

• 调查报告 •

3 678 例已婚女性宫颈细胞 HPV 感染基因谱的研究*

张劲松¹, 耿建祥^{2△}, 韩春荣², 王旭波², 李海², 兰建云², 张昶², 张微², 赵雪²(1. 南京扬子医院感染科, 江苏南京 210048; 2. 南京中医药大学第三附属医院
病理科/江苏省 HPV 协作组, 江苏南京 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因子。该文旨在探讨南京地区已婚女性宫颈细胞中 23 种人乳头瘤病毒感染的基因谱分布情况及其临床意义。方法 从南京地区扬子石化集团公司 3 678 例已婚女性职工的宫颈上皮细胞标本中提取 23 种 HPV DNA, 采用基因扩增结合基因芯片技术对其宫颈细胞进行 23 种 HPV 基因型的检测, 并对其受检者进行相关资料分析。结果 3 678 例已婚女性宫颈上皮细胞标本中检出 HPV 感染者 397 例, 总的 HPV 感染率为 10.79%(397/3 678), 其中单一型别的阳性检出率为 9.11%(335/3 678); 单一型别的感染中 HPV43 型为 80 例, 其阳性检出率为 2.18%(80/3 678), 是最主要的感染型别; 其次为 HPV16 型 35 例、58 型 33 例, 其阳性检出率分别为 0.95%(35/3 678)、0.90%(33/3 678); 混合型 HPV 感染 62 例, 其阳性检出率为 1.69%(62/3 678); 其中 HPV43 型+X 型 12 例及 43 型+X 型+X 型 10 例、43+X+X+X 型 1 例, 占混合型感染的 37.10%(23/62), 是混合型感染的主要型别; 其次是 HPV16 型的二和三重混合型 16 例, 占混合型感染的 25.81%(16/62)。结论 HPV43、16、58 型单一型别及 43 型和 16 型的混合型是感染南京地区已婚女性宫颈细胞的主要基因型, 基因扩增结合基因芯片检测技术可适用于宫颈细胞标本, 一次可检测 23 种 HPV 感染的基因型, 其特异性强, 敏感性高, 对我国已婚女性宫颈 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: 宫颈细胞; 人乳头瘤病毒; 基因分型; 基因芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0439-03

Study on human papillomavirus genetic profile in 3 678 cervical cell samples of married women*

Zhang Jinsong¹, Geng Jianxiang^{2△}, Han Chunrong², Wang Xubo², Li Hai²,
Lan Jianyun², Zhang Chang², Zhang Wei², Zhao Xue²

(1. Department of Infectious Diseases, Hospital of Yang Zi, Nanjing, Jiangsu 210048, 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 research the intrubution of 23 genotypes of human papillomavirus(HPV) which was well known as the major cause of cervical cancer in human and its clinical significance. **Methods** Based on the original cell materials from the Department of Infectious Diseases, Hospital of Yang Zi and the Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, 23 types of HPV genotype in cervical cell samples from 3 678 cases of married women were tested by PCR and gene-chips technique. **Results** There were 397 positive cases among 3 678 cervical cell samples of married women. The total HPV infection rates was 10.79%(397/3 678), and the HPV infection rates of single types was 9.11%(335/3 678). The predominant types from single infection with HPV were in turn as follows: type 43(2.18%, 80/3 678), type 16(0.95%, 35/3 678), and type 58(0.90%, 33/3 678). The mixed infection rates of HPV was 1.69%(62/3 678). The predominant types from mixed infection with HPV were in turn as follows: HPV type 43 superinfection(12 cases), triple infection(10 cases), and multiple infection(1 case). The total infection rate of above three infection modes was 37.10%(23/62). Secondly the rate of superinfection and triple infection of HPV type 16 was 25.81%(16/62). **Conclusion** Single infection of HPV type 43, 16, and 58, and mixed infection of HPV type 43 and 16 were the main infection modes in 3 678 cases of married women. Gene chip technology could detect multiple HPV genotypes in cervical cell samples with high sensitivity and specificity, which was useful in the pathogenesis and prevention of cervical cancer.

