

• 临床检验研究 •

北京石景山地区人乳头瘤病毒(HPV)感染的分子流行病学研究

李晓阳¹, 郭学青^{2△}

(1. 首都医科大学附属北京朝阳医院京西院区检验科, 北京 100043; 2. 北京军区总医院 263 临床部检验科, 北京 101149)

摘要:目的 探讨北京石景山地区妇科疾病与人乳头瘤病毒感染(HPV)的关系, 建立本地区不同妇科疾病和不同年龄段妇女 HPV 感染的流行病学资料库。方法 应用反向点杂交技术分别对疾病组 1 012 例患者标本和正常组 500 例标本进行 HPV 检测, 所得数据用 SPSS13.0 统计软件进行分析。结果 疾病组 1 012 例标本中, 阳性标本 351 例, 感染率为 34.7%; 其中双重感染 51 例, 占阳性标本的 14.5%; 多重感染 22 例, 占阳性标本的 6.3%; 而高危感染 226 例, 感染率为 22.3%, 占阳性标本的 64.4%; 单纯 HPV16 亚型感染 140 例, 占所有阳性标本的 39.9%。正常组 500 例标本中, 阳性标本 93 例, 感染率为 18.6%; 高危型所占比例为 21.6%。不同年龄段、不同性生活史和不同妇科疾病的 HPV 感染检出率都有显著性差异。结论 HPV DNA 的基因分型可为宫颈癌及女性生殖道肿瘤的病因学和癌前预报提供重要的参考价值, 为高风险人群的早预防、早诊断、早治疗提供依据。

关键词:流行病学, 分子; 生殖系统疾病, 女(雌)性; 人类乳头瘤病毒; 反向点杂交
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.019 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)08-0866-03

An molecular epidemiology investigation on human papillomavirus infection in Shijingshan area in Beijing

Li Xiaoyang¹, Guo Xueqing^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Western Department of Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100043, China; 2. Department of Clinical Laboratory, No. 263 Clinical Department of the Military General Hospital of Beijing, Beijing 101149, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship of gynecological diseases and human papillomavirus (HPV) infection in Shijingshan area in Beijing, and establish the epidemiological data base of HPV infection in female with different in gynecological diseases and at different ages. **Methods** 1 012 cases of specimens from patients and 500 cases from healthy females were detected with reverse dot blot, and the data were analyzed by statistical software SPSS13.0. **Results** Among the specimens from patients, 351 (34.7%) cases were positive. Among the positive specimens, 51 (14.5) cases were with double infection, 22 (6.3%) were with multiple infection, 226 (22.3%) were with high risk infection and 140 (39.9%) were with HPV16 infection only. Among the specimens from healthy females, 93 (18.6%) cases were positive and the rate of high risk infection was 21.6%. There was significant difference of HPV infection among females at different ages, with different sexual history and gynecologic diseases. **Conclusion** HPV genotyping could provide important reference for the etiology analysis and prediction of uterine cervix cancer and female genital tract cancer, and offer evidence for the prophylaxis, diagnosis, and therapy of uterine cervix cancer at early stage.

Key words: epidemiology, molecular; genital diseases, female; human papillomaviruses; reverse blot hybridization

人类乳头瘤病毒(human papillomaviruses, HPV)是一种小的 DNA 双链病毒, 可以特异性地感染人皮肤和黏膜的鳞状上皮细胞, 引起多种良、恶性病变, 其中长期、反复的高危型 HPV 感染是女性宫颈癌发生的主要原因^[1-2]。人体感染 HPV 后, 因为目前尚不可能从人体内彻底清除病毒, 所以感染是终身的, 传染性也是终身的^[3-4]。HPV 的致病性与其亚型有关, 如低危亚型感染仅诱发生殖器疣样病变, 高危亚型感染是导致宫颈癌发生最主要的原因。本研究对 2007 年 6 月至 2009 年 6 月于本院及其他医院就诊的 1 012 例不同妇科疾病患者进行 HPV 检测, 以探讨妇科疾病与 HPV 感染的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 宫颈采集物标本源自 2007 年 6 月至 2009 年 6 月于本院及其他医院做 HPV 感染筛查的女性。其中, 疾病组 1 012 例, 年龄 15~63 岁; 正常组 500 例, 年龄 16~65 岁。疾病组采纳标准: 患有一种或几种宫颈疾病, 患者没有做过宫

颈切除手术, 在采集标本时没有怀孕, 不处于月经期。患者基本资料包括年龄、职业、怀孕次数、首次性生活年龄、文化程度、婚姻状况及妇科疾病临床诊断情况。正常组采纳标准: 临床上没有任何妇科疾病症状, 没有作过宫颈切除手术, 在采集标本时没有怀孕, 不处于月经期。

