

## 高危型人乳头瘤病毒诱导的抗体水平与宫颈病变的相关性

方秀丽<sup>1</sup>, 魏旻希<sup>2</sup>, 李云华<sup>1</sup>, 李少伟<sup>2</sup>, 于杰<sup>1</sup>, 林燕真<sup>1</sup>, 陈珣<sup>1</sup>, 黄莉莉<sup>1</sup>, 李婷<sup>1</sup>, 王大宁<sup>2</sup>, 潘晖榕<sup>2</sup>

1. 厦门大学附属中山医院妇产科, 福建 厦门 361004; 2. 厦门大学分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361005

**摘要:** 目的 研究高危型人乳头瘤病毒 (HR-HPV) 感染相关的宫颈病变程度与抗人乳头瘤状病毒 (HPV) 抗体水平的相关性, 探讨 HPV 致病的免疫学问题。方法 选取 2012 年 1 月-2013 年 6 月在该院妇产科门诊就诊的女性中选取 60 例病理确诊为女性宫颈病变 (CIN I 及以上), 且宫颈脱落细胞的 DNA 检测为 HR-HPV 阳性者为研究组, 根据组织学检测结果将研究组进一步分为低度病变组 30 例 (CIN I) 和高度病变组 30 例 (CIN II 或 III)。对照组为经核酸检测无 HPV 感染且病理诊断未见癌前病变的门诊患者 60 例, 按年龄进一步分为低年龄组和高年龄组。低年龄组和高年龄组与低度病变组和高度病变组的年龄差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。分别抽取研究组及对照组外周血, 检测其抗 HR-HPV L1 IgG 抗体及中和抗体滴度, 比较研究组与对照组抗体阳性率及抗体滴度水平的差别。结果 研究组血清中的抗 HR-HPV L1 IgG 抗体阳性率及抗体滴度均高于对照组 ( $P<0.05$ ); 低度病变组患者血清中的抗 HR-HPV 的中和抗体滴度高于相应对照组 ( $P<0.05$ ), 而高度病变组的抗 HR-HPV 的中和抗体阳性率及抗体水平与相应对照组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。结论 宫颈病变患者血清中抗 HR-HPV L1 IgG 抗体升高, 说明 HPV 感染可引起机体的体液免疫反应。低度病变组的中和抗体水平相对较高, 可能是机体产生的中和抗体阻止了病毒的进一步感染。高度病变组的 IgG 抗体和中和抗体均低下, 说明进入 CIN II / III 后 HPV 已经逃避了免疫系统的监视。

**关键词:** 宫颈癌前病变; 人乳头瘤状病毒; 抗 HPV L1 IgG 抗体; 中和抗体

中国图书分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1001-4411(2017)09-4857-04; doi: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2017.09.11

研究<sup>[1-2]</sup>表明, 高危型人乳头瘤病毒 (HR-HPV) 感染是引起包括宫颈癌在内的各类宫颈病变的必要因素。在与宫颈癌高度相关的 15 个人乳头瘤病毒 (HPV) 型别中, 中国主要流行的型别前 6 位依次为 HPV16、HPV18、HPV58、HPV33、HPV52 和 HPV31, 而 HPV45 型位于第 8 位, 这 7 种型别 HPV 所引起的宫颈癌约占全部宫颈癌的 87.3%。HPV56 所引起的宫颈癌占全部宫颈癌的 0.1%<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4-5]</sup>表明, 女性感染 HPV 的概率约为 80%, 其中约 1% 的感染者将发展为宫颈癌患者, 而大部分感染者在 HPV 感染后的 1~2 年内会自然清除体内病毒, 部分患者也能从低级的癌前病变中痊愈。在病毒的自然清除中, 人体免疫系统, 尤其是体液免疫发挥了重要作用。研究<sup>[6]</sup>发现, 机体所产生的抗 HPV 抗体中, 绝大部分都是抗 L1 衣壳蛋白的抗体。但不是所有抗体都具有中和病毒、阻止病毒感染的作用, 仅有一部分抗体具有中和活性。Roden 等<sup>[7]</sup>建立了一套 HPV 假病毒-细胞中和检测方法, 评价具有中和能力的中和抗体水平。有学者<sup>[8]</sup>发现, HPV 中的 L1 衣壳蛋白的相关抗体水平对于宫颈病变的转归和预后有重要意义。为评价宫颈病变患者中的体液免疫水平, 本文分别利用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和假病毒-细胞中和实验检测女性宫颈病变患者中特异性的抗 HPV L1

