

HR-HPV 感染合并 CIN 与阴道微环境、TAP1 及 TAP2 基因多态性的关系研究

刘忠, 杨素芬, 杨阳

【摘要】目的 探讨高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)感染合并宫颈上颈上皮内瘤变(CIN)与阴道微环境、TAP1 及 TAP2 基因多态性的关系。**方法** 收集 2022 年 5 月至 2024 年 5 月宁波大学附属第一医院收治的 HR-HPV 感染患者 120 例,行液基薄层细胞学检测或宫颈活检,合并 CIN 75 例(HR-HPV 感染合并 CIN 组),不合并 CIN 45 例(HR-HPV 感染组)。采集宫颈阴道分泌物,运用 16S rRNA 技术进行测序,比对 Greengene 数据库,以“门、属”水平分析两组阴道微环境菌群分布;收集外周静脉血行聚合酶链式反应扩增 TAP1 及 TAP2 基因多态性片段,分析 HR-HPV 感染合并 CIN 与 TAP1、TAP2 基因多态性的关系。**结果** “门”水平上,HR-HPV 感染合并 CIN 组厚壁菌门相对丰度低于 HR-HPV 感染组,放线菌门、拟杆菌门、变形菌门、软壁菌门及梭杆菌门均高于 HR-HPV 感染组(均 $P < 0.05$);“属”水平上,HR-HPV 感染合并 CIN 组乳酸杆菌属低于 HR-HPV 感染组,加德纳菌属、普氏菌属、奇异菌属、脲原体属、纤毛菌属、链球菌属及厌氧球菌属均高于 HR-HPV 感染组(均 $P < 0.05$)。两组 TAP1、TAP2 基因多态性位点理论值与实际值差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);两组 TAP1 rs41549617 位点基因型分布差异有统计学意义($P < 0.05$),且 HR-HPV 感染合并 CIN 组 AA 基因型、A 等位基因频率高于 HR-HPV 感染组(均 $P < 0.05$);两组 TAP2 rs1135216 位点基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** HR-HPV 感染患者可因阴道微生物菌群变化以及 TAP1 rs41549617 位点改变进一步发展为 CIN,检测阴道微生物菌群以及 TAP1 rs41549617 位点有助于对 HR-HPV 感染患者进行风险分层,以便制定个体化随访策略。

【关键词】 高危型人乳头瘤病毒;宫颈上颈上皮内瘤变;阴道微环境;TAP1;TAP2

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.11.004

【中图分类号】 R737.33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)11-1413-05

Relationship between high-risk HPV infection combined with cervical intraepithelial neoplasia and vaginal microenvironment and TAP1 and TAP2 gene polymorphisms

LIU Zhong, YANG Sufen, YANG Yang (The First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315010, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the relationship between high-risk human papilloma virus (HR-HPV) infection and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) with vaginal microenvironment, TAP1, and TAP2 gene polymorphisms. **Methods** A total of one-hundred and twenty patients with HR-HPV infection were selected, thinprep liquid-based cytology test (TCT) showed that twenty-five patients were complicated with CIN (HR-HPV infection combined with CIN group), and the other forty-five patients were included in HR-HPV infection cervicitis group. Cervical and vaginal secretions were collected and sequenced by 16S rRNA technology. The distribution of vaginal microenvironment flora in the two groups was analyzed at the “phylum” and “genus” level by comparison with the Greengene database. TAP1 and TAP2 gene polymorphisms were amplified by polymerase chain reaction (PCR) in peripheral venous blood, and the relationship between CIN, TAP1 and TAP2 gene polymorphisms in HR-HPV infection was analyzed. **Results** At the “phylum” level, the relative abundance of Firmicutes in the HR-HPV infection complicated CIN group was lower than that in the HR-HPV infection cervicitis group, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Tenericutes and Fusobacteria were higher than those in HR-HPV infected cervicitis group (all $P < 0.05$). At the “ge-

