



授予单位代码
学号或申请号
中国图书分类号
是否保密及密级

10089
20172167
R711.74
否

河北医科大学
Hebei Medical University

硕士学位论文

学术学位

阴道蒲公英中药制剂治疗宫颈人乳头瘤病毒感染的
临床研究

**Clinical study on treatment of cervical human papilloma
virus infection with taraxacum extract for vagina**

研 究 生：徐帅师
导 师：张咏梅 主任药师
专 业：临床药学
二级学院：河北省人民医院

2020年3月

目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
英文缩写	6
研究论文 阴道蒲公英中药制剂治疗宫颈人乳头瘤病毒感染的临床研究	
第一部分 26385 例妇科门诊患者宫颈细胞 HPV 基因亚型分析	
前言	7
材料与方法	7
结果	8
讨论	11
小结	12
参考文献	12
第二部分 阴道蒲公英中药制剂制备工艺研究	
前言	14
材料与方法	14
结果	18
讨论	22
小结	23
参考文献	24
第三部分 阴道蒲公英中药制剂治疗宫颈 HR-HPV 感染的疗效观察	
前言	25
材料与方法	25
结果	27
讨论	29
结论	30
参考文献	31
附录	32
综述 宫颈人乳头瘤病毒感染治疗方法研究进展	34
致谢	47
个人简历	48

阴道蒲公英中药制剂治疗宫颈人乳头瘤病毒感染的临床研究

摘 要

第一部分 26385 例妇科门诊患者宫颈细胞 HPV 基因亚型分析

目的：分析河北省人民医院妇科门诊患者人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染率及感染亚型情况。**方法：**回顾性分析 2014 年 4 月到 2017 年 8 月来医院妇科门诊接受 HPV 检测的患者 26385 例，按照患者年龄阶段分为五组，15~25 岁组 1792 例，26~35 岁组 7974 例，36~45 岁组 8178 例，46~55 岁组 6055 例，≥56 岁 2386 例。分析五组患者 HPV 感染率及不同亚型分布情况。**结果：**26385 例受检者中，HPV 阳性率为 33.05%(8719/26385)，其中高危型感染 6992 例，低危型感染 784 例，高低危型混合感染 943 例；共计 12901 例次 HPV 感染，其中高危型 HPV 感染 11059 例次，占比 91.46%，感染前三位依次为 HPV16，HPV58，HPV52；各年龄组的感染率不同($\chi^2=42.198$, $P<0.01$)，15~25 岁最高，其次是≥56 岁年龄组，分别与其他年龄组比较差异均有统计学意义($\chi^2=203.281$, $P<0.01$; $\chi^2=42.033$, $P<0.01$)。**结论：**该医院就诊女性患者 HPV 感染率较高，以高危型 HPV 感染为主，主要感染型别为 HPV16, HPV58, HPV52。15~25 岁和≥56 岁年龄组 HPV 感染率相对较高，临床应采取具有针对性的预防和筛查措施。

第二部分 阴道蒲公英中药制剂制备工艺的研究

目的：优化蒲公英制剂制备工艺，制备阴道蒲公英中药制剂。**方法：**以浸膏中各有效成分的含量及制剂的成型性、硬度、均一性等为评价指标，确定阴道蒲公英中药制剂制备工艺流程中的醇沉浓度、辅料种类和剂量。**结果：**蒲公英水提物最佳醇沉浓度 60%，浸膏适宜辅料为丙二醇、聚乙二醇 6000，三者比例为 32:1:7。**结论：**该制备方法简单可行，所得制剂性状稳定，微生物限度检查以及含量测定均符合标准，可用于临床研究。

第三部分 阴道蒲公英中药制剂治疗宫颈 HR-HPV 感染的疗效观察

目的：探讨阴道蒲公英中药制剂治疗宫颈 HR-HPV 感染的临床疗效。**方法：**选取 2018 年 11 月到 2019 年 6 月，到河北省人民医院妇科门诊就

诊确诊为宫颈 HR-HPV 感染的患者 63 例，随机分为治疗组和对照组。治疗组患者给予蒲公英制剂进行治疗，对照组患者给予重组人干扰素 $\alpha 2b$ 泡腾胶囊进行治疗，对比两组的临床疗效。**结果：**两组均可降低患者临床证候积分($Z_{\text{治疗组}}=-3.740, P=0.00$; $Z_{\text{对照组}}=-3.619, P=0.00$)；治疗组中 ≤ 30 岁患者转阴率最高，与其他年龄段患者比较差异有统计学意义($\chi^2=8.068, P=0.018$)；对照组中 ≤ 30 岁患者转阴率最高，与其他年龄段患者比较差异无统计学意义($\chi^2=3.768, P=0.152$)。针对 HPV16 型和 18 型，治疗组转阴率高于对照组，差异无统计学意义($\chi^2=0.268, P=0.605$)。治疗组总有效率优于对照组，差异无统计学意义($\chi^2=0.032, P=0.859$)。**结论：**蒲公英制剂在治疗宫颈 HR-HPV 感染上具有一定潜在价值，尤其对 30 岁以下患者疗效较好，可作为下一个重点研究方向。

关键词：人乳头瘤病毒；感染率；超高效液相色谱；蒲公英；临床研究

Clinical study on the treatment of cervical human papilloma virus infection with vaginal dandelion

ABSTRACT

Part one Analysis of Human Papilloma Virus subtypes in cervical cells of 26385 gynecological outpatients

Objective: To analyze the prevalence and subtypes of human papilloma virus (HPV) infection in gynecological outpatients of Hebei general hospital. **Methods:** From April 2014 to August 2017, a retrospective analysis was made of 26385 patients who received HPV test in the gynecological clinic of the hospital. According to the age stage, the patients were divided into five groups: 1792 in the 15~25-year-old group, 7974 in the 26~35-year-old group, 8178 in the 36~45-year-old group, 6055 in the 46~55-year-old group and 2386 in the 56 year-old group. The infection rate and distribution of different subtypes of HPV in five groups were analyzed. **Results:** Among the 26385 cases, the positive rate of HPV was 33.05% (8719 / 26385), including 6992 cases of high-risk infection, 784 cases of low-risk infection and 943 cases of high-risk mixed infection. There were 12901 cases of HPV infection in total, including 11059 cases of high-risk HPV infection, accounting for 91.46%, the most common subtypes were HPV16, HPV58, and hpv52. The infection rate of each age group was different ($\chi^2 = 42.198$, $P < 0.01$), the highest age group was 15-25 years old, and the second age group was ≥ 56 years old. The difference was statistically significant compared with other age groups ($\chi^2 = 203.281$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 42.033$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The HPV infection rate was higher in the hospital, mainly with a high-risk HPV infection, and the main infection was HPV16, HPV58 and HPV52. The infection rate of HPV in the age group of 15-25 and ≥ 56 years old is relatively high, so the clinical prevention and screening measures should be taken.

Part two Study on preparation technology of dandelion extract for vagina

Objective: optimize the preparation process of dandelion preparation and prepare vaginal dandelion preparation. **Methods:** The content of the effective components in the extract and the formability, hardness and homogeneity of the preparation were used as the evaluation indexes to determine the alcohol precipitation concentration, the types and doses of the auxiliary materials in the preparation process of vaginal dandelion traditional Chinese medicine preparation. **Results:** The optimum concentration of the water extract of dandelion was 60% alcohol, and the appropriate excipients of the extract were propylene glycol and polyethylene glycol 6000, with a ratio of 32:1:7. **Conclusion:** The preparation method is simple and feasible, the properties of the preparation are stable, its microbial limit test and content determination meet the standards, and it can be used in clinical research.

Part three Observation on the therapeutic effect of dandelion preparation in vagina on cervical HR-HPV infection

Objective: To explore the clinical effect of dandelion preparation for vagina in the treatment of cervical HR-HPV infection. **Methods:** From November 2018 to June 2019, 63 patients with cervical HR-HPV infection diagnosed in the gynecological outpatient department of Hebei general hospital were randomly divided into treatment group and control group. The patients in the treatment group were treated with dandelion preparation, and the patients in the control group were treated with Recombinant Human α -2b Interferon Capsule for Vaginal Foams. To compare the clinical effect of the two groups. **Results:** Both groups can reduce the clinical symptom score of patients (Z treatment group = -3.740, $P = 0.00$; Z control group = -3.619, $P = 0.00$); In the treatment group, the negative conversion rate of patients under 30 years old is the highest, which is statistically significant compared with other age groups ($\chi^2=8.068$, $P=0.018$). In the control group, the negative rate of patients under 30 years old was the highest, which is no statistically significant compared with

other age groups($\chi^2=3.768$, $P=0.152$). For HPV16 and HPV18, the negative rate in the treatment group was higher than that in the control group,the difference was not statistically significant ($\chi^2=0.268$, $P=0.605$).The total effective rate of the treatment group was better than that of the control group,the difference was not statistically significant ($\chi^2=0.032$, $P=0.859$).
Conclusion: Dandelion preparation has a certain potential value in the treatment of cervical HR-HPV infection, especially for patients under 30 years old, which can be the next research direction..

Keywords: Human papillomavirus, Infection rates, High performance liquid chromatography, Dandelion,Clinical research

英文缩写

英文缩写	英文全称	中文全称
HPV	Human papilloma virus	人乳头瘤病毒
HR-HPV	High Risk Human papilloma virus	高危型人乳头瘤病毒
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤变
NILM	No intraepithelial lesion cells and malignant cells	未见上皮内病变细胞和恶性细胞
ASC	atypical squamous cells	不典型鳞状细胞
ASC-US	atypical squamous cell of undetermined significance	无明确诊断意义的非典型鳞状细胞
ASC-H	atypical squamous cells-cannot exclude HIS	不能排除高级别鳞状上皮内病变非典型鳞状细胞
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesion	低级别鳞状上皮内病变
CIN I	cervical intraepithelial neoplasia I	宫颈上皮内瘤变 I 级
CIN II	cervical intraepithelial neoplasia II	宫颈上皮内瘤变 II 级
CINIII	cervical intraepithelial neoplasiaIII	宫颈上皮内瘤变III级
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion	高级别鳞状上皮内病变
LEEP	Loop Electrosurgical Excision Procedure	子宫颈环行电切术
PDT	photodynamic therapy	光动力疗法
NK cells	Natural killer cells	自然杀伤细胞
5-FU	5-fluorouracil	5-氟尿嘧啶
HLA	human leukocyte antigen	人类白细胞抗原
DCs	dendritic cells	树突状细胞

第一部分

26385 例妇科门诊患者宫颈细胞 HPV 基因亚型分析

前 言

宫颈癌是全世界妇女中常见的恶性肿瘤之一^[1]，每年有超过 25 万人死于宫颈癌^[2]。人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染被认为是女性患相关癌症的主要原因之一^[3]。HPV 是一种无包膜的小型环状双链 DNA 病毒，已经发现了超过 200 种的 HPV 基因型。根据病毒基因组结构和对人类上皮组织的亲嗜性不同，将它们分于不同的属^[1]。根据其流行病学及生物学特征，又分为高危型(High risk,HR)和低危型(Low risk,LR)。某些高危型 HPV (High risk HPV, HR- HPV)被世界卫生组织认定为一级致癌物，是宫颈癌发展的必要危险因素^[4]。除宫颈癌外，它们还可引起许多皮肤黏膜良性增生性疾病，头颈鳞状细胞癌、直肠癌等。尽管有预防疫苗，但 HPV 感染在世界范围内仍然非常普遍^[2]。在不同的国家和地区，HPV 亚型分布也不同。明确一个地区主要感染类型对宫颈病变的防治尤为重要。为了解河北省人民医院妇科门诊女性 HPV 感染情况，本研究收集了河北省人民医院妇科门诊患者 26385 例，按年龄分组对 HPV 感染情况进行对比分析。