的 IgG 抗体与中和抗体, 旨在揭示宫颈病变的发展、转归、病程与特异性抗体水平生成的相关性, 为 HPV 感染相关疾病的病程发展和治疗提供信息。

### 1 资料与方法

1.1 资料来源 选取 2012 年 1 月-2013 年 6 月中山医院妇产科门诊病理确诊为宫颈病变 (CIN I) 及以上, 且宫颈脱落细胞 DNA 检测为 HR-HPV 阳性者 60 例为研究组。研究组进一步分为两组: 低度病变组 (CIN I) 30 例, 年龄 22~58 岁, 平均 39.0 岁; 高度病变组 (CIN II / III) 30 例, 年龄 36~68 岁, 平均 50.1 岁。病理诊断未见癌前病变且 HR-HPV 为阴性者 60 例为对照组。对照组进一步分为两组: 低年龄组 30 例, 作为低度病变组的对照组, 年龄 24~57 岁, 平均 38.9 岁; 高年龄组 30 例, 作为高度病变组的对照组, 年龄 36~68 岁, 平均 51.9 岁。研究组与相应对照组年龄差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

宫颈脱落细胞 DNA 检测采用 PCR 荧光法进行检测, 可检测 HPV16、HPV18、HPV58、HPV33、HPV52、HPV31、HPV45 和 HPV56 共 8 种 HR-HPV 的感染。

1.1.1 样本采集 研究组和对照组患者均抽取肘静脉血 5 ml, 静置 20 min 以上、离心后分离上部血清, 置 -80 °C 冰箱备用。

1.1.2 实验仪器及试剂 奥地利 TECAN 公司生产的 Columbus Plus 型自动洗板机和酶标仪; 美国 Beckman 公司生产的 Paradigm 型荧光读板机。HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV45、HPV52、HPV58 型的 L1 蛋白由本实验室制备及保存<sup>[9-12]</sup>。生产

基金项目: 厦门市科技局项目 (3502Z20124050); 2011 年福建省科技计划项目资助计划, 青年创新项目 (2011D00310517)

通讯作者: 李云华, E-mail: 1336261031@qq.com

HPV16和HPV18假病毒的相关质粒由美国NCI的Schiller教授惠赠,其余HPV31、HPV33、HPV45、HPV52、HPV58型假病毒由本实验室构建并生产<sup>[13]</sup>。

1.2 检测方法

1.2.1 血清中抗HR-HPV L1 IgG抗体的测定 用ELISA法测定,以OD值0.1为cutoff值判断是否阳性,以最低稀释倍数读值仍为阳性的倍数作为该抗体的IgG抗体滴度,若10倍稀释的血清反应值仍然低于cutoff值,该型别IgG抗体视为阴性,抗体滴度记为1,否则视为阳性。分别测定HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV45、HPV52、HPV58型中的IgG抗体滴度,将各型IgG抗体滴度的乘积作为该样品的总IgG抗体滴度。若各型IgG抗体均为阴性,则该份血清的IgG抗体视为阴性,总IgG抗体滴度记为1,否则视为阳性。

1.2.2 血清抗HR-HPV中和抗体的测定 将293FT细胞铺于96孔细胞培养板中(1.5培养板4/孔),8h后进行中和实验。待测血清使用10%DMEM分梯度稀释后与假病毒液混合。4℃孵育1h后加入细胞培养板中,37℃培养72h后先用荧光观察确定各样品大概的中和滴度,再用流式细胞仪检测各孔细胞的感染率,计算单抗或多抗血清的准确中和滴度,计算感染抑制率。抗体中和滴度的定义为: >50%感染抑制率的最大稀释倍数。若10%DMEM 10倍稀释的血

