

• 调查报告 •

1 827 例女性宫颈细胞 HPV 感染基因型分析

李 丽¹, 王志蕙², 耿建祥^{2△}, 朴正爱², 肖 蔚², 龙秀荣², 万美珍², 兰建云², 张 昶²

(1. 苏州大学附属第一医院妇产科研究室, 江苏苏州 215006 ; 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 探讨苏州地区女性宫颈细胞中 23 种人乳头瘤病毒(HPV)感染的基因型分布情况及其临床意义。方法 采用基因扩增结合基因芯片技术对 1 827 例女性宫颈细胞标本进行 23 种 HPV 基因型别的检测, 并对其受检者进行相关资料分析。结果 1 827 例中检出 HPV 感染者 611 例, 总的 HPV 感染率为 33.44%, 其中 1 种型别感染的阳性检出率为 22.44%; 1 种型别感染中 HPV16 型为 114 例, 其阳性检出率为 6.24%, 是最主要的感染型别; 其次 HPV58 型为 48 例, 其阳性检出率为 2.63%; 多重 HPV 感染 201 例, 其阳性检出率为 11.00%; 其中多重 HPV16 型 68 例, 占多重感染的 33.83%, 是多重感染的主要型别, 其次是多重 HPV11 型 32 例, 占多重感染的 15.92%。结论 HPV16 型、58 型 1 种型别及 16 型和 11 型多重型别是感染苏州地区女性宫颈细胞感染的主要基因型别, 基因扩增结合基因芯片技术一次可检测 23 种 HPV 基因型别, 特异性强, 敏感性高, 可应用于宫颈细胞标本 HPV 感染的检测。

关键词:子宫颈; 乳头状瘤病毒科; 基因型; 生物技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)23-2884-03

Analysis on human papillomavirus genotyping in 1 827 cervical cells of women

Li Li¹, Wang Zhihui², Geng Jianxiang^{2△}, Piao Zheng'ai², Xiao Wei²,
Long Xiurong², Wan Meizhen², Lan Jianyun², Zhang Chang²

(1. Research Home of Obstetricians and Gynecologists, First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, 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 cervical cell specimens from 1 827 cases of women in Suzhou region. And related materials of all subjects were analyzed. **Results** In 1 827 cases of subjects, the infection rate of HPV was 33.44%(611/1 827). The detection rate of single genotype infection was 22.44%(410/1 827), including 6.24%(114/1 827) for HPV16 and 2.63%(48/1 827) for HPV58. The detection rate of multiple genotype infection was 11.00%(201/1 827), most of which were 16 types multiple infection, accounting for 33.83%(68/201), and 11 types multiple infection, accounting for 15.92%(32/201). **Conclusion** HPV 16 and 58 single types, HPV16 and HPV11 multiple types are the main genotype of 1 827 cases of women. Gene chip technology can detect single and 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; papillomaviridae; genotype; biotechnology

人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌的主要致病因子。以致 HPV 已成为全世界病毒致癌领域研究的热点^[1]。本文采用基因扩增及基因芯片检测技术, 对 1 827 例女性宫颈细胞标本进行 23 种常见的 HPV 基因检测, 以了解苏州地区女性宫颈细胞中 HPV 感染和基因型分布的情况, 以便为 HPV 流行趋势的预测、HPV 疫苗及试剂的研发, 甚至政府部门对公共卫生政策的决策提供数据资料和参考。

1 资料和方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 6 月至 2012 年 5 月苏州大学附属第一医院妇产科的 1 827 例女性的宫颈上皮细胞标本, 年龄 19~74 岁, 平均年龄 39.69 岁, 其中 19~29 岁 529 例、30~34 岁 337 例、35~39 岁 275 例、40~44 岁 290 例、45~49 岁 207

例、50~54 岁 88 例、55~59 岁 73 例、60 岁以上 28 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

△ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

头部放入洗脱管中,旋紧洗脱管盖,做好标本标识,保持采集管直立,放入 -20°C 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°C 10 min,立即 13 000 r/min 离心 10 min 后,取中间层 DNA 溶液待用。PCR 扩增、杂交、孵育和显色按照说明书进行操作,显色后可观察结果。

