

· 临床研究 ·

DNA 倍体联合高危型 HPV 在宫颈鳞癌患者淋巴结转移中的表达

徐晓燕¹, 翟瑞芳²

1. 山西医科大学, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第一医院妇科, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 探讨 DNA 倍体联合高危型 HPV (HR-HPV) 在宫颈鳞癌患者术后盆腔淋巴结微转移中的表达及意义。**方法** 根据术后淋巴结常规病理学检查 (HE 染色) 结果分为淋巴结转移组 (实验 1 组) 和淋巴结无转移组 (实验 2 组)。采用 DNA-AICM 及导流杂交方法分别对两组进行 DNA 倍体及 HR-HPV 的检测; 将 HE 染色结果与 DNA 异倍体、HR-HPV 检测结果进行对比。**结果** DNA 异倍体及 HR-HPV 在实验 1 组中的阳性表达率分别为 56.07% 及 50.47%, 双阳性率为 44.86%。二者在实验 2 组中的阳性表达率分别为 17.49% 及 10.59%, 双阳性率为 4.93%; 二者在转移阳性淋巴结中的阳性表达率及双阳性率均为 100%。二者在转移阴性淋巴结中的阳性表达率分别为 19.58% 及 12.42%, 双阳性率为 6.32%。**结论** DNA 倍体及 HR-HPV 有可能作为宫颈鳞癌盆腔淋巴结微转移的指标, 二者联合检测可提高盆腔淋巴结微转移的检出率。

关键词: 宫颈鳞癌; 盆腔淋巴结; 微转移; DNA 倍体; 高危型 HPV

中图分类号: R 737.33 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2019)11-1535-04

Expression of DNA ploidy combined with high-risk HPV in lymph node metastasis of patients with cervical squamous cell carcinoma

XU Xiao-yan*, ZHAI Rui-fang

*Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Corresponding author: ZHAI Rui-fang, E-mail: ruifangzhai@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of DNA ploidy combined with high-risk HPV (HR-HPV) in pelvic lymph node micrometastasis in patients with cervical squamous cell carcinoma after operation. **Methods** According to the results of routine pathological examination (HE staining) of lymph nodes after operation, the patients were divided into lymph node metastasis group and non-metastasis group. DNA ploidy and HR-HPV were detected by DNA-AICM and conduction hybridization, and the results of HE staining were compared with those of DNA aneuploidy and HR-HPV. **Results** The positive rates of DNA aneuploidy and HR-HPV in lymph node metastasis group were 50.47% and 48.60% respectively, and the double positive rate was 44.86%. The positive expression rates of DNA aneuploidy and HR-HPV in non-metastasis group was 18.97% and 11.08%, respectively, and the double positive rate was 4.92%. The positive expression rates and double positive rates of DNA aneuploidy and HR-HPV in metastatic positive lymph nodes were 100%. The positive expression rates of DNA aneuploidy and HR-HPV in metastatic negative lymph nodes were 19.58% and 12.42% respectively, and the double positive rate was 6.32%. **Conclusion** DNA ploidy and HR-HPV may be used as indicators of pelvic lymph node micrometastasis in cervical squamous cell carcinoma, and their combined detection can improve the detection rate of pelvic lymph node micrometastasis.

Key words: Cervical squamous cell carcinoma; Pelvic lymph node; Micrometastasis; DNA ploidy; High-risk HPV

Fund program: Applied Basic Research Program of Shanxi Province (201801D121224)

宫颈癌是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤, 治疗方案主要为手术治疗。临床上有的宫颈癌患者术后淋巴结常规病理学检查阴性, 但最终还是出现了肿瘤