材料与amp;方法

1. 材料

1.1 一般资料

收集 2014 年 4 月—2017 年 8 月到河北省人民医院妇科门诊就诊患者 26385 例为研究对象。年龄为 15~96 岁，中位数 40 岁，其中 15~25 岁 1792 例，26~35 岁 7974 例，36~45 岁 8178 例，46~55 岁 6055 例，≥56 岁 2386 例。所有受检者知情同意采用人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒(荧光 PCR 法)进行 21 种 HPV 基因分型检测。

1.2 仪器与试剂

人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒(荧光 PCR 法),购自广东凯普生物科技股份有限公司及由该公司提供的荧光 PCR 仪。可检测 21 种 HPV 基因亚型,包括 15 种高危型别 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、53、66,6 种低等风险型别 HPV6、11、42、43、44、CP8304。

2. 方法

2.1 人乳头瘤病毒试剂盒检测

2.1.1 标本采集

由妇科门诊医生以窥阴器暴露宫颈,用棉签擦去宫颈过多的分泌物,将 HPV 采样刷置于宫颈口采集标本。将宫颈刷置于宫颈口,轻搓宫颈刷使其单方向旋转 3~5 圈,慢慢取出宫颈刷,将刷头放入加有细胞保存液的取样管中,沿刷柄折痕处将多余的部分折断,拧紧瓶盖,标上病人的唯一编号,立即送检。

2.1.2 DNA 提取

适当振荡样本管,使宫颈刷得到充分涮洗,在管壁挤干。自样本管取 1 mL 洗脱液至 1.5 mL Ep 管中,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,保留管底细胞沉淀(若无沉淀留少许液体)。沉淀加入 50 μ L 裂解液,在 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热 10 min 使其裂解,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液待查。

2.1.3 PCR 扩增

将待测样品 DNA 溶液加入离心完毕的 PCR 反应管中,反应总量为 25 μ L,严格按试剂盒说明书所述条件进行扩增。扩增产物经杂交液杂交、洗膜、显色,最终根据试剂盒提供的膜条 HPV 分型分布图判读结果。

2.2 数据分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 26385 例受检患者中,HPV 感染 8719 例,总感染率为 33.05%。其中高危型 HPV 感染 6992 例,感染率为 26.50%;低危型 HPV 感染 784 例,感染率为 2.97%;高危型与低危型 HPV 混合感染 943 例,感染率为 3.57%。

共计检出 21 种亚型,8719 例感染者共感染 12901 例次(双重感染者记为感染 2 例次,以此类推),感染例次最高的是 HPV16,其次是 HPV58,HPV52,分别占 17.33% (2236/12901),11.15% (1438/12901),10.36%(1337/12901)(见表 1)。8719 例感染者中,单重感染 5824 例,占比 66.80%; 双重感染 2007 例,占比 23.02%; 三重感染 615 例,占比 7.05%; 四重及四重以上感染 273 例,占比 3.13%(见表 2)。

表 1 HPV 亚型分布

Table1. Distribution of HPV subtypes

HPV 亚型	感染例次	构成比(%)
高危型	11059	85.72
HPV16	2236	17.33
HPV58	1438	11.15
HPV52	1337	10.36
HPV53	816	6.33
HPV33	767	5.95
HPV51	765	5.93
HPV39	752	5.83
HPV18	568	4.4
HPV66	546	4.23
HPV31	545	4.22
HPV68	401	3.11
HPV56	398	3.09
HPV59	199	1.54
HPV45	165	1.28
HPV35	126	0.98
低危型	1842	14.28
HPV6	555	4.30
HPV11	368	2.85
HPV42	748	5.80
HPV43	47	0.36
HPV44	26	0.20
HPV CP8304	98	0.76
总计	12901	100.00

表 2 HPV 多重感染情况

Table 2. Multiple HPV infections

感染类型	感染例数	构成比(%)
单重感染	5824	66.80
双重感染	2007	23.02
三重感染	615	7.05
四重感染	190	2.18
五重感染	57	0.65
六重感染	17	0.19
七重感染	4	0.05
八重感染	4	0.05
九重感染	1	0.01
总计	8719	100.00

2. 15~25 岁、26~35 岁、36~45 岁、46~55 岁及≥56 岁各组感染率依次为 47.66%、32.12%、31.00%、30.90%和 37.64%，不同年龄组的感染率差异有统计学意义($\chi^2=226.829$, $P<0.01$)(见表 3)。其中 15~25 岁最高，其次是≥56 岁年龄组，分别与其他三组比较差异均有统计学意义($\chi^2=203.281$, $P<0.01$; $\chi^2=42.033$, $P<0.01$)。15~25 岁与≥56 岁年龄组感染率差异有统计学意义($\chi^2=42.198$, $P<0.01$)。

表 3 不同年龄组 HPV 感染情况

Table 3 HPV infection in different age groups

年龄组(岁)	检查人数	感染例数	感染率(%)
15~25	1792	854	47.66
26~35	7974	2561	32.12
36~45	8178	2535	31.00
46~55	6055	1871	30.90
≥56	2386	898	37.64
总计	26385	8719	33.05
χ^2 值		226.829	
P 值		0.000	

3.各年龄组 HPV 亚型感染前三位分别为：15~25 岁组和 26~35 岁组均为 HPV16、HPV52、HPV58；36~45 岁组、46~55 岁组和≥56 岁组均为 HPV16、HPV58、HPV52，可见不同年龄组 HPV 的主要感染型别差异不大。分析各组 HPV 感染情况，可见不同年龄组的 HPV 感染者都以感染高危型 HPV 为主(见表 4)。

表 4 不同年龄组 HPV 感染亚型分析

Table 4 Subtypes of HPV infection in different age groups

年龄组 (岁)	检查 人数	高危型 HPV		低危型 HPV		混合感染	
		人数	感染率(%)	人数	感染率(%)	人数	感染率(%)
15~25	1792	564	31.47	115	6.42	175	9.77
26~35	7974	2001	25.09	250	3.14	310	3.89
36~45	8178	2175	26.60	196	2.40	164	2.01
46~55	6055	1538	25.40	155	2.56	178	2.94
≥56	2386	714	29.92	68	2.85	116	4.86
总计	26385	6992	26.50	784	2.97	943	3.57

讨 论

1.宫颈癌一般是由高危型 HPV 持续感染而形成的，从感染 HPV 到发展成宫颈癌长达 15~30 年，且早期大多数感染可通过自身免疫系统消除。由于病毒的致病性及自身免疫情况不同，有些病毒 DNA 可整合到宿主细胞 DNA 中，干扰宿主细胞基因的转录与表达，最终导致宫颈、阴道、外阴和肛周区域癌症^[5]。在宫颈癌的预防中，筛查是一项重要的二级预防策略^[6]。但最安全有效的预防措施还是一级预防及注射 HPV 疫苗^[7]。尽管在国家免疫规划中引入了 HPV 疫苗，但大多数国家的疫苗接种率仍然较低^[8]。此外，HPV 疫苗仍存在许多不足，比如不能用于已感染者；不能防止所有高危亚型；储存成本过高，导致无法广泛推广及使用等^[9]。要预防宫颈病变及宫颈癌就要早发现、早诊断、早治疗，因此了解本地区 HPV 感染现状及主要型别对于宫颈病变及宫颈癌的防治有重要意义。

2.协和医学院的多中心研究结果显示，我国一般女性 HPV 感染率为 15.5%^[10]。本研究结果表明，河北省人民医院妇科门诊检查的患者总感染

率为 33.05%，高于国内部分地区，如佛山地区感染率 25.16%^[11]、南京 26.80%^[12]，长春地区 30.23%，深圳地区 29.12%，成都地区是 21.14%，武汉地区 21.1%，甘肃地区 19.9%，上海地区 11.86%^[13]，在国内属较高水平。本研究共检出了 21 种亚型，8719 例感染者共感染 12541 例次感染，这是因为部分阳性患者中存在多重感染，导致 HPV 检出例次高于感染人次。其中，高危型占 86.95%，低危型占 13.05%，主要感染型别依次为 HPV16、HPV58、HPV52。本研究中 HPV 感染以单重性感染为主(67.45%)，多重感染中以二重感染为主。病例中有七重和八重感染各 4 例，其中有 2 例年龄在 20 岁以下，还有 1 例同时感染九种亚型，年龄为 23 岁。因此，需对年轻人加强 HPV 感染的健康教育。

3.本研究显示，不同年龄组 HPV 感染率有差异，15~25 岁组最高，其次是≥56 岁组。出现这样的“V”型趋势，可能是由于本研究样本量小；患者一般是机体出现症状才去检查；年轻女性宫颈发育不成熟易受 HPV 感染；25 岁以下患者初次感染距离两年的自愈期时间较长。各年龄组以高危型 HPV 感染为主，各亚型排位稍有差异，主要包括 HPV16、HPV58、HPV52，可考虑将其作为宫颈癌筛查的重要指标。

小 结

本实验分析了 2014 年 4 月—2017 年 8 月到河北省人民医院妇科门诊就诊 26385 例患者感染情况，结果表明，妇科门诊感染率较高，感染较高的亚型依次为 HPV16， HPV58， HPV52， HPV53， HPV33。不同年龄组感染率不同，均以高危型感染为主，主要包括 HPV16， HPV58， HPV52，这几种亚型应作为宫颈筛查和临床治疗的重点。

参考文献

1. De Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papilloma virus infection[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017,47:2-13.
2. Hancock G, Hellner K, Dorrell L. Therapeutic HPV vaccines[J]. Best

- Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018,47:59-72.
3. Serrano B, Brotons M, Bosch FX, et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018, 47:14-26.
 4. Berti FCB, Pereira APL, Cebinelli GCM, et al. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017,34:1-13.
 5. Adams TS, Mbatani NH. Clinical management of women presenting with field effect of HPV and intraepithelial disease[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018,47:86-94.
 6. Basu P, Mittal S, Bhadra Vale D, et al. Secondary prevention of cervical cancer[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018,47:73-85.
 7. 智艳芳,徐雪峰,李肖甫等. 河南地区宫颈上皮内瘤变及宫颈癌患者 HPV 感染型别分析[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014,48(2):142-146.
 8. Patty NJS, van Dijk HM, Wallenburg I, et al. To vaccinate or not to vaccinate? Perspectives on HPV vaccination among girls, boys and parents in the Netherlands: a Q-methodological study[J]. BMC Public Health, 2017, 17 (1): 872.
 9. 王卡娜, 郗明蓉. HPV 治疗性疫苗研究现状[J]. 实用妇产科杂志, 2017,33(2):89-90.
 10. 赵宇倩,赵方辉,胡尚英,陈汶,陈凤,崔剑锋,刘彬,章文华,张询,潘秦镜,乔友林. 中国女性人群宫颈人乳头瘤病毒感染及型别分布的多中心横断面研究[J]. 中华流行病学杂志,2015,12:1351-1356.
 11. 陈淑芬,嵒淑莉,宋春林等. 佛山地区 8985 例 HPV 感染亚型分析[J]. 热带医学杂志, 2015,15(3):325-327.
 12. 焦杰,俞杨,邬兰等. 南京地区 9515 例女性宫颈细胞 HPV 基因分型分析[J]. 江苏医药, 2017,43(1):14-16.
 13. 张鸢,韩一栩,周小飞,陈琨,张若. 某医院就诊女性人群 HPV 感染率及亚型分析[J]. 中华医院感染学杂志,2018,19:2996-2999.

