

• 调查报告 •

1 722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头瘤病毒基因的分型

董云灿¹, 耿建祥^{2△}, 张劲松², 王旭波², 李海², 兰建云², 张昶², 孟献威², 魏谨²

(1. 亚能生物技术(深圳)有限公司, 广东深圳 518057;

2. 南京中医药大学附属第三医院病理科 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

摘要:目的 探讨已婚女性宫颈细胞中 23 种人乳头瘤病毒(HPV)感染的基因分布情况及其临床意义。方法 采用基因扩增芯片技术对 1 722 例已婚女性的宫颈上皮细胞标本进行 23 种 HPV 基因型别的检测, 并对受检者进行相关资料分析。结果 1 722 例中检出 HPV 感染者 178 例, 总的 HPV 感染率为 10.34%(178/1 722), 其中单一型别的阳性检出率为 8.89%(153/1 722); 单一型别的感染中 HPV43 型为 27 例, 其阳性检出率为 1.57%(27/1 722), 是最主要的感染型别。混合型 HPV 感染 25 例, 其阳性检出率为 1.45%(25/1 722); 其中 HPV16 型+X 型 7 例及 16 型+X 型+X 型 2 例, 占混合型感染的 36.00%(9/25), 是混合型感染的主要型别, 其次是 HPV43 型的 2 型感染 6 例和 3 型感染 2 例, 占混合型感染的 32.00%(8/25)。结论 HPV43、58 型单一型别及 HPV16、43 型的混合型是感染的主要基因型别, 基因扩增芯片检测技术可应用于宫颈细胞标本, 一次性可检测 23 种 HPV 基因型别, 特异性强, 敏感性高。

关键词: 子宫颈; 人乳头瘤病毒; 基因分型; 基因芯片技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)07-0817-02

Analysis of human papillomavirus genotyping in 1 722 cervical cell samples of married women

Dong Yuncan¹, Geng Jianxiang², Zhang Jinsong², Wang Xuibou², Li Hai²,

Lan Jianyun², Zhang Chang², Meng Xianwei², Wie Jin²

(1. Biotechnology CO., Ltd of Shenzhen Yaneng, Shenzhen Guangdong 518057, China; 2. HPV Collaboration of Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing Jiangsu 210001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical distribution of 23 kinds of human papillomavirus(HPV) genotypes and its clinical significance. **Methods** Polymerase chain reaction and gene chip technology were utilized for the detection of 23 kinds of HPV genotypes in epithelial cell specimens from 1 722 cases of married women. And related materials of all subjects were analyzed. **Results** In 1 722 cases of subjects, the infection rate of HPV was 10.34%(178/1 722). The detection rate of single genotype infection was 8.89%(153/1 722), including 1.57%(27/1 722) for HPV43. The detection rate of mixed genotype infection was 1.45%(25/1 277), most of which were 7 cases of HPV16+X and 2 cases of HPV16+X+X, accounting for 36.00%(9/25), and mixed infection of subtype 2 and 3 of HPV43 were in 6 and 2 cases of subjects respectively, accounting for 32.00%(8/25). **Conclusion** HPV43, 58, HPV16+X or HPV16+X+X, HPV43+X or HPV43+X+X could be the main genotypes in 1 722 cases of married women. Gene chip technology could detect multiple HPV genotypes in cervical cell samples with high sensitivity and specificity, which might be useful for pathogenesis research and prevention of cervical cancer.

