

内源性雌、孕激素与人乳头瘤病毒在宫颈癌发生中的协同作用研究

王金桃 高尔生 程玉英 闫建文 丁玲

【摘要】 目的 探讨雌、孕激素对宫颈癌发生的作用及其与人乳头瘤病毒(HPV)的协同作用。方法 采用热启动 PCR 和 ELISA 法,对 141 例宫颈癌和 129 名健康妇女进行了 HPV_s、HPV16、雌二醇(E₂)和孕酮(P)含量的测定。结果 宫颈癌组 HPV_s 和 HPV16 的阳性率分别为 75.2% 和 46.8%, 显著高于健康对照组;血清中 E₂ 和 P 的平均浓度均为病例组高于对照组,差异有统计学意义,特别是 E₂ 水平与宫颈癌之间呈剂量反应关系;E₂ 与 HPV_s 之间呈正相加交互作用,且有统计学意义。结论 HPV 感染,特别是 HPV16 感染在宫颈癌发生中起重要作用;内源性雌激素的升高可增加宫颈癌发生的危险性;高水平的雌二醇和 HPV 感染对宫颈癌的发生可能具有协同作用。

【关键词】 宫颈癌;人乳头瘤病毒;内源性雌激素;协同作用

Analysis on synergistic action between estrogen, progesterone and human papillomaviruses in cervical cancer WANG Jin-tao*, GAO Er-sheng, CHENG Yu-ying, YAN Jian-wen, DING Ling. *Department of Epidemiology, Public Health College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of estrogen (E₂) and progesterone (P) on cervical cancer and the synergistic action between estrogen, progesterone and human papillomaviruses (HPV). **Methods** Hoted-start polymerase chain reaction (HS-PCR) was used to detect HPV_s, HPV16 and ELISA was used to assay E₂ and P on 141 cases with cervical cancer and on 129 healthy controls. **Results** Positive rates of HPV_s and HPV16 were 75.2% and 46.8% respectively in cervical cancer group, significantly higher than that in controls. Levels of estrogen and progesterone in case group were significantly higher than that in controls and a dose-responded relationship between the levels of estrogen and cervical cancer was revealed. Estrogen and HPV showed an additive interaction in the development of cervical cancer. **Conclusion** HPV16 infection played a principal role in the development of cervical cancer. The high levels of entogenous estrogen could increase the risk of cervical cancer and might serve as a cofactor in the development of HPV-induced cervical cancer.

【Key words】 Cervical cancer; Human papillomaviruses; Entogenous estrogen; Synergistic action

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,死亡率居妇女恶性肿瘤的首位,其病因至今尚不明确^[1-3]。人乳头瘤病毒(HPV)感染与宫颈癌发生关系密切,但感染了 HPV 的妇女只有少部分发展为癌,说明单独 HPV 感染还不足以引起恶变,势必还有其他致癌因素或协同 HPV 作用的因素存在。在众多可能的协同因素中,雌激素的作用是目前引起关注的热门话题^[2,4]。内源性雌激素在每个个体均按照一定规律发生周期性变化,但在一定条件下可发生异常变化。

研究内源性雌激素与宫颈癌发生、发展的关系,似乎更能较为客观地反映两者之间的关联性。本研究旨在探讨雌、孕激素对宫颈癌发生的作用,以及两者与 HPV 在该病发生中的协同作用,为宫颈癌的病因及发病机制的研究提供科学依据。

对象与方法

1. 研究对象:2001 年 11 月至 2002 年 11 月在山西省肿瘤医院,依据住院编号随机抽取按照现行诊断标准、经病理学确诊的宫颈癌新发病例 141 例作为病例组,同时从社区妇科体检的 1582 名妇女中选择非肿瘤、无妇科现病史、宫颈细胞巴士涂片Ⅱ级以下的健康妇女为对照组,从中选取符合纳入与排

基金项目:山西省科技攻关课题资助项目(021080)

作者单位:030001 太原,山西医科大学流行病学教研室(王金桃、丁玲);上海市计划生育科研所(高尔生);山西省肿瘤医院(程玉英、闫建文)