第二部分

阴道蒲公英中药制剂的制备工艺研究

前 言

中药蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.、碱地蒲公英 *Taraxacum borealisinense* Kitam. 或同属数种植物的干燥全草，具有清热解毒，祛湿，消肿散结，利尿通淋等功效^[1]。现代药理学研究表明，蒲公英含有黄酮类、酚酸类、多糖、萜类等有效成分，具有抑菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、增强免疫力、抗肿瘤等作用^[2]。其注射液抗菌 2 号曾是我院久负盛名的制剂产品，多年的临床使用证明其治疗慢性盆腔炎疗效显著，在临床使用中发现其对 HPV 也有作用。目前尚无临床研究将蒲公英用于 HPV 感染的治疗，其治疗效果尚未明确。因此，本研究拟在提取、纯化蒲公英有效成分的基础上，制备其阴道用制剂，用于治疗宫颈 HPV 感染。

材料与amp;方法

1. 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 超高效液相色谱仪，美国 Waters 公司，包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Empower 色谱工作站；New Classic MF 电子分析天平，Mettler Toledo 有限公司；KR-360B 型超声清洗器，科尔超声波设备(集团)有限公司。

1.2 试药

绿原酸(批号：110753-200413，含有量 99.3%)、咖啡酸(批号：110885-200102，含有量 99.1%)均购自中国药品生物制品检定所。阿魏酸(批号：110773-201614，含有量 99%)、槲皮素(批号：10081-201610，含有量 99.1%)、木犀草素(批号：111520-201605，含有量 99.6%)均购自中国食品药品检定研究院提供。菊苣酸(批号：18032811，含有量 99%)购自上

海士锋生物科技有限公司。甲醇为色谱纯；磷酸为优级纯；液相用水为超纯水。蒲公英药材购自国药乐仁堂河北药业有限公司，执行标准为《中国药典》2015年版一部。

2.方法

2.1 蒲公英水提物的制备

通过文献检索可知^[3,4]，蒲公英水提 2 次为宜，浸泡后有效成分的得率会明显提高，且加水量对试验结果影响很显著，加 12 倍量水效果优于加 10 倍量和 8 倍量水；水煮时间对试验结果影响不显著，以 1.5h 加 1h 或者 2h 加 1.5h 提取效果较好。根据实际情况（以岭药物研究所），本实验精密称取蒲公英干燥全草适量，第一次加 14 倍量水浸泡 0.5h 后，加热煎煮 1.5h，第二次加 14 倍量水煎煮 1h，合并煎煮液，浓缩至相对密度为 1.20，冷却，得蒲公英水提物。

2.2 6 种成分的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱为依利特 C18 柱 (4.6mm×150mm, 5μm)，流动相甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B)，梯度洗脱(程序见表 1)；体积流量 0.8ml/min；检测波长 325nm；柱温 25℃；进样量 5μL。在此色谱条件下，槲皮素和木犀草素均达到基线分离(R>1.5)。

表 1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution programs

时间/min	甲醇/%	0.1%磷酸水/%
0	21	79
18	25	75
19	33	67
33	37	63
35	52	48
45	60	40
50	21	79

2.2.2 供试品溶液制备

精密量取蒲公英浸膏 1g 置 25 mL 量瓶中，加甲醇定容，超声提取

(250 W, 40 k Hz) 30 min, 冷却后, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 取 1.5 mL 上清液, 13000 r/min 离心 8 min, 过 0.22 μ m 微孔滤膜两次, 即得。

2.2.3 混合对照品溶液制备

精密称取绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素、木犀草素 8.7083、11.1125、0.8003、25.5013、1.3188、3.125mg, 置于 25mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 充分溶解后摇匀, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得各对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液 100 μ L, 加甲醇稀释至 1000 μ L, 制成每 ml 分别含绿原酸 34.833 μ g、咖啡酸 44.450 μ g、阿魏酸 3.201 μ g、菊苣酸 102.005 μ g、槲皮素 5.275 μ g、木犀草素 12.500 μ g 的混合对照品溶液。

2.2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.3”项下混合对照品溶液 2、4、5、6、8、10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 制得系列质量浓度的混合对照品溶液, 各精密吸取 5 μ L, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。

2.2.5 专属性考察

分别精密吸取对照品、供试品溶液及空白溶剂甲醇 5 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进行分析。

2.2.6 精密度考察

精密吸取混合对照品溶液 5 μ L, 按“2.1”项下的色谱条件, 重复进样测定 6 次, 测定绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素和木犀草素峰面积。

2.2.7 稳定性考察

取同一批蒲公英浸膏(190203), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于室温放置 0、2、4、8、10、12、24 h, 精密吸取 5 μ L 按“2.1”项下的色谱条件进行分析, 测定绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素和木犀草素色谱峰面积。

2.2.8 重复性试验

取同一批蒲公英浸膏(190203), 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别精密吸取 5 μ L 在“2.1”项色谱条件下进样分析, 测定绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素和木犀草素色谱峰面积。

2.2.9 加样回收率试验

精密称定已知含量蒲公英浸膏(190303)1g, 平行 6 份, 加入 6 种对照品适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 测定绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素和木犀草素的峰面积, 计算各成分的含量, 根据以下公式计算回收率。(回收率(%))=(测定量-药材含量)/标准品加入量×100%)

2.3 醇沉浓度的选择

取蒲公英水提浓缩液, 快速搅拌下缓慢加入无水乙醇至体积分数分别为 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 搅拌, 静置 48h(期间每天搅拌一次), 取上清液回收乙醇, 得 5 批蒲公英浸膏编号为 190301、190302、190303、190304、190305。按“2.2”项下供试品溶液方法制备(n=5), 按“2.1”项下色谱条件分析, 计算 6 种成分的含量。参照聂文佳测定方法, 测定各批浸膏中总黄酮, 总酚酸, 总多糖的含量。

2.4 辅料的选择

按上述工艺水提醇沉后所得浸膏, 需加入一些添加剂以改善蒲公英浸膏的性状。考虑到蒲公英浸膏中各有效成分含量较少, 且主要考察浸膏的药理作用, 故所制备的制剂中浸膏含量宜≥80%。称取蒲公英浸膏 4g, 平行 5 份, 分别加入丙二醇, 吐温 80, 5%高分子透明质酸钠, 聚乙二醇 6000 各 1g, 制备成浸膏含量为 80%的制剂, 对其流动性、黏性, 涂展性, 均匀性及拉丝情况进行比较。

2.5 辅料用量的选择

本实验固定蒲公英浸膏与辅料比例为 4:1, 通过改变丙二醇和聚乙二醇 6000 的比例来改变制剂的性状。小试以丙二醇与聚乙二醇 6000 比例为 1:1 制得蒲公英制剂, 结果浸膏质地稀软, 粘性降低且不易成型。之后将两者比例增大至 1:7 性状较为适宜。分别以比例为 1:5,1:6,1:7,1:8,1:9 制备制剂, 灌封于阴道给药器中, 24h 后比较成品的硬度, 均一性, 成型性和所需推力。

2.6 验证试验

所得制剂经辐射灭菌, 20℃下冷藏保存。为验证优选工艺的稳定性, 取 3 个批次的蒲公英浸膏, 按优选的工艺重复制备 3 批, 分别进行验证实验。

结 果

1. 单一成分的含量测定

1.1 标准曲线的绘制

通过建立线性回归方程, 计算得出定量范围内各化合物的线性良好($r > 0.9990$), (见表 2)。

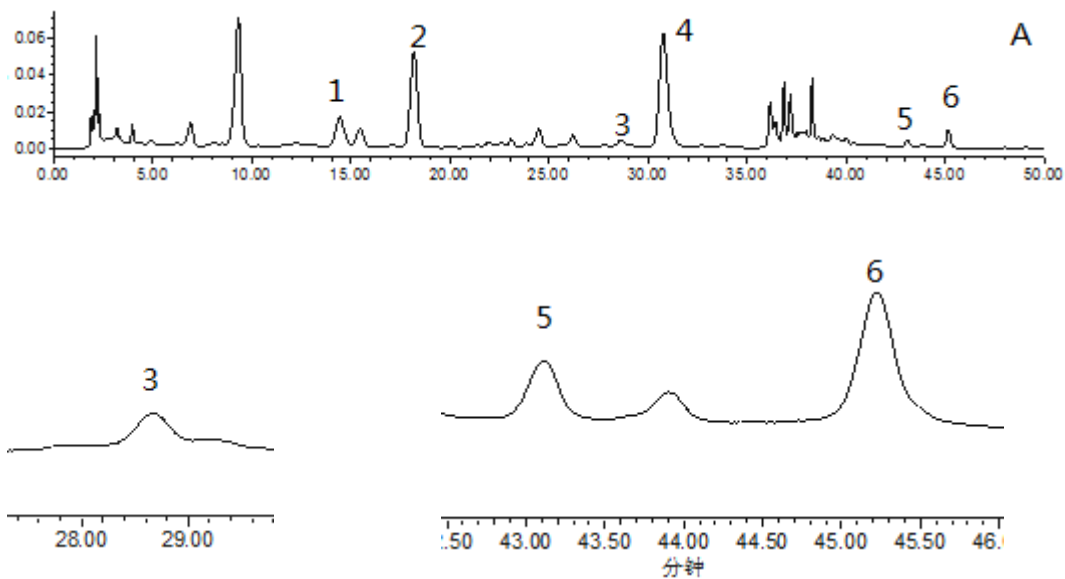
表 2 各成分线性关系考察结果

Tab.2 Linear relationships of various constituents

峰号	成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g/ml}$)
1	绿原酸	$Y=16468x+1922.1$	0.9999	6.967~34.833
2	咖啡酸	$Y=36386x-117400$	0.9992	8.890~44.450
3	阿魏酸	$Y=33326x-15729$	0.9997	0.640~3.201
4	菊苣酸	$Y=22661x+78667$	0.9992	20.401~102.005
5	槲皮素	$Y=12320x-4097.1$	0.9996	1.055~5.275
6	木犀草素	$Y=15474x-7284$	0.9998	2.500~12.500

1.2 专属性考察

各组分与其相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 分离效果较好, 空白无干扰, 该方法专属性良好, (见图 1)。



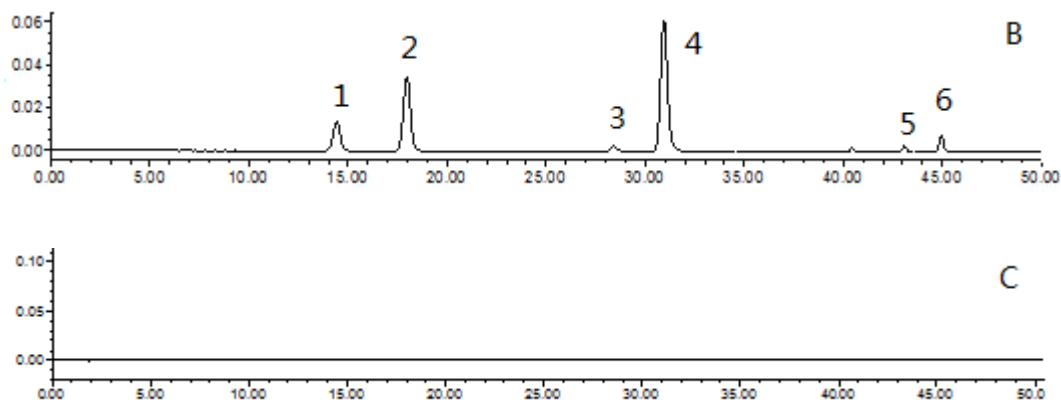


图 1. 供试品溶液对照品溶液及空白溶剂甲醇的 UPLC 色谱图

Fig 1. UPLC chromatogram of the control solution and the blank solvent and methanol

(图释)A. sample; B.mixed reference substances; C.blank .1. chlorogenic acid 2. caffeic acid 3.ferulic acid 4.chicoric acid 5.quercetin 6.luteolin

1.3 精密度实验

计算得到绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素和木犀草素峰面积的 RSD 值在分别为 0.61%，0.50%，0.75%，0.42%，1.69%，1.32%(n=6) 表明仪器精密度良好。

1.4 重复性实验

计算得到绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素和木犀草素峰面积的 RSD 值分别为 1.55%，0.37%，2.24%，0.45%，1.68%，1.57%(n=6) 说明该方法重复性良好。

1.5 稳定性实验

计算得到绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素和木犀草素峰面积的 RSD 值分别为 1.32%，1.43%，1.75%，1.39%，1.02%，1.18%(n=6)，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

