

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.05.017

❖ 临床研究 ❖

5-ALA 光动力疗法对宫颈上皮内瘤样病变合并 HPV 感染的临床疗效及其影响因素

周丽, 张莉

(南通市中医院妇科, 江苏 南通 226001)

【摘要】目的: 探讨 5-氨基酮戊酸(5-ALA)光动力疗法(PDT)对宫颈上皮内瘤样病变(CIN)合并 HPV 感染的临床疗效及其影响因素。**方法:** 以 75 例 CIN 合并 HPV 感染患者作为研究对象,包括 CIN I 30 例, CIN II 25 例, CIN III 20 例,均予以 5-ALAPDT 治疗;比较治疗 3 个月和 6 个月 HPV 转阴率和不良反应发生情况,并于治疗前取阴道活检的组织标本;采用免疫组织化学实验测定 p53、p16、Bcl-2、Bax 的表达水平,分析影响 HPV 转阴的因素。**结果:** 5-ALAPDT 治疗 CIN 患者 3 个月和 6 个月的转阴率分别为 70.67%、68.00%;治疗 6 个月,不良反应总发生率为 48.00%,主要不良反应为局部出血,红肿及局部不适症状,无严重不良反应发生。HPV 转阴患者与未转阴患者 Bax、Bcl-2、p16、p53 四种蛋白的表达水平及 HPV 分型差异有统计学意义($P < 0.05$)。Logistic 回归分析结果显示, p53 表达强阳性和 HPV 高危型为阻碍 HPV 转阴的独立危险因素($OR = 1.510, 1.229, P < 0.05$); Bax 表达强阳性为促进 HPV 转阴的保护性因素($OR = 0.426, P < 0.05$)。**结论:** 5-ALAPDT 治疗 CIN 合并 HPV 感染可以取得较好的 HPV 转阴率, p53、Bax 表达与 HPV 分型可能对判断预后存在指导意义。

【关键词】 宫颈上皮内瘤样病变; HPV 感染; 光动力学疗法; 转阴率

【中图分类号】 R711.74 **【文献标志码】** A

Clinical efficacy and influencing factors of 5-ALA photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia with HPV infection

ZHOU Li, ZHANG Li

(Department of Gynecology, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the efficacy of 5-ALA photodynamic therapy (PDT) in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) caused by HPV infection and its influencing factors. **Methods:** 75 patients infected by HPV including 30 cases of CIN I, 25 cases of CIN II, and 20 cases of CIN III were selected in this study, all of which were treated with 5-ALAPDT. The HPV trans-negative rate and adverse reactions were observed between 3 m and 6 m after treatment. Tissue samples from vaginal biopsies were taken before treatment, and the expression levels of p53, p16, Bcl-2 and Bax were measured by immunosopic chemistry experiments, the influencing factors of HPV negative were analyzed. **Results:** The negative conversion rate of CIN patients treated by 5-ALAPDT therapy for 3 months and 6 months was 70.67% and 68.00%, respectively. After 6 months of treatment, the total incidence of adverse reactions was 48.00%, and the main adverse reactions were local bleeding, redness and local discomfort symptoms, without serious adverse reactions. There were significant differences in the expression of Bax, Bcl-2, p16 and p53 proteins and HPV typing between the negative HPV group and the non-negative HPV group ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that strong positive expression of p53 and high risk type of HPV were independent risk factors for preventing HPV from turning negative ($OR = 1.510, 1.229, P < 0.05$). Strong positive expression of Bax was a protective factor for promoting HPV negative ($OR = 1.962, P < 0.05$). **Conclusion:** 5-ALAPDT therapy for CIN combined with HPV infection can achieve a good HPV negative conversion rate, p53, Bax expression and HPV typing may be of guiding significance for the judgment of prognosis.