除标准、处于月经周期第 5-8 天者共 129 名。病例与对照均需排除孕妇、卵巢既往或现症患者、其他癌症患者、甾体类激素使用者。

2. 标本来源: 宫颈癌患者于手术后采集组织标本, 液氮保存; 健康对照和部分病例于入院后系统治疗前用宫颈刮片 360° 旋转 2 圈收集宫颈脱落细胞, 置事先配制的 PBS 液中, 12 h 内离心、富集细胞, -80℃ 贮存待检。同时于卵泡期(月经周期第 5-8 天)采集全部对象空腹静脉晨血 3 ml, 分离血清置 -40℃ 冰箱贮存、待检。

3. 实验方法:

(1) 聚合酶链式反应(PCR): 采用酚-氯仿蛋白酶 K 法提取 DNA。选择 HPV L 区基因序列片段为共用引物^[5](含 HPV6、11、16、18、31 和 33 共 6 个主要亚型)进行 HPV DNA 检测; 选择 HPV16 基因中较稳定的 E6 和 E2 基因序列为特异性多重引物^[6], 进行高危型 HPV16 的扩增。引物由上海生工生物工程公司合成。PCR 扩增体系: 总体积 50.0 μ l, 含 10 \times buffer 5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ l, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ l, 25 pmol/L P1、P2 各 1 μ l, 模板 DNA 100 ng, 置 PTC-100 PCR 扩增仪上采用热启动 PCR 法进行 HPV 和 HPV16 的扩增。PCR 的反应条件参见文献[5, 6]。每次测定均设阳性、阴性和空白对照。取 PCR 扩增产物 10 μ l, 经 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB)电泳, 在 VILBER CV-A50C 凝胶成像仪上扫描并保存图片。

(2) 酶联免疫吸附试验(ELISA): 对所采集的血清标本, 应用 ELISA 法批量测定雌二醇(E₂)和孕酮(P)的含量。检测试剂盒购自 U. S. A Biocheck Inc, 严格按照说明书进行操作, 每块测定板均设双份标准系列和质控。在伯乐-450 酶标仪于 450 nm 单波长下读取各标准孔、质控孔和样本待测孔的吸光度值(A 值)。以各标准孔 E₂(pg/ml)或 P(ng/ml)的浓度为横坐标、平均 A 值为纵坐标绘制标准曲线, 进而查得样本中雌、孕激素的含量。

4. 统计学分析: 采用 SPSS 10.0 软件进行各組间观察指标的 *t* 检验、 χ^2 检验、趋势 χ^2 检验以及多元 logistic 回归分析。应用交互作用定性和定量测量公式进行雌、孕激素与 HPV 协同作用分析。

结 果

1. 病例组与对照组的均衡性分析: 宫颈癌患者 141 例, 年龄 25~75 岁, 平均 49.00 岁 \pm 9.80 岁; 对照

组 129 例, 年龄 24~78 岁, 平均 50.50 岁 \pm 11.31 岁, 两组的平均年龄差异无统计学意义($t = 1.16, P = 0.245$)。两组人群的出生地、种族、居住地(城乡)、婚姻状况、绝经状况等因素的分布一致, 差异均无统计学意义。

2. HPV 及 HPV16 感染状况: HPV DNA 检测结果显示, 病例组和对照组的阳性率分别为 75.2% 和 6.2%, 差异有统计学意义($OR = 45.81, 95\% CI: 20.36 \sim 103.09$)。高危型 HPV16 的检测以 E6 或 E2 任一片段阳性时判为阳性。结果显示, 上述两组的阳性率各为 46.8% 和 2.3%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 70.07, P = 0.000$), HPV16 阳性分别占各組 HPV 阳性者的 62.3% (66/106) 和 37.5% (3/8)。

为了防止手术组织与宫颈脱落细胞样本来源不同对 HPV 感染标志检测带来的偏倚, 按住院顺序随机抽取了 24 例宫颈癌患者进行手术组织和脱落细胞 HPV 感染状况的一致性评价。结果显示, HPV 和 HPV16 的一致性分别为 91.67% 和 87.50%, Kappa 值分别为 0.78 和 0.75, 具有统计学意义($P = 0.000$)。

