·论　著·

某地区 HPV 不同亚型感染与宫颈病变的相关研究*

王雪春[1]，孙蓬明[2△]，林　芬[2]，毛晓丹[2]，蔡良知[2]，宋一一[2]

（1. 福建医科大学第一临床医学院妇产科教研室，福州 350005；2. 福建省妇幼保健院妇科肿瘤研究室/福建医科大学妇幼教学医院，福州 350001）

摘　要：目的　探讨该地区人群不同亚型人乳头瘤病毒（HPV）感染与宫颈病变的关系。**方法**　采用 PCR DNA 反向斑点杂交技术，对 1 039 例门诊首诊人群的宫颈脱落细胞标本进行 HPV 基因诊断和分型，所得数据用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。**结果**　1 039 例标本中 HPV 整体感染率为 32.1%，其中单重感染占阳性标本的 75.4%，双重感染和多重感染分别占阳性标本的 17.7%、6.9%。HPV 感染在小于 30 岁年龄段感染率最高，随着年龄的增加，感染率降低。HPV 感染率随着宫颈病变级别的增加逐渐上升（$P<0.001$），HPV16 亚型随宫颈病变级别的增加感染率逐渐上升（$P<0.001$）。不同年龄段 HPV 多重感染率差异有统计学意义（$P<0.05$）。**结论**　DNA 杂交技术能一次性检测 23 种 HPV 型别，敏感性高、特异性强、操作简便、结果易于判读，适合临床应用。HPV 分型检测对筛选宫颈高度病变有重要意义。

关键词：乳头状瘤病毒科；　基因型；　宫颈疾病；　HPV 多重感染

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.003　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2011)10-1024-03

The relationship between various sub-type HPV infection and pathological changes of cervix*

Wang Xuechun[1], *Sun Pengming*[2△], *Lin Fen*[2], *Mao Xiaodan*[2], *Cai Liangzhi*[2], *Song Yiyi*[2]

(1. *First Clinical College, Fujian Medical University, Fuzhou* 350005, *China*; 2. *Institute of Gynecologic Oncology, Fujian Maternal and Children Hospital/Maternal and Children Teaching Hospital Fujian Medical University, Fuzhou* 350001, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the relationship between various sub-type human papillomavirus (HPV) infection and pathological changes of cervix. **Methods**　Cervix exfoliative cells from 1 039 cases of preliminarily diagnostic individuals were detected for HPV genotypes by using DNA hybridization. The data was analyzed with the statistical software SPSS 17.0. **Results**　In total 1 039 cases, the positive rate of HPV DNA was 32.1%. In the HPV DNA positive cases, the rates of simple, double and multiple infection were 75.4%, 17.7% and 6.9%. In different age groups, the HPV infection rate of 30 years old group was the highest, and there was a trend of the decrease of infection rate with the increase of age. HPV infection rate and the infection rate of HPV16 increased with the increase of the grade of the cervix lesions ($P<0.001$). There was statistical difference of the multiple HPV infection rate between the different age groups ($P<0.05$). **Conclusion**　DNA hybridization can be used to simultaneously detect and classify different HPV genotypes with high sensitivities and specificities, which may be performed as a screen method to diagnose high-grade cervical lesion.

Key words: papillomaviridae;　genotype;　uterine cervical disease;　HPV multiple infection