的复发及转移, 说明这些患者盆腔淋巴结中已经出现了常规病理学检查无法检测出来的微小转移病灶。因此, 这些微小转移病灶的检出有助于评估宫颈癌手

术治疗后的预后,可以有针对性地对患者进行补充治疗,制定个体化治疗方案,减少术后复发率。高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)的持续感染是子宫颈鳞癌发生的高危因素。当细胞发生恶性变,细胞遗传物质发生变化,即 DNA 含量发生变化。目前 DNA 倍体检测及 HR-HPV 检测已应用于宫颈癌的筛查,而宫颈癌的淋巴结转移,目前观点认为主要是由输入淋巴管和输出淋巴管共同参与,据此推测 DNA 异倍体及 HR-HPV 可作为宫颈鳞癌淋巴结微转移的检测指标。本研究主要探讨 DNA 倍体及 HR-HPV 在宫颈鳞癌淋巴结微转移的检测意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2017 年 11 月至 2018 年 11 月在山西医科大学第一医院妇科进行手术治疗的宫颈癌患者 27 例。纳入标准为:未曾接受过任何治疗;FIGO 分期为 I A2 ~ II A2 期;术前宫颈 HR-HPV 阳性结果,宫颈活检病理检查为宫颈鳞癌;手术方式为经腹广泛性全子宫切除 + 双侧附件切除 + 盆腔淋巴结清扫术;体温正常,血细胞分析白细胞、中性粒细胞、中性粒细胞百分比等指标均在正常范围;临床资料完整;除外其他恶性肿瘤。年龄 36 ~ 61 岁,中位年龄 48 岁。其中 I A2 期 4 例, I B1 期 6 例, I B2 期 5 例, II A1 期 9 例, II A2 期 3 例。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 宫颈鳞癌患者术后盆腔淋巴结离体后逐个进行标记,为保证常规病理学检查所需标本,对于直径 < 5 mm 的淋巴结,长轴纵行切取淋巴结总体积的 2/3 经 10% 福尔马林液固定后常规行石蜡包埋 HE 染色供病理学检查,剩余 1/3 淋巴结液氮保存后,在新鲜状态下研磨成组织匀浆共 2 份,1 份制成单细胞悬液供 DNA 异倍体分析,另 1 份装入潮州凯普生物化学有限公司专用 HPV 细胞保存液送入实验室行 HR-HPV 检查。对于直径 ≥ 5 mm 的淋巴结,切成 3 块组织,第 1 份完全满足病理检查所需的样本量,行石蜡包埋 HE 染色,第 2 份和第 3 份分别 DNA 倍体检测和 HR-HPV 检测,方法同前,所有用于检测的淋巴结标本均保证有所属小叶的淋巴结被膜。实验 1 组:即转移组患者,所有切除的淋巴结,经 HE 染色病理检查有转移的患者(含 1 枚及 1 枚以上淋巴结病理学检查阳性);实验 2 组:即无转移组患者,切除的全部淋巴结,经 HE 染色病理检查结果均无转移的患者。阳性对照组:自身原发癌组织。

1.2.2 HR-HPV 的检测 采用潮州凯普生物化学有限公司的 PCR + 膜杂交法(导流杂交技术)进行 21 种

(6、11、16、18、31、33、35、39、42、43、44、45、51、52、53、56、58、59、66、68 和 81)。首先提取 DNA,按试剂说明书操作,进行 PCR 扩增、杂交实验。将涂有基因型特异性探针的杂交膜置于杂交器中进行快速核酸杂交,用酶标记反向斑点印迹法测定扩增产物,得到有色反应。阳性测试结果显示为蓝紫色点。

1.2.3 DNA 倍体检测 DNA 含量可用 DNA 指数(DNA index, DI)表示,通常人体细胞为二倍体,DI = 1。将标本浸入 AF 固定液(40% 甲醛溶液 10 ml + 95% 乙醇 90 ml),进行 Feulgen 染色,采用购自武汉兰丁公司的全自动细胞图像分析仪扫描细胞学印片,经计算机程序自动分析计算 DI 值,DI < 0.9 或 DI > 1.1 为 DNA 异倍体。

1.2.4 病理学检查 10% 福尔马林液固定手术标本 8 ~ 10 h,自动脱水机进行洗涤、乙醇脱水及二甲苯透明,常规包埋,石蜡固定后切片。切片置入含有 2% 伊红的 0.9% 的生理盐水中,使组织着色,由两位经验丰富的病理科医生分别单独阅片得出结果。

1.3 统计学方法 用 SPSS 25.0 软件包处理数据,组间阳性率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

