

·临床研究·

宫颈上皮内瘤样病变及宫颈癌患者HPV16、18型感染对阴道局部免疫功能的影响

韩华 陈闻月 周红儿

[摘要] 目的 探讨人乳头状瘤病毒(HPV)16、18型感染对宫颈疾病患者相关细胞免疫功能的影响。方法 选择不同宫颈疾病患者且HPV16、18型阳性30例作为研究对象(HPV组),另取健康体检女性且液基细胞学检查及HPV均阴性33例作为对照组。采用流式细胞仪检测阴道局部分泌物CD⁴⁺T淋巴细胞、CD⁸⁺T淋巴细胞,并计算CD⁴⁺/CD⁸⁺比值;采用ELISA法检测肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素2(IL-2)、IL-4、IL-6水平。结果 HPV组患者CD⁴⁺T浓度、CD⁴⁺/CD⁸⁺比值明显低于对照组,差异有统计学意义(Z 分别=-2.78、-4.93, P 均<0.05);而两组患者CD⁸⁺T浓度比较,差异无统计学意义(Z =-0.60, P >0.05)。HPV组患者CD⁴⁺/CD⁸⁺比值 ≤ 1 的比例明显高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2=27.07$, P <0.05)。HPV组患者IL-2水平明显低于对照组,而IL-4水平明显高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=17.65、9.50, P 均<0.05)。而两组患者IL-6和TNF- α 水平比较,差异均无统计学意义(t 分别=0.14、0.59, P 均>0.05)。结论 HPV16、18型感染可能导致患者细胞免疫低下,持续性HPV感染引起宫颈癌前病变及宫颈癌。

[关键词] 人乳头状瘤病毒; 宫颈上皮内瘤样病变; 宫颈癌; T淋巴细胞亚群细胞因子; 免疫功能

Effect of human papillomavirus type 16 and 18 infection on the cellular immune function in patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer HAN Hua, CHEN Wenyue, ZHOU Honger. Department of Gynaecology, the First People's Hospital of Fuyang, Hangzhou 311400, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 infection on the cellular immune function in patients with cervical diseases. **Methods** Thirty patients with different cervical diseases and positive HPV16 and 18 were selected as the HPV group. Thirty-three healthy women with negative HPV and negative liquid-based cytology were selected as the control group. Flow cytometry was used to detect CD⁴⁺ T lymphocyte and CD⁸⁺ T lymphocyte in local vaginal secretion, and the ratio of CD⁴⁺/CD⁸⁺ was calculated. The levels of TNF- α , IL-2, IL-4 and IL-6 were detected by ELISA. **Results** The concentration of CD⁴⁺T lymphocyte and the proportion of CD⁴⁺/CD⁸⁺ in HPV group were significantly lower than those in control group (Z =-2.78, -4.93, P <0.05), but there was no significant difference in the concentration of CD⁸⁺T lymphocyte between the two groups (Z =-0.60, P >0.05). The proportion of CD⁴⁺/CD⁸⁺<1 in HPV group was significantly higher than that in control group ($\chi^2=27.07$, P <0.05). The level of IL-2 in HPV group was significantly lower than that in control group, while the level of IL-4 was significantly higher than that in control group (t =17.65, 9.50, P <0.05). There was no significant difference in the levels of IL-6 and TNF- α between the two groups (t =0.14, 0.59, P >0.05). **Conclusion** The HPV16 and 18 infection may lead to low cellular immunity hypofunction in the vagina, and persistent HPV infection may cause cervical precancerous lesions and cervical cancer.

[Key words] human papilloma virus; cervical intraepithelial neoplasia; cervical cancer; T lymphocyte subsets cytokines; cellular immune function

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.02.009

基金项目: 杭州市农业与社会发展科研项目 (20163501Y104)