【Key words】 Cervical intraepithelial neoplasia; HPV infection; Photodynamic therapy; Negative conversion rate

宫颈上皮内瘤样变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是成年妇女宫颈的常见病变,有转化为侵袭性宫颈癌的倾向^[1],临床分为 CIN I、CIN II 和 CIN III 3 级。研究^[2]表明, CIN 的发生发展与人

乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染相关。5-氨基酮戊酸(5-aminolevulinic acid hydrochloride, 5-ALA)光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是一种非侵袭性的新技术,近年来广泛应用于

基金项目:江苏省南通市科技计划项目(MSZ19171)

作者简介:周丽(1980-),女,主治医师。E-mail:zgy2315@sina.com

癌前病变、尖锐湿疣等疾病的治疗当中。本研究探讨了5-ALAPDT疗法对CIN合并HPV感染患者的临床疗效及其影响因素。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年12月在南通市中医院妇产科就诊,并经阴道镜活检和HPV检测确诊为HPV感染的75例CIN患者为研究对象。其中,CIN I 30例,患者平均年龄(31.7 ± 4.6)岁,平均病程(14.9 ± 3.3)个月;CIN II 25例,平均年龄(28.3 ± 4.4)岁,平均病程(14.7 ± 3.2)个月;CIN III 20例,平均年龄(27.8 ± 3.8)岁,平均病程(15.1 ± 3.9)个月。

纳入标准:(1)经组织病理学确诊为CIN I ~ III的初诊患者;(2)均在本院接受治疗,资料完整;(3)自愿签署知情同意书。排除标准:(1)妊娠期和哺乳期患者;(2)任何形式的有放射治疗史;(3)免疫功能缺陷;(4)药物过敏史;(5)光敏史等。所有患者在接受治疗前均进行充分的宣教并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 取膀胱截石位,清洁外阴后放置阴道窥器,0.1%的新洁尔灭依次对阴道、子宫颈及宫颈管进行消毒。将20%浓度的5-ALA温敏凝胶敷于宫颈皮损表面4 h,应用上海复旦张江生物医药股份有限公司生产的XD-635AB型半导体激光治疗仪,635 nm、100 J/cm²红光照射病变部位25 min,1次/周,共3次。

1.2.2 HPV DNA分型检测 所有患者治疗前和治疗后3个月、6个月随访时取宫颈脱落细胞进行宫颈HPV DNA检测。采用亚能生物技术(深圳)有限公司的HPV-DNA分型测定试剂盒检测,应用PCR-反向点杂交法检测23种HPV亚型,包括5种低危亚型和18种高危亚型。其中高危型包括HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、83;低危亚型包括HPV6、11、42、43、81。

1.2.3 免疫组化标记 治疗前采用获取阴道镜活检的组织标本,经4%甲醛溶液固定后石蜡包埋,4 m厚连续切片,免疫组化采用SP法,具体操作步骤按试剂说明书进行。高压抗原修复后DAB显色,苏木精复染,中性树胶封固后镜下观察。根据表达强度和分布对阳性结果进行半定量评分:(-)表示P16、Bcl-2、Bax不表达;仅胞浆染色或局灶表达阳性,p53不表达或仅基底或基底旁表达;(+)表示染色位于基底下1/3内的细胞;(++)表示染色位于

基底下2/3内的细胞;(+++)超过基底下2/3的全层细胞。

1.2.4 观察指标 (1)转阴率:脱落细胞HPV DNA的RLU/CO < 1.0为转阴;(2)治疗6个月HPV转阴相关因素;(3)治疗期间的不良反应包括局部出血、局部不适以及红肿等。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两样本t检验;计数资料[n(%)]表示,组间比较采用 χ^2 检验或Fisher精确检验;相关性采用Logistic回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-ALA光动力疗法对CIN I ~ III的治疗效果比较

5-ALA光动力疗法治疗CIN患者3个月、6个月的转阴率分别为70.67%、68.00%。见表1。

表1 5-ALA光动力疗法对CIN I ~ III的治疗效果比较[n(%)]

组别	例数	HPV转阴率	
		3个月	6个月
CIN I	30	21(70.00)	20(66.67)
CIN II	25	20(80.00)	20(80.00)
CIN III	20	12(60.00)	11(55.00)
合计	75	53(70.67)	51(68.00)

2.2 治疗前p16、p53、Bcl-2、Bax蛋白表达水平及HPV分型比较

根据治疗6个月的转阴情况,将75例患者分为HPV转阴组($n = 51$)和未转阴组($n = 24$)。两组患者治疗前p16、p53、Bcl-2、Bax蛋白表达水平及HPV类型比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2和图1。

