瘤病毒(HR-HPV)的载量与子宫颈上皮内瘤变(CIN)的关系。方法 收集参加横断面普查研究的 1997 名 35~45 岁已婚妇女的子宫颈脱落细胞,采用第二代杂交捕获试验(HC2)进行 HPV DNA 检测,病毒载量由样本的相对光单位(RLU)与标准阳性对照(PC)之比(RLU/PC)来衡量,按照 \log_{10} RLU/PC 分为阴性(<0)、低度载量(0~1.12)、中度载量(1.13~2.23)和高度载量(2.24~3.37)。子宫颈病变按照病理诊断分为正常、CIN 1、CIN 2~3 和子宫颈癌(SCC)。采用非条件多项式 logistic 回归分析病毒载量与子宫颈病变级别的关系。结果 100% (12/12)的 SCC、97.3% (72/74)的 CIN 2~3、58.3% (74/127)的 CIN 1、11.5% (205/1784)的正常对象 HR-HPV DNA 检测阳性,各组阳性对象的中位 \log_{10} RLU/PC 分别为 2.60、2.32、2.18 和 1.18。从低度病毒载量与 CIN 1 的危险比值比(OR)为 3.8(1.9~7.3)至高度病毒载量与 CIN 2~3 的 OR 值为 865.9(200.1~3738.0),显示出感染病毒载量与子宫颈病变程度呈正相关($P < 0.001$)。结论 子宫颈 HR-HPV 病毒载量是影响 SCC 及癌前病变的重要危险因素。

【关键词】 子宫颈肿瘤; 人乳头状瘤病毒; 病毒载量; 杂交捕获

Association between high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial lesion ZHAO Fang-hui*, MA Jun-fei, QIAO You-lin, RONG Shou-de, LI Ling, ZHANG Wen-hua. *Department of Epidemiology, Cancer Institute/Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China
Corresponding author: QIAO You-lin. Email: Qiaoy@public.bta.net.cn

【Abstract】 Objective To determine the association between viral load of high risk type human papillomavirus (HR-HPV) and stage of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesion. **Methods** Cervical exfoliated cells were collected from 1997 women aged 35-45 in a cross-sectional screening study. HPV DNA was detected by hybrid capture 2 (HC2) system, and viral load was measured by the ratios of relative light units compared to standard positive control (RLU/PC). \log_{10} RLU/PC were categorized into four groups: negative (<0), low viral load (0-1.12), medium viral load (1.13-2.23), and high viral load (2.24-3.37). Cervical lesions were diagnosed by biopsies as normal, CIN 1, CIN 2-3, and squamous cervical cancer (SCC). Association between HR-HPV and CINs were evaluated by unconditional multinomial logistic regression. **Results** 100% (12/12) SCC, 97.3% (72/74) of CIN 2-3, 58.3% (74/127) of CIN 1, and 11.5% (205/1784) of normal women were positive for HPV DNA. The median \log_{10} RLU/PC for the positive women with SCC, CIN 2-3, CIN 1 and in normal women were 2.60, 2.32, 2.18 and 1.18 respectively. The odds ratio(OR) between low viral load of HPV DNA and CIN 1 was 3.8(1.9-7.3) while between high viral load and CIN 2-3 was OR = 865.9(200.1-3738.0) which showed that higher viral load could increase the risk of cervical lesions ($P < 0.001$). **Conclusion** Both cervical cancer and CINs were highly influenced by HR-HPV viral load.

【Key words】 Cervical neoplasm; Human papillomavirus; Viral load; Hybrid capture

目前在世界范围内已经确认感染高危型人乳头状瘤病毒 (high risk human papillomavirus, HR-HPV) 是引起子宫颈癌 (SCC) 及其癌前病变的必要

因素^[1]。虽然在不同的国家和地区所报道的 HPV 感染率各不相同^[2,3], HPV 感染却是一种常见的通过性生活传播的疾病,感染率高低主要取决于人群的年龄和性行为习惯,尤其是年轻性活跃的妇女 HPV 感染率最高,可达 40%^[4]。与 SCC 的发病率相比,可以看出大部分妇女都是短暂性的 HPV 感染,通常在 8~10 个月左右消失,仅有少数妇女会持

作者单位:100021 北京,中国医学科学院肿瘤医院研究所肿瘤医院
流行病学室(赵方辉、乔友林、戎寿德),妇瘤科(章文华),病理科(李凌);山西省襄垣县妇幼保健院(马俊飞)

