

• 临床检验研究论著 •

苏州两医院女性宫颈 HPV 感染基因型别的对比研究^{*}

王宏景¹, 刘忠伦², 耿建祥^{2△}, 李 丽², 李 海², 王晓红², 赵 雪², 夏思钧², 夏 林²

(1. 江苏省镇江市丹徒区人民医院病理科, 江苏镇江 212003; 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 比较苏州市两家医院女性宫颈上皮细胞中人乳头瘤病毒(human papillomavirus, 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 4 393 例宫颈上皮细胞标本进行 23 种 HPV 基因分型检测。结果 4 393 例女性宫颈上皮细胞标本, HPV 总阳性率为 31.64%(1 390/4 393), 苏州大学附属第一医院和苏州市立东区医院 HPV 总阳性率分别为 33.44%(611/1 827)、30.36%(779/2 566), 一重感染阳性率分别为 22.44%(410/1 827)、20.73%(532/2 566), 多重感染阳性率分别为 11.00%(201/1 827)、9.63%(247/2 566), 两院 HPV 总阳性率及一重、多重感染阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 基因扩增结合基因芯片检测技术可应用于宫颈细胞标本 HPV 分型检测, 对女性宫颈 HPV 感染的分子流行病学研究具有重要意义。

关键词:女性; 宫颈细胞; 人乳头瘤病毒; 基因分型; 基因芯片技术
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.009 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)04-0404-03

A comparative study of HPV infective genotypes in cervical cells in two hospitals of Suzhou City^{*}
Wang Hongjing¹, Liu Zhonglun², Geng Jianxiang^{2△}, Li Li², Li Hai², Wang Xiaohong², Zhao Xue², Xia Sijun², Xia Lin²
(1. Department of Pathology, the People's Hospital of Dantu District of Zhenjiang, Zhenjiang, Jiangsu 212003, China; 2. Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, HPV Collaboration of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To compare the clinical distribution of human papillomavirus(HPV) genotypes in two hospitals of Suzhou city. Methods Polymerase chain reaction and gene chip technology were utilized for the detection of 23 kinds of HPV genotypes in epithelial cell specimens from 4 393 cases of women. And related materials of all subjects were analyzed. Results The total HPV positive rate was 31.64%(1 390/4 393) in all specimens. The total positive rates of HPV were 33.44%(611/1 827) and 30.36%(779/2 566) in First Affiliated Hospital of Suzhou University and East District Hospital of Suzhou City respectively. The positive rates of single genotype infection were 22.44%(410/1 827) and 20.73%(532/2 566). The positive rates of multiple genotypes infection were 11.00%(201/1 827) and 9.63%(247/2 566). All of the positive rates mentioned above were not significantly different between two hospitals ($P>0.05$). Conclusion Gene chip technology could detect HPV genotypes in cervical cell samples, and might be important for the study of HPV genotypes distribution among women.

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

宫颈癌依然是妇女第二位恶性肿瘤, 位居乳腺癌之后, 高危型 HPV 感染是宫颈癌的主要致病因素^[1-5]。由于 HPV 是一类庞大的异质性家族, 其感染和致病的型别存在着种族和地域的差异性, 因此, 弄清楚中国各个地区一般女性人群中宫颈 HPV 感染基因谱的分布状况非常必要。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, 对苏州市区两家大医院 4 393 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对比研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 9 月至 2012 年 5 月苏州大学附属第一医院(苏大附一院)1 827 例和苏州市立东区医院(市立东区医院)2 566 例女性的宫颈上皮细胞标本, 年龄 19~74 岁, 平均年龄 31.50 岁。苏大附一院: 19~29 岁 529 例、30~39 岁 612 例(30~34 岁 337 例、35~39 岁 275 例)、40~49 岁 497 例(40~44 岁 290 例、45~49 岁 207 例)、50~59 岁 161 例、60 岁