27 例宫颈鳞癌患者检出淋巴结共 513 枚。实验 1 组有 5 例,检出淋巴结 107 枚,其中 38 枚病理学检查阳性,60 枚淋巴结 DNA 为异倍体(DI < 0.9 或 DI > 1.1),阳性检出率为 56.07% (60/107)。54 枚淋巴结 HR-HPV 阳性,阳性检出率为 40.47% (54/107)。48 枚淋巴结 DNA 异倍体及 HR-HPV 为双阳性,双阳性率为 44.86% (48/107)。实验 1 组病理学检查阳性的 38 枚淋巴结 DNA 倍体及 HR-HPV 全部为阳性。

实验 2 组有 22 例,检出淋巴结 406 枚,其中 71 枚淋巴结 DNA 为异倍体,阳性检出率为 17.49% (71/406)。43 枚淋巴结 HR-HPV 阳性,阳性检出率为 10.59% (43/406)。20 枚淋巴结 DNA 异倍体及 HR-HPV 为双阳性,双阳性率为 4.93% (20/406)。

在实验 1 组中,病理学检查阴性淋巴结 69 枚,其中 DNA 异倍体 22 枚,阳性检出率为 31.88% (22/69);HR-HPV 阳性 16 枚,阳性检出率为 23.19% (16/69);DNA 异倍体及 HR-HPV 双阳性 10 枚,双阳性率为 14.49% (10/69)。比较 DNA 异倍体、HR-HPV 检测与常规病理学检查宫颈鳞癌淋巴结的阳性率,宫颈鳞癌分期组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),随着临床分期期别的增加,二者阳性检出率

上升。在实验 1 组中全部淋巴结、实验 1 组中阴性淋巴结、实验 2 组中全部淋巴结组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。三组比较,实验 1 组淋巴结中 DNA 异倍体及 HR-HPV 阳性检出率最高,实验 1 组阴性淋巴结次之,实验 2 组的淋巴结最低。在年龄组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

在全部淋巴结中,病理学检查阴性淋巴结 475 枚,其中,实验 2 组淋巴结 406 枚,实验 1 组阴性淋巴结 69 枚,此两组淋巴结中 DNA 异倍体表达率、HR-HPV 阳性表达率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

3 讨论

微转移这一概念最早于 1971 年由 Huvos 在对乳腺癌的研究中提出,且目前其在乳腺癌及消化道恶性肿瘤方面的研究已取得一定程度的认可^[1-2]。此后不断有研究证明妇科肿瘤淋巴结中也存在微转移^[3-4]。宫颈癌的转移途径主要为淋巴转移,术后盆腔淋巴结转移与患者预后相关^[5]。研究显示,术后盆腔淋巴结无转移的宫颈癌患者 5 年生存率为 85%~90%,而术后盆腔淋巴结转移患者 5 年生存率则下降 25%~60%^[6]。可见,准确的预后判断有助于提高部分患者的生存率。

恶性肿瘤的细胞学特点之一是遗传物质的异常增殖,其含量及倍体特性直接反应了细胞增殖的活跃状态,在这些异常增殖的细胞中 DNA 多为非整倍体。研究显示超过 90% 宫颈癌患者 HR-HPV 阳性^[7-9],研究显示宫颈鳞癌患者术后部分盆腔淋巴结 HPV16/18-DNA 为阳性表达^[10],笔者推测在宫颈癌淋巴循环过程中,伴随有 HR-HPV 进入到相应淋巴结的可能,而这种变化在一定时间内尚未形成组织学改变,用常规的 HE 染色方法无法找到转移灶的形态学改变,事实上这部分盆腔淋巴结已经发生了微转移。因此,HR-HPV 及 DNA 异倍体可作为检测宫颈癌淋巴结微转移的指标。

目前,多数 DNA 倍体检测研究使用的标本为石蜡组织进行脱蜡所得,本实验采用液氮保存后的新鲜淋巴结标本制成单细胞悬液,可避免石蜡包埋组织在制片过程中组织内化学成分的变化和丢失,能更准确

地反映细胞所处的状态,测得的 DNA 倍体值更加精确。此外,在同一组织细胞内,DNA 含量的检测结果可能存在一些差别,但一般情况下这种差别较小,基于这个特征,本实验选取 $DI < 0.9$ 或 $DI > 1.1$ 作为 DNA 异倍体取值范围。另外,一些其它特殊情况也可能影响 DNA 检测结果,如炎症细胞、破损细胞、VitB12 缺乏、放射线等因素,因此,本实验在收集标本时已排除以上因素,并注意保存细胞的完整性。