近年来流行病学研究发现，宫颈癌的发病率呈上升趋势，主要与高危型人乳头瘤病毒（HPV）的持续性或反复性感染有关[1]。在已知的 130 多种 HPV 基因型中，有超过 30 多型可以感染人宫颈上皮。宫颈上皮内瘤变（CIN）发展到宫颈癌是 1 个较长的过程，因此，及早发现高危型 HPV 感染和及早治疗 CIN 患者以阻断宫颈癌的发生，是当前医学预防和研究的重点之一[2]。本研究利用 DNA 杂交技术检测 1 039 例妇科门诊患者标本的 HPV 感染状态，通过分析不同程度宫颈病变组织，如宫颈炎、CIN 及宫颈浸润癌（ICC）中 HPV 感染情况，探讨不同型别 HPV 感染与宫颈病变的关系及 HPV 分型检测在临床中的应用价值，并报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取 2009 年 4 月至 2010 年 1 月福建医科大学第一临床医学院妇科门诊中同时行宫颈薄层细胞液基细胞学检查和 HPV 检查的患者 1 039 例为研究对象，研究人群年龄 18～78 岁，平均（40.2±9.9）岁。纳入标准包括：未行子宫切除手术；就诊时处于非妊娠状态；就诊前 48 h 内无性生活；就诊前 48 h 内无阴道处理。对两种检查方法同时发现异常的患者进一步行阴道镜检查联合活检，对活检提示高度宫颈病变的患者再进一步行宫颈冷刀锥切或环形电圈锥切术（LEEP）。同时，收集患者的病理诊断资料。

1.2　方法　HPV 基因分型检测：采用深圳亚能生物技术有限公司生产的 HPV 基因分型检测系统，可检测 23 种 HPV 亚型，包括 18 种高危亚型（HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83 及 MM4）以及 5 种低危亚型（HPV6、11、42、43、44）。暴露宫颈，并拭去宫颈表面分泌物，用专用宫颈刷伸入颈管内 0.5 cm，顺时针和逆时针各旋转 4 圈，将获取足量的宫颈脱落上皮细胞，于保存液中－20 ℃保

*　基金项目：福建省医学创新基金资助项目（2009-CXB-33）；福建省青年自然科学基金资助项目（X0750019）。

△　通讯作者，E-mail：dr.sunfengming@gmail.com。

存。由脱落的宫颈细胞中提取 1 μg DNA，在 25 μL PCR 反应体系中扩增，扩增条件为：50 ℃ 15 min；95 ℃ 10 min；94 ℃ 30 s；42 ℃ 90 s；72 ℃ 30 s，循环 40 次；72 ℃延伸 5 min。将扩增后的 PCR 产物和固定有 23 种 HPV 分型探针的膜条放入杂交缓冲液中，沸水中加热 10 min 后，51 ℃杂交 90 min。于 51 ℃洗涤缓冲液中轻摇洗涤 5 min。显色液中避光显色 15 min，肉眼观察结果。作为阴性对照的杂交膜条，会在 PC 位置出现蓝色斑点，同时，其他位点不应该显色；检测用的每张膜条在 PC 处均应有蓝色斑点出现，此时结果判为有效[3]。

1.3　统计学处理　用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。

2　结　　果

2.1　HPV 人群整体感染情况　23 种 HPV 亚型在本研究人群中，除 HPV44、83 及 MM4 型外其余均有检出。1 039 例标本中，阳性标本 333 例，感染率 32.1%。其中双重感染 59 例，占阳性标本的 17.7%；多重感染 23 例，占阳性标本的 6.9%；而高危亚型感染 270 例，感染率 26.0%，占阳性标本的 81.1%。其中 HPV16 亚型感染 90 例，占所有阳性标本的 27.0%（包括混合感染），占高危阳性标本的 33.3%。HPV 单一型别以 HPV16 感染率最高，然后由高到低依次为 HPV58、52、18、6、11、56、43、42、59、66、31、53、51、68、73、39、35。

2.2　HPV 感染与年龄的关系　小于 30 岁年龄段 HPV 感染率最高（44.4%）。随着年龄的增加，感染率降低，>30～40、>40～50、>50～60、>60 岁年龄段 HPV 感染率分别为 37.0%、24.4%、31.2%、20.5%，不同年龄段的 HPV 感染率比较，差异有统计学意义（$\chi^2=20.846$，$P<0.001$）。