Key words: cervix uteri; human papillomavirus; genotype; Gene chip technology

现研究已证实, 高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈癌的主要致病因素^[1-5]。现采用基因扩增及基因芯片检测技术, 对已婚女性宫颈细胞标本进行 23 种常见的 HPV 基因检测, 以了解 HPV 感染和基因型别分布的情况, 以便为了解 HPV 流行趋势、HPV 与宫颈癌发生发展关系及高危人群的筛查、宫颈癌的干预治疗、HPV 疫苗及试剂的研发提供数据资料和参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 4~9 月该院体检的 1 722 例已婚女性的宫颈上皮细胞标本, 年龄 23~56 岁, 平均年龄 41.64 岁, 其中 20~29 岁 34 例, 30~39 岁 519 例, 40~49 岁 1 072 例(40~44 岁 585 例, 45~49 岁 487 例), 50~59 岁 97 例。

1.2 仪器与试剂 基因扩增仪为新加坡生产的 Gene Amp

PCR system 2400 型; 分子杂交仪为江苏省兴化市分析仪器厂生产的 FYY-3 型; 高速冷冻离心机为德国生产的 eppendorf 5810R 型; 生物安全柜为江苏省苏州市安泰空气技术有限公司生产的 BHC-1300 II A2 型; 青岛海尔有限公司生产的一 20℃ 冰箱等。HPV 基因分型检测试剂盒, 由亚能生物技术(深圳)有限公司提供。显色液须新鲜配制, 使用时按所需浓度加蒸馏水配制。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集及保存 采用窥阴器或阴道扩张器充分暴露宫颈, 用棉拭子擦去宫颈口过多的分泌物, 将采样宫颈刷置于宫颈口, 顺时针旋转宫颈刷 4~5 圈, 慢慢抽出, 以获得足够的宫颈上皮细胞标本, 然后沿刷柄折痕处折断刷头, 将宫颈刷头部放入洗脱管中, 旋紧洗脱管盖, 做好标本标识, 保持洗脱管

△ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

直立,放入-20℃冰箱保存待测。

1.3.2 DNA 的提取 将宫颈刷头充分漂洗后,把洗脱液全部移至 1.5 mL 的离心管中,13 000 r/min 离心 10 min 后,弃去上清液,保留管底的细胞。随后加入裂解液 50 μ L,充分振荡混匀,在金属浴中 100℃加热 10 min,立即 13 000 r/min 离心 10 min 后,取中间层 DNA 溶液待用。

1.3.3 PCR 扩增 将 PCR 反应管(20 μ L)3 000 r/min 离心 4 s 后依次编号,分别加入 2 μ L 矿物油和已提取的 DNA 样品、空白对照或阳性对照各 5 μ L,反应体系总体积 27 μ L,3 000 r/min 离心 4 s,上机扩增。扩增条件为 50℃15 min;95℃10 min;94℃30 s;42℃90 s;72℃30 s;共 40 个循环,72℃5 min。

1.3.4 杂交、孵育和显色 取 15 mL 离心管,放入标有样本编号的膜条,加入 5~6 mL A 液(2 $\times$ SSC,0.1%SDS)及所有 27 μ L PCR 产物,拧紧管盖,将离心管放入沸水浴中变性 10 min(确保 A 液液面完全位于沸水浴液面之下),取出并立即放入 51℃杂交箱内杂交 1.5 h。同时取 50 mL 离心管,加入 50 mL B 液(0.5 $\times$ SSC,0.1%SDS),于杂交箱预热。取出膜条,移至已预热的 B 液中,51℃轻摇洗涤 5 min,将膜条移至孵育液中室温孵育 30 min,弃去孵育液,用 A 液室温轻摇洗涤 2 次,每次 5 min,再用 C 液(0.1 mol/L 柠檬酸钠)轻摇洗涤 2 min;显色液(C 液 19 mL,TMB 1 mL,30% H_2O_2 2 μ L)中显色,至少 30 min,最后移至去离子水中浸泡即可观察结果。

1.4 统计学处理 应用统计软件包 SPSS 13.0 对相关数据进行统计学处理,率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法。