清仍然无法达到>50%的感染抑制率,则该型别中和抗体视为阴性,抗体滴度记为1,否则视为阳性。分别测定血清HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV45、HPV52、HPV58型的中和抗体滴度,将各型中和抗体滴度的乘积作为该样品的总中和抗体滴度。若各型中和抗体均为阴性,则该份血清的中和抗体视为阴性,总中和抗体滴度记为1,否则视为阳性。

1.3 统计学分析 采用SPSS 11.0统计软件进行统计学分析,采用t检验或χ<sup>2</sup>检验,Fisher精确概率检验,Logistic回归分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中抗HR-HPV L1 IgG抗体阳性率比较 低度病变组中抗HPV16、33、58 L1 IgG抗体阳性率高于低年龄组,差异均有统计学意义(均P<0.05),计算至少一型抗体的阳性率,低度病变组高于低年龄组,差异有统计学意义(P<0.01)。在高度病变组中抗HPV16、HPV58 L1 IgG抗体阳性率高于高年龄组,差异均有统计学意义(均P<0.05),计算至少一型抗体的阳性率,高度病变组高于高年龄组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表1。

2.2 血清中抗HPV中和抗体阳性率比较 低度病变组中仅抗HPV58型中和抗体阳性率与低年龄组比较差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

表1 研究组与相应对照组血清中抗HR-HPV L1 IgG抗体阳性率比较 [例(%) ]

组别	例数	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV52	HPV58	至少一型抗体的阳性率
低年龄组	30	5(16.7)	7(23.3)	1(3.3)	6(20.0)	1(3.3)	7(23.3)	3(10.0)	18(60.0)
低度病变组	30	21(70.0)	10(33.3)	2(6.7)	14(46.7)	2(6.7)	9(30.0)	12(40.0)	27(90.0)
P值		0.019	0.390	0.557	0.028	0.557	0.559	0.007	0.007
高年龄组	30	5(16.7)	9(30.0)	2(6.7)	4(13.3)	3(10.0)	8(26.7)	4(13.3)	22(73.3)
高度病变组	30	24(80.0)	13(43.3)	3(10.0)	10(33.3)	3(10.0)	11(36.7)	12(40.0)	29(96.7)
P值		-9.18E-07	0.284	0.643	0.067	1.000	0.405	0.020	0.012

表2 研究组与相应对照组血清中和抗体阳性率比较 [例(%) ]

组别	例数	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV52	HPV58	至少一型抗体的阳性率
低年龄组	30	6(20.0)	2(6.7)	2(6.7)	3(10.0)	1(3.3)	2(6.7)	2(6.7)	14(46.7)
低度病变组	30	8(26.7)	6(20.0)	0(0.0)	5(16.7)	0(0.0)	3(10.0)	8(26.7)	21(70.0)
P值		0.542	0.129	0.246	0.226	0.500	1.000	0.038	0.292
高年龄组	30	8(26.7)	4(13.3)	1(3.3)	4(13.3)	1(3.3)	2(6.7)	2(6.7)	17(56.7)
高度病变组	30	8(26.7)	2(6.7)	0(0.0)	1(3.3)	0(0.0)	4(13.3)	2(6.7)	10(33.3)
P值		1.000	0.389	0.500	0.151	0.500	0.671	1.000	0.069

2.3 血清中抗HR-HPV L1 IgG抗体水平 低度病变和高度病变组中均显示抗HPV16的IgG抗体水平最高,抗HPV45的IgG抗体水平最低。低度病变组中抗HPV16、HPV33、HPV58的IgG抗体滴度与低年

龄组比较,差异均有统计学意义(均P<0.01),高度病变组中抗HPV16、HPV18、HPV58的IgG抗体滴度与高年龄组比较差异均有统计学意义(均P<0.05)。见表3。总IgG抗体滴度见图1。低度病