2.3 治疗6个月HPV转阴相关因素分析

多因素Logistic回归分析结果显示,p53表达强阳性表达与HPV高危型为阻碍HPV转阴的独立危险因素($OR = 1.510、1.229, P < 0.05$);Bax表达强阳性为促进HPV转阴的保护性因素($OR = 0.426, P < 0.05$)。见表3。

2.4 不良反应发生率

治疗后6个月,总不良反应总发生率为48.00%,主要不良反应为局部出血,红肿,及局部不适症状,无严重不良反应发生。见表4。

表 2 治疗前 p16、p53、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平及 HPV 分型比较 [n(%)]

蛋白	例数	转阴组 (n=51)	未转阴组 (n=24)	χ^2 值	P 值
p16				3.93	0.047
-	4	3(75.00)	1(25.00)		
+	16	8(50.00)	8(50.00)		
++	27	18(66.67)	9(33.33)		
+++	28	22(78.57)	6(21.43)		
p53				8.91	0.003
-	9	7(77.78)	2(22.22)		
+	11	7(63.64)	4(36.36)		
++	21	19(90.48)	2(9.52)		
+++	34	18(52.94)	16(47.06)		
Bcl-2				7.21	0.007
-	5	2(40.00)	3(60.00)		
+	15	7(46.67)	8(53.33)		
++	22	18(81.82)	4(18.18)		
+++	33	24(72.73)	9(27.27)		
Bax				7.31	0.007
-	37	20(54.05)	17(45.95)		
+	23	20(86.96)	3(13.04)		
++	11	8(72.73)	3(27.27)		
+++	4	3(75.00)	1(25.00)		
HPV 分型				9.26	0.002
高危型	41	34(82.93)	7(17.07)		
低危型	34	17(50.00)	17(50.00)		

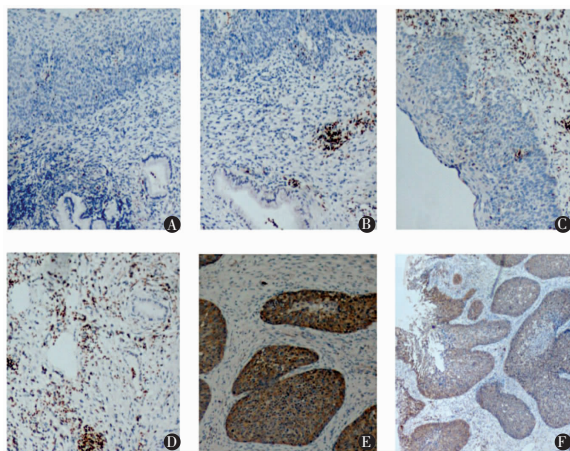


图 1 典型免疫组织化学图片

A. 阴性对照; B. Bax, 弱阳性(+); C. Bcl-2, 弱阳性(+); D. Bcl-2, 中等阳性(++); E. P16, 强阳性(+++); F. P53, 强阳性(+++)。

表 3 治疗 6 个月 HPV 转阴相关因素分析

因素	B 值	SE 值	Wald 值	OR 值	95% CI		P 值
					下限	上限	
P16	1.025	0.874	1.375	2.787	0.505	15.456	0.241
p53	0.412	0.186	4.906	1.510	0.047	0.776	0.026
Bcl-2	0.674	0.388	3.018	1.962	0.971	4.197	0.082
Bax	-0.854	0.374	5.214	0.426	0.205	0.886	0.022
HPV	1.665	0.744	5.008	1.665	1.229	22.719	0.026
常量	1.020	0.811	1.582	0.773			0.208

表 4 不良反应发生率 [n(%)]

组别	治疗后 6 个月			
	局部出血	局部不适	红肿	合计
CIN I (n=30)	4(13.33)	5(16.67)	5(16.67)	14(46.67)
CIN II (n=25)	3(12.00)	5(20.00)	4(16.00)	12(48.00)
CIN III (n=20)	3(15.00)	3(15.00)	4(20.00)	10(50.00)
合计	10(13.33)	13(17.33)	13(17.33)	36(48.00)