1.2 方法

1.2.1 临床样品 HPV DNA 获取和处理 (1) 临床样本获取: 宫颈表皮脱落细胞及活检组织(用棉拭子或宫颈脱落细胞采集器取得)。于女性宫颈口使用宫颈脱落细胞采集器采样, 用宫颈刷紧贴宫颈口, 转动两周, 取得脱落细胞, 将刷子从刻痕处折断, 放入装有洗脱液的套管中保存。对于生殖器或肛周疣体增生(怀疑为尖锐湿疣)患者, 采集疣体表皮脱落细胞。用生理盐水湿润棉拭子, 用力来回擦拭疣状组织表面几次, 取得脱落细胞。将取样后的棉拭子放入备有 1 mL 无菌生理盐水的试管中, 充分漂洗后将棉拭子贴壁挤干丢弃。样本在室温放置

△ 通讯作者, E-mail: guoxueqing198@163.com。

不超过 2 h, 4℃ 保存不超过 24 h, -20℃ 保存不超过 3 个月, 避免反复冻融。(2)样本处理:将漂洗过棉拭子的生理盐水或洗脱液全部转移至 1.5 mL 微量离心管中, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 保留管底的细胞块。加入 50 mL 细胞裂解液悬浮沉淀, 100℃ 加热 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 保留上清待用。

1.2.2 HPV DNA 片段的聚合酶链反应(PCR)扩增及反向点杂交 针对 HPV L1 基因设计 23 种 HPV 亚型的特异性探针并固定在固相支持物(硝酸纤维素膜)上, 然后以一对生物素标记的通用引物扩增 HPV L1 基因序列, 其 PCR 产物与膜条进行杂交, 再通过过氧化物同工酶(POD)的信号放大作用即可进行检测。以人类基因组的看家基因 *beta-globin* 作为 PCR 对照。按 PCR 常规标准加入反应缓冲液(含 MgCl₂)、三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)、引物、无菌双蒸水, 而后分别加入已提取的待测样品 DNA 5 mL, 反应总体积为 25 mL。按以下条件进行扩增: 50℃ 15 min; 95℃ 10 min; 94℃ 30 s, 42℃ 90 s, 72℃ 30 s, 40 个循环; 72℃ 5 min。杂交和显色: 将 PCR 产物和固定有 23 种 HPV 分型探针的膜条放入 5 mL A 液[2×枸橼酸钠缓冲液(SSC)、0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)、pH 7.4]管中, 沸水浴 10 min 后于 51℃ 杂交箱中杂交 1 h, 膜条转移至已于杂交箱中预热到 51℃ 的 40 mL B 液(0.5×SSC、0.1% SDS、pH 7.4)管中, 于 51℃ 轻摇洗涤 15 min(每管 40 mL, 最多可同时洗涤 4 张膜)。弃液体, 将膜条置于 POD 溶液中室温轻摇孵育 30 min, 弃 POD 溶液, 用 A 液室温轻摇 2 次, 每次 5 min, 再用 C 液室温轻摇 1~2 min, 最后膜条置于新鲜配制的显色液中避光显色 15 min, 显色完毕后, 将膜条浸泡在水中清洗, 取出膜条装入封口袋于 4℃ 避光保存。根据蓝色斑点出现的有无及位置即可判断 HPV 是否感染及基因亚型, 当对照膜条 PC 点出现蓝色斑点时提示 PCR、杂交、显色等各个环节操作正常, 此时结果真实有效。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 分别统计正常组和疾病组的 HPV 感染率, 同时分别以不同年龄段、不同妇科疾病类型和不同孕次作为分组因素, 统计疾病组 HPV 感染率。不同组别间 HPV 感染率的比较采用 χ^2 检验进行, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 正常组和疾病组 HPV 感染率的比较及 HPV 感染与相关疾病的关系 疾病组标本检出阳性标本 351 例, 总感染率为 34.7%(351/1 012), 显著高于正常组的 18.6%(93/500)($P<0.05$)。其中, 疾病组阳性标本中单纯 HPV16 亚型感染率为 39.9%(140/351), 双重感染率为 14.5%(51/351), 多重感染率为 6.3%(22/351); 高危型 HPV 感染率为 64.4%(226/351), 亦显著高于正常组高危型 HPV 检出率(21.6%)($P<0.05$)。分组统计结果显示, 妇科疾病个体中尖锐湿疣患者组 HPV 总感染率显著高于宫颈炎、宫颈糜烂和其他疾病组($P<0.05$), 而且宫颈炎、宫颈糜烂和尖锐湿疣患者组中高危型 HPV 的感染率显著高于其他疾病组和正常组($P<0.05$) (表 1)。宫颈炎和宫颈糜烂患者组高危型 HPV 的感染率显著高于仅有低危型 HPV 感染患者组($P<0.05$), 见表 2。

