

## 研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.08.014

## 鼻内翻性乳头状瘤中 HPV 感染状况分析

谢佳 颜永毅 龚辉成

**【摘要】** 目的 分析鼻内翻性乳头状瘤(NIP)中人乳头状瘤病毒(HPV)感染的情况,为进一步研究 HPV 介导 NIP 发病、复发及恶变机制提供实验及理论依据。方法 应用核酸分子快速导流杂交基因芯片分型技术(HybriMax)检测 NIP 实验组(48 例)及正常鼻黏膜对照组(20 例)中 HPV 的感染率及其各亚型的表达情况。结果 NIP 实验组组织标本中 HPV 总阳性率为 64.58% (31/48),正常鼻黏膜对照组组织标本中 HPV 检测结果均为阴性,2 组阳性率比较差异有统计学意义( $\chi^2=32.178, P < 0.01$ )。在 31 例 HPV 阳性标本中共检测出 HPV 病毒 49 株,含 12 个亚型,其中 HPV6 占 4.08% (2/49)、HPV11 占 32.65% (16/49)、HPV16 占 12.24% (6/49)、HPV18 占 4.08% (2/49)、HPV33 占 4.08% (2/49)、HPV39 占 2.04% (1/49)、HPV44 占 10.20% (5/49)、HPV52 占 8.16% (4/49)、HPV53 占 2.04% (1/49)、HPV56 占 2.04% (1/49)、HPV58 占 16.30% (8/49)、HPV68 占 2.04% (1/49)。结论 HPV 感染与 NIP 的发病有着密切关系,国内 NIP 的发生发展可能与 HPV11、16、44、58 亚型有关。

**【关键词】** 人乳头状瘤病毒;鼻内翻性乳头状瘤;亚型;感染率;复发

**Analysis of HPV infection in nasal inverted papilloma** Xie Jia, Yan Yongyi, Gong Huicheng. Guangzhou Twelfth People's Hospital, Guangzhou Otolaryngology Head and Neck Surgery Hospital, Guangzhou 510620, China

**【Abstract】 Objective** To analyze the infection of human papilloma virus (HPV) in nasal inverted papilloma (NIP) through experiments, aiming to provide experimental and theoretical basis for further research on the incidence, recurrence and malignant transformation mechanism of HPV-mediated NIP. **Methods** The infection rates and expression levels of HPV subtypes in the experimental group (NIP group,  $n = 48$ ) and control group (normal nasal mucosa,  $n = 20$ ) were detected by nucleic acid molecular rapid diversion hybrid gene chip typing technique (HybriMax). **Results** The total positive rate of HPV in the tissue samples of the NIP group was 64.58% (31/48). The HPV test results of normal nasal mucosa specimens in the control group were all negative, and the difference between two groups was statistically significant ( $\chi^2=32.178, P < 0.01$ ). Forty-nine strains of HPV virus were detected in 31 HPV positive specimens. A total of 12 subtypes were classified including 4.08% (2/49) of HPV6, 32.65% (16/49) of HPV11, 12.24% (6/49) of HPV16, 4.08% (2/49) of HPV18, 4.08% (2/49) of HPV33, 2.04% (1/49) of HPV39, 10.20% (5/49) of HPV44, 8.16% (4/49) of HPV52, 2.04% (1/49) of HPV53, 2.04% (1/49) of HPV56, 16.30% (8/49) of HPV58, and 2.04% (1/49) of HPV68. **Conclusion** HPV infection is closely associated with the incidence of NIP, and the occurrence and development of NIP in China may be correlated with HPV11, 16, 44 and 58 subtypes.

**【Key words】** Human papilloma virus; Nasal inverted papilloma; Subtype; Infection rate; Recurrence

作为一种来源于鼻黏膜上皮组织的良性肿瘤,鼻内翻性乳头状瘤(NIP)有鲜明的临床特点,即易侵蚀破坏周围组织、术后易复发、有癌变倾向。据文献报道其发病率为 0.03%~0.84%,在鼻腔鼻窦乳头状瘤中约占 70%,在全部鼻部肿瘤中占 0.5%~4.0%,超过 10%的 NIP 可能会发生癌变<sup>[1]</sup>。Holm 等<sup>[2]</sup>在研究 NIP 的发病因素时发现 1984 至 2014 年 NIP 发病率上升了 7.6%。绝大多数学者在研究 NIP 起病相关因素时发现,HPV 感染与 NIP