2 结果

对 1 722 例宫颈上皮细胞标本进行 23 种 HPV 基因分型,检出了 21 种 HPV 基因型别(除 44 型和 MM4 型外),HPV 阳性感染者 178 例,阴性者 1 544 例,总的 HPV 感染率为 10.34%(178/1 722),其中单一型别的阳性检出率为 8.89%(153/1 722);单一型别的感染中 HPV43 型为 27 例,阳性检出率为 1.57%(27/1 722),是最主要的感染型别,其次 HPV58 型为 18 例,阳性检出率为 1.05%(18/1 722);混合型 HPV 感染 25 例,阳性检出率为 1.45%(25/1 722);其中 HPV16 型+X 型 7 例及 16 型+X 型+X 型 2 例,占混合型感染的 36.00%(9/25),是混合型感染的主要型别,其次是 HPV43 型的 2 型感染 6 例和 3 型感染 2 例,占混合型感染的 32.00%(8/25)。153 例单一的 HPV 感染型别为 6 型 2 例、11 型 2 例、16 型 13 例、18 型 10 例、31 型 5 例、33 型 11 例、35 型 4 例、39 型 2 例、42 型 7 例、43 型 27 例、45 型 2 例、51 型 3 例、52 型 11 例、53 型 7 例、56 型 9 例、58 型 18 例、59 型 3 例、66 型 7 例、68 型 7 例、73 型 3 例。25 例混合型感染者中,21 例 2 种 HPV 感染型别为 11+66 型 1 例、16+18 型 1 例、16+33 型 3 例、16+42 型 2 例、16+58 型 1 例、18+33 型 1 例、18+43 型 2 例、31+43 型 1 例、33+43 型 1 例、35+51 型 1 例、35+73 型 1 例、43+52 型 1 例、43+83 型 1 例、45+66 型 1 例、52+53 型 1 例、52+56 型 1 例、53+66 型 1 例。4 例 3 种 HPV 感染型别为 11+16+68 型 1 例、11+33+58 型 1 例、16+35+43 型 1 例、18+33+43 型 1 例。

3 讨论

宫颈癌是目前人类所有癌症中唯一病因明确的癌症,也是第一个可防、可控、可干预治疗的癌症。现研究表明,HPV 病

毒感染是引起宫颈癌及其癌前病变的主要因素,99.7%的宫颈癌患者都可检测到 HPV DNA,全球超过 2/3 的宫颈癌病例是由高危型 HPV 病毒引起的^[1-5]。分子流行病学调查显示,高危型 HPV 导致宫颈癌的概率约为 1.00%,而低危型 HPV 导致宫颈癌的概率仅为 0.10%^[6]。早期诊断、早期治疗对预防和治疗有着非常重要的意义^[7-8]。

研究表明约 80%以上有性行为的女性在其一生的某个阶段都曾感染过 HPV,但绝大多数的感染者在感染 HPV 后 6~12 个月内可自行消退,1 年后 HPV 持续感染率为 30%,2 年后仅为 9%。只有 HPV 持续性感染才是诱发宫颈上皮恶性转化的最重要的危险因素^[9]。一项针对 HPV 的流行病学调查发现,13 个不同国家的 15~74 岁的女性中,6.6%的 HPV 携带者,其细胞学检查结果为正常。通过对 4 504 例因 HPV 感染引起鳞状上皮非典型增生和鳞状上皮内低度病变的女性进行随访,发现 99%的 HPV 感染者在 2 年内得以清除,而感染持续超过 6 个月者易发生癌变^[10-11]。

本研究表明:(1)本调查的宫颈上皮细胞中既有单一型别的 HPV 感染,也有混合型别的 HPV 感染,以单一型别感染为主。(2)单一型别的 HPV 感染中,以 43 型为主,其次为 58 型;混合型别的感染中,以 HPV16 型+X 型及 16 型+X 型+X 型为主,其次是 HPV43 型的 2 型和 3 型混合型感染。(3)所有 178 例 HPV 感染的女性中有 140 例(除 6 型 2 例、11 型 2 例、42 型 7 例、43 型 27 例外)都伴有高危型 HPV 感染,其总感染率为 8.13%(140/1 722)。(4)女性生殖道存在着一条 HPV 感染通道,宫颈是其通道中 HPV 感染最高的部位,也就是最易感部位。(5)1 722 例体检者中,29 岁以下的 34 例,HPV 感染率 11.77%(4/34);30~39 岁的 519 例,感染率 6.94%(36/519);40~49 岁的 1 072 例,感染率 11.57%(124/1 072);50 岁以上的 97 例,感染率 14.43%(14/97)。提示 HPV 感染存在着两个高峰,一个在 29 岁以下,一个在 50 岁以上。(6)本调查结果将为宫颈及肛门区 HPV 感染的预防、治疗,疫苗和诊断试剂的研发以及分子流行病学调查提供理论依据。(7)位居单一和混合感染前 5 位的 HPV 型别是必须重点关注和监测的型别。(8)HPV44 型和 MM4 型这两型不是宫颈感染较常见的型别。