2.3　HPV 感染与宫颈病变的关系　宫颈炎组、CIN Ⅰ组、CIN Ⅱ组、CIN Ⅲ组、宫颈癌组及其他（包括阴道炎等其他妇科疾病）HPV 感染率分别为 23.3%、54.0%、58.6%、69.4%、89.1%、21.6%。其中，各感染组高危亚型 HPV 所占比例分别为 74.2%、87.3%、97.1%、91.2%、97.0%、80.7%，不同宫颈病变 HPV 感染率比较，差异有统计学意义（$\chi^2=175.272$，$P<0.001$），高危亚型所占比例差异有统计学意义（$\chi^2=43.758$，$P<0.001$）。在宫颈炎组中检出 20 种 HPV 亚型，以 HPV16、58、52、6、42、11 最为常见；随着病变程度的增加，HPV 亚型分布有所变化，在 CIN 病变组中高危亚型 HPV 检出率有所增加，而低危亚型 HPV 检出率逐渐下降，低度病变组（CIN Ⅰ）依次以 HPV58、52、56、16、18 和 6 为常见类型，而高度病变组（CIN Ⅱ～CIN Ⅲ）以高危型 HPV16、52、58、18、56 和 68 最为常见；55 例宫颈癌中检出 10 种高危亚型 HPV，他们分别是 HPV16、33、18、58、56、52、59、35、53 和 66。在检出的 20 种 HPV 亚型中，HPV16 检出率随着宫颈病变级别的增加而逐渐上升（$\chi^2=146.349$，$P<0.001$），是宫颈癌发生的重要危险因素（$OR=32.54$）。

2.4　HPV 多重感染与患者年龄、宫颈病变级别的关系　不同年龄段 HPV 多重感染差异有统计学意义（$\chi^2=13.774$，$P<0.05$）。40 岁以下者 HPV 多型别感染率（57/486，11.7%）高于 38 岁以上者（25/553，4.5%）。慢性宫颈炎组、CIN Ⅰ组、CIN Ⅱ组、CIN Ⅲ组、宫颈癌组及其他疾病组多型别感染率分别为 7.3%（40/550）、12.6%（11/87）、10.3%（3/29）、14.3%（7/49）、9.1%（5/55）、5.9%（16/269）。多型别感染中以双重感染常见（59/82，71.95%），偶有六重感染（1/82，1.22%）。不同宫颈病变级别 HPV 感染差异无统计学意义（$\chi^2=14.811$，$P>0.05$），见表 1。

表 1　HPV 多重感染与患者宫颈病变级别的关系[n(%)]

组别	单重感染	双重感染	多重感染
宫颈炎	88(68.8)	31(24.2)	9(7.0)
CIN Ⅰ	36(76.6)	9(19.1)	2(4.3)
CIN Ⅱ	14(82.4)	2(11.8)	1(5.9)
CIN Ⅲ	27(79.4)	4(11.8)	3(8.8)
宫颈癌	44(89.8)	2(4.1)	3(6.1)
其他	42(72.4)	11(19.0)	5(8.6)
合计	251(75.4)	59(17.7)	23(6.9)

3　讨　　论

自 1995 年世界卫生组织宣布 HPV 是引起宫颈癌病变的首要因素以来，HPV 检测作为筛查宫颈癌的手段受到了人们的重视。有研究显示，HPV16 型与宫颈鳞癌关系最为密切，HPV18 型与宫颈腺癌关系密切，而不同的型别引起宫颈癌的危险性不同[4-5]。本实验共检出 20 种 HPV 亚型，提示本地区宫颈疾病患者中感染的亚型较多种，感染率排在前五位的分别为 HPV16、58、52、18、6 型。这对今后临床上疫苗的应用提供了 1 个重要的数据。

本研究显示，HPV 亚型感染在小于 30 岁年龄段为高峰期（感染率为 44.4%），随着年龄的增加，感染率降低，可见，年龄是 HPV 感染的 1 个重要因素。主要可能是由于年轻女性性生活频繁，免疫系统未能被致敏，易受 HPV 感染，如果是持续感染高危 HPV，很有可能进一步导致宫颈恶性病变，故要重点筛查这个年龄段的女性。Torres 等[6]通过对宫颈癌发病机制的流行病学分析和全球性风险评估还发现，年轻女性更容易感染高危型 HPV，进而发展为宫颈癌，其预后较差。在慢性宫颈炎组中，HPV 感染率较高，提示 HPV 作为 1 种常见的性传播疾病因子，有极高的感染率，但机体对 HPV 自然清除率也极高。有报道，子宫、阴道 HPV 感染 6 个月后清除率为 31%，12 个月后清除率为 70%，18 个月清除率达 89%[7]。大部分 HPV 感染是暂时性的，特别是在性活跃期的年轻女性。但作者认为，临床上对 HPV 感染者，特别是年龄大于 35 岁的高危型 HPV 阳性者，即使是细胞学检测阴性，也不能掉以轻心，应积极地治疗，定期复查。因为持续的高危型 HPV 感染，给其基因整合到宿主细胞提供了机会，被整合后的细胞遗传发生了改变，也改变了细胞形态，甚至发生细胞恶变。