作者单位: 315010 宁波,宁波大学附属第一医院

通信作者: 刘忠, Email: huangyi123450@163.com

nus” level, the Lactobacillus in the HR-HPV infected CIN group was lower than that in the HR-HPV infected cervicitis group; Gardnerella, Prevotella, Atopobium, Ureaplasma, Sneathia, Streptococcus and Anaerococcus were higher than those in HR-HPV infected cervicitis group (all $P < 0.05$). There was no significant difference between the theoretical and actual values of TAP1 and TAP2 polymorphic loci between the two groups ($P > 0.05$). The genotype distribution of TAP1 rs41549617 locus was statistically significant between the two groups ($P < 0.05$), and the AA genotype and A allele frequencies in the HR-HPV infection combined with CIN group were higher than those in the HR-HPV infection cervicitis group (all $P < 0.05$). There was no significant difference in genotype distribution of TAP2 rs1135216 between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** HR-HPV infected patients can further develop CIN due to changes in vaginal microflora and TAP1 rs41549617 site. Detection of vaginal microflora and TAP1 rs41549617 site is helpful for risk stratification of HR-HPV infected patients.

【Key words】 High-risk human papilloma virus; Cervical intraepithelial neoplasia; Vaginal microenvironment; TAP1; TAP2

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(11):1413-1417]

高危型人乳头瘤病毒 (high-risk human papilloma virus, HR-HPV) 感染是导致宫颈上颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 乃至宫颈癌发生重要原因^[1]。对 HR-HPV 感染患者进行筛查以便早期识别 CIN 的发生, 对于宫颈癌的防治具有重要意义^[2]。研究表明, HR-HPV 感染患者较健康人群阴道微生物菌群失调明显^[3]。基于墨西哥女性人群的一项研究证实, HR-HPV 感染合并 CIN 患者较 HR-HPV 感染未合并 CIN 患者阴道金黄色短杆菌及砾状短杆菌相对丰度增加, 乳酸杆菌相对丰度减少。有研究还发现, CIN 发生、进展与感染宿主免疫相关基因序列介导的信号通路有关, 譬如 TAP1 及 TAP2 基因等^[4]。基于此, 本研究拟探讨 HR-HPV 感染合并 CIN 与阴道微环境、TAP1 及 TAP2 基因多态的关系, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2022 年 5 月至 2024 年 5 月宁波大学附属第一医院收治的 HR-HPV 感染患者 120 例, 进一步行液基薄层细胞学检测 (thinprep liquid-based cytology test, TCT) 或宫颈活检, 合并 CIN 75 例 (HR-HPV 感染合并 CIN 组), 不合并 CIN 45 例 (HR-HPV 感染组)。纳入标准: (1) 符合《HPV DNA 检测应用于健康体检人群子宫颈癌初筛的专家共识》中 HR-HPV 感染诊断标准^[5]; (2) 年龄 20 ~ 70 岁, 临床资料完备。排除标准: (1) 合并其他生殖系统疾病者, (2) 近期接受过相关药物治疗者, (3) 妊娠期孕妇, (4) 入组前 2 d 内有性行为者。本研究获得宁波大

学附属第一医院医学伦理委员会批准, 所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

HR-HPV 感染合并 CIN 组年龄 (46.0±7.6) 岁; 体质指数 (BMI) 为 (23.51±1.12) kg/m²; 感染 HPV 分别为 16/18 型 64 例, 其他 11 例; 感染类型为单一 34 例, 混合 41 例。HR-HPV 感染组年龄 (45.4±7.4) 岁; BMI 为 (23.69±1.24) kg/m²; 感染 HPV 分别为 16/18 型 38 例, 其他 7 例; 感染类型为单一 21 例, 混合 24 例。两组一般资料差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 阴道微环境检测 采用无菌拭子采集宫颈阴道分泌物, 使用 DNA 试剂盒提取宫颈阴道分泌物 DNA, 应用琼脂糖电泳测定 DNA 含量, 运用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 16S rRNA 基因 V3 ~ V4 区域片段, 反应体系 30 μl: 2× Gflex PCR Buffer 15 μl、Template DNA ≥ 1 μl、Tks Gflex DNA Polymerase 0.6 μl、5 pmol/μl primer F 1 μl 及适宜双蒸水补足。引物序列为 343 F: 5' TAC-GGRAGGCAGCAG-3'、798 R: 5' AGGGTATC-TAATCCT-3'。PCR 程序: 95 °C 预变性 (5 min), 30 循环; 95 °C 变性 (30 s), 58 °C 退火 (30 s), 72 °C 伸延 (30 s), 72 °C 10 min 伸延。按 1 : 1 比例将 PCR 产物混合均匀, 送至检测机构使用 DNA 基因分析仪 (美国 Applied Biosystems 3730xL) 进行测序, 比对 Greengene 数据库, 以“门、属”水平分析阴道微环境菌群分布。