以上 28 例; 市立东区医院: 20~29 岁 1 312 例、30~39 岁 731 例(30~34 岁 411 例、35~39 岁 320 例)、40~49 岁 408 例(40~44 岁 246 例、45~49 岁 162 例)、50~59 岁 92 例和 60 岁以上 23 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; 高速冷冻离心机为德国生产的 ependorf 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 -200℃ 冰箱等。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

^{*} 基金项目: 南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介: 王宏景, 男, 副主任医师, 主要从事宫颈癌及癌前病变 HPV 感染基因分型研究。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

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。按照试剂盒说明书对 DNA 提取液行 PCR 扩增,并对 PCR 产物进行杂交、孵育和显色后判断结果。

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

苏大附一院:1 827 例宫颈上皮细胞标本中检出 HPV 阳性感染者 611 例,阴性者 1 216 例,总的 HPV 感染率为 33.44%(611/1 827),其中一重感染率为 22.44%(410/1 827),多重感染率为 11.00%(201/1 827),其中一重感染 410 例,二重感染 149 例,三重感染 40 例,四重感染 9 例,五重感染 2 例,八重感染 1 例;市立东区医院:2 566 例宫颈上皮细胞标本中检出 HPV 阳性感染者 779 例,阴性者 1 787 例,总的 HPV 感染率为 30.36%(779/2 566),其中一重感染率为 20.73%(532/2 566),多重感染率为 9.63%(247/2 566),其中一重感染 532 例,二重感染 170 例,三重感染 50 例,四重感染 19 例,五重感染 5 例,六重感染 2 例,七重感染 1 例。两院 HPV 总感染阳性率、一重感染阳性率和多重感染阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。两院总阳性人数、一重和多重感染人数及百分比对比见表 1。

表 1 4 393 例苏州市两院女性宫颈 HPV 检测
阳性结果[n(%)]

医院	总人数(n)	总阳性数	一重感染	多重感染
苏大附一院	1 827	611(33.44)	410(22.44)	201(11.00)
立东区医院	2 566	779(30.36)	532(20.73)	247(9.63)
总计	4 393	1 390(31.64)	942 (21.44)	448(10.20)

3 讨 论

目前宫颈癌仍是女性的主要杀手。20 世纪 70 年代到 90 年代,中国的宫颈癌发病率下降了 69%,应该说宫颈癌的防治工作取得了很大的成绩。虽然宫颈浸润性癌的发病率下降了,但早期宫颈癌的发生,特别是年轻化的趋势十分明显,这与 HPV 感染有着明确的关系。HPV 是人类肿瘤发病中唯一可以完全确认的致癌病毒。预防 HPV 感染就可以预防宫颈癌,没有 HPV 感染就可以不罹患宫颈癌^[1]。

研究发现各国、各地区致癌的 HPV 型别存在着差异性。HPV 感染可分为高危、低危、一过性、迟延性及持续性几种类型,以高危型持续性感染最为重要。HPV 感染很常见,潜伏期可长达 15 年,在 30 岁以下(18~28 岁)性生活活跃的年轻妇女中感染的机会在 4%~15%,终身积累概率大于 60%。大多数的感染是“一过性”的,只是一种“一过性的 HPV 携带状态”,即大多数可以自行清除,平均时间 8 个月。宫颈病变发展缓慢,并不是所有被 HPV 感染者的身体表面都会出现症状,

无症状感染者往往会被忽视,一旦其机体免疫力下降,病毒活动就会加剧,过度表达,最终导致宫颈恶性病变。只有持续的 HPV 感染才会发生宫颈癌前病变(CIN),一般平均 8~24 个月可发生 CIN I, CIN II 和 CIN III 平均 8~12 年可发生宫颈浸润性癌^[6-10]。