1.6 加样回收率实验

通过所测得绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素和木犀草素的峰面积，计算出六个成分的平均加样回收率分别为 99.35%，100.22%，99.48%，100.87%，100.44%，98.48%，RSD 分别为 1.91%，0.94%，1.07%，1.84%，1.76%，2.35%，表明方法回收率良好，符合含量测定要求。

((加入标品后含量-样品含量)/加入标品量*100%=回收率)

2. 醇沉浓度的选择

在相同的水提浓缩条件下, 5 个醇沉浓度所得蒲公英浸膏中 6 种活性成分含量差异较大, 醇沉浓度越高, 所得浸膏中各成分含量越高。但醇沉浓度为 60%, 70%和 80%时, 各成分含量差异较小(见表 3)。因为 40%醇沉浓度下所得浸膏丢失, 故只测得 4 种醇沉浓度下所得浸膏中各总成分的含量, 结果, 总黄酮, 总酚酸及总多糖含量分别在醇沉浓度为 80%、60%、50%达到最高(见表 4)。由于在醇沉过程中, 多糖有较大幅度的损失。而多糖是蒲公英中的重要组成成分, 其在抗肿瘤、抗病毒、抗氧化^[5]、抗衰老^[6]以及增加免疫性等方面有独特的生物活性^[7], 且考虑到浸膏得率, 乙醇用量应尽量降低, 故采用 60%醇沉浓度, 即可较好去除杂质, 又使各有效成分含量均较高。

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=5)

Tab.3 Results of content determination of various constituents

醇沉浓度	绿原酸	咖啡酸	阿魏酸	菊苣酸	槲皮素	木犀草素
40%	0.4172	0.5652	0.0365	1.4500	0.0676	0.1747
50%	0.5218	0.6806	0.0491	1.5625	0.0798	0.1967
60%	0.6148	0.7895	0.0581	1.6779	0.0908	0.2190
70%	0.6368	0.8404	0.0623	1.7398	0.0985	0.2339
80%	0.6430	0.8626	0.0714	1.8087	0.1066	0.2492

表 4 各总成分含有量测定结果 (mg/g, n=5)

Tab.4 Results of Content determination of total components

醇沉浓度	总黄酮	总酚酸	总多糖
50%	2.2260	0.6806	0.0491
60%	2.6904	0.7895	0.0581
70%	2.2579	0.8404	0.0623
80%	7.5110	0.8626	0.0714

3. 辅料的选择

相同载药量下, 不同添加剂对浸膏产生不同影响, 丙二醇可与浸膏均匀混合, 增加其流动性, 但降低了黏性, 可与其他辅料混合调节形状; 吐

温-80 大大增加了浸膏的黏性，易拉丝，不选择；5%透明质酸钠难与浸膏混合，且载药量太低，不选择；聚乙二醇 6000 冷却后，可使浸膏凝结，可降低流动性(见表 5)。因此，选择丙二醇与聚乙二醇 6000 为辅料，调试两者比例，使蒲公英浸膏达到适宜状态。

表 5 不同添加剂种类对蒲公英浸膏的影响

Tab.5 The effect of different kinds of additives on dandelion concrete

添加剂	流动性	黏性	涂展性	均匀性	拉丝情况	载药量
丙二醇	++++	+	+++	++++	无拉丝	++++
吐温-80	+++	++++	+++	+	易拉丝	+++
5%高分子透明质酸钠	+	++	+++	++	无拉丝	+
聚乙二醇 6000	+	++	+	++	无拉丝	++++

(注: + 为差, ++ 为较差, +++ 为较好, ++++ 为良好)

4 辅料用量的选择

相同载药量下，聚乙二醇所占比例越大，制剂硬度越大，溶解性越差，从给药器中推出的阻力越大。为方便患者自行上药，所的制剂应保证单手给药时可推出药膏，且药膏应成型易断，均一性较好。对比结果可知，适宜用量为丙二醇：聚乙二醇 6000 为 1：7，(见表 6)。

表 6 不同添加剂比例对蒲公英浸膏的影响

Tab.6 The effect of different proportion of additives on dandelion concrete

丙二醇：聚乙二醇 6000	硬度	均一性	成型性	所需推力
1：5	软	分布均匀	不成型	小
1：6	较软	分布均匀	较成型	小
1：7	适宜	分布均匀	成型，较易断	较小
1：8	适宜	分布较均匀	成型，不易断	较大
1：9	较硬	有白色颗粒析出	成型，棒状	大

5 验证试验

5.1 外观

观察外观性状，3批制剂的硬度适中能成型，且混合性较好，成分均一，所需推力大小适宜。

5.2 微生物限度检查

河北省人民医院微生物实验室对该制剂进行了微生物试验。微生物学检查以金黄色葡萄球菌、绿脓芽孢杆菌、白色念球菌、黑曲霉菌、厌氧菌、枯草芽孢杆菌、梭菌、弯曲芽孢杆菌、细枝农霉菌、尼氏森民芽孢杆菌为对象。标准工作方法基于2015版《中国药典》。三次检查中，菌落计数要么为零，要么在可接受的范围内。

5.3 含量测定

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，精密吸取三批供试品溶液各5 μ L分别进样，测定峰面积，代入回归方程计算绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素、木犀草素的含量(见表7)。

表7 6种成分含有量测定结果 (mg/g, n=5)

Tab.7 The results of quantitative determination of 6 components

成分	绿原酸	咖啡酸	阿魏酸	菊苣酸	槲皮素	木犀草素
含量	0.4393 \pm 0.0194	0.6848 \pm 0.0168	0.0485 \pm 0.0010	1.4015 \pm 0.1159	0.0803 \pm 0.0023	0.1932 \pm 0.0146

讨 论

1. 蒲公英浸膏的工艺优化

蒲公英中的成分较复杂，在水提取的过程中，药材中蛋白质、脂溶性色素等成分会随有效成分一起溶出，为去除多余杂质便于制剂成型，需要进行醇沉处理^[8]。醇沉可使蛋白质等不溶于乙醇的物质沉降下来，提高部分成分的含量并减小体积^[9]，以更好地发挥其有效成分的治疗作用，是中药制剂中常用的精制工艺。研究表明，蒲公英提取物中绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、菊苣酸、槲皮素，木犀草素等，多具有抗炎、抗病毒、抗氧化、增强人体免疫等作用^[10-14]，是抗 HPV 感染的重要成分。因此本实验以上

述 6 种单一成分为评价指标,综合考虑多糖的含量,选择蒲公英水提物的最佳醇沉浓度。本实验对乙腈-0.1%甲酸水、甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-0.2%磷酸水 3 种流动相体系进行了考察,结果甲醇-0.1%磷酸水流动相对样品分离的效果稍好,且峰形也更好,因此本实验选择甲醇-0.1%磷酸水作为流动相。由于这 6 种成分极性差异较大,洗脱梯度设计较长。但该方法简便,重复性好,可用于测定上述 6 种成分的含量。结果表明最佳的醇沉浓度为 60%。

2.辅料的选择与用量

丙二醇、异丙醇等醇类在经皮给药系统中常作为溶剂或载体,亦可作为促渗剂^[15]。聚乙二醇系列产品无毒、无刺激性,具有良好的水溶性,并与许多有机物组份有良好的相溶性。两者合用能提高浸膏的渗透性,改善浸膏性状。参考栓剂体积及给药器容量,每支灌封装量 5g 为宜,制成阴道蒲公英中药制剂。阴道环境 pH3.8~4.5,偏酸性,蒲公英制剂的 pH 在此范围,因此不需调节酸碱度。

3.制备蒲公英制剂的意义

宫颈 HPV 感染是由 HPV 引起性传播疾病,发病率较高,目前尚无疗效确切的治疗方案,而高危型 HPV 持续感染可能会造成宫颈癌。蒲公英是传统医学中的疗疾良药,具有很高的医疗价值,国内外对其产品与制剂的开发一直在不断开展,但目前尚无研究用其治疗宫颈 HPV 感染的研究。局部外用制剂安全性高,患者可自行上药,因此本实验将蒲公英制成该种剂型,便于今后治疗宫颈 HPV 感染的临床研究。经初步评价,该制剂涂于皮肤和粘膜时,易涂布,无刺激性。但真正用于临床试验时还需做好消毒和灭菌措施。此外,制剂中各有效成分的稳定性及含量变化还需进一步研究。

结 论

本实验基于 UPLC,建立了蒲公英浸膏中 6 种成分的含量测定方法,优化了蒲公英浸膏的醇沉工艺。蒲公英水提物以 60%的醇沉浓度最佳,浸膏、丙二醇与聚乙二醇 6000 的比例为 32:1:7,制备出阴道蒲公英中药制剂,可用于治疗宫颈 HPV 感染的临床研究。

参考文献

1. 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:352.
2. 谢沈阳,杨晓源,丁章贵,李铭刚,赵江源. 蒲公英的化学成份及其药理作用[J]. 天然产物研究与开发,2012,S1:141-151.
3. 谭红胜,夏新华,楚生辉. 正交试验法优选蒲公英水提工艺[J]. 中药材. 2004;27(3):211-212.
4. 苏韶,王平,刘善新.正交试验优选仙鹿活骨丸的水提工艺[J].中华中医药杂志, 2018,33(1):370-373.
5. 孟祥云,汪永锋,杨丽霞等.中药多糖抗氧化作用及其机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018;33(8):3504-3509 .
6. 尚林,李建菊,尚军.锁阳多糖的抗衰老作用[J]. 中国老年学杂志, 2018,38(6): 1458-1460 .
7. 刘婷,张继秀,李先哲等.蒲公英的开发与利用[J]. 沈阳药科大学学报, 2019,(5):450-458.
8. 杜正彩,齐彪,张明哲,韦燕霞等.正交设计结合药效学实验优选桂栀助眠胶囊提取工艺研究[J]. 中草药, 2019,50(3):618-625.
9. 晏晨,丁丽馨,张卫青等.枳茵益子安母颗粒醇沉工艺的优化[J]. 中成药, 2018,40(7):1630-1632.
10. 刘爱朋,郭利霄,薛紫鲸等. 基于指纹图谱和多组分含量测定的蒲公英药材质量控制研究[J]. 中国中药杂志, 2018,43(18): 3715-3721.
11. 兰瑞容,刘燕,苏英. HPLC 同时测定蒲公英颗粒中的单咖啡酰酒石酸和菊苣酸[J]. 华西药学杂志,2018,33(2):197-199.
12. 崔广林,李隆云,谭均等. 不同产地川佛手中 8 种化学成分的分析与评价 [J]. 天然产物研究与开发,2019,31(9):250-260.
13. 杨立芳,郭洋洋,黄美玲等. HPLC 法测定玉叶解毒颗粒中绿原酸和槲皮素两种主要成分的含量[J]. 时珍国医国药,2018,(10):2346-2348.
14. 许赞杉,林小华. 高效液相色谱法同时测定鼠曲草中槲皮素与木犀草素的含量[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2018,20(4):553-557.
15. 吴素香. 桂枝茯苓透皮贴剂的制备[J]. 中成药,2018,40(3): 571-577.