HPV 有近 130 多种亚型，约 40 种与肛门生殖道感染有关，根据在宫颈癌发生中的危险程度，分为高危型和低危型，而且不同 HPV 亚型的感染其致病性和后果也有差异，其中 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、82 等主要导致高度鳞状上皮内病变和宫颈癌的发生[8]；而 HPV6、11、42、43、44 等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鳞状上皮内病变。本研究应用 DNA 杂交技术对门诊首次诊断人群的宫颈脱落细胞标本进行 HPV 检测，检出 4 种低危型和 16 种高危型 HPV，宫颈炎组中，16 种高危亚型和 4 种低危亚型均被检出，以 HPV16、58、52、6、42 和 11 为最常见。随着宫颈病变程度的增加，HPV 亚型分布有所变化，在 CIN 病变组中，高危型 HPV 检出率有所增加，而低危型 HPV 检出率逐渐下降，低度病变组（CIN Ⅰ）依次以 HPV58、52、56、16、18 和 6 为常见类型，而高度病变

组(CIN Ⅱ～CIN Ⅲ)以高危型 HPV16、52、58、18、56 和 68 最为常见;55 例宫颈癌检出 10 种高危亚型 HPV,他们分别是 HPV16、33、18、58、56、52、59、35、53 和 66。虽然不同病变级别间感染型别存在差异,但高危型 HPV16、58、18、52、33 在不同病变级别组均占有一定优势,提示上述型别具有较高致病性,尤其是感染率最高的 HPV16 亚型,随宫颈病变级别的增高其感染率明显上升,在宫颈炎和低度病变组分别为 3.82%和 4.60%,而在高度病变组和宫颈癌组的感染率高达 28.21%和 56.36%,组间差异有统计学意义($P<0.01$),说明 HPV16 致癌性更强。由此可见,HPV 基因型与宫颈癌病变程度明显相关,特别是高危型 HPV16、58、18、52、33 的持续性感染是导致宫颈癌发生的最主要原因之一[9]。

目前,HPV 多重感染与宫颈病变关系的研究较少。据报道,HPV 在宫颈鳞癌组织中的检出率为 99%,在宫颈鳞状上皮中为 94%。HPV 多重感染与宫颈病变呈正相关,随着宫颈病变级别增加,多重感染呈上升趋势,但宫颈癌除外[10]。多重感染表明,机体免疫清除机制清除病毒不利,预示病情进展。亦有研究显示,随宫颈病变级别增加,多重感染率趋于下降,且宫颈鳞癌 HPV 感染趋于单一高危型[11]。HPV 感染有四重、五重,甚至七重感染报道,在相关的研究中,从正常组织到 CIN Ⅱ的不同病变中,多型别感染比例随病变级别上升逐渐增加,由宫颈炎的 7.3%升高到 CIN Ⅲ的 14.3%,在 CIN Ⅱ及宫颈癌中比例有所下降,而仍高于宫颈炎组的比例。虽差异无统计学意义,但在一定程度上说明多型别感染对宫颈病变以及宫颈癌的发展起促进作用,有待进一步研究。本研究同时发现,HPV 多重感染有年龄集中趋势,小于 40 岁者 HPV 多重感染率较高($P<0.05$),可能与性生活频率、性伴侣数量多有关。

本研究利用 DNA 杂交技术这一高通量基因检测技术,仅需 1 次扩增,即可同时检测 23 种高、低危型 HPV DNA。该方法具有高通量、高灵敏度、特异性好、可监测多重感染等优点,可用于宫颈癌等疾病的早期预警和诊断,适用于大规模临床筛查及推广应用[12]。

参考文献

[1] Iftner T, Eberle S, Iftner A, et al. Prevalence of low-risk and high-risk types of human papillomavirus and other risk factors for HPV infection in Germany within different age groups in women up to 30 years of age: an epidemiological observational study[J]. J Med Virol, 2010, 82(11): 1928-1939.