目前通过宫颈 HPV 基因检测、宫颈细胞学检查、阴道镜检查及宫颈活组织检查等,已使发达国家及大城市女性宫颈癌的发病率开始呈现下降的趋势。宫颈癌很可能会成为人类第一个可进行有效预防的恶性肿瘤,这将需进一步深入研究^[1,9-11]。

参考文献

- [1] 耿建祥,王旭波.人乳头瘤病毒检测及其临床应用[M].北京:人民卫生出版社,2009:381-427.
- [2] 兰建云,邵伟伟,袁苏娟,等.外耳道乳头状瘤中的人乳头瘤病毒检测及其临床意义[J].医学研究生学报,2010,23(4):391-393.
- [3] 张金浩,耿建祥,吴崑崙,等.结直肠肿瘤中 HPV 感染的基因分析[J].医学研究生学报,2011,24(2):391-393.
- [4] 李海,邓志勇,张阳,等.人乳头状瘤病毒在阴茎鳞癌组织中的表达及意义[J].现代实用医学,2010,22(9):391-393.
- [5] 王建英,范明明,吴效科,等.人乳头状瘤病毒感染及端粒酶 hTERT 表达与宫颈癌关系的研究进展[J].医学研究生学(下转第 820 页)

续表 1 各年龄段男、女性血细胞参考值结果比较(±s)

性别	年龄(岁)	例数(n)	RBC(×10 ¹² /L)	Hb(g/L)	HCT	WBC(×10 ⁹ /L)	PLT(×10 ⁹ /L)
	5~	692	4.485±0.352 5	118.6±7.83	0.360±0.021 1	8.436±1.886 3	311.9±62.28
	6~	568	4.471±0.348 3	119.1±7.15	0.364±0.017 6	8.381±1.732 7	323.1±68.48

表 2 各年龄段儿童血细胞参考值结果比较(±s)

年龄(岁)	例数(n)	RBC(×10 ¹² /L)	Hb(g/L)	HCT	WBC(×10 ⁹ /L)	PLT(×10 ⁹ /L)
3~	272	4.520±0.430 2	116.6±7.76	0.352±0.002 6	8.917±1.891 5	304.8±63.73
4~	968	4.498±0.380 5	119.0±7.33	0.358±0.018 8	8.952±1.757 0	315.6±72.48
5~	1 720	4.501±0.372 4	119.2±7.69	0.360±0.020 0	7.982±1.761 6	305.7±65.44
6~	1 428	4.524±0.362 3	120.1±7.63	0.363±0.019 6	8.129±1.500 5	318.5±57.58