第三部分

阴道蒲公英中药制剂治疗宫颈 HR-HPV 感染的疗效观察

前 言

目前，对宫颈 HPV 感染主要有手术治疗、物理治疗、免疫治疗和药物治疗四种手段。手术治疗包括宫颈环形电切术，冷刀锥切；物理治疗包括冷冻、激光、电凝等，这些治疗手段可用于宫颈病变，但对身体伤害较大，治疗后有病灶残留的可能并且存在复发的风险^[1]。免疫治疗前景广阔，但无法用于免疫抑制患者^[2]。药物治疗周期长，但对机体伤害较小，可用于未生育的年轻女性。因此，找寻理想的药物，既可以治疗 HPV 潜伏感染又可以阻止宫颈病变，对宫颈癌的防治意义重大。本研究用蒲公英制剂治疗宫颈 HPV 感染患者，通过观察治疗前后宫颈脱落细胞中病毒载量的变化，评估其治疗效果，以期为宫颈癌的防治提供临床依据。

材料与amp;方法

1.临床资料

1.1 一般资料

选取 2018 年 11 月到 2019 年 6 月，到河北省人民医院妇科门诊就诊，确诊为宫颈 HR-HPV 感染，年龄 21~50 岁的患者 63 例，随机分为两组，治疗组 32 例和对照组 31 例。治疗组平均年龄(35.78±9.22) 岁，平均孕次(2.16±1.37)次，平均产次(1.06±0.67)次，宫颈病理检查为未见上皮内病变细胞和恶性细胞(No intraepithelial lesion cells and malignant cells, NIL M)24 例，无明确诊断意义的不典型鳞状细胞(atypical squamous cell of undetermined significance, ASC-US) 8 例；对照组平均年龄(35.23±8.85)岁，平均孕次(2.06±1.26)次，平均产次(1.06±0.63)次，宫颈病理检查为 NILM 患者 24 例，ASC-US 患者 7 例。比较两组患者年龄，孕次，产次，差异无统计学意义，具有可比性。本研究在河北省人民医院药学部进行。本研究经河北省人民医院伦理委员会批准(项目编号:2017 科研伦审第 189 号)。

所有患者均被告知本研究的作用及目的，并于用药前签署知情同意书。

1.2 纳入及排除标准

1.2.1 纳入标准

年龄 21~50 岁,或有性生活史 3 年以上;HPV 检测结果为高危阳性;宫颈液基薄层细胞学检查(Thinprep cytologic test, TCT)无异常或为宫颈上皮细胞内瘤变(Cervical intraepithelial neoplasia,CIN) I 级及以下者;入组前两周未进行宫颈疾病治疗者;愿意服从用药安排者。

1.2.2 排除标准

妊娠及哺乳期妇女;合并有心脑血管、血液系统和肝肾等重要脏器相关的严重疾病;合并宫颈异常,包括宫颈息肉、宫颈肌瘤等;TCT 结果为 CIN II 级及以上;合并精神疾病、认知功能障碍者;三个月内用过激素类药物或参与其他药物实验者。

2.方法

2.1 治疗方法

2.1.1 治疗组

使用本院自制的外用蒲公英制剂治疗,于月经干净后第一天用药,每日一次,每次用特制阴道给药器上药 5g 覆盖宫颈表面(睡前),并加用一枚卫生棉条防止流出,月经期间停止用药,连续治疗三个月,停药一个月后返院复查。

2.1.2 对照组

使用重组人干扰素 $\alpha 2b$ 泡腾胶囊治疗于月经干净后第一天用药,睡前清洁外阴后将胶囊置于阴道后穹窿处,每日一次,每次一粒,月经期间停止用药,连续治疗三个月,停药一个月后复查。

2.2 观察指标及评定标准

2.2.1 临床症候积分

按阴道分泌物的量,色,质,味,外阴瘙痒,接触性出血,腰骶部疼痛,下腹坠胀疼痛,尿频尿急评价,每项按轻、中、重分别记 1 分,2 分,3 分,正常或无症状记 0 分。

2.2.2 HPV 转阴率

采集患者宫颈脱落细胞,用人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(荧光定量 PCR 法)检测 21 种 HPV 基因亚型,包括 13 种常见致病高危型别 HPV16、

18、33、52、58、31、35、39、45、51、56、59、68，5种中等风险致病高危型 HPV26、53、66、73、82，3种低危型别 HPV6、11、81。根据试剂盒提供的膜条 HPV 分型分布图判读结果：

HPV 检测结果完全阴性为痊愈；

HPV 病毒载量下降 $\geq 60\%$ 且无新亚型感染为显效；

HPV 病毒载量下降 $\geq 30\%$ 但 $< 60\%$ 且无新亚型感染为有效；

HPV 病毒载量下降 $< 30\%$ 甚至增加为无效。

2.2.3 总疗效比较

对患者同时行 HPV 和 TCT 检测，TCT 检查结果为低级别鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)及以上，或 ASC-US 伴 HR-HPV 阳性者行阴道镜检查确诊，以宫颈组织病理学检查作为确定病变的金标准。

TCT 结果为正常，HPV 检测结果完全阴性为痊愈；

TCT 结果无变化或减轻，HPV 病毒载量下降 $\geq 60\%$ 且无新亚型感染为显效；

TCT 结果无变化或减轻，HPV 病毒载量下降 $\geq 30\%$ 但 $< 60\%$ 且无新亚型感染为有效；

TCT 结果加重或 HPV 病毒载量下降 $< 30\%$ 甚至增加，判定为无效。

(总有效率=(痊愈+显效+有效)/总例数 $\times 100\%$)

2.3 统计学方法

采用 SPSS21.0 软件处理，计量资料符合正态分布者采用 t 检验，不符合正态分布者用非参数检验。计数资料采用 χ^2 检验。检验水平 $\alpha=0.05$ ， $P<0.05$ 差异有统计学意义， $P>0.05$ 差异无统计学意义。

结 果

1.临床证候积分比较

治疗组治疗前后的症候积分，经秩和检验比较发现 $P<0.05$ ，差异有统计学意义，对照组治疗前后的症候积分，经秩和检验比较发现 $P<0.05$ ，差异有统计学意义(见表 1)。比较两组间的症状积分，结果治疗前 $Z=-0.180$ ， $P=0.857$ ，治疗后 $Z=-0.399$ ， $P=0.690$ ，差异均无统计学意义。

表 1 2 组患者治疗前后积分比较

Table 1 Comparison of scores before and after treatment in 2 groups

组别	例数	治疗前	治疗后	Z	P 值
治疗组	32	5.59±2.82	2.66±2.56	-3.740	0.00
对照组	31	5.65±3.08	2.60±2.04	-3.619	0.00

2. HPV 转阴率

对比治疗组和对照组转阴率，差异无统计学意义($\chi^2 = 0.176$, $P=0.674$)。治疗组中，≤30 岁以下患者转阴率最高，各组年龄组比较差异有统计学意义。对照组中，≤30 岁年龄组转阴率最高，各年龄组差异无统计学意义。治疗组与对照组同年龄组比较，差异均无统计学意义。(见表 2)。针对感染有 16 型或 18 型的患者，治疗组组的转阴率高于对照组组，且差异无统计学意义(见表 3)，对于其他亚型感染，对照组转阴率高于治疗组，差异无统计学意义(见表 4)。总体来看，HPV 病毒载量与转阴率无明显趋势，但单看各年龄组可看出，除少数个例外，病毒载量较少的患者更容易转阴。

表 2 2 组患者 HR-HPV 转阴率比较

Table 2 comparison of HR-HPV clearance rates between the two groups

组别	例数	阴性	阳性	转阴率	χ^2	P
治疗组≤30 岁	11	8	3	72.73		
31~40 岁	9	3	6	33.33	8.068	0.018
41~50 岁	12	2	10	16.67		
共计	32	13	19	40.63		
对照组≤30 岁	11	6	5	54.55		
31~40 岁	8	3	5	37.50	3.768	0.152
41~50 岁	12	2	10	16.67		
共计	31	11	20	35.48		

表 3 2 组患者 16 或 18 型转阴率比较

Table 3 comparison of type 16 或 18 clearance rates between the two groups

组别	感染 16/18 型例数	阴性	阳性	转阴率	χ^2	<i>P</i>
治疗组	8	2	6	25.00	0.268	0.605
对照组	7	1	6	14.29		

表 4 2 组患者其他亚型转阴率比较

Table 3 comparison of other type clearance rates between the two groups

组别	其他亚型例数	阴性	阳性	转阴率	χ^2	<i>P</i>
治疗组	36	20	16	55.56	0.184	0.668
对照组	38	24	14	63.16		

3 总有效率比较

对比治疗组和对照组总有效率，差异无统计学意义(见表 3)。治疗组和对照组在此期间无不良反应发生，治疗安全性良好。

表 4 2 组患者总有效率比较

Table 4 comparison of total effective rate between the two groups

组别	例数	痊愈	显效	有效	无效	有效率	χ^2	<i>P</i>
治疗组	32	13	5	3	11	63.33	0.032	0.859
对照组	31	11	4	6	10	59.38		

讨 论

中医认为，带下病的主要病因机制是“湿”邪浸淫，并与脾肾肝三脏功能失常，致任带二脉失约有关^[6]。治疗原则以清热解毒、利湿活血为主，同时注意对脾肾肝等脏腑功能的调理。目前尚没有针对宫颈 HR-HPV 的疗效肯定确切的药物。

中药蒲公英具有清热解毒，消肿散结，利尿通淋的功效^[7]。其水提物化学成分复杂，主要含有多糖类、黄酮类、有机酸类物质^[8]。近年来，有研究发现蒲公英中的多种化学成分具有提高免疫力^[9]，抗菌，抗炎^[10]，抗病毒^[11]，抗氧化^[12]等作用，广泛应用于药品、食品、保健品、化工等领

域^[13]。但目前未见用于治疗宫颈 HPV 感染的报道。重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的作用机制是其与靶细胞表面的干扰素受体相结合,诱导细胞内抗病毒蛋白的生成,同时阻止病毒蛋白质的合成,抑制病毒核酸的复制与转录过程^[14]。目前,在临床上被广泛用于宫颈 HPV 感染的治疗。

本研究结果显示,通过阴道塞药方式治疗,蒲公英制剂和干扰素都能明显改善患者临床症状,分别比较两组治疗前后的证候积分,发现差异均具有统计学意义($Z_{\text{蒲公英}}=-3.740, P=0.00; Z_{\text{干扰素}}=-3.619, P=0.00$)。对于 HR-HPV 感染患者,蒲公英组转阴 13 例(40.63%),干扰素组的转阴 11 例(35.48%),两组的转阴率差异无统计学意义($\chi^2=0.176, P=0.674$),但蒲公英组的转阴率高于干扰素组。由此可见,单纯依靠证候积分不能完全正确判断药物疗效,还需参考 HPV 和 TCT 的结果。不同年龄组转阴率不同,蒲公英制剂可促使 30 岁以下感染者转阴,降低患者向宫颈癌进展的危险性,同时药物治疗避免了宫颈物理治疗及手术等对患者的伤害,减轻了患者的心理及经济负担,是一种较佳的治疗选择。蒲公英制剂对于 16 型或 18 型的感染及总有效率,治疗效果优于干扰素,说明蒲公英浸膏在治疗 HR-HPV 感染上具备一定的潜在价值,可做进一步开发和研究。

惯例公认 HPV 转阴率观察疗程为 24 个月,由于时间所限,本研究只观察了 3 个月,样本每组仅为 30 余例,不能完全作为最终结论,需进一步研究。蒲公英抗 HPV 作用机制尚不明确,亦可作为将来的研究重点。

结 论

蒲公英浸膏和干扰素均能有效促使 HR-HPV 感染者转阴,降低 HR-HPV 患者向宫颈癌进展的危险性,是一种较佳的治疗选择,同时药物治疗避免了宫颈物理治疗及手术等对患者的伤害,减轻了患者的心理及经济负担。但蒲公英具体的作用机制尚不明确,治疗效果也需要更多的样本证实,希望在将来的研究中作为一个重点的探讨方向。

参考文献

1. Giovanni Maina, Raffaella Ribaldone, Saverio Danese, et al.Obstetric

- outcomes in patients who have undergone excisional treatment for high-grade cervical squamous intra-epithelial neoplasia[J].*Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019,236:210-213.
2. 赵爽,赵方辉. HPV 治疗性疫苗研究进展[J]. *中华预防医学杂志*,2018,52(5):556-560.
 3. 谈勇. 中医妇科学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016:90-94.
 4. 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2018:295-298.第九版.国家卫生健康委员会“十三五”规划教材.
 5. 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:29-32.
 6. 程泾.妇科疑难病现代中医诊断与治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:861-863.
 7. 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S].北京: 中国医药科技出版社, 2015:352.
 8. 耿淑琴,郝鹏升,白雅妮等.蒲公英不同提取物的红外光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2018,10(38):107-108.
 9. CAI LL,WAN DW,YI FL,et al.Purification,preliminary characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from dandelion root [J]. *Molecules*,2017,22(9):1409.
 10. XUE Y S, ZHANG S M, DU M,et al. Dandelion extract suppresses reactive oxidative species and in-flammasome in intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017,29:10-18.
 11. 陈婷,成旭东,王玳珠等. 抗病毒颗粒 HPLC 指纹图谱建立及 9 种成分同时测定[J]. *中成药*,2019,9(41):2044-2048.
 12. 刘杨,赵婧,梁莉等. 响应面优化蒲公英多酚超声波辅助乙醇提取工艺及其抗氧化性[J]. *食品工业科技*,2017,38(2):287-292.
 13. 刘婷,张继秀,李先哲等.蒲公英的开发与利用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2019,(5):450-458.
 14. 贾利平,刘玉珠,周小飞等. 重组人干扰素 α -2b 联合保妇康栓对 HPV 感染患者的治疗效果[J]. *中华医院感染学杂志*.2019,29(5):749.