[2] 虞善之,马刚. 宫颈上皮内瘤变的临床研究进展[J]. 右江医学, 2009, 38(4): 489-491.

[3] 黄庆,府伟灵,周玉,等. 基因芯片对人乳头瘤病毒的快速检测和分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(4): 476-478.

[4] 陈贤璟,宋一一,孙蓬明,等. 全酿酒酵母 HPV16-E7 疫苗的构建及免疫原性研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2009, 10(2): 123-126.

[5] 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.

[6] Torres LA, Rojo HG, Torres RA, et al. Cervical cancer: current view of its epidemiology and risk factors[J]. Ginecol Obstet Mex, 2004, 72: 466-474.

[7] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in yong women[J]. N Eng J Med, 1998, 338(7): 423-428.

[8] 黄进波,叶珊. 基因芯片检测人乳头瘤病毒 23 种亚型的应用评价[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2007, 21(2): 78-81.

[9] 孙蓬明,陈贤璟,林超琴,等. 应用导流杂交基因芯片技术检测人乳头状瘤病毒亚型的临床意义[J]. 海峡预防医学杂志, 2010, 16(1): 4-7.

[10] 陶萍萍,卞美璐,李敏,等. HPV 多重感染与宫颈病变关系探讨[J]. 妇产科临床杂志, 2006, 7(2): 94-96.

[11] Chang DY, Chen RJ, Lee SC, et al. Prevalence of single and multiple infection with human papillomaviruses in various grades of cervical neoplasia[J]. J Med Microbiol, 1997, 46(1): 54-60.

[12] 庞伟鸿,刘红杏,宁学玲,等. 基因芯片检测技术在女性生殖道 HPV 分型感染中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7): 630-631, 634.

(收稿日期:2011-01-20)

(上接第 1023 页)

[2] 潘虹,黄庆,府伟灵. EGFR 信号通路基因突变与非小细胞肺癌的靶向性治疗[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 869-871.

[3] Luo G, Huang S, Xie X, et al. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas[J]. Cancer Immun, 2002, 2: 11.

[4] Li M, Yuan YH, Han Y, et al. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 1809-1814.

[5] 贾正才,吴玉章. 肿瘤抗原 MAGE-A3 研究进展[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(3): 28-31.

[6] 刘庆伦,张昌卿,冯凯涛. 非小细胞肺癌 MAGE-A3 基因产物的表达[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(2): 138-140.

[7] 吴逸明,巴月,赵国强,等. 肺癌组织中黑色素瘤抗原-3 基因 mRNA 的表达[J]. 郑州大学学报:医学版, 2002, 37(2): 153-156.

[8] Wang RF, Zheng G, Samuel FJ, et al. T cell-mediated immune responses in melanoma: implications for immunotherapy[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 43(1): 1-11.

[9] 尤健,王长利. 肺癌的免疫治疗进展[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(17): 1015-1017.

[10] 刘庆伦,张昌卿,冯凯涛,等. 非小细胞肺癌 MAGE-A3 抗原的表达[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 127-129.

[11] 李秋泽,董子明,赵国强,等. 黑色素瘤抗原基因 *MAGE*-1、*MAGE*-3 和抑癌基因 *p*53 在肺癌中表达的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(8): 1106-1108.

[12] Sienel W, Varwerk C, Linder A, et al. Melanoma associated antigen(MAGE)-A3 expression in stages Ⅰ and Ⅱ non-small cell lung cancer: result of a multi-center study[J]. Eur J Candiothorac Surg, 2004, 25(1): 131-134.

(收稿日期:2011-03-05)