发生、进展有着极大关系。国内外已有不少关于 HPV 与 NIP 发生发展关系的文献报道,但以往报道的相关研究样本量相对较少,缺乏代表性,且样本中 HPV 检出率在 0%~86%,检测结果大相径庭,故 HPV 与 NIP 的关系成为当下临床研究关注的重点<sup>[3]</sup>。笔者团队将在本次实验中分析 HPV 在 NIP 中的感染情况,并且运用核酸分子快速导流杂交基因芯片分型技术(HybriMax)检测 NIP 中的 HPV 亚型,为进一步研究 HPV 介导 NIP 发病、复

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(B2019141)

作者单位:510620 广州,广州市第十二人民医院 广州市耳鼻咽喉头颈专科医院耳鼻咽喉头颈外科

发及恶变机制提供实验及理论依据。

## 资料与方法

### 一、临床资料

选取广州市第十二人民医院住院患者的石蜡包埋存档组织标本, 2010至2019年48例经病理确诊为NIP(男32例, 女16例, 中位年龄52.2岁)患者的石蜡包埋组织标本作为NIP实验组; 另取同期20例因鼻中隔偏曲行鼻中隔矫正患者术中所取鼻中隔切口边缘黏膜组织的石蜡包埋标本(男11例, 女9例, 中位年龄45岁)作为正常鼻黏膜对照组; 所有入组患者均在本院耳鼻咽喉头颈外科住院治疗, 在只给予手术治疗尚未给予放射治疗、化学治疗、IFN治疗、免疫治疗等措施的条件下进行病理组织学检查, 并排除其他系统的恶性肿瘤。

### 二、HE及免疫组织化学(组化)染色

NIP实验组48例石蜡标本及正常鼻黏膜对照组20例石蜡标本均经过10%中性福尔马林溶液固定、脱水及石蜡包埋。

#### 1. 常规病理制片

①切片: 将每例石蜡标本作4 μm厚的连续切片4张; ②展片、贴片: 在40~45℃的水面上, 用镊子将蜡片平铺于水面并充分展平, 将蜡片贴于载玻片上, 载玻片预先涂上0.05%多聚赖氨酸; ③烤片: 将蜡片放在烤箱中, 温度设置为60℃, 时间设置为0.5~1h; ④脱蜡: 使用二甲苯、不同浓度乙醇进行脱蜡; ⑤染色: 进行HE及免疫组化染色, 根据试剂盒具体做法进行操作(4张切片中, 2张切片行目的蛋白免疫组化染色、1张切片行HE染色、剩下1张切片则用于设置空白对照)。

#### 2. 判断标准

在400倍显微镜下, 选取5个视野, 需遵循随机取样原则, 观察5个视野中的细胞染色情况。①根据5个视野中观察到的染色细胞平均百分比记分: 0%~10%、11%~25%、26%~50%、51%~75%、超过76%。分别记为1分、2分、3分、4分、5分。②根据5个视野中观察到的细胞着色强度进行分级: 未着色、淡黄色、黄色、棕黄色, 分别记为0级、1级、2级、3级。③最终判定: 根据①、②结果的乘积判定, <3为(-), 定义为阴性表达; 3~6为(+), 7~9为(++), 10~12为(+++), 均定义为阳性表达。病理切片的观察、结果读取及记录由2位医师负责, 由符合资质的病理科医师进行最终审核。

### 三、运用HybriMax检测HPV病毒分型检测

#### 1. 材料准备

将NIP实验组中的48例石蜡标本及正常鼻黏膜对照组中的20例石蜡标本随机进行排列, 从每个标本上连续切下3片石蜡组织, 厚度均为10 μm, 并将切下的石蜡组织放入干净研钵。

#### 2. HPV DNA提取

在研钵中加入适量液氮后充分研磨, 根据试剂盒说明进行DNA的提取。

#### 3. PCR扩增

PCR总反应体积为25 μL, 其中含有PCR premix 23.25 μL、Taq酶0.75 μL、不同标本的HPV DNA 1 μL, 并设置蒸馏水作为HPV阴性对照, 在PCR仪上设置好反应程序, 循环次数为40次。

#### 4. 导流杂交

将低密度基因芯片放入导流杂交仪中, 芯片标记有21种常见HPV寡核苷酸探针(HPV6、11、16、18、31、33、35、39、42、43、44、45、51、52、53、56、58、59、66、68、CP8304), 根据试剂盒具体做法进行操作, 酶标显色。以上全过程需进行无菌操作。

### 四、统计学处理

采用统计软件SPSS 22.0。计数资料用率或构成比表示, 计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结果

### 一、HPV在NIP实验组与正常鼻黏膜对照组中的感染情况

NIP实验组与正常鼻黏膜对照组HPV感染情况见表1。

经统计学分析, NIP实验组与正常鼻黏膜对照组的中位年龄、性别比较差异均无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ )。NIP实验组组织标本中HPV总阳性率为64.58%(31/48), 正常鼻黏膜对照组组织标本中HPV阳性率为0(0/20), NIP阳性率高于正常鼻黏膜对照组, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 32.178$ ,  $P < 0.01$ )。