Horn 等^[11]对 894 例宫颈癌患者研究发现微转移是宫颈癌的危险因子,推荐存在微转移的患者接受辅助治疗。本实验结果显示,(1)在宫颈鳞癌不同分期中,DNA 异倍体率及 HR-HPV 阳性率不同,分期越高,DNA 异倍体率及 HR-HPV 阳性率越高,表明 DNA 异倍体率及 HR-HPV 阳性率与病情严重程度有关。(2)在 475 枚转移阴性淋巴结中,实验 1 组中的阴性淋巴结与实验 2 组中全部淋巴结比较,前者的 DNA 异倍体率及 HR-HPV 阳性率均高于后者,说明了 DNA 异倍体率及 HR-HPV 阳性率更高的患者,发生转移的可能性更大,也为 DNA 倍体及 HR-HPV 可作为淋巴结微转移指标提供了佐证。故在临床中微转移阳性表达较高的患者术后随访应引起临床医师的足够重视,根据情况定制随访时间。

本实验研究样本量较少,且缺乏预后随访结果,故目前结论尚不十分明确,需加大样本量并有效随访来进行预后及生存曲线分析,从而提高实验结论的准确性。目前关于 DNA 倍体、HR-HPV 与宫颈鳞癌

表 1 淋巴结微转移率在各临床指标间的表达差异

临床指标	淋巴结 DNA 异倍体及 HR-HPV 双阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
分期			
I A2 期	5.33 (4/75)	20.508	0.000
I B1 期	5.13 (6/117)		
I B2 期	12.77 (12/94)		
II A1 期	18.60 (32/172)		
II A2 期	23.64 (13/55)		
年龄			
≤48 岁	20.65 (51/247)	0.275	0.600
>48 岁	22.56 (60/266)		
淋巴结			
实验 1 组淋巴结	44.86 (48/107)	107.945	0.000
实验 1 组阴性淋巴结	14.49 (10/69)		
实验 2 组淋巴结	4.93 (20/406)		

表 2 转移阴性淋巴结中 DNA 异倍体及 HR-HPV 阳性率的差异

组别	例数	DNA 倍体的表达		χ^2 值	P 值	HR-HPV 阳性的表达		χ^2 值	P 值
		异倍体数	异倍体率 (%)			HR-HPV 阳性数	HR-HPV 阳性率 (%)		
实验 1 组阴性淋巴结	69	22	31.88	7.763	0.005	16	23.19	8.604	0.003
实验 2 组淋巴结	406	71	17.49			43	10.59		

修补术,18 例患者憩室前方肌层厚度均 < 3 mm; 评估为重型憩室的患者 22 例,其中 13 例患者采用经阴道剖宫产疤痕憩室修补术,前方肌层厚度均 < 3 mm,术后随访患者临床症状均有明显改善。

综上所述,经阴道二维及三维超声检查联合应用可全面评估憩室类型(憩室大小、前方残存肌层厚度、肌层血流、憩室容积,子宫周围情况),提高 PCSD 诊断准确率,尤其是对轻型憩室的诊断及对残存肌层的测量更精准,为临床医生诊治子宫切口憩室提供可靠的参考依据。

参考文献

- [1] Osser OV, Jokubkiene L, Valentin L. High prevalence of defects in Cesarean section scars at transvaginal ultrasound examination [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2009, 34(1): 90-97.
- [2] Tower AM, Frishman GN. Cesarean scar defects: an underrecognized cause of abnormal uterine bleeding and other gynecologic complications [J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2013, 20(5): 562-572.
- [3] 陈晓端,石一复. 剖宫产后疤痕部位相关病变临床及病理改变 [J]. *中华病理学杂志*, 2016, 45(10): 731-733.
- [4] Fabres C, Aviles G, De La Jara C, et al. The cesarean delivery scar pouch: clinical implications and diagnostic correlation between transvaginal sonography and hysteroscopy [J]. *J Ultrasound Med*, 2003, 22(7): 695-700.
- [5] 洪燕语,贺晶. 子宫疤痕憩室对再生育的影响 [J]. *中华围产医学杂志*, 2016, 19(9): 684-687.