1.2.2 TAP1 及 TAP2 基因多态性检测 入组第 2 天空腹状态下收集患者外周静脉血 5 ml, 经离心处理

后制备血浆储放于 -20°C 环境下以备检测。应用 DNA 提取试剂盒(日本 Takara 公司)提取血浆 DNA,运用 PCR 扩增 TAP1 及 TAP2 基因多态性片段,反应体系 25 μl ,其中,2 $\times$ master mix 12.5 μl ,上/下游引物均为 1.25 μl ,DNA 模版 2 μl 以及适宜双蒸水补足。PCR 程序流程:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性(5min),30 循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性(30s),58 $^{\circ}\text{C}$ 退火(30s),72 $^{\circ}\text{C}$ 伸延(30s),72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 伸延。按 1:1 比例将反应底物与染色剂一并发于 10 μl 电泳槽用于目的片段扩增,引物、设计及结果测序均由检测机构完成。

1.3 观察指标 比对 Greengene 数据库,以“门、属”水平分析两组阴道微环境菌群分布,分析 HR-HPV 感染合并 CIN 与 TAP1、TAP2 基因多态性的关系。

1.4 统计方法 数据采用 SPSS 22.0 软件分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 t 检验;计数资料采用例数表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阴道微环境菌群分布 “门”水平上,HR-HPV 感染组检出 6 种菌群,构成比依次为厚壁菌门(54.87%)、放线菌门(23.46%)、拟杆菌门(8.72%)、变形菌门(6.47%)、软壁菌门(2.97%)及梭杆菌门(1.15%)。HR-HPV 感染合并 CIN 组亦检出上述 6 种菌群,构成比依次为厚壁菌门(47.64%)、放线菌门(26.72%)、拟杆菌门(10.01%)、变形菌门(7.83%)、软壁菌门(4.14%)及梭杆菌门(1.63%)。HR-HPV 感染合并 CIN 组厚壁菌门相对丰度低于 HR-HPV 感染组,放线菌门、拟杆菌门、变形菌门、软壁菌门及梭杆菌门均高于 HR-HPV 感染组(均 $P < 0.05$)。

“属”水平上,HR-HPV 感染组共检出 8 个菌属,

构成比依次为乳酸杆菌属(40.38%)、加德纳菌属(18.91%)、普氏菌属(10.27%)、奇异菌属(10.18%)、脲原体属(7.26%)、纤毛菌属(5.43%)、链球菌属(3.32%)及厌氧球菌属(1.86%)。HR-HPV 感染合并 CIN 组共检出 9 个菌属,构成比依次为乳酸杆菌属(36.27%)、加德纳菌属(19.45%)、普氏菌属(11.00%)、奇异菌属(10.75%)、脲原体属(7.41%)、纤毛菌属(5.78%)、链球菌属(3.56%)、厌氧球菌属(2.13%)及支原体属(1.09%)。HR-HPV 感染合并 CIN 组乳酸杆菌属低于 HR-HPV 感染组,加德纳菌属、普氏菌属、奇异菌属、脲原体属、纤毛菌属、链球菌属及厌氧球菌属均高于 HR-HPV 感染组(均 $P < 0.05$)。