本文 4 393 例女性宫颈上皮细胞标本中检出了 21 种基因型别(除 44 型和 MM4 型外),总的 HPV 感染率为 31.64%。提示:(1)苏大附一院和市立东区医院 HPV 感染比较其总感染率、一重和多重感染率无统计学差异($P>0.05$)。感染者中既有单一型别的 HPV 感染,也有混合型别的 HPV 感染,以一重感染为主,多重感染为辅,说明苏州市一般女性群体中一重感染类型丰富,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)苏大附一院一重感染(410 例)和多重感染(201 例)之比为 2.04:1,市立东区医院一重感染(532 例)和多重感染(247 例)之比为 2.15:1,两院一重和多重感染的比较无统计学差异($P>0.05$),但两院都比国内一般女性群体一重和多重感染之比 3:1 要低得多,这说明苏州市随着一般女性群体 HPV 感染率的增加,多重感染的增加超过了一重感染的增加,多重化的趋势在不断上升,尤其在 HPV 流行度较高的地区,这种多重化的趋势增加就显得更加明显,应引起密切关注。(3)苏大附一院 1 827 例女性一般群体中 HPV 总的感染率为 33.44%,而市立东区医院 2 566 例女性一般群体中 HPV 总的感染率为 30.36%,HPV 感染率明显的高于南京市和深圳市,表明 HPV 在苏州市一般女性人群中流行度较高,这可能与苏州地区外籍人口较多、开放度较高有关,应密切关注其流行趋势(流行度及基因谱的变化)。(4)苏大附一院一重感染前 11 位依次为 16 型(114 例)、58 型(48 例)、52 型(32 例)、18 型(23 例)、31 型(20 例)、33 型(19 例)、66 型(17 例)、56 和 68 型(各 13 例)、35 型(11 例)、59 型(10 例),而市立东区医院一重感染前 11 位依次为 16 型(112 例)、52 型(59 例)、58 型(43 例)、18 型(28 例)、56 型(27 例)、31 型(26 例)、33 型(16 例)、68 型(15 例)、35 和 51 型(各 13 例)、59 型(12 例),两院前 4 位均为 16、18、52、58 型,16 型均位居第一位,18 型均位居第四位,52 和 58 型两院排序颠倒,说明苏州市一般女性群体中以 16、18、52、58 型感染为主(四型占苏大附一院一重感染的 52.93%,占市立东区医院一重感染的 45.49%),其他型别存在着较大的差异性。(5)由于 HPV 的致病型别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,而且 HPV 在一般人群女性中也存在着一个感染流行的平衡问题,也就是说 HPV 感染由高流行区域向低流行区域流动。苏州市为 HPV 高感染区就存在着向低感染区流动的趋势。这种 HPV 感染的差异性值得研究者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。(6)宫颈癌是感染性疾病,是可以预防、治疗及治愈的病变,这是因为:知道其发病原因;认真普查和随诊可以预防;早期诊断可以完全治愈。CIN 有一个相对较长的时间过程,这使得干预和治疗成为可能,关键在于普查、发现和处理。中国幅原辽阔,人口众多,经济卫生发展很不平衡,尚未建立完善的筛查制度和体系。筛查方案和方法亦有所不同,可

谓因地制宜。最佳方案是做 TCT 和 HPV 检查。欧洲(德、英、法)的一项 23 890 例筛查数据显示,行 HPV 检测能明显地提高筛查效果^[11]。由于育龄妇女特别是年轻妇女是 HPV 感染的最脆弱的群体,因此对年轻妇女及育龄妇女开展 TCT 和 HPV 的双检,这有利于最大限度的把女性宫颈癌阻止在癌前病变阶段。建议有条件的医院应尽快开展女性宫颈 TCT 和 HPV 的双检。(7)宫颈癌筛查显然不只是医生的行为,更是政府的行为,它是一个系统工程,应根据情况尽可能进行至少是区域性的筛查。宫颈癌发病关键在于 HPV 感染这一基本因素,以及 HPV 能否被消除,是否会促成宫颈癌。这取决于 HPV 的型别——高危型、HPV DNA 含量和首感时间;每个女性个体对 HPV 感染的易感性;宿主的免疫功能,包括产次、激素、营养的影响;其他因素,如性行为、STD 及重复 HPV 感染等^[11]。