变组和高度病变组的抗体滴度水平均显著高于相应对照组 ( $P < 0.01$ )。

2.4 血清抗 HPV 中和抗体水平 低度病变组中抗 HPV58 的中和抗体滴度高于相应对照组 ( $P < 0.05$ )。总中和抗体滴度低度病变组高于相应对照组 ( $P < 0.05$ )。见图 2、表 4。

2.5 IgG 抗体阳性者中和抗体阳性率及中和抗体水平 低度病变组中和抗体阳性者高于相应对照组 ( $P < 0.05$ )，高度病变组中和抗体阳性者低于相应对照组 ( $P < 0.05$ )，而在 IgG 抗体与中和抗体均阳性的人群中，低度病变组和高度病变组的中和抗体滴度与相应对照组比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 5。

表 3 研究组与相应对照组血清中抗 HPV L1 IgG 抗体滴度 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV52	HPV58	总 IgG 抗体滴度 (log10)
低年龄组	30	0.23±0.54	0.46±0.73	0.09±0.34	0.24±0.63	0.11±0.34	0.41±0.72	0.18±0.48	1.61±1.29
低度病变组	30	1.59±1.17	0.70±1.09	0.17±0.64	0.89±1.08	0.08±0.29	0.71±1.15	0.82±1.09	4.89±2.43
<i>t</i> 值		-5.826	-1.021	-0.607	-2.827	0.407	-1.232	-2.929	-6.524
<i>P</i> 值		0.000	0.311	0.546	0.006	0.686	0.223	0.005	0.000
高年龄组	30	0.26±0.59	0.34±0.67	0.07±0.40	0.33±0.69	0.03±0.18	0.40±0.77	0.16±0.51	1.57±1.60
高度病变组	30	1.59±1.03	0.89±1.16	0.21±0.66	0.83±1.25	0.15±0.47	0.72±1.04	0.77±1.05	5.01±2.50
<i>t</i> 值		-6.149	-2.262	-0.967	-1.896	-1.260	-1.327	-2.865	-6.353
<i>P</i> 值		0.000	0.027	0.337	0.063	0.213	0.190	0.006	0.000

