

• 基础实验研究论著 •

某市 2 109 例女性宫颈细胞中 HPV 基因型别的研究

任晓慧¹,耿建祥^{2△},李海²,张劲松²,王旭波²,兰建云²,张昶²,赵雪²,魏谨²

(1. 广东省深圳市妇幼保健院保健部 518000; 2. 南京中医药大学

第三附属医院病理科 HPV 协作组 210001)

摘要:目的 人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的主要致病原因。本文旨在探讨深圳市女性宫颈细胞中 23 种 HPV 感染的基因型分布情况。方法 从深圳市妇幼保健院体检中心的 2 109 例女性宫颈上皮细胞标本中提取 23 种 HPV DNA, 采用基因扩增及基因芯片技术对其宫颈细胞中的 23 种 HPV 基因型别进行检测, 并对受检者的感染情况进行分析。结果 2 109 例女性宫颈上皮细胞标本中检出 HPV 感染者 446 例, 总的 HPV 感染率为 21.15% (446/2 109), 其中单一型别的阳性检出率为 15.32% (323/2 109); 单一型别的感染中 HPV52 型为 47 例, 其阳性检出率为 2.23% (47/2 109), 其次是 HPV43 和 58 型均为 38 例, 其阳性检出率均为 1.80% (38/2 109), 是单一型别感染中最主要的型别。混合型 HPV 感染 123 例, 其阳性检出率为 5.83% (123/2 109); 其中 HPV16+43、HPV16+58 型各 5 例, 均占混合型感染的 4.07% (5/123), 其次是 HPV43+52、HPV43+56、HPV43+66 型的二重感染各 3 例, 均占混合型感染的 2.44% (3/123), 是混合型感染的主要型别。结论 HPV43、HPV52、HPV58 单一型别及 HPV16+43 和 HPV16+58 型是感染深圳市女性宫颈细胞的主要基因型别, 基因芯片检测技术可应用于宫颈细胞标本, 一次可检测 23 种 HPV 基因型别, 特异性强, 敏感性高, 对中国女性宫颈 HPV 感染基因型的分子流行病学的调查研究具有重要的意义。

关键词:人乳头瘤病毒; 宫颈细胞; 基因分型; 基因芯片技术; 女性**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.003**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)13-1542-03**Genotyping of human papillomavirus in cervical cell samples from 2 109 cases of women in certain city**Ren Xiaohui¹, Geng Jianxiang^{2△}, Li Hai², Zhang Jinsong², Wang Xubo²,Lan Jianyun², Zhang Chang², Zhao Xue², Wei Jin²

1. Department of Health, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China;

2. HPV Collaboration of Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210001, China

Abstract: Objective To study the genotypes distribution of human papillomavirus (HPV) in cervical cell samples of women in Shenzhen City. **Methods** 23 types of HPV DNA were extracted and detected in cervical cell samples from 2 109 cases of women in Center of Physical Examination, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital, by means of polymerase chain reaction (PCR) and gene-chips technique. Infection states among all subjects were also analyzed. **Results** The total infection rate of HPV was 21.15% (446/2 109). Single infection rate of HPV was 15.32% (323/2 109), including 2.23% (47/2 109) of HPV52 and 1.80% (38/2 109) of HPV43 or 58. Mixed infection rate of HPV was 5.83% (123/2 109), including 4.07% (5/123) of HPV16+43 or HPV16+58 and 2.44% (3/123) of HPV43+52, HPV43+56 or HPV43+66. **Conclusion** HPV52, 43, 58, 16+43, 16+58 might be the main genotypes in cervical cells of women in Shenzhen City. Gene-chips technique could be used for detecting 23 HPV genotypes in cervical cell samples with high sensitivity and specificity, which might be useful for molecular epidemiology investigation of cervical infection caused by HPV in Chinese women.