2.2 HPV 感染与年龄及孕史的关系 年龄段越低, 受检者 HPV 感染率越高。而且, HPV 阳性率与首次性生活年龄史呈负相关, 首次性生活年龄越小, 感染率越高。HPV 感染率与孕

次的相关分析显示, 随着怀孕次数的增加, HPV 感染率也明显增加, 见表 3。

表 1 HPV 感染与不同宫颈疾患的关系以及与正常组的比较

组别	检测例数 (<i>n</i>)	阳性数 (<i>n</i>)	总感染率 (%)	高危例数及占比 [<i>n</i> (%)]
宫颈炎组	335	112	33.4	80(71.4)
宫颈糜烂组	294	103	35.0	81(78.6)
尖锐湿疣组	116	78	67.2 [#]	52(66.7)
其他妇科疾病组	267	58	21.7	13(22.4)
正常组	500	93	18.6	20(21.6)

[#]: $P<0.05$, 与宫颈炎、宫颈糜烂或其他疾病组比较。

表 2 不同妇科疾病患者感染 HPV 型别的比较[*n*(%)]

组别(<i>n</i>)	感染状况		
	仅高危	高危和低危	仅低危
宫颈炎组(112)	76(67.8)*	8(7.1)	28(25.0)
宫颈糜烂组(103)	87(84.5)*	13(12.6)	3(2.9)
尖锐湿疣组(78)	32(41.0)	3(3.8)	43(55.1)
其他妇科疾病组(58)	27(46.5)	9(15.5)	22(37.9)

*: $P<0.05$, 与高危和低危或仅低危 HPV 感染率比较。

表 3 HPV 感染与患者年龄及孕史的关系

因素	<i>n</i>	阳性数(<i>n</i>)	阴性数(<i>n</i>)	HPV 感染率(%)
年龄(岁)				
15~24	126	48	78	38.1
>24~34	425	155	270	36.4
>34~44	190	63	127	33.1
>44~54	178	46	132	25.8
>54	93	13	80	13.9
首次性生活年龄(岁)				
15~18	162	83	79	51.2
>18~21	299	116	183	38.8
>21~24	441	123	318	27.9
>24	110	29	81	26.4
怀孕次数(次)				
1	139	33	106	23.7
2	283	94	189	33.2
≥3	347	137	210	39.5

3 讨 论

HPV 感染是宫颈癌的主要致病因素, 筛查仍是现阶段控制和预防子宫颈癌的主要手段。目前, HPV 的检测方法主要包括血清学方法、DNA 印迹法、原位杂交法、PCR、杂交捕获法等, 但以上各种方法都存在一定的缺点, 比如, 血清学方法检测灵敏度较低, DNA 印迹操作麻烦、耗时、费用高, 原位杂交法的杂交率低, 因此大大降低了其临床应用价值。近年逐渐被广泛应用的基因芯片检测基于反向点杂交技术, 在很大程度上克服了以上缺点, 具有敏感性高、特异性强、检测结果准确可靠、操作简单等优点, 通过一次杂交检测不仅可以判断待检样品中是否存在 HPV 感染, 而且还可以鉴定出是哪一种型别的 HPV 感染; 可对样品中的 HPV DNA 直接进行检测, 可以检出 HPV

的潜伏期感染;同时检测多种 HPV 型别,对多重 HPV 感染的判断一目了然,克服了其他 HPV 检测方法难以判断混合感染或操作繁琐的缺点^[5-7]。

目前,确定的 HPV 基因型别约有 100 余种,其中有约 40 种可以感染人的生殖器官,根据其感染后的致癌性与否又分为高危型和低危型,低危型 HPV 常引起外生殖器湿疣等良性病变包括宫颈上皮内低度病变(CIN1),高危型 HPV 与宫颈癌及宫颈上皮内高度病变(CIN2/3)的发生相关,尤其是 HPV16 和 18 亚型。本研究对疾病组 1 012 例临床标本进行了 HPV 基因芯片检测,351 例为 HPV 阳性,阳性感染率为 34.0%,其中高危感染率为 30.3%。而正常组 500 例标本中,阳性感染率为 18.6%,高危型所占比例为 21.6%。疾病组和正常组比较,不论是总感染率还是高危感染率,疾病组明显高于正常组。另外,本试验疾病组的 HPV 感染率也明显高于国内其他的研究数据^[8-10]。本试验疾病组的检测对象都是患有不同妇科疾病的患者,其中宫颈炎、宫颈糜烂和尖锐湿疣所占比例最多,其感染率分别为 33.4%、35.0%和 67.2%,明显高于其他疾病(如阴道炎等)的患者(1.7%),其中高危型感染所占比例分别为 71.4%、78.6%、66.7%和 22.4%,很显然,宫颈炎和宫颈糜烂 HPV 阳性患者中,高危感染率远远高于其他妇科疾病患者($\chi^2=33.760, P<0.05$)。流行病学资料显示,在 99.7%的宫颈癌组织中存在 HPV DNA,且主要为 4 种高危型 HPV 16、HPV 18、HPV 31 和 HPV 45 感染,其中 50%的宫颈癌与 HPV16 感染有关^[11]。还有研究表明,宫颈炎与高度宫颈上皮瘤变有关^[12]。