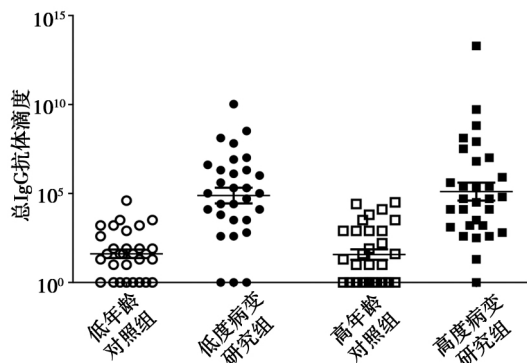


图 1 血清中抗 HPV L1 IgG 抗体水平

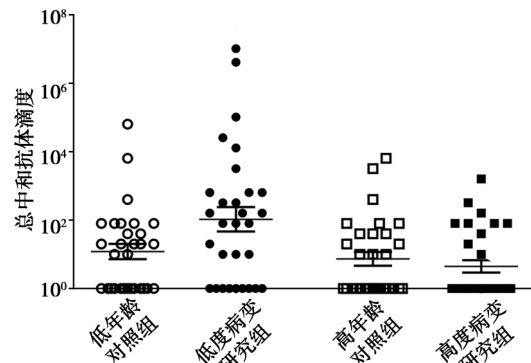


图 2 血清中抗 HPV 中和抗体水平

表 4 研究组与相应对照组血清中和抗体滴度 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV52	HPV58	总中和抗体滴度 (log10)
低年龄组	30	0.41±0.72	0.18±0.48	0.06±0.35	0.24±0.63	0.03±0.18	0.10±0.37	0.09±0.33	1.08±1.22
低度病变组	30	0.59±1.03	0.41±0.90	0.00±0.00	0.25±0.59	0.00±0.00	0.23±0.72	0.55±0.97	2.02±1.95
<i>t</i> 值		-0.789	-1.222	1.000	-0.020	1.000	-0.902	-2.471	-2.247
<i>P</i> 值		0.433	0.227	0.321	0.984	0.321	0.371	0.016	0.028
高年龄组	30	0.32±0.67	0.10±0.37	0.08±0.29	0.16±0.50	0.03±0.18	0.12±0.45	0.10±0.39	0.87±1.11
高度病变组	30	0.13±0.49	0.10±0.37	0.00±0.00	0.06±0.35	0.00±0.00	0.21±0.57	0.15±0.56	0.65±0.99
<i>t</i> 值		1.277	0.000	1.426	0.876	1.000	-0.732	-0.401	0.808
<i>P</i> 值		0.207	1.000	0.159	0.385	0.321	0.467	0.690	0.422

表 5 IgG 抗体阳性者血清中和抗体 [例 (%) ] ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IgG 抗体阳性	中和抗体阳性	总中和抗体滴度 (log10)
低年龄组	18	8 (44.4)	2.04±1.05
低度病变组	27	20 (74.1)	2.97±1.70
<i>t</i> 值			-1.435
<i>P</i> 值			0.156
高年龄组	22	13 (59.1)	1.61±0.46
高度病变组	29	10 (34.5)	1.94±0.61
<i>t</i> 值			-1.490
<i>P</i> 值			0.141

### 3 讨论

3.1 血清抗 HR-HPV L1 的 IgG 抗体与宫颈病变的相关性 检测血清中相应抗体是病原体检查的常见方法，但通常认为 HPV 的感染仅累及表皮或黏膜上皮，一般不进入血液循环，机体对于 HPV 缺少有效的抗原呈递途径，免疫应答往往低下，因此抗 HPV L1 抗体检测的价值容易被忽视。HPV 的型别众多，血清抗体的检测需多型别的 HPV L1 抗原作为检测材料，也成为阻碍该检测方法应用的重要因素。与细胞学、

组织学诊断相比,抗 HPV L1 IgG 抗体的检测操作简单,灵敏度与特异性相对较好,且机体清除 HPV 后,抗体还会存在较长的一段时间,有助于对 HPV 既往感染的诊断。在本研究中,低年龄病变组和高龄病变组的抗 HPV16、HPV58 L1 IgG 抗体和中和抗体阳性率均显著高于相应对照组,研究组的总抗体滴度水平也显著高于对照组,提示血清中抗 HPV L1 IgG 抗体水平与宫颈病变有较高的相关性,可能可作为细胞学和组织学诊断的补充依据。

3.2 中和抗体与宫颈病变的相关性及其在预测转归中的价值 研究<sup>[14-15]</sup>表明,在抗 HPV 感染免疫中,抗体的作用最关键,但只有部分抗体即中和抗体能阻止病毒的再次感染,动物乳头瘤病毒(PV)模型实验表明,血清中和抗体阳性个体可以防止病毒的再次感染,在被动转移实验中,对 PV 病毒感染的抵抗能力能够通过含有中和抗体血清转移。HPV16 VLP 疫苗的临床试验也进一步证明血清中和抗体水平也与保护效果密切相关<sup>[16]</sup>。本研究发现,在低度病变组中部分患者的中和抗体高于对照组与高度病变研究组,同时,该组中仍存在部分患者未产生可检测到的中和抗体,前者可能处于清除 HPV 的恢复期,而后者则存在 HPV 持续感染的可能。因为,癌前病变发展成宫颈癌需要 HPV 的持续感染,而血清中的中和抗体有助于阻断这一过程,使病变组织减小甚至痊愈。部分患者产生免疫应答,产生了中和抗体具有清除 HPV 的效果,而部分患者的免疫系统可能无法诱导产生足够的中和抗体,结果 HPV 持续感染,使病情进一步发展。因此,血清中的 IgG 抗体水平和中和抗体水平可作为判断宫颈病变的发生、转归指标。