2.2 TAP1 及 TAP2 基因多态性分析 两组 TAP1 及 TAP2 基因多态性位点理论值与实际值相比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。

2.3 TAP1 及 TAP2 基因多态性分布 两组 TAP1 rs41549617 位点基因型分布比较差异有统计学意义($P < 0.05$),且 HR-HPV 感染合并 CIN 组 AA 基因型、A 等位基因频率均高于 HR-HPV 感染组($\chi^2=2.66, 8.51$, 均 $P < 0.05$)。两组 TAP2 rs1135216 位点基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

3 讨论

感染 HR-HPV 尤其是 16/18 型是发生宫颈癌的危险因素,原因在于 HR-HPV 可对细胞凋亡相关基因活性产生抑制,进而促进细胞异常增殖^[6]。在 HR-HPV 持续感染过程中,可与其他因素共同作用诱发 CIN,进而导致宫颈癌发生。CIN 阶段具有可逆性,若能及早识别 CIN 发生,对于延缓宫颈癌发生具有现实意义。

表 1 两组 TAP1 及 TAP2 基因多态性分析

基因型	例			
	HR-HPV 感染组($n=45$)		HR-HPV 感染合并 CIN 组($n=75$)	
	理论值	实际值	理论值	实际值
TAP1 rs41549617	GG	20	17	13
	GA	13	25	30
	AA	12	33	32
TAP2 rs1135216	GG	17	30	24
	GC	13	24	31
	CC	15	21	20

注: HR-HPV 感染组实际值与理论值比较, $\chi^2_{\text{TAP1}}=0.35, P > 0.05; \chi^2_{\text{TAP2}}=0.35, P > 0.05$ 。HR-HPV 感染合并 CIN 组实际值与理论值比较, $\chi^2_{\text{TAP1}}=0.22, P > 0.05; \chi^2_{\text{TAP2}}=0.55, P > 0.05$

表2 两组 TAP1 及 TAP2 基因多态性分布

基因型		HR-HPV 感染组 (n=45)		HR-HPV 感染合并 CIN 组 (n=75)	
		例数	构成比 (%)	例数	构成比 (%)
TAP1 rs41549617	GG	16	35.56	13	17.33
	GA	19	42.22	30	40.00
	AA	10	22.22	32	42.67
	G	51	56.67	56	37.33
	A	39	43.33	94	62.67
TAP2 rs1135216	GG	12	26.67	24	32.00
	GC	20	44.44	31	41.33
	CC	13	28.89	20	26.67
	G	44	48.89	79	52.67
	C	46	51.11	71	47.33

一般来说,阴道内微生物菌群处于动态平衡,以维持阴道正常环境,可抑制病原体生长。HR-HPV 感染后,多数女性阴道微环境可自行清除病毒,但若出现反复或持续性感染,可能打破阴道微生物菌群动态平衡,进而诱发 CIN^[7]。本研究结果显示,相比于 HR-HPV 感染,HR-HPV 感染合并 CIN 阴道微生物菌群出现异常改变,在“门”水平上主要表现为厚壁菌门相对丰度减少,放线菌门、拟杆菌门、变形菌门、软壁菌门及梭杆菌门增加,且在“属”水平特征趋势相仿。而作为厚壁菌门的乳酸杆菌属,为阴道微生物菌群中的优势菌属,多为有益菌,不仅可将阴道上皮内的糖原发酵形成乳酸用以阴道内酸性环境维持,进而对病原微生物繁殖产生抑制,且可促进宿主细胞/体液免疫用于防止病原体黏附,并发挥细胞自噬作用用以病原微生物清除。加德纳菌属、普氏菌属、奇异菌属、脲原体属、纤毛菌属、链球菌属及厌氧球菌属相对丰度增加,多为厌氧有害菌。普氏菌属丰度与 HR-HPV 持续感染相关,且与乳酸杆菌数量呈负相关,可通过释放胶原酶或纤溶酶破坏宫颈上皮细胞屏障作用,进而导致出现 HR-HPV 持续感染。可见当乳酸杆菌属相对丰度降低、厌氧有害菌属相对丰度增加时,HR-HPV 可能出现反复且持续感染,可进一步诱发 CIN^[8-9]。