3 讨论

CIN 是一种癌前病变,如不及时接受治疗,CIN II 或 CIN III 可进展为宫颈癌。据估计,全世界每年有 1%~2% 的妇女发生 CIN II~III,HPV 阳性者患病率更高,约为 10%^[3]。吸烟、微生物感染和内源性、外源性免疫缺陷与 CIN 的发生有一定的关系。HR-HPV 的持续感染会促进宫颈鳞状上皮非典型增生加快和 CIN 向宫颈癌的转变。目前,临床针对 CIN 的主要治疗措施有子宫颈环形电切除术和宫颈锥形切除术等,均存在增加早产和流产等风险。PDT 利用特定波长的光激发光敏剂产生高活性的自由基团灭杀宫颈增生活跃的上皮细胞^[4]。5-ALAPDT 作为一种局部用光敏剂 PDT 疗法被广泛应用于 CIN I~II 的研究中,但其临床疗效存在较大的差异,可能是由于随访期与光敏剂使用的差异及不良的研究设计所导致的^[5]。

2012 年 ASCCP 诊疗指南推荐对 CIN I 患者可选择性进行随访观察或切除治疗,而现有文献报道对于 CIN I 患者是否接受治疗存在较大争议。李丽等^[6]对 CIN I 患者进行随访发现,无治疗 CIN I 患者随访 6 个月及 12 个月 HPV 转阴率分别为 15% 和 35%,而 HPV 病毒载量增加者分别为 25% 及 12.5%,因此建议对 HPV 阳性时间超过 12 个月的 CIN I 患者接受相应治疗,以防治病理恶化。本研究表明,进行 5-ALAPDT 治疗的 CIN I 患者 6 个月转阴率可以达到 66.67%,说明该治疗在遏制 CIN I 病毒载量增加和提高转阴率方面具有积极意义。本研究中,接受 5-ALAPDT 治疗 3 个月及 6 个月后,HPV 病毒总转阴率分别为 70.67%、68.00%,与既往相关研究结果一致,均支持 5-ALAPDT 治疗 CIN 可以取得较好疗效这一观点^[7-11]。

既往有研究^[12-13]指出,p16、p53、Bcl-2 的阳性表达与 CIN 的病变程度呈正相关,而 Bax 的阳性表达与 CIN 的病变程度呈负相关^[14]。p53 蛋白和 p16 蛋白都属于肿瘤抑制蛋白,在人体中,p53 蛋白由 TP53 基因编码,p16 蛋白由 p16 基因编码,两者均具有调节细胞周期的能力。p53 蛋白是目前已知的细胞周期信号通路 p53-p21-DREAM-E2F/CHR 通路的上游关键蛋白,能够下调 cyclin、CDK 等多种细胞

周期相关基因的表达,从而使细胞周期阻滞于G1期^[15],p16蛋白则可以通过抑制细胞周期依赖性蛋白激酶4(Cdk4)的活性防止细胞周期进入S期^[16]。p53和p16在宫颈病变中呈现出高表达的趋势,且随着CIN级别的增高,其表达率也逐渐升高,多数学者认为这是一种代偿机制。目前研究^[17-18]已证实,p53蛋白和p16蛋白对判断CIN的级别、是否发生宫颈癌及宫颈癌患者的治疗效果均有一定的指导意义。Bcl-2基因也称为永生基因,其编码的Bcl-2蛋白是一种线粒体内膜蛋白,可以减少由各种刺激引起的细胞损伤,从而抑制细胞凋亡;而Bax是Bcl-2的负反馈调控基因,也有学者将Bax与Bcl-2称为凋亡与抗凋亡基因,并主张以Bax/Bcl-2这一比值作为评估肿瘤细胞增殖与凋亡能力的关键标志物。在CIN中,较多研究支持Bcl-2的表达水平随着CIN级别的升高而升高,其高表达预示着不良预后^[19]。可见,各个指标与患者预后密切相关,均可作为预后评估指标指导术后疾病管理和复发预防。HPV目前已经发现了140余种亚型,主要可以分为皮肤低危型、高危型和黏膜低危型和高危型几种,不同亚型的HPV导致的临床症状存在一定的差异。低危型HPV主要与寻常疣和良性病变相关,而高危型HPV能够增加疾病侵袭性,引起高级别的CIN或宫颈癌^[20]。据不完全统计,几乎90%的宫颈癌是由高危型HPV诱发的。因此,合并高危型HPV的CIN也有可能出现转阴率低下的情况。目前,p16、p53、Bcl-2、Bax表达情况及HPV基因型是否影响5-ALAPDT对CIN患者的疗效尚未有过报道。本研究采用Logistic回归分析以上几个指标是否对患者转阴率有影响,结果显示,p53表达强阳性表达与HPV高危型为阻碍HPV转阴的独立危险因素($OR = 1.510, 1.229$);Bax表达强阳性为促进HPV转阴的保护性因素($OR = 0.426$)。这提示在临床应用中,应该遵循个体化原则,更具患者情况改进治疗策略,提高治疗效率。