Key words: cervical cell; human papillomavirus; genotype; gene chip

宫颈癌是全世界女性健康的主要威胁之一, 在世界范围内宫颈癌是女性第二常见的恶性肿瘤。2010 年全球约有 585 278 例新发宫颈癌患者, 而 327 899 例宫颈癌患者因其癌致死。80% 以上的宫颈癌发生在发展中国家。宫颈癌的发生与 HPV 感染密切相关^[1,5]。因此, 早期发现、早期诊断、早期治疗仍是降低宫颈癌发病率和死亡率的关键。世界卫生组织新近提出 HPV 感染性疾病的诊断不仅要有临床和病理学诊断, 还应具

有基因水平的诊断才能确诊^[2-3]。

现阶段, 对我国宫颈癌、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、多中心的流行病学研究是一项非常紧迫的任务。本文采用基因扩增结合基因芯片检测技术, 以 23 种常见的 HPV 作为感染源, 对 3 678 例已婚女性宫颈细胞标本进行基因检测, 以了解南京地区已婚女性宫颈细胞中 HPV 感染和基因型分布的情况, 以便为宫颈癌的防

* 基金项目: 南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介: 张劲松, 男, 主治医师, 主要从事感染性疾病研究。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720 @ 163.com。

治、高危人群的筛查、HPV 疫苗、诊断试剂的优化及流行病学调查提供重要的数据资料和参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 4 月~12 月南京地区扬子石化集团的 3 678 例已婚女性职工的宫颈上皮细胞标本,年龄 23~59 岁,平均年龄 41.76 岁,其中年龄 20~29 岁 58 例、年龄 30~39 岁 1 049 例(30~34 岁 313 例,35~39 岁 736 例)、年龄 40~49 岁 2 404 例(40~44 岁 1 357 例,45~49 岁 1 047 例)、年龄 50~59 岁 167 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亚能生物技术(深圳)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 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-200C 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 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、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 sec;42℃ 90 sec;72℃ 30 sec;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 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 * 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 μ L POD 配制成 12 mL 孵育液)中室温孵育 30 min,弃孵育液,用 A 液室温轻摇洗涤 2 次,每次 5 min,再用 C 液(0.1M 柠檬酸钠)轻摇洗涤 2 min;显色液(C 液 19 mL,TMB 1 mL,30% H₂O₂ 2 μ L)中显色至少 30 min;转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

2.1 结果判定 (1)实验后每张膜条在 PC 位点必须出现蓝色显示信号;(2)阴性质控品除 PC 位点出现蓝色显色信号外其余位点均不出现蓝色显色信号;(3)阳性质控品除 PC 位点出现蓝色显色信号外,必须在相应 HPV 基因型位点上出现蓝

色显色信号;(4)每张膜条上除 PC 位点外有 23 种 HPV 型别(6、11、42、43、44、16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4 型)的杂交显色位点,除 PC 位点显色外,肉眼可观察 23 种 HPV 型别位点上呈现蓝色小圆点为阳性信号;(5)出现一个阳性信号为单一型别的感染,出现两个阳性信号为双型别的混合感染,出现两个以上的阳性信号为多型别的混合感染。

2.2 结果分析 3 678 例已婚女性宫颈上皮细胞标本中 23 种 HPV 基因分型检测检出了 21 种 HPV 基因型(除 44 型和 MM4 型外),其 HPV 阳性感染者 397 例,阴性者 3 281 例,总的 HPV 感染率为 10.79%(397/3 678),其中单一型别的阳性检出率为 9.11%(335/3 678);单一型别的感染中 HPV43 型为 80 例,其阳性检出率为 2.18%(80/3 678),是最主要的感染型别;其次为 HPV16 型 35 例,58 型 33 例,其阳性检出率分别为 0.95%(35/3 678)、0.90%(33/3 678);混合型 HPV 感染 62 例,其阳性检出率为 1.69%(62/3 678);其中 HPV43 型+X 型 12 例及 43 型+X 型+X 型 10 例,43+X+X+X 型 1 例,占混合型感染的 37.10%(23/62),是混合型感染的主要型别;其次是 HPV16 型的二和三重混合型 16 例,占混合型感染的 25.81%(16/62)。335 例 HPV 单一感染 62 例混合感染者中;48 例 HPV 二重感染为;13 例 HPV 三重感染;1 例 HPV 四重感染为 43+53+58+68 型。