作者单位: 311400 浙江杭州, 杭州市富阳区第一人民医院妇科

通讯作者: 周红儿, Email: hongerzhou@126.com

宫颈癌是女性生殖系统常见的一种恶性肿瘤,其病理生理进程是由癌前病变逐渐演化成癌症的过程。宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是其主要的癌前病变表现。既往研究证实人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染是CIN及宫颈癌的主要危险因素^[1,2]。但是由于女性阴道微环境具有自我清洁感染的能力,仅约5%~10%的患者会存在持续的HPV感染,最终成为罹患宫颈癌的高危人群^[3]。然而,导致患者持续感染HPV的具体机制目前尚不完全清楚,可能与宫颈局部及全身免疫反应失衡有关。Nelson等^[4]研究认为人阴道局部黏膜表面及以T淋巴细胞为主要效应的局部细胞免疫是抗HPV感染的主要防线,而肿瘤免疫也是以细胞免疫为主。鉴于此,本研究拟探讨CIN、宫颈癌患者HPV感染与阴道局部免疫功能的关系,为临床防治宫颈癌的发生、发展提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2016年1月至2018年2月在杭州市富阳区第一人民医院就诊的不同宫颈病变的患者30例作为研究对象(HPV组)。纳入标准为:①年龄20~65岁;②既往有性生活史;③HPV16、18型阳性;④经病理活检确诊为CIN或宫颈癌。排除:①月经期、妊娠期及哺乳期妇女;②既往3d内曾有性生活史、妇科检查、阴道冲洗或阴道内用药者;③在本院或外院已经全身或局部治疗的患者;④所有指标检查结果不齐全的患者;⑤有糖尿病、冠心病等慢性病史患者;⑥其他肿瘤及免疫性疾病等病史患者。另选同期体检女性且液基细胞学检查及HPV均为阴性的33例为对照组。两组患者平均年龄、孕次及产次见表1,两组一般资料比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

表2 两组患者阴道局部CD⁴⁺T淋巴细胞、CD⁸⁺T淋巴细胞检测结果比较

组别	n	CD ⁴⁺ T/个/ml	CD ⁸⁺ T/个/ml	CD ⁴⁺ /CD ⁸⁺	CD ⁴⁺ /CD ⁸⁺ 比值/例(%)	
					≤1	>1
HPV组	30	155.37(75.32, 235.11)*	185.61(90.67, 279.08)	0.78(0.35, 1.26)*	24(80.00)*	6(20.00)
对照组	33	231.68(115.15, 349.23)	203.03(99.84, 306.21)	1.26(0.58, 1.93)	6(18.18)	27(81.82)

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见, HPV阳性组患者CD⁴⁺T浓度、CD⁴⁺/CD⁸⁺比值明显低于对照组, 差异有统计学意义(Z 分别=-2.78、-4.93, P 均 <0.05); 而两组患者CD⁸⁺T浓度比较, 差异无统计学意义($Z=-0.60$, $P>0.05$)。HPV组患者CD⁴⁺/CD⁸⁺比值≤1的比例明显高于对照

表1 两组患者一般资料的比较

组别	n	年龄/岁	孕次/次	产次/次
HPV组	30	47.21 ± 7.62	2.01 ± 0.91	1.90 ± 0.81
对照组	33	45.63 ± 6.80	2.23 ± 0.63	2.11 ± 0.62

1.2 方法 用0.9%氯化钠溶液冲洗患者宫颈管及阴道上段后, 于后穹窿吸取灌洗液14~15 ml, 过滤去除杂质, 留取盥洗液。然后以1 500 r/min离心5 min, 弃上清液, 用磷酸缓冲盐溶液洗涤, 采用密度梯度离心法分离淋巴细胞和上皮细胞, 最后于-80℃冰箱冻存。去将前述制备的淋巴细胞制成悬液, 计数并调节细胞为每管 2×10^4 ml, 加入CD⁴FITC/CD⁸PE荧光抗体20 μl, 室温孵育20 min, 加入红细胞裂解液后避光10 min, 再以1 500 r/min的速度离心10 min, 弃上清液, 磷酸缓冲盐溶液离心冲洗, 最后用0.5 ml磷酸缓冲盐溶液缓冲细胞悬液。采用流式细胞仪检测CD⁴⁺T淋巴细胞、CD⁸⁺T淋巴细胞, 并计算CD⁴⁺T/CD⁸⁺T比值。

另外, 用无菌刷子采集宫颈内口分泌物, 置于0.9%氯化钠溶液无菌试管内, 离心处理后用ELISA法检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、IL-4、IL-6水平。

1.3 统计学方法 采用SPSS 18.0统计软件。计数资料组间比较采用 χ^2 检验; 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)或者中位数及百分位数 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验和Mann-Whitney检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者阴道局部CD⁴⁺T淋巴细胞、CD⁸⁺T淋巴细胞检测结果比较见表2

组, 差异有统计学意义($\chi^2=27.07$, $P < 0.05$)。

2.2 两组患者宫颈分泌物炎症因子比较见表3

由表3可见, HPV组患者IL-2水平明显低于对照组, 而IL-4水平明显高于对照组, 差异均有统计学意义(t 分别=17.65、9.50, P 均 <0.05)。两组

患者IL-6和TNF- α 水平比较,差异均无统计学意义 (t 分别=0.14、0.59, P 均>0.05)。

表3 两组患者宫颈分泌物炎症因子比较/ng/L

组别	n	IL-2	IL-4	IL-6	TNF- α
HPV组	30	101.21 $\pm$ 15.43*	33.98 $\pm$ 4.12*	2.68 $\pm$ 0.75	49.38 $\pm$ 8.25
对照组	33	165.58 $\pm$ 13.52	24.51 $\pm$ 3.79	2.65 $\pm$ 0.91	48.21 $\pm$ 7.45