- [6] 易莉莎,黄子健,石琨. 两种不同手术方式治疗剖宫产后疤痕憩室的疗效比较 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2016, 22(2): 142-145.
- [7] 郭银树,段华,张颖,等. 宫腔镜联合 B 超及腹腔镜在剖宫产切口憩室诊治中的应用 [J]. *中国微创外科杂志*, 2011, 11(11): 1019-1021.
- [8] 王马列,梁润彩. 剖宫产后子宫切口憩室治疗进展 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2013, 29(5): 390-392.
- [9] 符小艳,洪燕,覃伶伶. 经阴道超声对剖宫产后子宫切口憩室的诊断价值 [J]. *海南医学*, 2010, 21(13): 106-107.
- [10] 廖一名,李翠兰. 剖宫产后子宫切口憩室的诊疗进展 [J]. *中国临床医生杂志*, 2016, 44(1): 19-22.
- [11] 陶可伟,郭晓利,李杰,等. 剖宫产疤痕部位妊娠的 CT 表现及其分型 [J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(20): 3311-3313.
- [12] Bij de Vaate AJ, Brölmann HA, van der Voet LF, et al. Ultrasound evaluation of the Cesarean scar: relation between a niche and postmenstrual spotting [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2011, 37(1): 93.
- [13] 李建华. 经阴道三维超声在子宫疾病诊断中的应用 [J]. *吉林医学*, 2012, 33(14): 3025-3026.
- [14] Bij de Vaate AJ, vander Voet LF, Naji O, et al. Prevalence, potential risk factors for development and symptoms related to the presence of uterine niches following Cesarean section: systematic review [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2014, 43(4): 372-382.
- [15] 余川蓉,楼江燕. 剖宫产切口憩室的诊治现状 [J]. *医学综述*, 2015, 21(5): 833-836.

收稿日期: 2019-04-03 修回日期: 2019-04-22 编辑: 王宇

(上接第 1537 页)

微转移的关系及作用机制尚不明确,可应用前瞻性研究对 DNA 异倍体和 HR-HPV 阳性均高的宫颈鳞癌术后患者进行密切随访,研究其 5 年复发率、10 年复发率,以及是否更容易发生淋巴结临床转移,从而更加了解淋巴结微转移与预后的关系,得出明确的结论,指导临床个体化治疗。

参考文献

- [1] Pinto AE, Pereira T, Silva GL, et al. Prognostic relevance of DNA flow cytometry in breast cancer revisited: the 25-year experience of the Portuguese institute of oncology of Lisbon [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2027-2033.
- [2] Nishimura S, Oki E, Ando K, et al. High ubiquitin-specific protease 44 expression induces DNA aneuploidy and provides independent prognostic information in gastric cancer [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(6): 1453-1464.
- [3] 房珊珊,翟瑞芳,张三元. DNA 倍体联合 P53 在子宫内黏膜转移阴性淋巴结中的检测意义 [J]. *中国药物与临床*, 2017, 17(2): 179-181.
- [4] 马晓洁,李莎莎,谭榜宪. 宫颈癌淋巴结微转移的研究进展 [J]. *现代妇产科进展*, 2015, 24(4): 303-305.
- [5] 邹美燕,李红梅,戴界香,等. 早期宫颈癌淋巴结微转移的临床

- [6] Huang CY, Chen YL, Chu T, et al. Prognostic factors in women with early stage small cell carcinoma of the uterine cervix [J]. *Oncol Res*, 2009, 18(5): 279-286.
- [7] Karuri AR, Kashyap VK, Yallapu MM, et al. Disparity in rates of HPV infection and cervical cancer in underserved US populations [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2017, 9: 254-269.
- [8] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(3): 621-632.
- [9] Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(4): 927-935.
- [10] 蒋燕明,杨岚,弋文娟. 早期宫颈癌前哨淋巴结中高危型 HPV16/18 DNA 表达的检测及临床意义 [J]. *癌症进展*, 2016, 14(6): 597-600.
- [11] Horn LC, Hentschel B, Fischer U, et al. Detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients with carcinoma of the cervix uteri using step sectioning: Frequency, topographic distribution and prognostic impact [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 111(2): 276-281.

收稿日期: 2019-04-01 修回日期: 2019-04-22 编辑: 王国品