

• 临床检验研究论著 •

苏州地区妇女宫颈人乳头状瘤病毒基因分型的研究^{*}龚培尧¹, 李海², 耿建祥^{2△}, 李丽², 刘忠伦², 王晓红², 王宏景², 夏林², 夏思钧²(1. 徐州市妇幼保健院病理科, 江苏徐州 221009; 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 探讨苏州地区妇女宫颈感染人乳头状瘤病毒(HPV)的基因型分布及其临床意义。方法 采用基因扩增结合基因芯片技术对 4 862 例宫颈上皮细胞标本进行 23 种 HPV 基因分型检测。结果 宫颈上皮细胞 HPV 阳性率为 31.74% (1 543/4 862)。其中,一重感染、多重感染的阳性率分别为 21.43% (1 042/4 862)、10.30% (501/4 862)。前 7 位高危型 HPV 分别为 16、58、52、33、18、56、31 型,占 59.09%,而低危型 HPV 分别为 11、6、43 型,占 23.70%。结论 基因扩增结合基因芯片技术可应用于宫颈细胞 HPV 分型检测。

关键词: 子宫颈; 人乳头瘤病毒; 基因型; 芯片分析技术**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.010**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2013)23-3127-02A research of genotypes of human papillomavirus infected in cervix uteri of women in Suzhou region^{*}Gong Peiyao¹, Li Hai², Geng Jianxiang^{2△}, Li Li², Liu Zhonglun²,Wang Xiaohong², Wang Hongjing², Xia Lin², Xia Sijun²

(1. Department of Pathology, Xuzhou Health Hospital for Women and Children, Xuzhou, Jiangsu 221009, China; 2. HPV Collaborative Group, Department of Pathology, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine/the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To investigate the genotype distribution of human papillomavirus(HPV) infected in cervix uteri of women in Suzhou region and its clinical significance. **Methods** Microarray gene amplification technique was employed to assay 23 kinds of HPV genotype in 4 862 samples of cervical epithelial cells. **Results** The HPV-positive rate of cervical epithelial cells was 31.74% (1 543/4 862). Among them, mono-infection rate and multiple infection rate were 21.43% (1 042/4 862) and 10.30% (501/4 862). The top seven high-risk HPV types were 16, 58, 52, 33, 18, 56, 31, accounting for 59.09%, while the low-risk HPV types were 11, 6, 43, accounting for 23.70%. **Conclusion** Microarray gene amplification technique can be applied to assay HPV genotyping in cervical cells.

Key words: cervix uteri; human papillomavirus; genotype; microchip analytical procedures

宫颈癌是一种严重威胁女性健康的恶性肿瘤,也是目前为止少数可以进行早期筛查的恶性肿瘤之一。高危型人乳头状瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌的主要致病因素^[1-4]。高危型 HPV 检测较重复细胞学检查能使宫颈病变的检出率明显提高^[1],应在临床推广应用,以提高宫颈癌及癌前病变的早期筛查效果。本研究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,对苏州地区的 4 862 例妇女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分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 9 月至 2012 年 5 月 4 862 例受检妇女的宫颈上皮细胞标本,来自苏州大学附属第一医院 1 827 例、苏州市立东区医院 2 566 例和苏州吴江县人民医院 469 例。受检妇女年龄 19~74 岁,平均 36 岁。由 2 位经验丰富的技术人员按照说明书规范操作。同时复习其相关资料。

1.2 主要仪器与试剂 GeneAmp PCR System 2400 基因扩增仪为美国 ABI 公司产品;FYY-3 型分子杂交仪为兴化市分析仪器厂产品;Eppendorf 5810R 高速冷冻离心机为德国 Eppendorf 公司产品;BHC-1300 II A2 型生物安全柜为苏州安泰

空气技术有限公司产品。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。

1.3 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。

1.4 DNA 的提取 采用基因扩增结合基因芯片技术对宫颈上皮细胞标本进行 23 种 HPV 基因分型检测。将宫颈刷头充分漂洗后,把洗脱液全部转移至 1.5 mL 离心管中,13 000 r/m 离心 10 min 后,弃去上清液,保留管底细胞。随后加入裂解液 50 μL,充分振荡混匀,在金属浴中 100 ℃ 加热 10 min,立即 13 000 r/m 离心 10 min,取中间层 DNA 溶液待用。按照试剂盒说明书对 DNA 提取液行聚合酶链反应(PCR)扩增,并对 PCR 产物进行杂交、孵育和显色后判断结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计数资料用率表示,率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法,以 $\alpha=$