综上所述,5-ALAPDT治疗CIN合并HPV感染可以取得较好的HPV转阴率,p53、Bax表达与HPV分型可能对判断患者预后有意义,在CIN个体化治疗中有一定的指导价值。

参考文献

- [1] 张金荣.郑州市2850例妇女HPV感染状况与亚型分析[J].保健医学研究与实践,2017,14(3):38-41.
- [2] Campion MJ,McCance DJ,Cuzick J,et al. Progressive potential of

mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic, and virological study[J]. Lancet,1986,2(8501):237-240.

- [3] Jeronimo J, Castle PE, Temin S, et al. Secondary Prevention of Cervical Cancer: ASCO Resource-Stratified Clinical Practice Guideline [J]. J Glob Oncol, 2017, 3(5): 635-657.
- [4] 盛宇,周毅成,李鹤玉,等.5-氨基酮戊酸光动力疗法治疗寻常疣的临床观察[J].哈尔滨医科大学学报,2015,49(5):453-455.
- [5] Zhang W, Zhang A, Sun W, et al. Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(21): e10864.
- [6] 李丽,刘婷婷. HR-HPV载量指导 CIN I 治疗及随访的探讨 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(29): 5-7.
- [7] Wierrani F, Kubin A, Jindra R, et al. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of intraepithelial neoplasia and human papillomavirus of the uterine cervix-a new experimental approach [J]. Cancer Detect Prev, 1999, 23(4): 351-355.
- [8] Chen MK, Luo DQ, Zhou H, et al. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on cervical condylomata acuminata [J]. Photomed Laser Surg, 2011, 29(5): 339-343.
- [9] Wang HW, Zhang LL, Miao F, et al. Treatment of HPV infection-associated cervical condylomata acuminata with 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy [J]. Photochem Photobiol, 2012, 88(3): 565-569.
- [10] Keefe KA, Tadir Y, Tromberg B, et al. Photodynamic therapy of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with 5-aminolevulinic acid [J]. Lasers Surg Med, 2002, 31(4): 289-293.
- [11] Bodner K, Bodner-Adler B, Wierrani F, et al. Cold-knife conization versus photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II with associated human papillomavirus infection; a comparison of preliminary results [J]. Anticancer Res, 2003, 23(2C): 1785-1788.
- [12] 杨其昌,朱燕,刘宏斌,等.宫颈上皮内瘤变 p16INK4a 和 p53 及 Ki-67 表达及其诊断价值探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(16): 1255-1258.
- [13] 张卫华,刘思源,华长城.三氧化二砷对人骨肉瘤细胞 MG-63 增殖和凋亡的影响 [J]. 健康研究, 2020, 40(2): 184-187.
- [14] 陈赞,林朗,杨宗哨,等.益生菌抑制人结肠癌细胞 SW-480 细胞增殖的机制研究 [J]. 健康研究, 2018, 38(3): 301-304.
- [15] 曾永群,郭芳,李凡彩,等. CEA、p16、p53、Ki-67 在宫颈腺癌的表达及意义 [J]. 现代妇产科进展, 2009, 18(11): 858-860.
- [16] Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 114-132.
- [17] Yu L, Fei L, Liu X, et al. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers [J]. J Cancer, 2019, 10(12): 2654-2660.
- [18] 罗晓莉. p16 p53 及 Ki-67 免疫组织化学检测对宫颈病变的诊断价值分析 [J]. 基层医学论坛, 2020, 24(8): 1122-1123.
- [19] Raffone A, Travaglio A, D'Antonio A, et al. BAG3 expression correlates with the grade of dysplasia in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2020, 99(1): 99-104.
- [20] Özdemir E, Kısa S. Validation of the Turkish Cervical Cancer and Human Papilloma Virus Awareness Questionnaire [J]. International nursing review, 2016, 63(3): 465-472.

(收稿日期:2020-12-21

修回日期:2021-01-13)