3 讨 论

本组调查佛山地区学龄前儿童的血液常规 5 项基本值的参考范围与《全国临床检验操作规程》(3 版)的参考值比较,本组调查的 Hb 范围明显较低、RBC 范围较高,其他项目都与其参考范围差异不大。而《全国临床检验操作规程》(3 版)未单独列出儿童 HCT 参考范围,本组调查的 HCT 接近女性的参考范围。总体而言,佛山地区学龄前儿童的 RBC 较小、色素低,这与地区的地理气候条件,生活、饮食习惯都有一定关系。佛山位于低海拔、低纬度的平原地区,气候温和,人体受外界环境的刺激较高海拔、高纬度地区少。与倪林仙等^[2]调查的 1 000 例昆明健康儿童的参考值比较,相同年龄段的男、女性的 Hb 和 HCT 的参考值均低于昆明地区。可能是昆明地处高海拔,RBC 系统由于缺氧代偿所致。另外,与沈亚娟等^[3]调查的济南市槐荫区 767 例健康儿童的参考范围比较,RBC 计数与其相近,而 Hb 和 HCT 都显著低于其参考范围。说明各个地区都存在一定的差异,各个地区需制定各自的参考范围。从各年龄段分析,Hb 和 HCT 都随年龄的增长而增加,且增加明显,各年龄段差异有统计学意义($P<0.05$);WBC 计数随年龄的增长而下降。这都与其他地方的报道相符^[4]。学龄前儿童 HCT 正处于缓慢增加的阶段,要约 12 岁时才达到成人水平^[5-8]。该年龄段儿童由于男性雄性激素水平较低,促进 RBC 造血作用不明显,致使男、女性的差异无统计学意义($P>0.05$)。所以,在儿童期以前的参考范围男、女性都是合并在一起的。在 5~岁年龄段后明显下降,这一趋势符合从新生儿到成人逐渐下降^[9-10]。

参考文献

[1] 杨锡强,易著文. 儿科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004: 397-405.

[2] 倪林仙,马越明,刘雪,等. 正常儿童指血与静脉血血细胞参数参考值调查[J]. 上海医学检验杂志,2000,8(2):186-187.

[3] 沈亚娟,张之芬,刘静,等. 济南市槐荫区 767 例健康儿童指血血细胞参数参考范围调查[J]. 江西医学检验,2003,16(9):95-96.

[4] 金芳,王艳,王于芳,等. 北京地区幼儿血细胞参考范围的调查[J]. 中国基层医药,2009,3(2):2180-2181.

[5] 杨必清,潘云华,燕红,等. 青少年儿童静脉血血细胞各参数调查分析[J]. 中国当代医药,2011,32(18):152-154.

[6] 杜煜,杨可,杜青,等. Sysmex XT-2000i 全血细胞分析仪计数白细胞提示 IP 警示的准确性评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,30(6): 1222-1223.

[7] 徐燕,朱宝香,赵芋意,等. 不同民族儿童红细胞体积分布宽度参考值探讨[J]. 国际检验医学杂志,2011,30(11):1896-1897.

[8] 丛玉隆,金大鸣,郑勇,等. 中国人群成人静脉血细胞分析参考范围调查[J]. 中华医学杂志,2003,41(9):1201-1205.

[9] 张雪琳. 桂林市 1 929 例儿童红系相关参数和贫血状况分析[J]. 现代中西医结合杂志,2011,6(4):2410-2411.

[10] 陈小剑,王晓欧,赵芝华,等. 浙南地区 11~14 岁儿童血红蛋白参考范围的建立[J]. 医学研究杂志,2011,3(8):63-65.

(收稿日期:2012-01-07)

(上接第 818 页)

报,2008,21(12):1321-1324.

[6] 范文生,李亚里,杨怡卓,等. 基因芯片技术检测宫颈病变中 HPV 感染的临床研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(7):745-747.

[7] 毕蕙,赵健,陈锐,等. 宫颈上皮内瘤变患者人乳头状瘤病毒感染亚型的分布差异[J]. 中国实用女性与产科杂志,2010,26(6):367-370.

[8] 赵方辉,章文华,潘秦镜,等. 宫颈癌多种筛查方案的研究[J]. 中华肿瘤杂志,2010,32(6):420-424.

[9] Giuliano AR, Tortolero LG, Ferrer E, et al. Epidemiology of hu-

man papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditionns[J]. Vaccine,2008,26(1):17-28.

[10] Zhao R, Zhang WY, Wu MH, et al. Human papillomavirus infection in Beijing, Peoples Republic of China; a population-based study[J]. Br J Cancer,2009,101(9):1635-1640.

[11] Jiang P, Liu J, Zeng X, et al. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women[J]. Cancer Genet Cytogenet,2010,197(2):174-178.

(收稿日期:2012-01-04)