* 基金项目:南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。作者简介:龚培尧(1970~),男,副主任技师,主要从事临床人乳头瘤病毒的研究工作。△ 通讯作者,E-mail:dyc720@163.com。

0.05 为检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

4 862 例受检妇女宫颈上皮细胞标本中检出 HPV 阳性 1 543 例,阳性率为 31.74% (1 543/4 862)。其中,一重感染阳性率为 21.43% (1 042/4 862); 多重感染阳性率为 10.30% (501/4 862), 包括二重感染 359 例,三重感染 97 例,四重感染 34 例,五重感染 7 例,六重感染 2 例,七重感染 1 例,八重感染 1 例。21 种 HPV 型别的感染情况见表 1(对多重感染者,各型别的阳性率重复计算)。前 7 位高危型 HPV 分别为 16、58、52、33、18、56、31 型,占总 HPV 感染型别的 59.09%,而低危型 HPV 分别为 11、6、43 型,占总 HPV 感染型别的 23.70%,前 10 位 HPV 感染型别占总感染型别的 82.79%。

表 1 21 种 HPV 型别在苏州地区受检女性中感染的分布情况

HPV 型别	阳性数(n)	百分比(%)	HPV 型别	阳性数(n)	百分比(%)
16	430	19.12	35	67	2.98
58	224	9.96	59	56	2.49
11	223	9.92	66	50	2.22
52	211	9.38	51	41	1.82
6	206	9.16	42	28	1.25
33	153	6.80	45	23	1.02
18	118	5.25	53	22	0.98
56	108	4.80	39	15	0.67
43	104	4.62	73	6	0.27
31	85	3.78	83	3	0.13
68	76	3.38	总计	2 249	100.00

3 讨 论

目前宫颈癌的早期诊断与治疗仍是改善宫颈癌患者预后的首选策略。虽然细胞学筛查的应用使宫颈癌发病率下降 50%,但宫颈癌仍然是威胁广大妇女健康的重要疾病。据估计,全世界范围内每年约有 50 万新发病例及 24 万死亡病例,特别是在发展中国家,发病率和病死率高^[5-7]。由于 HPV 是人类肿瘤发病中惟一可以完全确认的致癌病毒,预防 HPV 感染可预防宫颈癌^[1]。因此,对一般女性群体进行 HPV 感染型别分布、感染特点与宫颈病变关系的研究就显得十分重要。

2009 年美国妇产科学会(ACOG)对宫颈癌筛查意见作了重要的修改:(1)将有性生活 3 年后开始筛查改为自 21 岁开始。因为宫颈癌或宫颈上皮内瘤变(CIN)的发生与 HPV 感染有关,青春期 HPV 感染发生 CIN 的并不多见,细胞学检查显示高级别鳞状上皮内病变仅占 0.7%,而且在此年龄段中绝大多数都可自然消退,因此,青春期女性不必过早开始筛查。(2)30 岁以前的筛查,将每年 1 次改为每 2 年 1 次,30 岁以后则可每 3 年 1 次。但有以下情况例外,人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者,用免疫抑制药者(如肾移植者),用雌激素治疗者、患过宫颈 CIN I ~ III 级及宫颈癌者。(3)65~70 岁妇女在近 10 年中连续 3 次或以上细胞学检查无异常则可停止筛查。(4)良性疾病而非 CIN 者,子宫切除后可停止筛查。(5)行 HPV 检测能明显地提高筛查效果^[5-7]。