本研究中获得的宫颈病变患者的中和抗体阳性率与 Wu 等<sup>[17]</sup>研究获得的甘肃地区宫颈病变患者的中和抗体阳性率相近,抗体水平也相近。说明患者在 HPV 持续感染发展成宫颈癌的过程中,虽然部分患者能产生一定水平的中和抗体,可能对病程具有一定的减缓或逆转作用,但由于整体中和抗体水平较低,部分患者不足以完全阻止病程的进展。因此要做到更好的预防宫颈癌还是应当在女性有性生活之前尽早接种宫颈癌疫苗,以避免 HPV 感染的发生。由于宫颈癌疫苗尚未进入我国,应对宫颈癌的预防更加重视,定期宫颈细胞学检测及 HR-HPV DNA 检测;推动 HPV 疫苗尽快上市,将对 HPV 感染及相关疾病的防治起到积极作用。

## 参考文献

[1] Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, et al. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction [J]. *Biophys J*, 1991, 60

- (6): 1445-1456.
- [2] Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid [J]. *EMBO J*, 2002, 21 (18): 4754-4762.
- [3] Bao YP, Li N, Smith JS, et al. Human papillomavirus type-distribution in the cervix of Chinese women: a meta-analysis [J]. *Int J STD AIDS*, 2008, 19 (2): 106-111.
- [4] Breitburd F, Kimbauer R, Hubbert NL, et al. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection [J]. *J Virol*, 1995, 69 (6): 3959-3963.
- [5] Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, et al. Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus [J]. *J Virol*, 1996, 70 (2): 960-965.
- [6] Wikström A, van Doornum GJ, Quint WG, et al. Identification of human papillomavirus seroconversions [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76 (Pt 3): 529-539.
- [7] Roden RB, Greenstone HL, Kimbauer R, et al. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype [J]. *J Virol*, 1996, 70 (9): 5875-5883.
- [8] Kawano Y, Noma T, Kou K, et al. Regulation of human IgG subclass production by cytokines: human IgG subclass production enhanced differentially by interleukin-6 [J]. *J Immunol*, 1995, 155 (2): 278-284.
- [9] 魏旻希, 李少伟, 黄博, 等. 人乳头瘤病毒 16 型病毒样颗粒的制备及其免疫原性研究 [J]. *病毒学报*, 2009, 25 (4): 245-250.
- [10] 谢明辉, 李少伟, 沈文通, 等. 人乳头瘤病毒 18 型病毒样颗粒在大肠杆菌中的表达及免疫原性分析 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25 (7): 1082-1087.
- [11] 潘晖榕, 李少伟, 刘波, 等. 人乳头状瘤病毒 6 型类病毒颗粒的制备及其中核抗体的检测 [J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2009, 29 (1): 71-76.
- [12] 杨春燕, 李少伟, 王晋, 等. 大肠杆菌来源的人乳头瘤病毒 11 型病毒样颗粒的制备及其免疫原性 [J]. *微生物学报*, 2009, 49 (11): 1527-1533.
- [13] 卢五迅, 程通, 李少伟, 等. 人乳头瘤病毒 16 型假病毒中和实验的建立和初步应用 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22 (6): 990-995.
- [14] Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347 (21): 1645-1651.
- [15] Nardelli-Haeffliger D, Wirthner D, Schiller JT, et al. Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 16 virus-like particles [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95 (15): 1128-1137.
- [16] Lowe RS. Human papillomavirus type 11 (HPV-11) neutralizing antibodies in the serum and genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV-11 virus-like particles expressed in yeast [J]. *J Infect Dis*, 1997, 176 (5): 1141-1145.
- [17] Wu XL, Zhang CT, Feng SX, et al. Detection of HPV types and neutralizing antibodies in gansu province, China [J]. *J Med Virol*, 2009, 81 (4): 693-702.

收稿日期: 2016-03-01 责任编辑: 邹庆红/柳明秀