3. 雌、孕激素含量的分析: 血清中 E₂ 和 P 定量测定结果显示, 两者的平均浓度均为病例组高于对照组, 经方差齐性检验, 差别均无统计学意义(E₂: $F = 3.025, P = 0.083$; P: $F = 1.327, P = 0.250$), 两组 E₂ 和 P 的平均浓度差别显著(表 1)。

表 1 病例组与对照组 E₂ 和 P 含量比较

分组	例数	E ₂ ($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$) [*]	P($\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$) [#]
病例组	141	47.49 \pm 25.78	2.34 \pm 4.71
对照组	129	27.98 \pm 32.51	1.13 \pm 1.39

* $t = 5.49, P = 0.000$; # $t = 2.81, P = 0.005$

以卵泡期正常参考值的下限浓度(E₂: 40 pg/ml, P: 2 ng/ml)为界, 病例组 E₂ 和 P 各有 75.2% 和 29.8% 的比例高于下限值, 与对照组的比例(22.5% 和 21.7%)相比, E₂ 有统计学显著差别($P = 0.000$)。进一步将雌、孕激素在对照组的含量以四分位数法分级, 进行不同雌、孕激素水平与宫颈癌关系的剂量反应关系分析, 结果显示, 随着雌激素水平的增高, 宫颈癌发生的危险性增大(表 2), 而孕激素与宫颈癌之间未见这种趋势($P > 0.05$)。

4. HPV 与雌性激素对宫颈癌发生的协同作用分析:

(1) 雌、孕激素与 HPV 交互作用的定量分析:

利用生物学交互作用原理,对 E₂ 和 P 与 HPV 交互作用的相加作用模式分析表明, E₂ 和 P 与 HPV_s 均显示有正相加作用,经 *u* 检验 E₂ 与 HPV_s 的相加模式有统计学意义 (*u* = 1.96, *P* = 0.05)。E₂ 和 P 与 HPV_s 交互作用超额相对危险度 (*RERI*)、交互作用归因比 (*API*) 和交互作用指数 (*S*) 三项指标的计算结果见表 3。

表2 不同 E₂ 水平与宫颈癌发生关系分析

分 组	E ₂ 水平 (pg/ml)				合计
	<10	10~	16~	≥35	
病例组	1	7	24	109	141
对照组	30	28	34	37	129
OR 值	1.00	7.50	21.18	88.38	-

注:趋势检验 $\chi^2 = 75.53, P = 0.000$

表3 E₂ 和 P 与 HPV_s 交互作用分析

E ₂ *	HPV _s	病例数	对照人数	OR 值
+	+	78	3	352.86
+	-	28	26	14.62
-	+	28	5	76.00
-	-	7	95	1.00

P#	HPV _s	病例数	对照人数	OR 值
+	+	36	2	58.97
+	-	6	26	0.76
-	+	70	6	38.22
-	-	29	95	1.00

* *u* = 1.958, *P* = 0.05; *RERI* = 263.86; *API* = 0.75; *S* = 3.97;

u = 0.458, *P* > 0.05; *RERI* = 7.10; *API* = 0.39; *S* = 1.72

(2) 雌、孕激素和 HPV 与宫颈癌关系的多元 logistic 回归分析:为了识别雌、孕激素及 HPV 各项感染标志之间的相互影响以及发现它们在宫颈癌发生中的效应修饰作用,将 HPV_s、HPV16、E₂、P、HPV_s * E₂ 和 HPV_s * P 6 个因素引入非条件 logistic 回归模型。在 $\alpha = 0.05$ 、允许误差为 0.10 水平,采用 *Wald* 前进法进行各变量的拟合,最终进入模型的变量为 E₂ 和 HPV_s,其主要参数见表 4。雌、孕激素与 HPV 的交互项均未进入模型。

表4 病例组与对照组比较 HPV 和雌孕激素多因素分析结果

变量	β	<i>s_e</i>	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值	OR 值 (95% CI)
E ₂	2.445	0.406	36.221	0.000	11.532 (5.20 ~ 25.57)
HPV _s	3.123	0.486	41.204	0.000	22.705 (8.75 ~ 58.91)
常数项	-4.897	0.703	48.532	0.000	-