3 讨论

宫颈癌是目前人类所有癌症中病因最明确的癌症。HPV 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 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]。因此,弄清楚我国各个地区 HPV 感染率、基因谱及流行趋势就显得非常必要。

本文通过对 3 678 例已婚女性宫颈上皮细胞标本 23 种 HPV 基因型的检测,检出了 21 种型别(除 44 型和 MM4 型外),其总的 HPV 感染率为 10.79%。提示:(1)我国南京地区已婚女性宫颈上皮细胞中即有单一型别的 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,前 5 位单一高危型依次为 16、58、33、18、52 型;(2)南京地区 3 678 例已婚女性的自然群体中 HPV 总的感染率为 10.79%,表明 HPV 在南京地区自然人群中呈低流行度,应密切关注其流行趋势(流行度及基因谱的变化);(3)本研究 3 678 例已婚女性中,29 岁以下的 HPV 感染率为 12.07%(7/58);30~34 岁的 HPV 感染率为 6.39%(20/313),35~39 岁的 HPV 感染率为 8.83%(65/736);40~44 岁的 HPV 感染率为 11.05%(150/1 357),45~49 岁的 HPV 感染率为 12.99%(136/1 047);50 岁以上的 HPV 感染率为 11.38%(19/167);由此可见,南京地区已婚女性宫颈细胞 HPV 感染存在着两个高峰,一个在 29 岁以下,一个在 50 岁左右。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 29 岁以下到 50 岁以上,其感染率呈现类似“S”字型。从 29 岁以下的小高点先下降,降至 30~34 岁最低点后曲线逐渐攀升,45~49 岁曲线达到最高点,到了 50 岁以上曲线呈略下降的曲线图。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。从本研究 HPV 感染率的曲线图来看 HPV 的高感染率与宫颈癌的高发病年龄段相吻合。而 29 岁以下的 HPV 高感染率与发患者群呈现低龄化的趋势相吻合,这就比较合理的解释了我国宫颈癌发病以 36~56 岁的女性最为集中,且呈低