注: *:与对照组比较, P <0.05。

3 讨论

HPV感染与CIN及宫颈癌的发生密切相关,约99%的宫颈癌标本中可检测到HPV DNA^[5]。研究表明,只有当患者局部及全身免疫反应持续减弱,的情况下才会导致HPV的持续感染,最终进展成宫颈癌^[6]。同时,HPV感染本身也会导致阴道局部免疫功能发生改变^[7]。郭彦蓉等^[8]发现机体感染HPV后会致其免疫功能下降,从而加快从CIN到宫颈癌的进展过程。但是,其具体作用机制仍未完全阐明。

CD⁴⁺T淋巴细胞、CD⁸⁺T淋巴细胞及CD⁴⁺/CD⁸⁺比值是反映宫颈局部细胞免疫状态最常用的指标^[9]。既往研究已证实,当CD⁴⁺/CD⁸⁺比值 ≤ 1 时常提示机体免疫功能处于抑制状态或者低下^[4,8]。雷永革等^[10]研究认为HPV感染后CD⁴⁺/CD⁸⁺比值构成的改变可导致宫颈病变的发生。本研究也发现,HPV组患者CD⁴⁺T浓度、CD⁴⁺/CD⁸⁺比值明显低于对照组(P 均<0.05),而CD⁸⁺T浓度差异无统计学意义(P >0.05)。说明HPV感染会导致阴道局部免疫功能下降,促进病情的进展。而当机体感染HPV后,免疫细胞上的模式识别受体可识别其衣壳蛋白并与之结合,从而激活NF- κ B等转录因子,导致TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-1 β 、IL-8及MIP-1 α 等细胞因子的表达发生改变,从而影响阴道局部的免疫功能。其中,TNF- α 和IL-2是当Th1细胞占优势时所分泌的,而IL-4和IL-6是由Th2细胞占优势时分泌。前者的出现说明感染会朝着痊愈的方向转归,同时具有抗肿瘤效应;后者的出现则说明感染有加重的可能。本研究显示,HPV组患者IL-2水平明显低于对照组,IL-4水平明显高于对照组(P 均<0.05),而两组患者IL-6和TNF- α 水平无明显差异(P >0.05)。这说明HPV感染与患者阴道局部Th1/Th2的比例失衡存在相关性。

综上所述,HPV感染患者阴道局部CD⁴⁺T淋巴细胞、CD⁸⁺T淋巴细胞、CD⁴⁺/CD⁸⁺比值及其所分泌的细胞因子结构发生改变,主要表现为CD⁴⁺T淋巴细胞及CD⁴⁺/CD⁸⁺比值下降,说明HPV感染者阴道局部免疫功能的下降。但高危HPV感染患者引起CD⁴⁺T

淋巴细胞、CD⁸⁺T淋巴细胞、IL-2、IL-4下降的原因尚需进一步研究予以证实。

参考文献

- Massad LS, Einstein MH, Huh WK, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors[J]. Obstet Gynecol, 2013, 121(4): 829-846.
- Kenya S, Carrasquillo O, Fatil M, et al. Human papilloma virus and cervical cancer education needs among HIV-positive haitian women in miami[J]. Womens Health issues, 2015, 25(3): 262-266.
- Grein IH, Groot N, Lacerda MI, et al. HPV infection and vaccination in systemic lupus erythematosus patients: what we really should know[J]. Pediatr Rheumatol Online J, 2016, 14(1): 12.
- Nelson EL, Stockdale CK. Vulvar and vaginal HPV disease[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2013, 40(2): 359-376.
- 刘慧强. 我国宫颈癌流行病学特征和高危因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(6): 1258-1260.
- Louvanto K, Rautava J, Syrjänen K, et al. The clearance of oral high-risk hpv infection is impaired by long-term persistence of cervical HPV infection[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 10(1): 1469-1481.
- Ancuta E, Butureanu S, Zugun-Eloae F, et al. Potential value of in situ cellular immune response in HPV subtype 16 and 18 positive cervical cancer[J]. Rom J Morphol Embryol, 2014, 55(3): 817-822.
- 郭彦蓉, 赵广超, 李文华, 等. 人乳头状瘤病毒感染对宫颈癌局部免疫功能的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(13): 3333-3334.
- 王颖, 刘植华. 阴道乳酸杆菌与HPV感染、宫颈癌及癌前病变的相关性研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2013, 19(8): 610-615.
- 雷永革, 曹巧林, 谭秋梅. 阴道局部T淋巴细胞的免疫指标变化与宫颈病变关系研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(3): 329-330.

(收稿日期 2018-09-15)

(本文编辑 蔡华波)