讨 论

宫颈癌的发生是多种因素综合作用的结果,除了 HPV 感染作为主要的生物学因素外^[1-3],其他各

种可预防性的环境因素在不同地区、不同人群中发生的作用效应可能不同。本研究从当地收住宫颈癌最多的医院中选择一定时期内确诊的新发病例和一定数量的社区健康妇女作为研究对象,具有较好的代表性。通过对病例与对照某些条件的限制,保证了两组的均衡、可比性。

迄今为止采用 DNA 同源性分析技术已发现的 100 余种 HPV 中,与生殖道感染有关的就达 30 多种,而高危型 HPV16 是导致宫颈癌发生的最主要型别^[7]。本次研究参照 Yoshikawa 设计的高保守区 (L₁ 区) 共用引物^[5],在实际操作中引入热启动 PCR 扩增技术,提高了实验结果的稳定性和基因扩增的特异性。141 例宫颈癌患者和 129 名健康对照者 HPV_s 检测结果显示,宫颈癌组阳性率为 75.2%,明显高于健康对照组 (6.2%),宫颈癌组 HPV16 阳性率为 46.8%,占 HPV_s 阳性者的 62.26%。综合几项涉及山西地区宫颈癌与 HPV 感染状况的研究,有一个共同的发现:宫颈癌的发生与 HPV 感染密切相关,其中 HPV16 感染有重要的意义^[5,8]。

研究发现,长期口服避孕药 (OCs) 可增加宫颈癌发生的危险性^[3,4]。OCs 作为外源性激素,进入体内后发生的生物学效应和机体对外源性物质的生物学反应受多种因素的影响。但目前关于内源性激素与宫颈癌的研究却鲜见报道。本研究结果显示,宫颈癌患者体内 E₂ 和 P 含量均显著高于对照组水平,特别是高水平的 E₂ 与宫颈癌的发生有显著的统计学相关性,且呈剂量反应关系。

在 HPV 致宫颈癌可能的协同因素中,由于甾体类雌、孕激素的变化与女性生理代谢功能密切相关,且涉及到发生宫颈病变后是否可以采用激素治疗等问题,对它们的作用更加关注^[4]。关于内源性雌、孕激素与 HPV 在宫颈癌发生中的相互关系,虽然最近国外有少数报道,但结论不一。本次对 E₂ 与 HPV_s 的生物学交互作用分析显示,两者之间存在正相加交互作用,且有统计学意义,经交互作用的定量分析, E₂ 和 HPV_s 同时存在所致宫颈癌发生的危险是其他因子所致危险性的 263 倍,占宫颈癌发生危险的 75%,两种因素同时存在的危险性是它们各自单独存在时危险性之和的 3.97 倍。但 P 与 HPV 的交互作用无统计学意义。经雌、孕激素与 HPV 感染标志的多元 logistic 回归分析, E₂ 和 HPV 作为独立变量引入了方程。结果提示, E₂ 水平的升高和

HPV 感染对宫颈癌的发生均具有重要作用,当两者同时存在时,主要表现为正相加交互作用,而多元 logistic 回归分析与生物学交互作用分析的结果均未显示雌激素与 HPV 之间存在相乘关系。事实上,在医学领域中许多相关因素间也并非相乘关系而是相加关系。有学者报道绝经期妇女使用性激素类药物能增加 HPV 感染和下生殖道侵袭性损伤发生的危险性^[9],进一步发现 2 年以上长期使用者 HPV 感染的危险性明显增高, Kedzia 等^[10]发现 HPV DNA 升高与血中孕酮水平的升高有关,提示雌、孕激素与 HPV 在宫颈癌的发生中可能有协同作用,但其详细机制有待深入研究。