总之,由于 HPV 可在两性之间互相传播,所以,有研究者强调应该给男孩接种宫颈癌疫苗,并认为如果给男孩接种宫颈癌疫苗预防的效果可能比只给女孩接种还要好。宫颈癌属于性传播性疾病,男人在 HPV 传播上起到非常重要的作用。因此,给男孩接种宫颈癌疫苗不仅可以防止他们今后将病毒传染给性伴侣,同时还可帮助他们预防生殖器官和肛门部位发生的癌变。如能打断男性 HPV 的传播链,就可降低两性的 HPV 感染率,宫颈癌及其他癌的发病率也会随之下降。同时也要加强女性宫颈癌的筛查。如果政府将这些措施都能够落实到位,宫颈癌将会成为人类第一个可进行有效预防的恶性肿瘤,这将造福于广大的女性^[1,12-15]。

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.

(上接第 403 页)

[2] 谭延国.反映脑损伤的特异性生物化学指标对缺血性脑卒中发生的评估价值[J].中国临床康复,2005,9(37):107-110.

[3] 颜鹏飞.新生儿缺氧缺血性脑病 48 例临床分析[J].中华全科医学,2008,6(9):945-946.

[4] 中华医学会儿科学会儿学组.新生儿缺氧缺血性脑病临床诊断依据和分度[J].中华儿科杂志,1997,35(2):99-100.

[5] Tekgul H, Yalaz M, Kutukculer N, et al. Value of biochemical markers for outcome in term infants with asphyxia[J] Obstet Gynecol Surv, 2005, 60(5): 293-295.

[6] Reisinger J, Hollinger K, Lang W, et al. Prediction of neurological outcome after cardiopulmonary resuscitation by serial determination of serum neuron-specific enolase[J]. Eur Heart J, 2007, 28(1): 52-58.

[7] 王家蓉,徐天鹤,余加林,等.32 例新生儿缺氧缺血性脑病患儿血中NSE的变化及其临床意义[J].重庆医学,2005,35(21):1937-1938.

[8] Berger R P, Dulani T, Adelson PD, et al. Identification of inflicted

[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):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):1303-1304,1307.

[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] 董云灿,耿建祥,张劲松,等.1 722 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.

[8] 任晓惠,耿建祥,李海,等.某市 2 109 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):1424-1426.

[9] 李海,耿建祥,张劲松,等.宫颈 HPV 感染基因型分布的比较研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(19):2319-2320.

[10] 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.

[11] 郎景和.子宫颈病变防治的几个问题[J].世界医学杂志,2004,8(11):1-3.

[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.妇科肿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, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2): 195-208.

(收稿日期:2012-10-03)

traumatic brain injury in well-appearing infants using serum and cerebrospinal markers: a possible screening tool[J]. Pediatrics, 2006, 117(2): 325-332.

[9] Beems T, Simons K S, van Geel WJA, et al. Serum and CSF concentrations of brain specific proteins in hydrocephalus[J]. Acta Neurochirurgica, 2003, 145(1): 37-43.

[10] 赵惠宁.脑出血患者急性期空腹血糖、乳酸脱氢酶及 CRP 表达的临床研究[J].中国现代医生,2010,48(5):60-71.

[11] 田建春.急性颅脑损伤患者血清中 C 反应蛋白及乳酸氧氢酶的表达及关系的研究[J].中国现代医生,2010,48(3):79-80.

[12] 叶应妩,王毓三,申子瑜,等.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:590-591.

[13] 尹晓华,陈亮,欧阳兆书.颅脑损伤后血清 EGF 和 CRP 的含量变化及临床意义[J].南华大学学报:医学版,2006,34(3):366-374.

[14] 董星河,张鹏远,牛光明,等.糖尿病大鼠颅脑损伤早期 CRP 的动态变化及意义[J].中国实用神经疾病杂志,2007,10(9):22-24.

(收稿日期:2012-10-11)