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

本研究检出了 21 种 HPV 基因型别(除 44 型和 MM4 型外),其 HPV 阳性感染者 611 例,阴性者 1216 例,总的 HPV 感染率为 33.44%(611/1 827),其中一重感染的阳性检出率为 22.44%(410/1 827);一重感染中 HPV16 型为 114 例,其阳性检出率为 6.24%(114/1 827),是最主要的感染型别;其次 HPV58 型为 48 例,其阳性检出率为 2.63%(48/1 827);多重 HPV 感染 201 例,其阳性检出率为 11.00%(201/1 827);其中多重 HPV16 型 68 例,占多重感染的 33.83%,是多重感染的主要型别,其次是多重 HPV11 型 32 例,占多重感染的 15.92%。410 例一重 HPV 感染型别分别为 6 型 20 例、11 型 18 例、16 型 114 例、18 型 23 例、31 型 20 例、33 型 19 例、35 型 11 例、39 型 2 例、42 型 7 例、43 型 33 例、45 型 2 例、51 型 2 例、52 型 32 例、53 型 4 例、56 型 13 例、58 型 48 例、59 型 10 例、66 型 17 例、68 型 13 例、73 型 1 例、83 型 1 例。二重 HPV 感染者 149 例,三重 HPV 感染者 40 例,四重 HPV 感染者 9 例,五重 HPV 感染者 2 例,八重 HPV 感染者 1 例。

3 讨 论

HPV 属乳头瘤病毒科,是一类特异感染人类上皮、黏膜的微小共价双链环状 DNA 病毒。现已发现 HPV 有 200 多个型别、亚型及变体,至今已鉴定出一百多种^[1-5]。人类是 HPV 的唯一宿主^[1]。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]。本研究选择了 23 种常见致癌型别的 HPV 作为研究的感染源,采用高通量的分型检测技术对苏州地区 1 827 例女性的宫颈细胞标本进行了 23 种 HPV 基因分型的研究和分析。

由于 HPV 感染分布存在着种族和地域的差异性^[1-4]。因此,应尽快弄清国内各地区 HPV 感染的流行度及 HPV 流行优势型别的分布情况,尤其是多中心大样本的分子流行病学的研究,这将对了解各地区 HPV 感染流行度及其流行优势型别基因库的建立起到标志性的作用,同时也为今后国内各地区 HPV 感染流行度及其流行优势型别的比对提供重要的数据资料及可比依据。

中国每年新发妇女宫颈癌病例 13 万以上,大约占世界的 1/5 以上。女性在 35 岁以后开始进入宫颈癌的高发期,尤其近十年来女性发病人群呈现低龄化的趋势,发病率以每年 2%~3% 的速度递增。因此,早期诊断、早期治疗对预防、治疗宫颈癌有着非常积极重要的意义^[7-8]。