临床证候表

项目/评分	无	轻度(1分)	中度(2分)	重度(3分)	分数
带下量	正常	较正常增多 1/2 以内	较平时增多 1/2 到 1 倍以内	较平时增多 1 倍以上, 需要垫纸上,	
带下色	正常	色淡黄	色黄如脓	色赤	
带下质	正常	较平时稀薄	较平时稍厚	较平时稠厚	
气味	正常	微臭	腥臭	秽臭	
接触性出血	无	偶尔 1-2 次出血	经常接触性出血	未接触也时常出血	
外阴瘙痒	无	偶有瘙痒	时常瘙痒 尚可忍受	经常瘙痒 难以忍受	
腰膝酸软疼痛	无	腰膝酸软不适	腰膝酸痛	腰膝酸痛 难以忍受	
下腹坠胀疼痛	无	偶有下腹坠胀	频发下腹坠胀 尚可忍受	下腹坠胀 疼痛难忍	

人员信息登记表

姓名		年龄		联系电话	
文化程度	小学及以下口 初中口 高中或中专口 大专口 本科及以上口				
家庭住址					
入组情况	入组时间			组别	
(一)个人史					
病史					
性史	初次性交年龄			性伴侣数	
孕产史	孕次			产次	
既往史	妊娠及哺乳期妇女，近期准备妊娠者；合并有心脑血管、血液系统和肝肾等重要脏器相关的严重疾病；合并宫颈异常，包括宫颈息肉、宫颈肌瘤、宫颈癌等；合并精神疾病、认知功能障碍者；三个月内用过其他治疗 HPV 药物或抑制免疫力药物者。				
(二)HPV 分型		治疗前		治疗后	
检测时间					
HPV 检测	1.阳性	2.阴性	1.阳性	2.阴性	
感染亚型 (病毒载量)					
症候积分					
(三)宫颈液基细胞学检查					
检测时间					
TBS 分类诊断标准	鳞状细胞病变				
	腺细胞病变				
镜检结果意见					
其他检查结果					

综述

宫颈人乳头瘤病毒感染治疗方法研究进展

宫颈人乳头瘤病毒感染(Human papilloma virus,HPV)是由 HPV 引起性传播疾病。HPV 是一种小型环状 DNA 病毒,目前已检测出 200 多种型别。宫颈 HPV 感染与年龄相关,高峰年龄为 15~25 岁,通常没有明显临床表现,多为亚临床型,现有多种检测方法^[1]。多数宫颈 HPV 感染是一过性的,可不引起任何病变,也可引起良性病变和癌前病变^[2],高危型 HPV 持续感染可能造成宫颈癌^[3]。宫颈癌是全球妇女第四大最常见的癌症,在低收入和中等收入国家中,宫颈癌的发病率和死亡率均较高^[4]。近年来,通过 HPV 疫苗接种进行的一级预防以及宫颈癌筛查和管理建议的推广使 HPV 感染所导致宫颈疾病的患病率有所下降^[5]。然而即使在发达国家,宫颈癌仍然是一个重要的公共卫生问题^[6]。基于疾病进展特点,宫颈 HPV 感染引发的负担不容小觑。本文旨在对目前临床应用的从宫颈 HPV 感染后到宫颈癌各个阶段的治疗方法进行总结,以期帮助临床选择合适的治疗手段。

1.手术治疗

1.1 宫颈锥切术(Conization of uterine cervix) 是妇产科切除子宫颈的一种手术,将子宫颈阴道部及子宫颈管由外向内作锥状切除。既可做病理检查,用于确诊宫颈的病变;又可作为治疗方法,切除病变部分并清除 HPV 感染^[7]。早期是通过解剖刀进行的,优点是切缘清晰,利于病理检查。缺点是需要住院和麻醉,手术时间长,术中容易多量出血。如今,子宫颈环行电切术(Loop Electrosurgical Excision Procedure, LEEP)得到广泛开展,是治疗 CIN 最常用的方法^[8]。它的优点是简便易行,安全无痛,不需要住院,手术时间短,仅需要 5-10 分钟左右。在病变的清除、复发方面,电刀锥切的效果与冷刀锥切相当,两者无显著性差异。LEEP 刀技术能减少组织破损,同时切除病灶组织精确,这大大降低了疾病复发率,弥补传统治疗反复发作、久治不愈等缺陷^[9]。缺点是妊娠妇女是否可以进行锥切尚存在争议^[10]。适用于 HSIL,包括 CIN2 和 CIN3,见表 1。研究表明,接受过 CIN2+切除治疗的妇女早产、胎膜早破、胎膜早破和难产的风险增加^{[11],[12]}。

1.2 子宫全切术 根据病变的性质、部位、大小以及患者年龄的不同,可采取全切除、次全切除、部分切除、广泛切除和次广泛切除等不同手术方式。手术可经腹部、经腹腔镜和经阴道等途径进行^[13]。子宫切除术和宫颈冷刀锥切术均对 HPV 有一定的清除效果,两组的治愈率差异无统计学意义。对于已绝经的妇女,其宫颈萎缩明显,阴道穹隆与宫颈不易分辨,冷刀锥切易发生宫颈管粘连及周围血管组织损伤。所以锥切术困难的患者可选全子宫切除术^[14]。研究表明,腹腔镜下全子宫切除术可以作为宫颈癌 I A1 期的基本治疗手段^[15]。腹腔镜下全子宫切除术配合盆腔淋巴结清扫,可以减少患者切除术中的出血量,增加淋巴结切除数目,缩短发热时间,提高患者生活质量^[16]。对于子宫全切术后意外发现的宫颈癌,可用腹腔镜下广泛性宫旁切除术加阴道上段切除术治疗,其结果是安全、可行的^[17]。

2.物理治疗

2.1 冷冻治疗(Cryotherapy) 或称冷冻消融,是指利用快速降温装置冷冻子宫颈局部组织,以达到破坏病变组织清除 HPV 的一种治疗方法^[18]。其主要机制是低温使病灶组织的细胞内形成冰晶,对细胞产生机械性损伤,细胞内、外渗透压差异使细胞脱水皱缩;细胞电解质浓缩,导致酶活力降低或丧失;pH 值降低,使细胞膜脂蛋白成分改变,膜结构破坏;破坏微循环血管系统,导致血液瘀滞和微血栓形成,加重局部缺血、缺氧;激活免疫等,最终使病变组织坏死脱落^[19]。目前临床应用的低温包括相变制冷、气体膨胀制冷、热电效应制冷等,其中以液氮、二氧化碳、氩氦刀等冷冻系统最为常用^[20]。氩氦刀是一种新型冷热双重微创靶向治疗系统,利用反复冻融技术破坏肿瘤细胞,具有创伤小,治疗成功率高,复发率低,并发症少等优点,但因为氩、氦气损耗,长期应用往往导致疗效降低,也限制了其临床应用^[21]。冷冻治疗的优点是该技术简单、并发症发生率低、成本低,无痛无血,疤痕少,使其成为低资源条件下对符合条件的病变的首选治疗方法^[22]。较适用于门诊治疗,术中肿瘤细胞不易播散。同时冷冻疗法去掉肿瘤组织后机体内随之产生免疫反应,有助于杀灭残余的肿瘤细胞^[23]。缺点是腔道局部温度较高,冷冻棒温度难以维持,影响治疗效果。

2.2 电凝治疗(Electrocoagulation) 系利用高频电流的透热作用,使组织凝固破坏以达到清除的目的^[24]。实验动物研究观察到,将带瘤动物瘤体的一部分用高频电流凝固后,剩余部分则会自行消退,这说明机体产生了免疫

抵抗性。电凝疗法在妇科临床上，多用于子宫颈糜烂或宫颈癌前病变的治疗，效果满意。这其中是否尚有免疫因素还有待研究讨论^[25]。其优点是可使血管淋巴道凝固，术中不出血，并能防止深部组织感染和肿瘤细胞播散等^[26]。

2.3 微波治疗(microwave therapy) 是应用一种高度可控的、均匀的方式传递能量并诱导组织加热来治疗疾病的方法^[27]。其原理是本身的热效应和非热(生物)效应，即当微波辐射 15 秒钟时，被照部位局部温度开始上升，使病变组织蛋白质变性、凝固、坏死，达到烧灼、破坏的程度。同时非热效应可使被辐射部位血液循环加速，代谢增强，组织再生能力提高，从而达到消炎与组织修复的作用^[28]。微波作为治疗 HPV 感染传统手段之一，其清除率相对较高^[29]。目前多用于治疗尖锐湿疣，研究表明，其联合咪喹莫特治疗尖锐湿疣效果良好，6 个月无复发情况^[30]。

2.4 激光治疗(Laser Therapy) 其原理是选择一种亮度高、单色性、方向性及相干性极好的新颖光源，将其聚合可达到一定的温度，并被生物组织吸收，短时间内，产生强大的能量使组织凝结、烧灼碳化和汽化。临床上常用二氧化碳来治疗宫颈疾病。其优点是简单、安全，可完全破坏病变组织，出血量少，无需麻醉即可进行^[31]。研究表明，激光汽化与锥切对 CIN 患者疗效差异无统计学意义，但激光汽化对希望将来怀孕的年轻 CIN3 患者很有用^[32]。

2.5 光动力疗法(photodynamic therapy, PDT) 是以光敏剂及相应光源相互作用为基础的一种全新的治疗技术^[33]。其机制是在病变组织内导入光敏剂及光导纤维，给予相应波长的光照射，使其在病变组织内发生光敏反应，吸收光子能量，经过退激过程释放出能量，生成大量的活性氧，尤其是单线态氧，损伤细胞结构、功能，导致病变组织坏死。PDT 组织选择性强，对机体正常组织影响较小，不良反应轻，目前可用于多种肿瘤的治疗^[34]。研究表明 PDT 还可以增加局部 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞数量，调节局部免疫，增强自然杀伤细胞(Natural killer cells,NK cells)活性，增强抗病毒作用^[35]。5-氨基酮戊酸(5-ALA)作为一种新型的外用光敏剂^[36]，其介导的光动力治疗可以有效治疗 CIN 1^[37]。该疗法具有安全、有效等特点，除宫颈 HPV 感染外，还可抑制口腔鳞状细胞癌细胞在体内外的生长^[38]。被广泛用于治疗皮肤肿瘤及部分非肿瘤性疾病，特别是对由低危型 HPV 感染

引起的尖锐湿疣^[39]。

2.6 聚焦超声(Focused Ultrasound) 是一种新型的由内向外的微创治疗,可实现靶区组织被完全损毁而不损伤靶外组织,即在治疗表层下病变组织时不损伤表层组织。其安全性及有效性已得到证实,且具有较其他物理治疗创伤小、不良反应少等优势,已成功用于临床多种实体肿瘤。聚焦超声用于治疗宫颈 HR- HPV 感染转阴率高,可降低 HR- HPV 持续感染导致宫颈癌的风险^[40]。在林琳等研究中,聚焦超声与 LEEP 比较,结果两组 HPV 转阴率差异无统计学意义,但聚焦超声治疗术后阴道排液、出血情况轻,宫颈创面愈合快^[41]。

