

基因芯片对尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒的检测和基因分型

杨 挺¹,浦 洁¹,谢 平²,施和建¹

(江苏省无锡市人民医院:1. 皮肤科,2. 中心实验室 214023)

摘 要:目的 研究尖锐湿疣患者皮损 HPV 感染的基因型分布状况。方法 采用基因芯片检测和分型方法,对该市 175 例尖锐湿疣患者的皮损组织进行 HPV 检测和分型。结果 175 例尖锐湿疣组织标本中 HPV 阳性为 167 例,总阳性检出率为 95.4%。各 HPV 类型检出率最高依次为 HPV11、6、16 型。56 例患者存在多重感染,占感染总数的 32.0%。结论 HPV11、6、16 型感染是尖锐湿疣发病的主要基因型,且 HPV 感染趋于多重化。

关键词:尖锐湿疣; 人乳头瘤病毒 16; 基因; 芯片分析技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0097-03

尖锐湿疣(condyloma acuminatum,CA)是 HPV 感染引起的生殖器、会阴、宫颈及肛门部位上皮乳头瘤样增生,是一种常见、易反复发作的性传播疾病,其感染主要与 HPV6、11、16、18、31、35、42、43、44 型有关^[1-2]。为了解 CA 患者 HPV 的基因型,以及给临床诊断及治疗提供可靠基因背景,现对临床诊断的尖锐湿疣患者进行皮损 HPV 基因型检测,报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 175 例标本取自 2008 年 11 月至 2009 年 11 月在本院皮肤科门诊就诊,且临床诊断为生殖器尖锐湿疣的患者。年龄 16~73 岁,平均 35.0 岁,其中男 100 例(≤35 岁 50 例,>35 岁 50 例),女 75 例(≤35 岁 51 例,>35 岁 24 例)。

1.2 仪器 HPV 基因分型检测试剂盒购自亚能生物技术(深圳)有限公司,该试剂盒能同时分型检出 18 种高危型(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4)和 5 种低危型(HPV6、11、42、43、44);Mastercycler ep gradient 银制梯度 PCR 扩增仪(Eppendorf 公司,德国);FYY-3 型分子杂交仪(兴化市分析仪器厂);XL-2000 SERIES 超声粉碎仪(美国);Eppendorf 高速低温离心机(德国)。

1.3 标本采集和处理 采集生殖器尖锐湿疣组织样本放置于 1.5 mL 离心管并立即送检,或放置-30℃冰箱保存待检。

1.4 HPV 基因分型检测 采用 PCR 体外扩增和 DNA 反向点杂交相结合的 DNA 芯片技术进行检测。利用 HPV 的基因特点设计特异性引物,可以扩增出包含 23 种 HPV 基因型的目的片段,再将扩增产物与固定在膜条上的分型探针进行杂交,依据杂交信号的有无来判断是否有何种 HPV 的存在。

(1)DNA 的提取及 PCR 扩增:将样本从冰箱取出,解冻,在 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 生理盐水,用超声粉碎仪探头持续低功率条件下,超声粉碎组织块,将组织粉碎成细胞悬液,以离心半径 8 cm,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 50 μL DNA 裂解液,混匀,100℃沸水浴加热 10 min,以离心半径 8 cm,13 000 r/min 离心 10 min,取待测样本 DNA 5 μL,加入 PCR 反应管中,进行 PCR DNA 扩增。PCR 反应条件为 50℃ 15 min,95℃ 10 min,然后进行 40 个循环;94℃ 30 s、42℃ 90 s、72℃ 30 s;最后 72℃ 延伸 5 min。每次同时设定 1 个阴性对照(纯水)和 1 个阳性对照。(2)杂交:取 15 mL 塑料离心管,放入标有样本编号的膜条,加入 A 液 5 mL 及所有(25 μL)的

PCR 产物,稍拧紧。将离心管放入沸水浴加热 10 min,取出并拧紧管盖,放入杂交箱,51 ℃ 杂交至少 1.5 h。另取 50 mL 塑料离心管,加入 500 mL B 液,于杂交箱预热至 51 ℃。(3)洗膜:取出膜条,移至装有预热 B 液的 50 mL 离心管中,于 51 ℃ 轻摇洗涤 5 min。(4)显色:按 A 液:POD=2 000:1 配制孵育液,室温轻摇孵育膜条 30 min,弃去孵育液。用 A 液室温轻摇洗 2 次,每次 5 min。用 C 液室温洗膜 2 min,同时配制显色液。将膜条浸泡于显色液避光显色至少 30 min 后,转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 统计软件包进行 χ^2 检验等统计处理。