本研究表明(1)苏州地区女性中即有一重型别的 HPV 感染,也有多重型别的 HPV 感染,以一重感染为主,多重感染为

辅。一重感染 410 例、多重感染 201 例,两者之比为 2.04 : 1,多重感染中以二重感染(149 例)和三重感染(40 例)为主,两者占多重感染的 94.03%(189/201),说明苏州地区女性一重感染类型丰富,而多重感染呈现出不断增加的趋势,特别是二、三重感染的比例比其他地区要高得多,尤其出现了其他地区非常罕见的八重感染,值得分析和研究。(2)一重 HPV 感染 410 例,其前 8 位感染型别分别为 16 型 114 例(占 27.81%);58 型为 48 例(占 11.71%);43 型为 33 例(占 8.05%);52 型为 32 例(占 7.81%);18 型为 23 例(占 5.61%);6 和 31 型均为 20 例(均占 4.88%);33 型为 19 例(占 4.63%);提示苏州地区 16、58、43、52、18、6、31、33 型为一重感染的主流型别,占一重感染的 75.37%(309/410)。(3)多重 HPV 感染 201 例,其阳性检出率为 11.00%(201/1 827);其前 8 位感染型别分别为 16 型 68 例(占 33.83%);HPV11 型 32 例(占 15.92%);HPV6 型 29 例(占 14.43%);HPV33 型 27 例(占 13.43%);HPV43 型 26 例(占 12.94%);HPV52 型 23 例(占 11.44%);HPV18 型 15 例(占 7.46%);HPV35 型 12 例(占 5.97%);提示苏州地区 16、11、6、33、43、52、18、35 型是多重感染的主要类型,其他多重感染也同步增加,主要以二重和三重感染为主。本研究结果提示苏州地区女性宫颈 HPV 感染率为 33.44%(611/1 827),明显高于深圳地区的 21.15%(446/2109)^[9]和南京地区的 10.34%(178/1722)^[10],提示苏州地区紧邻大都市上海,人口密度较大,社会的开放程度又比较高,常住的外来人口多,特别适合 HPV 生长、繁殖和传播,从而导致一般女性人群中 HPV 感染率较高,其流行度为高度流行,值得关注和监测。(4)实际上,女性生殖道存在着一条 HPV 感染的通道,宫颈是该通道中 HPV 感染率最高的部位,也就是最易感部位。从宫颈癌的病因学来看,宫颈癌是一种性传播性疾病,也就是说,性伴侣越多,性生活越早,HPV 感染率也就越高,宫颈癌的发病率也会随之增高^[1,8]。(5)本文 1 827 例女性中,29 岁以下的 529 例,HPV 感染率 31.57%(167/529);30~34 岁的 337 例,HPV 感染率 26.71%(90/337);35~39 岁的 275 例,HPV 感染率 32.73%(90/275);40~44 岁的 290 例,HPV 感染率 34.83%(101/290);45~49 岁的 207 例,HPV 感染率 38.16%(79/207);50~54 岁的 88 例,HPV 感染率 46.59%(41/88);55~59 岁的 73 例,HPV 感染率 50.69%(37/73);60 岁以上的 28 例,HPV 感染率 21.43%(6/28);提示苏州地区女性宫颈细胞 HPV 感染存在着两个高峰,一个在 29 岁以下,一个在 59 岁以下。本文 1 827 例受检者中 19~29 岁 529 例,占 28.96%(529/1 827);35~59 岁 933 例,占 51.07%(933/1 827);两组占总人数的 80.03%。29 岁以下及 35~59 岁之间的女性 HPV 的高感染率与目前宫颈癌呈年轻化的趋势以及宫颈癌集中于 35~59 岁高发年龄段相吻合,因此,她们是宫颈癌防治及 HPV 基因监控检测的主要对象,需要我们给予重点关注。(6)研究表明,在宫颈细胞学诊断正常的人群中,亚洲地区的 HPV 为 16、18 和 33 型等,而南美洲为 HPV16、58 和 18 型等。从世界范围来看,HPV 感染的主要型别为 16、18 型,其感染率约占 60% 以上,但其他重要型别,如 HPV52、58、56、33 型等存在着较大的地域性差异,并呈不断上升的趋势^[6-11]。从本文一重和多重感染来看,除 11、31、35 和 58 型外,6、16、18、33、43、52 型别都出现在一重和多重感染的前 8 位中,在苏州地区无论一重

还是多重感染 16 型都排在第一位,其总感染率为 29.79% (114+68/611),而 18 型一重感染排第五,多重感染排第七,其总感染率为 6.22% (23+15/611),提示 16 型是该地区最主要 HPV 感染类型,同时也要重视 6、11、18、31、33、35、43、52、58 型别的流行度及流行趋势的变化。(7)南京和苏州两地同属江苏省,但两地一般人群中 HPV 感染存在着较大的差异性,经统计学处理, χ^2 值等于 273.74, P 值小于 0.01,提示两地 HPV 感染差异显著,有统计学意义。这种差异性值得对沪宁线的黄金走廊各地区 HPV 感染率进行逐一对比研究,以弄清楚 HPV 在各地区的感染率及其规律。以便为 HPV 流行趋势的预测、HPV 疫苗及试剂的研发,甚至政府部门对公共卫生政策的决策提供数据资料和参考。