通讯作者:乔友林, Email: Qiaoy@public.bta.net.cn

续感染乃至最终发展成 SCC,因此如何识别这部分高风险人群至关重要。有研究表明高度病毒载量与 HPV 持续感染及 SCC 密切相关^[5,6],也有研究认为 HPV 病毒载量在子宫颈病变过程中的作用还不能确定^[7]。第二代杂交捕获试验(hybrid capture 2, HC2)是目前 FDA 批准的惟一一种可用于 SCC 筛查的 HPV 检测试验,除了具有灵敏度高、重复性强的优点外,还具有测定病毒载量的能力。本文旨在利用 HC2 对高发区妇女子宫颈 HR-HPV 感染的检测结果,研究病毒载量与子宫颈不同病变级别的相关关系,为病毒载量能否充当预测子宫颈病变生物学的标志物提供证据。

材料与方法

1. 材料来源:资料取自 1999 年在我国 SCC 高发区山西省襄垣县开展的中美合作项目——SCC 筛查方法的比较研究^[8,9]。采用整群抽样的方法,在襄垣县的四个乡镇随机选取了 1997 例 35~45 岁符合入选标准的已婚妇女,约占总目标人群的 60%。所有研究对象均同时接受了六种筛查方法,其中包括两种 HPV 检测方法——患者自我取材 HPV 检测和医生取材 HPV 检测,所有的妇女均进行了阴道镜检查及病理活检。

2. HPV DNA 检测:本文报道的主要是医生取材 HPV 检测的结果。采用的方法是美国 Digene 公司发展的第二代杂交捕获试验(HC2, Digene Corp., Gaithersburg, MD)^[10],其原理是利用对抗体捕获信号的放大和化学发光信号的检测,可一次性检测 13 种 HR-HPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68)。

(1)基本实验步骤:①样本 DNA 双链被释放并分解成为可以杂交的核苷酸单链;②DNA 单链与 RNA 组合探针结合为 RNA-DNA 杂合体;③特异性抗体将 RNA-DNA 杂合体捕获并固定在试管壁或微孔壁上;④偶联有碱性磷酸酶的第二抗体与 RNA-DNA 杂合体结合;⑤碱性磷酸酶使酶底物发光,判读光的强弱可确定碱性磷酸酶的含量,从而确定 RNA-DNA 杂合体的含量。

(2)病毒载量的测定:样本产生的光由 DML 2000 微孔板判读器来测量,表达为相对光单位(RLU)。通过其与设置的标准阳性对照(PC)之比来判定结果。当比 >1.0 时,认为 HPV DNA 检测阳性,反之 <1.0 时为阴性。由于 RLU 与样本所含

DNA 是成比例的,比值越高,样本中 HPV DNA 载量越高。

3. 数据处理和统计方法:应用 SPSS 10.0 软件进行数据处理和统计分析。对连续性变量进行频数分布和正态性检验,均值的比较采用方差分析。病毒载量原始记录为 RLU/PC,离散程度较大,对其进行对数转换。将 HPV 阳性对象按照百分位数等分成三组,即低度载量(\log_{10} RLU/PC = 0~1.12)、中度载量(\log_{10} RLU/PC = 1.13~2.23)和高度载量(\log_{10} RLU/PC = 2.24~3.37);HPV 阴性对象为一组(\log_{10} RLU/PC < 0)。采用非条件多项式 logistic 回归分析病毒载量与子宫颈各级病变的关系,控制婚孕及性行为等因素,计算危险度比值比(OR)。采用 Kruskal-Wallis 法比较子宫颈各级病变阳性病例的病毒载量。

结 果

1. 该人群平均年龄为(39.60 \pm 3.17)岁,均为已婚妇女,教育水平大多(88.6%)在中、小学程度,只有少数妇女(6.5%)吸烟,少数妇女(2.3%)喝酒。绝大多数妇女(90.1%)做了输卵管结扎术。按照子宫颈病变的病理结果可将人群分为四组:正常、CIN 1、CIN 2~3 和 SCC,其基本情况见表 1。

2. 由于 SCC 病例数较少,且 HPV 检测全部为阳性,所以没有进入病毒载量与子宫颈病变危险度分析模型。表 2 显示以正常组作为对照,调整初次性交年龄、性伴侣人数和怀孕次数后多项式 logistic 回归分析 CIN 1、CIN 2~3 和病毒载量的相关关系。在正常组中 88.5% 是 HPV 阴性,低度载量占 5.4%、中度载量占 4.2%、高度载量仅占 2.0%;在 CIN 1 中,41.7% 阴性、9.4% 低度载量、20.5% 中度载量及 28.3% 高度载量,其与 CIN 1 的 OR 值为 30.3,而在 CIN 2~3 中,仅 2.7% 是 HPV 阴性,54.1% 呈高度载量,OR 值达 865.9。此外,12 例 SCC 患者中 9 例呈高度载量。由此可以看出随着暴露的病毒载量的增加,子宫颈病变级别逐渐加重。