表1 NIP实验组与正常鼻黏膜对照组 HPV感染情况(例)

组别	例数	阳性病例	阴性病例
正常鼻黏膜对照组	20	0	20
NIP实验组	48	31	17

## 二、HPV亚型在NIP实验组石蜡标本中的分布情况

在48例NIP标本中,31例检测出HPV,其中检测出49株HPV病毒,含括12个亚型:HPV6占4.08%(2/49)、HPV11占32.65%(16/49)、HPV16占12.24%(6/49)、HPV18占4.08%(2/49)、HPV33占4.08%(2/49)、HPV39占2.04%(1/49)、HPV44占10.20%(5/49)、HPV52占8.16%(4/49)、HPV53占2.04%(1/49)、HPV56占2.04%(1/49)、HPV58占16.30%(8/49)、HPV68占2.04%(1/49)。

## 讨 论

NIP是一种良性肿瘤,发生于鼻黏膜上皮组织,鉴于其易侵蚀破坏周围组织、术后易复发、有癌变倾向等的显著特点,多数学者认为其是一种交界性肿瘤,各研究中NIP有较高的复发率及恶变率,其中复发率高达30%~78%,且恶变率可达5%~21%。NIP的发病因素尚未完全清楚,虽然NIP患病人群中以中老年男性患者居多,但并无相关研究明确年龄、性别与NIP发病的关系。国内外许多研究在NIP标本中检测出HPV,认为NIP的发病与HPV感染存在密切关系,但受取样、不同检测方法、不同地区及其他因素影响导致检出率差异性较大。目前,HPV介导NIP发生发展的机制尚不清楚,且NIP恶变机制也未明了,在判断NIP是否会发生恶变及如何有效地降低其复发率等方面研究也有所欠缺。

HPV是一种双链闭环DNA病毒,其致病途径是通过感染人体表皮和黏膜鳞状上皮,研究表明HPV亚型至今已有200种,可根据HPV亚型致病力及致癌力2个方面进行比较,将HPV亚型归为两类:低危型(HPV6、11、40、42等)、高危型(HPV16、18、31、33、35等)<sup>[45]</sup>。HPV自首次发现以来一直被认为是手足寻常疣、扁平疣及尖锐湿疣的病因。经后期大量研究发现,当受到某些病毒感染时易引起肿瘤发病,如EB病毒与鼻咽癌,伯基特(Burkitt)淋巴瘤,肝炎病毒与肝癌,HPV与宫颈癌等,使得人们越来越关注病毒与肿

瘤发病之间的关系,研究表明高危型HPV检测对宫颈病变的检出有重要意义<sup>[6]</sup>。HPV不仅与宫颈癌起病有明确关系,还与10%~15%其他部位肿瘤的发病有关联,如阴道、阴茎、肛门等部位,HPV与乳腺癌、头颈部肿瘤、食管癌、膀胱癌等之间也存在联系。随着病毒分子生物学的研究发展,对HPV感染致病的研究已不再聚焦于宫颈疾病,HPV与头颈部肿瘤,特别是与NIP的关系,也成为一项热门研究。近年来,HPV感染可引发头颈部肿瘤这一结论得到大多数学者的认可。

在NIP发病相关因素的研究中,大多数学者认为HPV感染与NIP的发生发展密切相关。Syrjantn等(1987年)最先运用原位DNA杂交技术在NIP中检测出HPVDNA。此后,国内外不断出现有关HPV感染与NIP的发生发展关系的研究报道。Beck等(1995年)研究了32例NIP的病理标本,应用PCR技术发现有20个标本被检出HPV阳性(20/32,62.5%),得出NIP与HPV感染有关的结论。McGovern等<sup>[7]</sup>报道HPV检出率为76.2%(16/21)。包永新等<sup>[8]</sup>对HPV16与NIP进行研究,发现NIP中HPV16阳性率为62.5%,NIP伴癌前病变中HPV16阳性率达66.7%,说明在NIP致病过程中HPV16可能起到关键作用。关亚峰等<sup>[9]</sup>运用PCR技术在NIP中检测出HPV57,阳性率为78.3%,得出HPV57可能与NIP的发病密切相关。有研究表明NIP同时合并2种HPV亚型感染率达17.5%,合并3种HPV亚型感染率达6.7%<sup>[10]</sup>。赵仁伍等<sup>[11]</sup>研究使用荟萃分析法证实了HPV感染可以增加NIP发病的风险,并可能在NIP的复发中起到至关重要的作用。王茂华等<sup>[12]</sup>用荟萃分析法进一步验证了HPV感染与NIP的发生、复发及癌变相关。同时,有研究表明NIP癌变中高危型HPV感染率明显高于复发及原发NIP,而NIP复发中高危型HPV感染率明显高于原发NIP<sup>[13]</sup>。Hwang等(1998年)应用PCR技术对42例NIP石蜡包埋组织进行研究,发现良性NIP中有HPV6和HPV11扩增,恶变NIP中有HPV16扩增。有学者认为HPV16、11/16、18、16/18可以增加NIP癌变的风险,而HPV6、11、6/11(尤其是HPV6)被认为是NIP复发的危险因素<sup>[14,15]</sup>。有学者研究表明,鳞状上皮增生、角化过度、核分裂像增加是影响NIP预后及复发的重要指标<sup>[16]</sup>。然而不少学者研究则表明HPV感染与NIP复发无明显关系,故HPV感染是否促进了NIP的复发仍然