2 结 果

2.1 CA 患者 HPV 检出率 175 例临床诊断尖锐湿疣标本检出 HPV 阳性 167 例,阳性率为 95.4%。有 8 例为阴性(男性 2 例,女性 6 例),且血液 RPR、TPHA 均阴性,经外用鬼臼毒素后皮损痊愈。本组另对 2 例(男、女性各 1 例)疑似尖锐湿疣的患者行皮损 HPV 基因型检测均为阴性,并行血液 RPR、TPHA 检测均为阳性,确诊为梅毒 2 期扁平湿疣并进行治疗后皮损消退。

2.2 感染 HPV 基因型分布 在 175 例尖锐湿疣患者的皮损组织进行 HPV 分型检测,共检测出 16 种 HPV,HPV35、39、44、53、73、83 及 MM4 未检测出。检出的低危型占 79.1%,高危型占 20.9%,低危型:高危型=3.78:1。其中,HPV11 型检出率最高,占 40.2%;其次为 HPV 6 型,占 35.6%。在高危型中,HPV16 型检出率最高,占总数的 8.4%。在女性患者中,高危型 HPV 检出 34 例,男性患者检出 16 例,经 SPSS 统计软件包进行 χ^2 检验, $\chi^2=11.345, P<0.05$,提示高危型检出率中,女性与男性检出情况差异有统计学意义,见表 1。

表 1 尖锐湿疣患者 HPV 基因分布情况(n)				
感染类型	分型	n	男性(≤35 岁/>35 岁)	女性(≤35 岁/>35 岁)
低危型	HPV6	85	46(26/20)	39(27/12)
	HPV11	96	60(24/36)	36(26/10)
	HPV42	2	1(1/0)	1(1/0)
	HPV43	6	4(2/2)	2(1/1)
高危型	HPV16	20	7(4/3)	13(10/3)
	HPV18	5	1(1/0)	4(3/1)
	HPV31	2	0(0/0)	2(0/2)
	HPV33	2	0(0/0)	2(2/0)
	HPV45	1	0(0/0)	1(1/0)
	HPV51	1	0(0/0)	1(0/1)
	HPV52	4	2(2/0)	2(2/0)
	HPV56	5	2(2/0)	3(3/0)
	HPV58	2	1(1/0)	1(1/0)
	HPV59	1	1(0/1)	0(0/0)
	HPV66	6	2(2/0)	4(4/0)
	HPV68	1	0(0/0)	1(0/1)

2.3 HPV 多重感染状况分析 56 例尖锐湿疣患者(占总数的 32.0%)存在 2~5 种 HPV 感染。其中双重感染检出率最高,占 25.1%;其次为三重感染,占 5.1%。多重感染主要表现

为高/低危混合或低危型感染,仅 2 例感染基因型均为高危型,此 2 例临床表现为尖锐湿疣,与其他患者相比无明显异常,经艾拉光动力治疗后皮损消失。多重感染具体组合趋于多样化,排序依次为 HPV11/6 型(19 例)、HPV11/16 型(8 例)、HPV 43/6 型(4 例)。从性别分组分析,女性(75 例)中多重感染有 31 例,男性(100 例)中有 25 例,经 SPSS 统计软件包进行 χ^2 检验, $\chi^2=5.254, P<0.05$,提示女性多重感染与男性相比差异有统计学意义。

从年龄分组分析多重感染状况,≤35 岁(101 例)组中有多重感染者 36 例,>35 岁(74 例)组中有 20 例,2 个年龄组多重感染情况比较, $\chi^2=1.457, P>0.05$,提示 2 个年龄组多重感染差异无统计学意义,见表 2。

表 2 尖锐湿疣患者 HPV 多重感染年龄组分布状况					
年龄组	类型	≤35 岁组		>35 岁组	
		男性	女性	男性	女性
双重感染	低危型	8	7	8	1
	混合型	2	8	4	6
三重感染	高危型	0	1	0	0
	混合型	2	5	0	1
四重感染	高危型	1	0	0	0
	混合型	0	1	0	0
五重感染	混合型	0	1	0	0

注:与≤35 岁组的多重感染比较, $\chi^2=1.457, P>0.05$ 。

3 讨 论

CA 是由 HPV 通过皮肤微小损伤进入人体,刺激表皮基层细胞发生分裂,使表皮发生增殖性损害而形成。CA 发病和复发与宿主的免疫状况有关,人体细胞免疫状态是影响 CA 发生、转归的重要基础之一。据文献报道,约 90% 感染 HPV 患者能自然清除病毒,而当人体免疫抑制或免疫缺陷时,生殖道 HPV 感染和相关疾病的发生率会增加^[3]。