3. 比较子宫颈正常、CIN 1、CIN 2~3 和 SCC 患者中阳性对象的病毒载量,100% (12/12) 的 SCC、97.3% (72/74) 的 CIN 2~3, 58.3% (74/127) 的 CIN 1, 11.5% (205/1784) 的正常对象 HR-HPV DNA 检测阳性,各组阳性对象的中位 \log_{10} RLU/PC 分别为 2.60、2.32、2.18 和 1.18(图 1)。各组阳性对

表1 四组人群基本信息

变量	正常组 ($n_0=1784$)	CIN 1 组 ($n_1=127$)	CIN 2~3 组 ($n_2=74$)	SCC 组 ($n_3=12$)	F 值	P 值
年龄(岁)	39.60±3.14	39.90±3.39	39.60±3.39	41.50±3.29	1.816	0.142
初潮年龄(岁)	15.00±1.70	15.10±1.74	15.00±1.65	15.50±2.78	0.492	0.688
首次性交年龄(岁)	19.80±2.21	19.40±2.05	18.80±2.96	18.50±1.98	7.007	<0.001
性伴侣人数	1.90±1.49	2.10±1.67	2.30±2.39	2.80±1.75	4.507	0.004
怀孕次数	3.10±1.25	3.30±1.42	3.40±1.47	3.20±1.27	2.508	0.057
生产次数	2.60±0.93	2.80±1.06	2.60±0.83	2.50±0.80	1.665	0.173

表2 HR-HPV 病毒载量与子宫颈病变程度的非条件多项式 logistic 回归分析

病毒载量 (\log_{10} RLU/PC)	正常组($n_0=1784$)		CIN 1 组($n_1=127$)			CIN 2~3 组($n_2=74$)		
	例数	构成比(%)	例数	构成比(%)	OR 值(95% CI)	例数	构成比(%)	OR 值(95% CI)
阴性	1579	88.5	53	41.7	1.0	2	2.7	1.0
低度载量(0~1.12)	96	5.4	12	9.4	3.8(1.9~7.3)	11	14.9	87.8(19.1~403.8)
中度载量(1.13~2.23)	74	4.2	26	20.5	10.4(6.1~17.5)	21	28.4	220.6(50.6~961.8)
高度载量(2.24~3.37)	35	2.0	36	28.3	30.3(17.6~52.1)	40	54.1	865.9(200.1~3739.0)

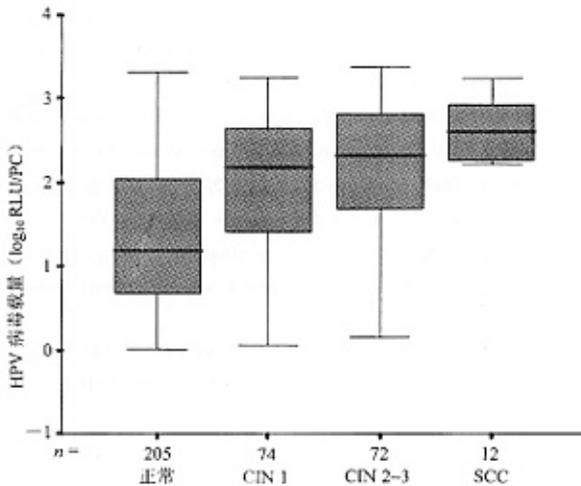


图1 子宫颈病变级别与 HPV 病毒载量分布

象的病毒载量差异有显著统计学意义(Kruskal-Wallis, $\chi^2=67.5, P<0.001$)。

讨 论

单纯通过 HR-HPV 感染阳性或阴性来判断和识别 SCC 的高风险人群有很大的局限性,因为通常大部分妇女的 HPV 感染都会在短期内自动消失,仅有少数的持续感染者才有患 SCC 的可能^[4]。如果能在 6~12 个月内重复检测 HPV 的感染状况,会提高预测子宫颈病变的鉴别力^[11]。但鉴于目前 HPV 检测的成本及患者接受重复检测的顺从性,其实际操作的可能性很小。因此病毒载量能否成为诊断或预测 SCC 的生物标志物是目前有待确定的问题。本次研究结果发现,在子宫颈正常的妇女中绝大多数(88.5%) HPV 呈阴性,感染病毒高度载量的