3. 药物治疗

宫颈人乳头瘤病毒感染至今尚无十分有效的药物可以治愈,但有些药物能提高 HPV 转阴率,可用于初期宫颈 HPV 感染或不想影响生育的患者。临床常用的药物多为宫颈局部外用药和口服。西药以增强局部或全身免疫力,抗病毒为主要手段。中医学中没有与该病直接对应的疾病,根据其发病特征以及色、质、气味异常或带下量多、夹血等临床表现,将其归为“带下病”范畴,分为内治和外治,其药物制剂大都具有清热解毒、祛湿活血、散结等功效。

3.1 西药

3.1.1 免疫调节剂 重组人干扰素 $\alpha 2\beta$ 是一种局部免疫调节剂,也具有广谱抗病毒作用,在临床治疗 HPV 感染中有着广泛的应用。朱丽娟的研究中,将其联合洁悠神治疗宫颈持续 HPV 感染,结果疗效确切并且可降低端粒酶与 HPV16/18 E6 蛋白表达水平,这表明两者联合使用可能具有降低宫颈癌发生风险的作用^[42]。咪喹莫得作为一种局部免疫反应调节剂^[43],用于治疗 CIN 2-3 是一种有效、可行的治疗方法^{[44],[45]}。

3.1.2 抗病毒药物 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil ,5-FU)不是美国食品和药物管理局批准或重新推荐的用于治疗宫颈疾病的药物。但研究表明 5% 5-氟尿嘧啶在 CIN 2 治疗中疗效确切,可作为希望避免手术的 CIN2 年轻女性的一种治疗选择^[46]。阴道内西多福韦的研究表明,在 CIN 2 和 CIN 3 的女性患者中,西多福韦对宫颈病变的临床消退和 HPV 的清除具有疗效,但出现了局部和系统副作用^[47]。抗 HPV 生物蛋白敷料是国内一款抗 HPV 药物,能靶向结合 HPV 簇状蛋白,特异性阻止 HPV 结合基底层细胞,使

得 HPV 失去感染能力。目前使用者及临床研究较少，疗效尚未明确。

3.2 中药

3.2.1 内治 主要为中药汤剂。孙红^[48]的研究用中药益气除湿解毒汤口服结合复方沙棘籽油栓阴道塞药治疗宫颈 HR- HPV 感染，结果益气除湿解毒汤能提高人体自身的免疫力，抗病毒，抗肿瘤，达到治疗 HPV 感染的目的，临床疗效较好。孙桂霞^[49]的研究表明采用化湿解毒汤干预 HR-HPV 感染合并 CIN 行 LEEP 术后的患者，能促使 HR-HPV 阴转，降低病毒载量，并调节 Th1/Th2 平衡，从而控制 CIN 向宫颈癌转变，改善其预后。

3.2.2 外治 主要包括栓剂、凝胶、带线棉球等中药制剂。保妇康栓是纯中药制剂，具有行气破瘀，生肌止痛之功效。主要用于治疗湿热瘀滞所致的带下病。临床上用于 HPV 感染时间较长，赵健等研究表明保妇康栓用于宫颈 HPV52 和 68 型感染转阴率为 84.85%，认为保妇康栓可有效清除宫颈 HPV 感染，值得临床推广^[50]。以雄黄为君药的中药验方“二黄散”经初期临床观察，可使 HR-HPV 转阴且未发现毒副反应。刘嵘等将其剂型优化，制备成栓剂，用于 HR-HPV 持续阳性且病理诊断为慢性宫颈炎或 CIN1 级患者，结果取得良好的临床疗效，其转阴率优于保妇康栓^[51]。徐培研究表明紫柏凝胶对宫颈 HR-HPV 感染疗效确定^[52]。派特灵是中国科学院研制专门用于治疗 HPV 的纯中药制剂，其药理机制为派特灵可选择性破坏细胞膜和线粒体等膜性系统，通过细胞毒性作用抑制瘤体细胞增殖，同时可通过破坏癌细胞对 HPV 起到清除和抑制作用^[53]。研究表明其能有效清除宫颈 HPV 感染，转阴率明显高于自然转阴率^[54]。冉雪梦^[55]用无菌带线棉球浸透清热解毒方药液后置于阴道内，连续用药 3 个月治疗宫颈 HR-HPV 感染，结果表明清热解毒方可显著降低 HPV 病毒载量，对于 HPV 转阴有确切疗效。

4. 免疫治疗

不同于预防性疫苗诱导机体产生特异性中和抗体，治疗性疫苗是通过改善和提高靶抗原的摄入、表达、处理及递呈，增强机体特异性免疫反应，从而清除病毒持续性感染、促进病变组织的消退，起到免疫治疗的作用^[56]。HPV 早期蛋白 E6 和 E7 是 HPV 相关肿瘤和癌前病变形和增殖所必需的^[57]，且在正常组织不表达，因此 E6、E7 蛋白成为 HPV 治疗性疫苗的理想靶点，事实上，许多临床试验已经使用 HPV16 E7 作为 CIN2-3 治疗性

HPV 疫苗的疫苗抗原。基于组成成分的不同，HPV 治疗性疫苗主要包括以下几类：载体疫苗、肽类疫苗、蛋白疫苗、DNA 疫苗及细胞疫苗等。

4.1 载体疫苗 载体疫苗以无毒、减毒或弱毒的细菌和病毒为载体，将编码 HPV 特异性抗原的 DNA 片段插入其中，产生并呈递该抗原，诱发特异性免疫反应，从而有效清除病变。该疫苗具有高度的免疫原性，但安全性有待提高，尤其在免疫受损的肿瘤患者使用，存在一定危险性；活载体可诱导机体产生中和抗体，重复接种受限。目前研究较多细菌载体是干酪乳杆菌和李斯特菌(Lm)，病毒载体主要包括痘苗病毒、腺病毒和甲病毒。研究表明，一种以干酪乳杆菌为载体的治疗性 HPV 疫苗“GLBL101c”在治疗 CIN3 患者中，有 70% 的患者出现了 CIN1-2 的消退^[58]。

4.2 DNA 疫苗 DNA 疫苗(基因疫苗)是将插入质粒的 HPV DNA 直接转染到宿主细胞，通过转录和翻译在宿主体内产生抗原蛋白，并呈递到细胞膜表面，从而刺激机体产生细胞免疫和体液免疫。然而，DNA 疫苗产生的抗原免疫原性相对较低，需要辅助方法促进序列的有效表达，如在载体抗原序列上加上辅助因子。该疫苗具有安全、易生产、稳定性好以及可重复接种不诱导中和抗体等优点。有研究表明，嵌合型 HPV-16 E7 DNA 疫苗(SP-SA-E7-4-1BBL)对宫颈癌小鼠模型具有预防和治疗作用^[59]。

4.3 肽类疫苗 肽类疫苗是在抗原表位合成多肽序列，直接呈递给树突状细胞，使 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞激活，从而诱导机体产生特异性细胞免疫反应。该疫苗易于生产，稳定，安全。然而免疫原性差，需要免疫佐剂以增强免疫应答。而且其在制备时需鉴定大量的 HPV 抗原表位和人类白细胞抗原(human leukocyte antigen ,HLA)配型，因而受到限制，影响应用。有研究设计了一种以 CpG 寡脱氧核苷酸 1826 为佐剂，HPV16 E7 43-77 肽为抗原的 HPV 疫苗，结果提示，该疫苗具有明显的抗肿瘤作用，并推测可能是该疫苗可诱导细胞免疫增强和免疫抑制细胞减少^[60]。

4.4 蛋白疫苗 蛋白疫苗以 HPV 的 E6、E7 蛋白为主要靶抗原，可诱发更多的特异性抗体靶向识别、杀伤表达 E6 和 E7 的细胞，减少或者消除体内已感染细胞，防止病变继续恶化。与肽疫苗相似，蛋白疫苗也需要免疫佐剂和免疫刺激性分子以增强免疫原性，但蛋白疫苗可克服肽疫苗的 MHC 限制，因蛋白质包含所有的 HLA 抗原表位，在人体内可自动降解为多肽，无需鉴别 HLA 类型和作用位点。研究表明，CpG ODN 和 GPI-0100

都是有前景的疫苗佐剂，均可提高 TVGV-1 蛋白疫苗对 HPV16 驱动型癌症的免疫原性和治疗效果^[61]。

除此之外，其他类型疫苗如针对树突状细胞(dendritic cells,DCs)的治疗性 HPV 疫苗、HPV E2 疫苗等也具有潜在的巨大优势，现已获得越来越多的关注，开始成为宫颈癌治疗性疫苗领域中新的研究方向。随着对肿瘤免疫调控的深入研究以及治疗性疫苗的优化和改造，安全有效的 HPV 治疗性疫苗将在宫颈 HPV 感染的治疗以及宫颈癌的预防方面发挥重要的作用，最终成为临床广泛应用的治疗手段之一^[62]。

5.结论

从宫颈 HPV 感染发展到宫颈癌期间历时十几年的时间，而且大部分的感染可通过自身免疫清除，目前最佳治疗时间和治疗方式仍存争议。手术治疗和物理治疗是通过切除或破坏病变组织来清除 HPV 感染，临床常用与治疗宫颈低度或高度病变，但治疗后有病灶残留的可能并且存在复发的风险。药物治疗适用于初期 HPV 感染患者或年轻尚未生育的患者，对机体伤害最小，主要通过增强患者免疫力或抗病毒能力提高 HPV 转阴率。尤其是中药治疗宫颈 HPV 感染具有广阔的应用前景，值得进一步深入研究。同时，治疗性 HPV 疫苗也具有潜在的巨大优势，现已获得越来越多的关注，开始成为宫颈 HPV 感染所致疾病治疗中热门的研究方向。综上所述，宫颈 HPV 感染的治疗方法较多，中西医各有特点。实际临床需合理应用，为患者制定个性化治疗方案，还可采用联合疗法，互相填补不足^{[63]、[64]}。在提高 HPV 病毒转阴率方面需要进行更深入的、大数量的科学研究，目前人们应对宫颈 HPV 感染的抗病毒治疗还任重道远。

参考文献

1. 田亚宾,张春涛. 人乳头状瘤病毒核酸分型检测试剂的研究进展[J]. 中华肿瘤杂志,2018,40(10):729-735.
2. de Sanjosé S,Brotos M,Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection[J]. J Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol,2018,47:2-13.
3. So Kyeong A, Lee In Ho, Lee Ki Heon, et al. Human papilloma virus

- genotype-specific risk in cervical carcinogenesis[J]. *J Gynecol Oncol*, 2019.
4. Gupta SM, Mania-Pramanik J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis[J]. *J Biomed*. 2019, 26(1):28.
 5. McClung NM, Gargano JW, Park IU, et al. Estimated Number of Cases of High-Grade Cervical Lesions Diagnosed Among Women-United States, 2008 and 2016[J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2019, 68(15):337-343.
 6. Lontos M, Kyriazoglou A, Dimitriadis I, et al. Systemic therapy in cervical cancer: 30 years in review[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019, 137:9-17.
 7. 曹泽毅. 妇科肿瘤学[M]. 北京:北京出版社, 1998:625.
 8. Wiik J, Sengpiel V, Kyrgiou M, et al. Cervical microbiota in women with cervical intra-epithelial neoplasia, prior to and after local excisional treatment, a Norwegian cohort study[J]. *BMC Womens Health*. 2019, 19(1):30.
 9. 郑顺杰, 胡旻, 邵明君, 等. LEEP 联合重组人干扰素对进展期宫颈癌 HPV 感染患者 SCCAg 与 CYFRA21-1 水平的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(24):3812-3815.
 10. Kyrgiou M, Athanasiou A, Paraskevaidi M, et al. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis[J]. *BMJ*. 2016, 354:3633.
 11. Giovanni Maina, Raffaella Ribaldone, Saverio Danese, et al. Obstetric outcomes in patients who have undergone excisional treatment for high-grade cervical squamous intra-epithelial neoplasia[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019, 236:210-213.
 12. Frega A, Santomauro M, Sesti F, et al. Preterm birth after loop electro-surgical excision procedure (LEEP): how cone features and microbiota could influence the pregnancy outcome[J]. *Eur Rev Med Pharmacol*. 2018, 22(20):7039-7044.
 13. 高楠编. 最新临床妇产科诊疗技术[M]. 天津:天津科技翻译出版有限公