Key words: human papillomavirus; cervical cell; genotyping; gene chip technology; female

宫颈癌是威胁女性健康的第二大恶性肿瘤, 全世界每年新增宫颈癌患者约 50 万。中国每年新增宫颈癌患者超过 13 万, 死亡约 5 万。因此, 早期发现、早期诊断、早期治疗是降低宫颈癌死亡率的关键。HPV 感染是宫颈癌的主要致病因素^[1-5], HPV 检测可捕获早期宫颈癌, 也是近年来国际医学界公认的一种快速、有效的检测方法, 可使宫颈癌早期检出率超过 90%^[6-8]。但是, 将 HPV 检测应用到中国妇女的宫颈癌早期筛查, 目前还缺少基础数据, 其中包括中国一般人群中 HPV 感染基因谱的分布状况。由于 HPV 感染存在着地域和种族的差异性, 而且中国地域辽阔, 应该在每个省、市、自治区建立一个 HPV 感染型别的基因数据库。目前, 国际上已经认定的

高危型 HPV 是否在中国具有类似的致癌性, 不同类型的 HPV 在中国人群中病毒载量的阈值等问题都需要逐一解决。此外, 尽管目前许多国家已开始使用疫苗来防治宫颈癌, 但是这项工作在中国还难以做到, 这需要弄清全国各省、市、自治区 HPV 感染基因谱后才能确定应用哪种疫苗。现阶段, 对中国宫颈癌、癌前病变及自然女性人群进行 HPV 感染基因谱分布规律的大样本、多中心的分子流行病学研究是 1 项非常紧迫且重要的任务。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 1 月至 2011 年 12 月深圳市妇幼保健院体检中心的 2 109 例女性的宫颈上皮细胞标本; 年龄

20~70 岁,平均 37.22 岁。将其分成 7 组,并进行 HPV 感染率比较,其中年龄 20~≤30 岁 522 例,>30~≤35 岁 385 例,>35~≤40 岁 395 例,>40~≤45 岁 355 例,>45~≤50 岁 224 例,>50~≤60 岁 189 例,>60~≤70 岁 39 例。由 2 位经验丰富的技术人员按照说明书规范操作。

1.2 仪器与试剂 HPV 基因分型检测试剂盒由深圳亚能生物技术有限公司提供;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。

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,做好标志,保持采集管直立,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,把洗脱液全部转移至 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 μL,充分振荡混匀,在金属浴中加热 100℃ 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 μL)3 000 r/min 离心 4 s 后依次编号,分别加入 2 μL 矿物油和已提取的 DNA 样品、空白对照、阳性对照各 5 μL,反应体系总体积 27 μL,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×SSC,0.1% SDS)及所有 27 mL 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×SSC,0.1% SDS)于杂交箱预热。取出膜条,转移至已预热的 B 液中,51℃ 轻摇洗涤 5 min,将膜条转移至孵育液(A 液:POD=2 000:1,4 张膜可用 6 μL POD 配制成 12 mL 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% H₂O₂ 2 μL)中显色至少 30 min;转移至去离子水中浸泡即可观察结果。按试剂盒说明书进行结果的判定。

2 结 果

2 109 例女性宫颈上皮细胞标本中 23 种 HPV 基因分型检测出 23 种 HPV 基因型别,HPV 阳性感染者 446 例,阴性者 1 663 例,总的 HPV 感染率为 21.15%(446/2 109),其中单一型别的阳性检出率为 15.32%(323/2 109);单一型别的感染中 HPV52 型为 47 例,其阳性检出率为 2.23%(47/2 109),其次 HPV43 和 HPV58 型均为 38 例,其阳性检出率均为 1.80%(38/2 109),是单一感染最主要的型别。混合型 HPV 感染 123 例,其阳性检出率为 5.83%(123/2 109),其中 HPV16+43、HPV16+58 型各 5 例,均占混合型感染的 4.07%(5/123),其次是 HPV43+52、HPV43+56、HPV43+66 型的二重感染各 3 例,均占混合型感染的 2.44%(3/123),是混合型感染的主要型别。