参 考 文 献

- 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.
- Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*, 2002, 89: 183-190.
- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*, 2002, 89: 191-199.
- Moodley M, Moodley J, Chetty R, et al. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer*, 2003, 13: 103-110.
- 赵富玺, 刘尚义, 司静懿, 等. 宫颈腺癌和鳞癌活检组织中的 HPV18 和 HPV16——一项对比研究. *中华肿瘤杂志*, 1994, 16: 102-105.
- Badaracco G, Venuti A, Sedati A, et al. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol*, 2002, 67: 574-582.
- Dell G, Gaston K. Contributions in the domain of cancer research: human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58: 1923-1942.
- 戎寿德, 陈汶, 吴令英, 等. 山西省襄垣县宫颈癌危险因素分析. *中华预防医学杂志*, 2002, 36: 41-43.
- Ferencyz A, Gelfand MM, Franco E, et al. Human papillomavirus infection in postmenopausal women with and without hormone therapy. *Obstet Gynecol*, 1997, 90: 7-11.
- Kedzia W, Gozdziacka-Jozefiak A, Kwasniewska A, et al. Relationship between HPV infection of the cervix and blood serum levels of steroid hormones among pre- and postmenopausal women. *Eur J Gynecol Oncol*, 2000, 21: 177-179.

(收稿日期: 2004-08-06)

(本文编辑: 张林东)

· 疾病控制 ·

西安市某校大学生人体蠕形螨流行情况调查

赵亚斌 寻萌 郭娜

为了解蠕形螨在大学生中的流行情况,我们于 2003 年 9—12 月对西安市某校蠕形螨的感染情况进行了调查。

1. 对象与方法: 调查对象为西安市某高校 383 名 18~23 岁在校学生。采用问卷的方式对蠕形螨分布情况进行调查。采用挤压法和透明胶纸粘贴法采取样品。感染度按每人 7 片检出的螨虫数分度: 1~10 只为轻度; 11~30 只为中度; 31 只以上为重度。采用 SPSS 软件分别对相关数据进行 Pearson 卡方检验。

2. 结果: 共调查了 383 人, 总阳性率为 93.73%。在 359 例阳性感染者中单纯毛囊蠕形螨、皮脂蠕形螨与混合感染检出率分别为 65.74%、3.34%、30.92%。采用透明胶纸粘贴法共检出阳性感染者 345 例, 其中轻度感染者占 71.01%, 中度感染者占 20.00%, 重度感染者占 8.99%。在完成该项目调查问卷的对象中, 男、女总阳性率分别为 95.08% (232/244) 和 91.36% (127/139); 城、乡感染率分别为 93.16% (218/234) 和 94.56% (139/147); 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。在本次调查中, 采用透明胶纸粘贴法检出率 91.76% (345/376) 明显高于挤压法检出率 34.49% (129/374), $\chi^2 =$

264.354, $P < 0.01$ 。检出部位以颜面部为高, 其中两颊感染率最高为 63.30% ($\chi^2 = 37.968$, $P < 0.05$); 其次为鼻部 52.66%、额头 50.53%、颈部 40.96%; 前胸 12.23% 和后背 7.45% 感染率较低, 且差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.856$, $P < 0.05$)。增加检查次数可以提高蠕形螨检出率, 对 205 人连续检查了三次, 第一次检出率为 90.24%, 第二次为 95.12%, 第三次为 96.10%。三次检出率明显高于一次检出率 ($\chi^2 = 6.956$, $P < 0.05$)。

3. 讨论: 调查表明男、女蠕形螨感染率无差异; 感染度以轻、中度多见; 感染虫种以单纯毛囊蠕形螨感染为主, 混合感染次之, 而单纯皮脂蠕形螨感染最少, 原因可能是皮脂蠕形螨寄生部位较深, 相对不易爬出, 相互间传播的可能性要小。同时调查发现, 城镇学生和农村学生之间、不同皮肤类型学生之间蠕形螨的感染均无差异。说明蠕形螨在学生中感染很普遍。因此, 对于长期集体生活的大学生来说, 一定要注意个人卫生, 避免身体密切接触, 盥洗用具一定要专人专用, 毛巾、内衣等要定期加热灭螨, 温度在 58~60℃ 以上 3 min 即可, 被褥要勤洗勤换, 常在日光下晾晒, 防止传播。

(收稿日期: 2004-12-23)

(本文编辑: 尹廉)