当 HR-HPV 感染发生后,机体细胞毒性 T 淋巴细胞可通过主要组织相容复合物- I 类(major histocompatibility complex- I ,MHC- I)分子途径加工及呈递作用,经 TAP1、TAP2 基因使得抗原肽自胞浆向内质网转运,进而形成 T 细胞特异性免疫性应答杀伤、消灭病原体。若 TAP1、TAP2 基因表达下调,可

使 MHC- I 分子表达降低,进而对抗原加工及呈递作用产生影响^[10]。本研究结果显示,相比于 HR-HPV 感染患者,HR-HPV 感染合并 CIN 患者 AA 基因型、A 等位基因频率更高,这与 Yang 等^[11]研究结果类似。但本研究仅证实 TAP1 rs41549617 的 A 等位基因可增加 CIN 发生风险,提示 TAP1、TAP2 基因可能存在不同途径作用诱使 CIN 发生,这有待研究作进一步揭示。

综上所述,HR-HPV 感染患者可因阴道微生物菌群变化以及 TAP1 rs41549617 位点改变进一步发展为 CIN,检测阴道微生物菌群以及 TAP1 rs41549617 位点有助于对 HR-HPV 感染患者进行风险分层,以便制定个体化随访策略。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突
作者贡献声明 刘忠:实验操作、论文撰写;杨阳:数据整理、统计学分析;杨素芬:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] YANG Y M, XU L J, YUAN S H, et al. Optimal screening and detection strategies for cervical lesions: A retrospective study[J]. J Cancer, 2024, 15(11): 3612-3624.

[2] YU Y Q, JIANG M Y, ZHANG X, et al. Effectiveness of high-risk human papillomavirus genotyping for cervical cancer screening. A multicentre screening cohort study in rural China[J]. An Sist Sanit Navar, 2024, 47(2): e1065.

[3] ZEBER-LUBECKA N, KULECKA M, DABROWSKA M, et al. Cervical microbiota dysbiosis associated with high-risk Human Papillomavirus infection[J]. PLoS One, 2024, 19(4): e0302270.

[4] WONG S C C, AU T C C, CHAN S C S, et al. Menstrual blood human papillomavirus DNA and TAP1 gene polymorphisms as potential biomarkers for screening and monitoring of cervical squamous intraepithelial lesion[J]. J Infect Dis, 2018, 218(11): 1739-1745.

[5] 中国医师协会妇产科分会阴道镜及子宫颈病变专业委员会,《中华健康管理学杂志》编辑委员会.HPV DNA 检测应用于健康体

- 检人群子宫颈癌初筛的专家共识[J].中华健康管理学杂志,2022,16(10):665-672.
- [6] 云红叶,程虹,于欣荣,等.阴道微环境改变和高迁移率蛋白 A2 水平变化与 HPV 感染及宫颈癌变的关系研究[J].中国病原生物学杂志,2022,17(8):955-959.
- [7] 刘春桃,胡红,陈尧俊,等.60 例高危型 HPV 感染藏族妇女阴道菌群分析[J].山东医药,2023,63(16):54-57.
- [8] MITRA A, MACINTYRE D A, LEE Y S, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16865.
- [9] MITRA A, MACINTYRE D A, MARCHESI J R, et al. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: What do we know and where are we going next[J]. Microbiome, 2016, 4(1): 58.
- [10] 郭金莲,王秀美,刘娅,等.宫颈癌前病变并发高危型人乳头瘤病毒感染与 TAP1 及 TAP2 基因多态性的关联[J].中华医院感染学杂志,2022,32(23):3624-3627.
- [11] YANG J, LIU W P, YAN Z L, et al. Polymorphisms in transporter associated with antigen presenting are associated with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in a Chinese Han population[J]. HLA, 2021, 98(1): 23-36.

收稿日期:2024-08-14
(本文编辑:钟美春)