3 讨 论

HPV 主要通过直接或间接接触污染物品或性传播方式感染人类。现研究表明,几乎所有宫颈癌都与 HPV 感染相关,HPV 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 的 DNA,全球超过 2/3 的宫颈癌病例是由高危型 HPV 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]。现已发现 HPV 和乳头瘤病毒有二百六十多种基因型,至今已鉴定出一百多种。目前,世界卫生组织(WHO)、国际癌症研究学会(IARC)根据 HPV 致癌危险性的高低将其分为低危型和高危型两大类,低危型:主要引起低度宫颈上皮内瘤变和皮肤及外生殖器的外生性疣类病变,其病毒型别主要有 HPV6、HPV11、HPV30、HPV42、HPV43、HPV44 型等;高危型:除可引起外生殖器疣外,更重要的是引起宫颈癌、高度宫颈上皮内瘤变及外生殖器癌,其病毒型别主要有 HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68、HPV73 型等^[1-6]。本文采用基因扩增及基因芯片检测技术,以 23 种常见的 HPV 作为感染源,对 2 109 例女性宫颈细胞标本进行基因检测,并对其感染基因谱分布情况进行总结和分析。

本研究表明,2 109 例女性宫颈上皮细胞标本中检测出 23 种 HPV 基因型别,HPV 阳性感染者 446 例,阴性者 1 663 例,总的 HPV 感染率为 21.15%(446/2 109)。以上结果表明:(1)深圳市女性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,混合型别感染为辅,单一型(323 例)和混合型(123 例)之比为 2.63:1,尤其出现了其他地区罕见的五重、六重及七重感染,说明深圳市女性单一型感染齐全,而且混合型感染呈现多型组合趋势,特别是三重以上型别的感染比例比其他地区要高得多,值得深入分析和研究。(2)目前,中国还没有全国性的宫颈 HPV 感染发生率的确切资料,部分区域性的研究表明,宫颈 HPV 感染发生率在山西省为 14.8%^[9],台湾南部为 19.3%^[10],西藏自治区为 9.19%^[11]。本研究结果提示,深圳市妇女宫颈 HPV 感染率为 21.15%,明显高于文献报道的中国其他地区。可能因深圳市位于中国的南方,且温暖潮湿,人口密度较大,社会的开放程度又比较高,特别适合 HPV 生长、繁殖和传播,从而导致人群中女性 HPV 感染率偏高,值得持续关注和监测。(3)所有 446 例 HPV 感染阳性的深圳市女性中有 362 例(除 HPV6 型 18 例、HPV11 型 7 例、HPV42 型 17 例、HPV43 型 38 例、HPV44 型 1 例,HPV6+43 型、HPV11+43 和 HPV11+44 型各 1 例外),都伴有高危型 HPV 感染,其总感染率为 17.17%(362/2 109),高、低危之比为 4.31:1,而这些高危型 HPV 感染往往是宫颈癌前病变及宫颈癌的主要诱发因素。因此,对所有伴有高危型 HPV 感染的女性进行其 HPV 感染型别的追踪检测就显得非常必要,如果其成为持续性感染者,就会成为 HPV 的传染源,而且宫颈癌前病变及宫颈癌发生的风险将会大大增加,应引起医务工作者的高度重视。(4)现研究表明,女性生殖道中存在着一条 HPV 感染通道,由于宫颈处于鳞腺上皮交界处,易损伤、糜烂且温暖潮湿,为 HPV 提供了极佳的感染条件,这就决定了宫颈是该通道中 HPV 感染率最