研究结果显示,随着年龄的不断增加,感染率也在降低,这可能是由于青年女性性生活频繁,免疫系统并未能被致敏,易受 HPV 感染,如果是持续地感染高危 HPV,很有可能进一步导致宫颈恶性病变,所以该年龄段的妇女应成为重点筛查对象。已有研究也发现,年轻妇女更容易感染高危型 HPV 进而发展为宫颈癌,其预后差^[13]。Velema 等^[14]研究发现 20 岁以上开始性生活的妇女患 CIN 的风险较 16 岁以前开始者降低 50%以上,16 岁以前开始性生活的妇女宫颈癌发病是 20 岁以后者 2 倍多。另外,HPV 的感染与怀孕次数也有很大的关系,感染率随着孕次的增加而增加,这可能是因为育龄妇女多次人工流产,导致宫颈受损,从而增加了 HPV 的易感性。

HPV DNA 的检测和分型对宫颈癌及女性生殖道肿瘤的病因学和癌前预报具有重要的意义,通过 HPV 基因分型检测高风险人群,根据感染型别处理 HPV 感染和癌前病变,做到早预防、早诊断、早治疗,可以有效地阻断病情的发展,预防宫颈癌的发生,或减少妇女死于宫颈癌的概率。

(上接第 865 页)

[11] 张微,刘丽娟. 168 株铜绿假单胞菌对 12 种药物的耐药性分析[J]. 检验医学,2009,24(1):43-47.

[12] 阮卫,杨祚升. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2004,25(6):536-538.

[13] 廖蕴惠,宋秀宇. 铜绿假单胞菌主动外排系统与多重耐药性[J].

参考文献

[1] Bosch FX, Munoz N, Chichareon S, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002,55(4):244.

[2] 吴文苑,段朝晖,方红辉,等. 多重 PCR 法和 HPV 分型基因芯片法在高危型人乳头瘤病毒感染检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(7):632-634.

[3] del Amo J, Gonzalez C, Losana J, et al. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain[J]. Sex Transm Inf, 2005,81(1):79-84.

[4] Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection[J]. CMA J, 2001,164(7):1017-1025.

[5] Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods[J]. Arch Pathol Lab Med, 2003,127(8):940-945.

[6] 姜晓曼,黄民主,张志魁,等. HPV L1 壳蛋白在宫颈病变中的表达及与 HR-HPV DNA 的关系[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(6):554-556.

[7] 陈淑芬,叶智良,朱晓丹,等. 反向斑点杂交技术应用于青少年女性 HPV 感染检测的研究[J]. 检验医学与临床,2010,16(3):104-106.

[8] Zhao FH, Li N, Ma JF, et al. Study of the association between human papillomavirus infection and cervical cancer in Xiangyuan county, Shanxi province[J]. Chin J Epidemiol, 2001,22(5):375-378.

[9] 谭晓燕,赵静,刘小宁,等. 珠海市正常人群妇女宫颈人乳头瘤病毒感染情况分析[J]. 中国妇幼保健,2005,20(14):1726-1727.

[10] 唐勇,唐孝亮. 尖锐湿疣患者及高危人群 HPV DNA 分型检测结果分析[J]. 检验医学与临床,2009,17(19):234-235.

[11] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Clin Microbio Rev, 2003,16(1):1-17.

[12] Castle PE. Beyond human papillomavirus the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer[J]. J Low Genit Tract Dis, 2004,8(3):224-230.

[13] Torres Lobatón A, Rojo Herrera G, Torres Rojo A, et al. Cervical cancer current view of its epidemiology and risk factors[J]. Gynecol Obstet Mex, 2004,72:466-474.

[14] Velema JP, Ferrer A, Figueroa M, et al. Burning wood in the kitchen increases the risk of cervical neoplasia in HPV-infected women in Honduras[J]. Int J Cancer, 2002,97(4):536-541.

(收稿日期:2011-02-18)

国际检验医学杂志,2010,31(2):139-141.

[14] 刘永芳,吕晓菊,宗志勇,等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药表型与外排泵表达水平的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2008,31(9):979-983.

(收稿日期:2011-02-08)