目前发达国家已通过宫颈细胞的 HPV 基因及 DNA 定量细胞学检测、液基细胞学、阴道镜及宫颈活组织检查,使得宫颈癌的发病率和死亡率都明显的下降,而发展中国家在宫颈癌的普查方面还做得远远不够,这是导致发展中国家宫颈癌仍在上升的最主要原因^[11-15]。另一方面,宫颈 HPV 持续感染的干预治疗也是目前研究热点之一,尤其是中医药在干预治疗方面的应用值得深入研究,只有宫颈癌的普查和干预措施落实到位,才能真正的将发展中国家宫颈癌的发病率和死亡率降下来,造福于广大的发展中国家妇女。

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] 唐永发,耿建祥,张金浩,等.196 例肛门及肛管尖锐湿疣病变中 HPV 感染的研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(11):1303-1307.
[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] 严粉琴,耿建祥,肖蔚,等.已婚女性宫颈上皮细胞中人乳头瘤病毒基因分型 2000 例分析[J].实用妇产科杂志,2012,28(5):390-393.
[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] 任晓惠,耿建祥,李海,等.某市 2109 例女性宫颈细胞中 HPV 基因型别的研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(13):1519-1522.
[10] 董云灿,耿建祥,张劲松,等.1722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒基因的分型[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):817-820.
[11] 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.
[12] 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.
[13] 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.
[14] 郎景和.妇科癌瘤临床诊治的挑战与对策[J].中国癌症防治杂志,2012,4(1):1-4.
[15] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2):195-208.

(收稿日期:2012-6-13)

(上接第 2883 页)

质量儿^[9]。妊娠妇女存在一定比例铁、钙、锌缺乏,临床可根据其微量元素失衡状态给予合理的补充^[10-12]。因此,从孕期开始就要保证合理膳食,在平时的饮食中,要做到粗、细粮结合和荤素搭配,不偏食,不挑食,多吃含铁、钙、锌丰富的食物,以防止婴儿先天营养素的缺乏,为孕妇自己和胎儿在宫内及产后的造血做好充分的储备。

参考文献

[1] 梁丛梅,杨柳,王延年.孕妇体内 5 种元素测定结果分析[J].中国妇幼保健研究,2007,18(3):208-209.
[2] 张建,张燕.妊娠期间血中微量元素变化分析[J].中国优生与遗传杂志,2010,18(4):83-84.
[3] 韩朝宏,冯欣,黄醒华,等.妊娠期高血压患者血浆、红细胞内五种微量元素代谢水平比较[J].中国优生与遗传杂志,2009,17(1):59-60.
[4] Hughes S, Samman S. The effect of zinc supplementation in humans on plasmalipids, antioxidant status and thrombogenesis [J]. J Am Coll Nutr, 2006, 25(4):285-291.

[5] 王红斌.妊娠妇女微量元素含量研究[J].临床合理用药杂志,2011,4(8):58.
[6] Singh K, Fong YF, Arulkumaran S. Anaemia in pregnancy—a cross-sectional study in Singapore[J]. Eur J Clin Nutr, 1998, 52(1):65-70.
[7] 胡嫦,孙海丽,郑孝清,等.孕妇微量元素铁随孕周变化的规律及其意义[J].中国妇幼保健,2008,23(23):3242-3243.
[8] 刘丽华,王秀东,贺春萍.哈尔滨地区 261 例孕妇缺铁性贫血分析[J].中国优生与遗传杂志,2008,16(8):75.
[9] 郑怀美.妇产科[M].3 版.北京:人民卫生出版社,1996:39-41.
[10] 王雪艳,张丽芬,李卢韞,等.170 例妊娠妇女全血微量元素检测结果分析[J].检验医学与临床,2011,8(5):609-610.
[11] 宋美兰,贾艳艳.微量元素与妊娠中期不良妊娠结局的相关性研究[J].中国妇幼保健,2011,26(32):4998-5000.
[12] 何雪雁,黄红梅,柯映春.孕妇体质饮食与新生儿微量元素的关系[J].实用临床医学(江西),2012,13(2):74-75.

(收稿日期:2012-07-23)