- 司, 2012:454-458.
14. 王雁,孔为民,吴玉梅,等. 宫颈冷刀锥切术和全子宫切除术对 CINIII合并高危型 HPV 阳性患者治疗结局的影响[J]. 实用妇产科杂志,2016,(2): 122-125.
 15. 吴小肆,王维贵,郑颖馨,等. 宫颈癌 I A1 期的临床诊治进展分析[J]. 复旦学报(医学版),2018,45(3):330-335.
 16. 原昕,孟凡东. 腹腔镜下广泛性子宫切除术治疗子宫颈鳞状细胞癌的临床疗效[J]. 中国医科大学学报,2019,(1):48-52.
 17. 谭青青,许培箴,朱鹏峰. 腹腔镜下广泛性宫旁切除术加阴道上段切除术治疗子宫全切术后宫颈癌临床分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2018,34(3):324-327.
 18. 赵锐瑾,李保中,马媛. 肿瘤健康教育[M]. 北京:军事医学科学出版社,2012,126.
 19. Malanga GA,Yan N,Stark J,et al. Mechanisms and efficacy of heat and cold therapies for musculoskeletal injury[J]. Postgrad Med,2015,127(1):57-65.
 20. 张新华.实用肝胆胰恶性肿瘤学[M]. 武汉:武汉大学出版社,2012,109-110.
 21. Huang C,Zhuang W, Feng H,et al. Analysis of therapeutic effectiveness and prognostic factor on argon-helium cryoablation combined with transcatheter arterial chemoembolization for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Ther,2016,12:148-152.
 22. Basu P,Taghavi K,Hu SY,et al. Management of cervical premalignant lesions[J]. Curr Probl Cancer,2018,42(2):129-136.
 23. Jahic M,Jahic E,Mulavdic M,et al. Difference Between Cryotherapy and Follow Up Low Grade Squamous Lesion of Cervix Uteri[J]. Med Arch,2017,71(4):280-283.
 24. Viviano M, Kenfack B, Catarino R,et al. Feasibility of thermocoagulation in a screen-and-treat approach for the treatment of cervical precancerous lesions in sub-Saharan Africa[J]. BMC Womens Health,2017,17(1):2.

25. Garaix F, Hery G, Tsimaratos M, et al. Human papillomavirus type 7-associated anal condyloma after renal transplantation in a child[J]. *Pediatr Transplant*, 2019:e13470.
26. Naud PS, Muwonge R, Passos EP, et al. Efficacy, safety, and acceptability of thermocoagulation for treatment of cervical intraepithelial neoplasia in a hospital setting in Brazil[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2016, 133(3):351-354.
27. Bristow I, Lim WC, et al. Microwave therapy for cutaneous human papilloma virus infection [J]. *Eur J Dermatol*, 2017, 27(5):511-518.
28. Chen X, Tan L, Liu T, et al. Micro-Nanomaterials for Tumor Microwave Hyperthermia: Design, Preparation, and Application[J]. *Curr Drug Deliv*, 2017, 14(3):307-322.
29. 王紫涵, 张玉杰, 高昱等. 生殖器高危 HPV 感染及防治现状[J]. *中国艾滋病性病*, 2019, 25(2):213-216.
30. Wu Y, Song G, Li M, et al. Condyloma acuminata on the nipple and coronary sulcus of the penis: A case report[J]. *Medicine*, 2019, 98(16):e15109.
31. Navarro Santana B, Sanz Baro R, Orozco R, et al. Cervical vaporization in LSIL and persistent HPV infection[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2018, 57(4):475-478.
32. Mariya T, Nishikawa A, Sogawa K, et al. Virological and cytological clearance in laser vaporization and conization for cervical intra-epithelial neoplasia grade 3[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2016, 42(12):1808-1813.
33. 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.
34. EI-Daly S M, Abba M L, Gamal-Eldeen A M. The role of microRNAs in photodynamic therapy of cancer [J]. *Eur J Med Chem*. 2017, 142: 550-555.
35. 王爱玲, 翟晓玲. 宫颈上皮内瘤变Ⅲ级患者宫颈锥切术后人乳头瘤病毒

- 感染的诊断及治疗[J]. 中国老年学杂志,2018,(38):124-126.
36. 王钊,郑立卿. 槲皮素和茶多酚对光动力疗法损伤 PC12 细胞效应的影响[J]. 中国药理学通报,2018,34(10):1392-1396.
37. Maldonado Alvarado E,Osorio Peralta MO,Moreno Vázquez A,et al. Effectiveness of Photodynamic Therapy in Elimination of HPV-16 and HPV-18 Associated with CIN I in Mexican Women [J]. *Photochem Photobiol*,2017,93(5):1269-1275.
38. 朱梦琪,史澍睿,万国运等. 5-氨基酮戊酸介导的光动力治疗对口腔鳞状细胞癌体内外作用的研究[J]. 中华口腔医学杂志,2019,54(3):176-182.
39. 潘慧仙,诸靖宇,李军华等. 5-氨基酮戊酸光动力疗法治疗高危型 HPV 感染尖锐湿疣的疗效及局部细胞免疫活性分析[J]. 中华男科学杂志,2019,(1):50-54.
40. 牟燕,刘晓芳,许温馨等. 聚焦超声对宫颈持续高危型 HPV 感染治疗的疗效研究[J]. 重庆医学,2019,48(2):281-284.
41. 林琳,傅亚均. 宫颈上皮内瘤变 I 级合并高危型 HPV 感染行宫颈环形电切术与聚焦超声治疗的疗效对比[J]. 传染病信息,2018,31(4):368-371.
42. 朱丽娟,周树林,江希萍. 重组人干扰素 $\alpha 2\beta$ 联合洁悠神对宫颈持续 HPV 感染患者端粒酶与 HPV16/18 E6 蛋白表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(25):23-27.
43. de Witte CJ,van de Sande AJ,van Beekhuizen HJ,et al. Imiquimod in cervical, vaginal and vulvar intraepithelial neoplasia: a review[J]. *Gynecol Oncol*,2015,139(2):377-384.
44. van de Sande AJM, Koeneman MM, Gerestein CG,et al. TOPical Imiquimod treatment of residual or recurrent cervical intraepithelial neoplasia (TOPIC-2 trial): a study protocol for a randomized controlled trial[J]. *BMC Cancer*,2018,18(1):655.
45. Koeneman MM,Essers BA,Gerestein CG,et al. Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: Patients Preferences for Surgery or Immunotherapy with Imiquimod [J]. *J Immunother*,2017,40(4):148-153.
46. Rahangdale Lisa,Lippmann Quinn K,Garcia Katelyn,et al.Topical 5-fluorouracil for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2:a random

- mized controlled trial[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2014,210(4):314-314.
47. Van Pachterbeke C,Bucella D,Rozenberg S,et al. Topical treatment of CIN 2 by cidofovir: results of a phase II, double-blind,prosective, placebo-controlled study[J]. *GynecolOncol*,2009,115:69-74.
48. 孙红,朱勤贤,顾伯林. 益气除湿解毒汤治疗宫颈 HPV 感染的临床研究[J]. *南京中医药大学学报*,2017,33(3):232-234.
49. 孙桂霞,李艳云,杨少琴等. 化湿解毒汤对高级别 CIN 高危型 HPV 感染者 LEEP 术后湿热下注证患者转归的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2017, 23(16):182-187.
50. 赵健,廖秦平,谢红等. 保妇康栓治疗人乳头瘤病毒感染的临床观察[J]. *实用妇产科杂志*,2015,(1):45-48.
51. 刘嵘,祝达,李天等.二黄栓治疗高危型 HPV 持续阳性宫颈病变的临床疗效观察及机制探讨[J]. *华中科技大学学报(医学版)*,2018,47(3):325-328.
52. 徐垵,薛晓鸥,马秀丽,等. 紫柏凝胶外治方治疗宫颈高危型人乳头瘤病毒感染临床观察[J]. *北京中医药大学学报*,2015,(8):566-568.
53. 王艳,何丽清,蔡序子等. 派特灵治疗高危人乳头瘤病毒持续感染患者的疗效及安全性研究[J]. *中国全科医学*,2019,22(11):1323-1326.
54. 冯凌,宋志琴,邵玉琳等. 派特灵用于宫颈高危型人乳头瘤病毒感染清除的临床观察[J]. *中国妇产科临床杂志*,2017,18(4):359-360.
55. 冉雪梦,王伟,王世欣等. 清热解毒方治疗宫颈高危型人乳头瘤病毒感染的临床研究[J]. *中国中西医结合杂志*,2018,38(4):421-424.
56. 周利军,李雯,刘君娟等.宫颈癌免疫治疗与应用展望[J].*现代妇产科进展*, 2018,27(9):709-712.
57. 王致萍,柳欣林,王大宁等.人乳头瘤病毒致癌蛋白 E6 的结构与功能研究进展[J].*病毒学报*,2019,35(02):292-299.
58. Komatsu A,Igimi S,Kawana K. Optimization of human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing lactobacillus-based vaccine for induction of mucosal E7-specific IFN- γ producing cells[J]. *Vaccine*,2018, 36(24):3423-3426.
59. Garza-Morales R,Perez-Trujillo JJ,Martinez-Jaramillo E,et al. A DNA Vaccine Encoding SA-4-1BBL Fused to HPV-16 E7 Antigen Has Pro

- phylactic and Therapeutic Efficacy in a Cervical Cancer Mouse Model[J]. *Cancers (Basel)*,2019,11(1).
60. Yang Y, Che Y, Zhao Y, et al. Prevention and treatment of cervical cancer by a single administration of human papillomavirus peptide vaccine with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in vivo.[J] *Int Immunopharmacol.*,2019,69:279-288.
61. Da Silva DM,Skeate JG,Chavez-Juan E,et al. Therapeutic efficacy of a human papillomavirus type 16 E7 bacterial exotoxin fusion protein adjuvanted with CpG or GPI-0100 in a preclinical mouse model for HPV-associated disease [J]. *Vaccine*.2019,37(22):2915-2924.
62. 赵爽,赵方辉. HPV 治疗性疫苗研究进展[J]. *中华预防医学杂志*,2018,52(5):556-560.
63. Meng X, Shi X, Li Y, et al. LEEP/Cone combined with photodynamic therapy for successful treatment of high-grade squamous intraepithelial lesion[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*,2019,25:237-238.
64. 夏丹丹,席晓薇. IL-15 联合 HPV 基因疫苗治疗宫颈癌的前景[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2019,(3):436-441.

致 谢

随着毕业答辩的来临，三年的研究生生活也即将画上句号。在这里，我想要对耐心指导我的老师和热心帮助我的同学表示由衷的感谢！

首先，感谢我的导师张咏梅老师。从课题的选择到项目的最终完成，张老师都始终给予我最大的支持和帮助。三年来，她不仅在学业上给我以精心指导，同时还在思想、生活上给我以无微不至的关怀。在张老师的指导下，我不仅按时完成了学业任务与课题计划，还对药学行业有了深刻的认知，同时，老师严谨负责，精益求精的科研态度也深深影响了我，让我受益匪浅。

其次，感谢牛凤霞和闫萍主任专业的建议和耐心的指导，感谢科室内各位老师的点播和提醒，感谢师姐和同学们的热心帮助，感谢同门聂文佳三年的陪伴与理解。

感谢我的家人，他们始终支持我，理解我，默默地做我最坚强的后盾。

感谢所有在我读研期间帮助过我的人，在此向各位老师同学致以诚挚的谢意和崇高的敬意！