存在争议。

本研究中针对 NIP 中 HPV 感染及表达情况, 笔者团队运用了 HE、免疫组化染色及 HybriMax, 结果显示在所有 NIP 石蜡标本中 HPV 总阳性率为 64.58%, 远高于对照组的 0。在 48 例 NIP 标本中, 检测出 49 株 HPV 病毒, 含括 12 个亚型 (HPV6、11、16、18、33、39、44、52、53、56、58、68), 认为 HPV 感染与 NIP 的发生有着密切关系, 特别是 HPV11、16、44、58 亚型。

综上所述, 国内 NIP 的发生发展与感染了 HPV11、16、44、58 亚型的可能性最大, 但 HPV 如何致癌分子途径尚未研究明白, 有待深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] von Buchwald C, Bradley P J. Risks of malignancy in inverted papilloma of the nose and paranasal sinuses. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 15 (2): 95-98.
- [2] Holm A, Allard A, Eriksson I, et al. Absence of high-risk human papilloma virus in p16 positive inverted sinonasal papilloma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2020, 137 (3): 201-206.
- [3] Hoffmann M, Klose N, Gottschlich S, et al. Detection of human papillomavirus DNA in benign and malignant sinonasal neoplasms. *Cancer Lett*, 2006, 239 (1): 64-70.
- [4] McBride A A. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem*, 2017, 398 (8): 919-927.
- [5] Castle P E, Porras C, Quint W G, et al. Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J Clin Microbiol*, 2008, 46 (10): 3437-3445.
- [6] 胡喜珍, 丁杰, 张旭, 等. 高危型 HPV 检测在宫颈病变筛查中的应用研究. *新医学*, 2017, 48 (8): 583-586.
- [7] McGovern S L, Williams M D, Weber R S, et al. Three synchronous HPV-associated squamous cell carcinomas of Waldeyer's ring: case report and comparison with Slaughter's model of field cancerization. *Head Neck*, 2010, 32 (8): 1118-1124.
- [8] 包永新, 马秀岚. HPV16 和 p53 蛋白在鼻腔鼻窦肿瘤组织中的作用. *中国医师杂志*, 2005 (1): 77-78.
- [9] 关亚峰, 臧朝平, 张重华. 人乳头状瘤病毒 57 感染与鼻内翻性乳头状瘤发生的相关性. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2006, 20 (20): 922-924, 927.
- [10] Vor der Holte A P, Fangk I, Glombitza S, et al. Identification of rare and common HPV genotypes in sinonasal papillomas. *Head Neck Pathol*, 2020, 14 (4): 936-943.
- [11] 赵仁伍, 汪永干, 史前妹, 等. 鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤发病及复发与人乳头状瘤病毒感染相关性 Meta 分析. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2012, 19 (5): 228-231.
- [12] 王茂华, 于爱民, 关兵, 等. HPV 感染与鼻内翻性乳头状瘤复发及恶变相关的 Meta 分析. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2018, 24 (4): 350-355, 360.
- [13] 计早, 韩佳利, 阎艾慧. 人乳头瘤病毒感染在鼻内翻性乳头状瘤中的表达及临床意义. *中国医科大学学报*, 2015, 44 (4): 323-326.
- [14] Ding R, Sun Q, Wang Y. Association between human papilloma virus infection and malignant sinonasal inverted papilloma. *Laryngoscope*, 2021, 131 (6): 1200-1205.
- [15] Paehler Vor der Holte A, Fangk I, Glombitza S, et al. Impact of human papillomaviruses (HPV) on recurrence rate and malignant progression of sinonasal papillomas. *Cancer Med*, 2021, 10 (2): 634-641.
- [16] Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Histopathological parameters of recurrence and malignant transformation in sinonasal inverted papilloma. *Acta Otolaryngol*, 2006, 126 (2): 214-218.

(收稿日期: 2022-04-25)

(本文编辑: 杨江瑜)