高的部位,也就是最易感染部位。(5)本研究 2 109 例女性中,不同年龄段感染情况显示,深圳市女性宫颈细胞 HPV 感染存在着两个高峰,一个在 30 岁以下呈现的小高峰,一个在大于 50~≤60 岁年龄段呈现的大高峰。以往女性在 50、60 岁出现两个宫颈癌患病高峰,现发现较多的 30 岁以下宫颈癌及其癌前病变的患者。由于女性在 35 岁以后开始进入宫颈癌的高发期,本研究 HPV 感染率从 30 岁以下的 18.58%,到 60 岁以上的 28.21%,其感染率呈现类似两个连接的“S”型曲线。即从 30 岁以下的小高点先下降,降至大于 30~≤35 岁最低点后曲线逐渐攀升,大于 40~≤45 岁曲线稍微降低,曲线又从大于 45~≤50 岁一直上升,至大于 50~≤60 岁曲线的最高点,60 岁以上曲线又开始稍下降。据流行病学调查发现,国内女性患宫颈癌以 36~56 岁最为集中,但是近年来,中国宫颈癌也呈现年轻化的趋势,而 40 岁以上的女性多数为 HPV 的持续感染者。从 HPV 感染率的曲线图来看,与宫颈癌的高发年龄段相吻合。而 30 岁以下的 HPV 感染率为 18.58%,35~59 岁 HPV 感染率呈不断攀升的曲线图,这与发病人群呈现低龄化的趋势相吻合,比较合理地解释了中国宫颈癌发病以 36~56 岁的女性最为集中,且呈低龄化趋势的现象。(6)由于不同致病型别的 HPV 在不同的国家和地区以及各民族之间都存在着一定的差异性,南京中医药大学第三附属医院病理科 HPV 协作组正在筹建宫颈及肛门区 HPV 感染的细胞和组织基因数据库,这将为中国宫颈及肛门区 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重要的实验依据,也为政府公共卫生政策的制定提供重要的数据资料。(7)本研究单一 HPV 感染前 5 位的型别为 HPV52 型 47 例、HPV43 型 38 例、HPV58 型 38 例、HPV16 型 29 例、HPV56 型 23 例;二重感染前 5 位的型别为 HPV16+43 型 5 例、HPV16+58 型 5 例、HPV43+52 型 3 例、HPV43+56 型 3 例、HPV43+66 型 3 例。这 10 种型别是深圳市女性宫颈细胞感染频率最高的类型,也是值得重点关注和监测的型别。(8)本研究 2 109 例深圳市女性宫颈上皮细胞标本中 23 种 HPV 基因分型检测出 23 种 HPV 基因型别,但 HPV44、HPV73、MM4、HPV83 型 4 种基因型检出率最低,说明这 4 型不是深圳市女性宫颈感染较常见的型别,提示试剂生产厂商应扩大其他相对常见的 HPV 型别,以满足宫颈癌前病变及宫颈癌筛查的需要。

由于宫颈癌的患病对象都是女性,但是无论女性本身,还是其另一半,都对宫颈癌的发病负有不可推卸的责任。性生活过早、多个性伴侣一直被认为是宫颈癌高发的两大因素。只要有性生活的女性,就可能存在患宫颈癌的风险。宫颈癌的 HPV 感染开始于男性,男性住酒店、洗桑拿、坐浴缸、裸睡,都很容易感染 HPV,再通过性生活把此病毒送入女性的阴道中,使得 HPV 在宫颈“落地生根”。由于 HPV 可在两性之间互相传播,所以,如果给男性接种 HPV 疫苗,预防的效果可能比只给女性接种好,给男性接种 HPV 疫苗不仅可以防止他们今后

将病毒传染给伴侣,同时还可帮助其预防生殖器官和肛门部位发生的癌变。随着人们对 HPV 致癌、致瘤机制日益深入的研究,将有助于预防性和治疗性多价疫苗的成功开发和应用,此类疫苗具有广阔的应用前景,并可逐渐减少宫颈癌及其他癌对人类健康的威胁,而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,这将造福于广大的已婚女性^[1,4,12-14]。

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,吴崑岚,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):154-157.
- [4] 李海,邓志勇,张阳,等.人乳头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):1037-1038.
- [5] 王建英,范明伟,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].中国实用妇科与产科杂志,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] Dai M, Ban YP, Li N, et al. Human papillomavirus infection in Shanxi province, People's Republic of China: a population-based study[J]. Br J Cancer, 2006, 95(1):96-101.
- [10] Lin H, Ma YY, Moh JS, et al. High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan[J]. Gynecol Oncol, 2006, 101(1):40-45.
- [11] 靳琼,沈铿,李辉,等.西藏自治区妇女子宫颈人乳头瘤病毒感染现状调查及相关因素分析[J].中华妇产科杂志,2009,44(12):898-902.
- [12] Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditionns[J]. Vaccine, 2008, 26(1):17-28.
- [13] Zhao R, Zhang WY, Wu MH, et al. Human papillomavirus infection in Beijing, People's Republic of China: a population-based study[J]. Br J Cancer, 2009, 101(9):1635-1640.
- [14] 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:2012-01-07)