妇女仅占 2.0%,反之在 CIN 2~3 中,54.1%呈高度载量,仅 2.7% 是 HPV 阴性,约 1/4 的 CIN 1 妇女感染病毒高度载量。病毒载量在各组人群的梯度性比例以及在控制了性行为方面混杂因素后多项式 logistic 回归分析得出的逐渐递增的 OR 值充分显示,HR-HPV 病毒载量与子宫颈病变的程度之间存在着明显的剂量反应关系,病毒载量越高,子宫颈病变加重的危险越大。这一结果与其他类似的研究基本一致^[6,12],一些随访研究也观察到相同的结果^[13,14],但并不是所有评价病毒载量与子宫颈病变危险性的队列研究都支持这一论点^[7]。

从研究设计的角度来讲,本研究是人群基础上的横断面调查,不同于医院基础的病例对照研究,具有很好的代表性,且本次研究的最大的优势是所有对象均有病理诊断,存在错分偏移的可能性较小。所采用的 HPV 检测方法是 HC2,可以检测 13 种 HR-HPV 包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68 型。有证据表明^[15],95% 以上的 SCC 与这些型别相关,低估病毒载量与子宫颈病变相关程度的可能性极小。此外,HC2 试验采用标准的试剂盒,已经被世界上许多国家采用,检测的结果具有很好的可比性。缺点是没有区分具体的 HPV 型别,无法估计各种型别 HPV 致癌的危害程度,有研究认为主要是 HPV-16 的载量起着重要的作用^[16]。

总之,在我国 SCC 高发区进行的研究表明,HR-HPV 病毒载量水平与 SCC 及癌前病变的程度密切相关,但鉴于目前评价病毒载量与子宫颈病变危险性的队列研究存在不一致的研究结果,我们有必要对该人群进行随访研究,进一步验证病毒载量

在 SCC 发病机理中的作用。

参 考 文 献

- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 2002, 55: 244-265.
- Molano M, Posso H, Weiderpass E, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*, 2002, 87: 324-333.
- Anh PTH, Hieu NT, Herrero R, et al. Human papillomavirus infection among women in south and north Vietnam. *Int J Cancer*, 2003, 104: 213-220.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 1998, 338: 423-428.
- Rousseau MC, Trevisan A, Villa L, et al. Viral load as a predictor of HPV infection persistence among women in the Ludwig- McGill cohort study in Sao Paulo, Brazil. In: *Proceedings of the 19th International Papillomavirus Conference*, Florianopolis, Sept. 2-7, 2001.
- Sun CA, Liu JF, Wu DM, et al. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet*, 2002, 76: 41-47.
- Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN 3 or cervical cancer. *Lancet*, 2002, 360: 228-229.
- Belinson JL, Qiao YL, Pretorius R, et al. Shanxi province cervical cancer screening study: a cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical intraepithelial Neoplasia. *Gynecological Oncology*, 2001, 83: 439-444.
- 乔友林, 章文华, 李凌, 等. 山西子宫颈癌筛查方法的横断面研究. *中国医学科学院学报*, 2002, 24: 50-53.
- Clavel C, Masure M, Putaud I, et al. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol*, 1998, 51: 737-740.
- Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*, 2001, 286: 3106-3114.
- Hernandez-Hernandez DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jimenez M, et al. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol*, 2003, 90: 310-317.
- Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer*, 2003, 106: 396-403.
- Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 2003, 103: 519-524.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003, 348: 518-527.
- Joseffson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*, 2000, 355: 2189-2193.

(收稿日期: 2004-06-03)

(本文编辑: 张林东)

· 消息 ·

《中华流行病学杂志》2005 年征订启事

《中华流行病学杂志》是由中华医学会主办的流行病学及其相关学科的高级专业学术期刊、国内预防医学和基础医学核心期刊、国家科技部中国科技论文统计源期刊,并被美国国立图书馆医学文献联机数据库收录。读者对象为预防医学、临床医学、基础医学及流行病学科研与教学工作者。征稿内容:重点或新发传染病现场调查与控制;慢性非传染病的病因学及流行病学调查(含社区人群调查)、干预与评价;环境污染与健康;食品安全与食源性疾病;流动人口与疾病;行为心理障碍与疾病;分子流行病学、基因学与疾病控制;我国西部地区重点疾病的调查与控制等。本刊设有述评、重点原著、疫情监测、现场调查、实验研究、临床流行病学、疾病控制、基础理论与方法、国家重点课题总结、文献综述、问题与探讨等重点栏目。

本刊每期 80 页,全年出版 12 期,每期定价 9 元(含邮费),全年 108 元,由全国各地邮局统一订阅,邮发代号:2-73。本刊编辑部常年办理邮购。地址:北京昌平流字五号《中华流行病学杂志》编辑部,邮编:102206,电话(传真):010-61739449, Email:lxbonly@public3.bta.net.cn 欢迎广大读者踊跃投稿,积极订阅。

本刊编辑部