基因芯片具有快速、灵敏度高、特异性好及同一标本可以同时检测多个 HPV 基因型别的优点。本研究采用基因芯片法检测本市 175 例 CA 患者皮损组织中 HPV 的 23 种基因型,结果表明,175 例标本中 HPV 阳性检出率为 95.4%,有 8 例阴性,可能感染检测范围以外的其他 HPV。本研究对 2 例梅毒扁平湿疣进行 HPV 检测,均为阴性,认为此检测可作为尖锐湿疣和扁平湿疣的鉴别诊断。

175 例尖锐湿疣患者中共检出 16 种 HPV 基因型,HPV 35、39、44、53、73、83 及 MM4 未检测出。在检测出常见的 16 种 HPV 基因型中,以 HPV11、6 型感染为多,与报道最常见的 HPV 基因型别为 6、16、52 和 59 型有所不同,说明 HPV 感染型别分布具有人群或地域差异^[4]。本研究发现尖锐湿疣患者皮损 HPV 感染以低危型为主,低危型:高危型=3.78:1,符合既往报道低危型感染主要引起生殖道肛周皮肤和阴道下部的外生性湿疣类病变、扁平湿疣类病变和低度子宫颈上皮内瘤样变^[5]。Munoz 等^[6]抽样调查发现,HPV16、18 型感染很普遍,没有明显的地区差异,但有些型别有地理位置的差异,如 HPV45 在非洲西部常见,而 HPV52、58 在中国女性中检出率较高。本研究发现,HPV16 最多见,与 Munoz 等^[6]报道类似。尖锐湿疣患者皮损高危型 HPV 检出率女性明显高于男性,提示女性更易感染高危型 HPV,增加宫颈癌发生的潜在危险性。

吕晓萍等^[7]报道,尖锐湿疣皮损患者中约 63.9% 存在 HPV 多重感染,而本研究尖锐湿疣患者中仅发现 32.0% 受检者存在多重感染,其中以双重感染为多(占 25.1%),且以高/低危混合型或低危型多重感染为主。本组发现,HPV 混合型感染中 HPV6+11 居多,是 CA 的主要致病因子,其次是 HPV16+18。而引起同一患者同一部位同时感染多种 HPV 型别的原因,可能与 HPV 各型别之间没有相互免疫有关。此外,本组发现三重及以上感染者临床表现与其他患者无明显异常,经常规治疗(外用鬼臼毒素或艾拉光动力)后均治愈。本研究发现,尖锐湿疣女性患者的多重感染率明显高于男性,提示女性更易受到 HPV 多重感染。年龄分组分析,小于或等于 35 岁组与大于 35 岁组者在多重感染方面差异无统计学意义。

大量的流行病学及分子生物学研究资料表明,尖锐湿疣与生殖器癌变的发生有密切关系,有报道指出,外阴部的尖锐湿疣经过 5~40 年后可能会转化为鳞状细胞癌;有 15% 的阴茎癌、5% 的阴道癌及某些肛门癌在原有尖锐湿疣的基础上发生^[8]。宫颈部位的尖锐湿疣并不少见,但醋酸白实验的价值有限,本组认为,尖锐湿疣患者有必要进行皮损 HPV 基因型检测,不仅有助于诊断并保留诊断依据,而且对于高危型感染者或多重感染者,应要求女性患者长期随访,其性伴侣也要定期进行检查。

参考文献

[1] Brown DR, Schroeder JM, Fife KH, et al. Detection of multiple human papillomavirus types in condylomata

acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients[J]. Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3316-3322.

- [2] 洪少林,王家璧,刘跃华,等. 北京地区尖锐湿疣患者皮损中人乳头瘤病毒的检测和分型[J]. 中国医学科学院学报, 2002, 24(4): 397-400.
- [3] 狄文,殷霞. 人乳头瘤病毒感染和宫颈尖锐湿疣[J]. 实用妇产科杂志, 2004, 20(2): 67-68.
- [4] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. Science, 1988, 239(4839): 487-491.
- [5] Dell G, Gaston K. Human papillomaviruses and their role in cervical cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(12, 13): 1923-1942.
- [6] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 518-527.
- [7] 吕晓萍,李体远,戴勇,等. 尖锐湿疣皮损人乳头瘤病毒基因分型的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(21): 2154-2156.
- [8] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 3 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 536.