龄化的趋势。(3)以南京地区为例,现在要求 30 岁以上,尤其是 35 岁以上,有 3 年以上性生活史的女性就需要进行宫颈癌筛查。因为女性的雌激素水平到 35 岁时升到顶峰,在这之前女性的免疫功能比较强,具有较好的抗病毒能力。但是过了 35 岁后,随着女性体内雌激素水平下降,免疫力也会逐渐减弱,更容易发生 HPV 感染,本研究表明 HPV 感染率从 35 岁以上的 8.52% 上升至 50 岁以上的 12.23%,这一年龄段正好是雌激素水平逐渐下降,免疫力逐渐减弱的阶段,此阶段的女性 HPV 感染更易成为持续性感染,以至感染率高,尤其是持续感染率高是 35~56 岁女性宫颈癌发病率高的主要原因。(4)由于致癌型别 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,我院病理科 HPV 协作组正在筹建江苏省宫颈及肛门区 HPV 感染的细胞和组织基因数据库,并通过对各地区宫颈 HPV 感染率及基因谱的比对研究,弄清楚各地区之间 HPV 感染的差异性,尤其是各地区大样本的基因研究,这些大样本基因研究资料将会成为各地区 HPV 感染率及基因谱的标杆,这将为我国各地区今后 HPV 分子流行病学调查提供重要的对比资料,也为 HPV 的流行趋势变化提供重要的对照资料,更为政府公共卫生政策的制定提供重要的依据。(5)现研究表明女性生殖道存在着一条 HPV 感染通道,由于宫颈癌好发于鳞状与柱状上皮交界部位,宫颈正位于鳞、柱两种上皮交界处,加之又非常容易糜烂(宫颈癌的发病率在有宫颈糜烂的妇女比无宫颈糜烂者高 10 倍),这就为 HPV 的感染提供了非常好的入侵门户和生存环境。所以说,宫颈是其通道中 HPV 感染率最高的部位,也就是最易感部位。(6)本研究 397 例 HPV 感染阳性的南京地区已婚女性中有 292 例(除 6 型 8 例、11 型 3 例、42 型 14 例、43 型 80 例外)都伴有高危型 HPV 感染,其高危型 HPV 总感染率为 7.94%(292/3678),而这些高危型别的 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,对所有伴有高危型别 HPV 感染的已婚女性进行其 HPV 感染型别的追踪检测就显得非常必要,如果他们成为持续性的感染者,就可能成为 HPV 的传染源,而且宫颈癌前病变及宫颈癌发生的风险也会大大增加,应引起我们高度的重视;(7)单一和混合感染出现频率前 5 位 HPV 型别分别为 43 型 104 例(80+24 例)、16 型 51 例(35+16 例)、58 型 45 例(33+12 例)、33 型 35 例(23+12 例)及 18 型 33 例(21+12 例),这 5 种型别是南京地区已婚女性宫颈细胞感染出现频率最高的类型,也是我们重点关注和监测的型别。(8)研究者发现单一型别的 HPV 感染除 44 型和 MM4 外,只是数量上的增加,而混合型别的 HPV 感染除 44 型和 MM4 外,不但数量上的增加,而且组合型别的多样化也不断的增加,已发现 4 重型别的混合感染。目前,HPV 的重叠感染仍以双重和三重感染为主。据报道,HPV 单一型别的感染可使宫颈癌的发病风险增加 19.9 倍,而多重型别的 HPV 感染可使宫颈癌的发病风险增加 31.8 倍,而且重叠感染的 HPV 病毒载量高于单一型别 HPV 感染,癌变相关风险更大,是宫颈癌发生的一个非常重要的危险因素,并且致病力更强,病变发展更快,复发率更高^[5-8,11]。提示体检医生及临床妇科医生应该加强对多重型别 HPV 感染妇女及患者的随访跟踪和监控。(9)HPV 单一型别的感染和重叠感染的比例一般约为 3:1,重叠感染有多重化的趋势^[6-9]。本文报告的 HPV 单一型别的感染和重叠感染的比例约为 5.4:1,比一般的 3:1 要高的多,这可能和受检者均为健康体检已婚女性有关。

虽然 HPV 仍然有许多问题有待我们继续探索,但 HPV

致癌的研究已表明高危型 HPV 的持续感染是宫颈癌发生的最主要的病因^[9-11]。随着人们对 HPV 研究的不断深入,建立一个对 HPV 流行趋势、基因谱变化以及与宫颈癌发生、发展演变关系进行长期监测的基因数据库是一项非常紧迫的任务。因为该数据库的建立将为宫颈癌及 HPV 感染相关疾病的防治提供非常宝贵的分子流行病学的基础资料,也有利于政府部门对公共卫生决策的制定。由于 HPV 可在两性之间互相传播,所以,豪森强调应该给男孩接种宫颈癌疫苗。他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。由于宫颈癌属于性传播性疾病,男人在 HPV 传播上即是播种者,又是传播者。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。如何打断男性 HPV 的传播链,这是尽可能减少 HPV 在两性之间传播的非常重要的一个环节。给男孩接种宫颈癌疫苗可逐渐减少宫颈癌及其他癌对人类健康的威胁,而宫颈癌将会成为人类第一个可进行有效预防的恶性肿瘤,这将造福于广大的已婚女性^[1,4,10-14]。

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):391-393.
- [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):391-393.
- [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.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.
- [8] 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):1424-1426.
- [9] 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.
- [10] Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions[J]. Vaccine, 2008, 26(1):17-28.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2):195-208.

(收稿日期:2012-10-09)