本研究中,4 862 例受检妇女宫颈上皮细胞标本中 23 种 HPV 基因型检出了 21 种型别(除 44 型和 MM4 型外),HPV 总阳

性率为 31.74% (1 543/4 862),一重感染阳性率为 21.43% (1 042/4 862),多重感染阳性率为 10.30% (501/4 862)。(1)苏州地区一般妇女 HPV 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,提示苏州地区一般妇女中一重感染类型丰富,而多重感染呈现出不断增加的趋势。(2)苏州地区 HPV 感染者中一重感染(1 042 例)和多重感染(501 例)之比为 2.08 : 1.00,低于国内水平(3:1)^[8],这说明 HPV 感染在中、高度流行区域,多重化感染呈现快速上升的趋势。(3)苏州地区高危型 HPV 前 7 位的分别为 16、58、52、33、18、56、31 型,而低危型 HPV 分别为 11、6、43 型。2006 年 6 月,美国食品药品管理局(FDA)正式批准 HPV 疫苗上市,用于宫颈癌的预防,这是世界上第一个肿瘤疫苗。目前全球已有 100 多个国家获准使用此疫苗,但 HPV 疫苗在中国尚未获得批准,中国 HPV 疫苗正在研发中^[5]。依据国外 HPV 疫苗使用情况,中国在研制 HPV 疫苗时应考虑 HPV58、52、33、56、31 和 43 型,以增加其疫苗的覆盖面,以最大限度保护 HPV 易感人群。(4)苏州地区前 7 位高危型 HPV 型别,占总 HPV 感染型别的 59.09%,低危型 HPV11、6、43 型占总 HPV 感染型别的 23.70%,前 10 种 HPV 感染型别占总感染型别的 82.79%,如果国内研发的 HPV 疫苗能够涵盖这 10 种 HPV 型别,则可保护绝大多数易感女性人群。(5)由于不同致病型别 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,而且 HPV 在一般女性群体中的流行度及流行优势型别也存在着一定的差异性。郎景和^[6]提出在中国一般正常妇女中,HPV 感染者不到 4%。随着时间的推移,中国各地的一般女性群体中 HPV 感染率在不断增加,HPV 感染率的增加又导致 HPV 多重感染比例的增加。到目前为止,中国各地区及各民族尚缺乏大样本(1 万例以上)、多中心的一般正常女性人群 HPV 流行度及流行优势型别的基因数据库,这个基因数据库的建立将对中国各地未来 HPV 流行度及流行优势型别的比对起着重要的参照作用,对 HPV 的防控具有非常重要的意义。(6)由于 HPV 感染的存在,预示宫颈疾病的存在,HPV 感染使宫颈癌的相对危险性增加 250 倍,高危型 HPV 持续感染使得宫颈 CIN III 级持续并进展^[9]。有必要根据 HPV 分型检测结果判断女性 HPV 感染状况,并采取针对性的治疗措施。对 30 岁以上的妇女,即使细胞学检查正常,如 HPV16、18 型持续性阳性,也应建议其行阴道镜检查^[5]。如女性患者被确诊为 CIN 后,若为低危型 HPV 感染可给予密切随访;若为高危型 HPV 感染,尤其是多重高危型 HPV 感染,无论 CIN 级别如何,均应立即治疗。30 岁以上的高危型 HPV 感染的女性,应建议其在 1 年内复查 HPV;如为同型别的高危型 HPV,应给予阴道镜检查;如有可疑病灶,可行宫颈活组织检查。HPV 分型检测对宫颈癌的筛查、监控、预后及 HPV 型别危险性的评估意义重大^[10-13]。

宫颈癌是一种感染性疾病,其发病与 HPV 感染型别有关,且一般女性群体中 HPV 感染,尤其是持续性高危型 HPV 感染是主要危险因素,也是诱发宫颈癌前病变及宫颈癌发生的诱因^[9]。因此,进行一般女性群体的 HPV 分型检测,对宫颈癌前病变及宫颈癌的筛查和防治均具有重要的意义。有证据表明,HPV-DNA 检测可作为子宫颈癌的初筛的手段,并可以降低子宫颈癌的发病率和病死率^[5]。由于育龄妇女是 HPV 感染的易感群体,因此,对年轻妇女及育龄妇女开展液基薄层细胞学检测(TCT)和 HPV 的双检。通过四阶梯式诊断技术(HPV 检测、细胞学检查、阴道镜检查和宫颈(下转第 3130 页))

2 结 果

20例男性体检者中,血清TK-1阳性者3例,阳性率为15.0%;31例女性体检者中,TK-1阳性者13例,阳性率为41.9%。女性体检者血清TK-1阳性率明显高于男性($P < 0.05$),见表1。

表1 男、女体检者血清TK-1阳性率的比较

组别	阳性(n)	阴性(n)	合计(n)	百分率(%)
男性	3	17	20	15
女性	13	18	31	42
合计	16	35	51	31

3 讨 论

有研究认为空气湿度对人体有重要影响,其高低程度直接影响人体各种生理功能。祖国医学将湿邪分为内湿和外湿,外湿通过对免疫、内分泌、肠道细菌、能量代谢、病理形态学及超微结构等方面的影响,造成多系统、多器官的形态与功能损害而致病^[3]。湿邪之所以能致病,是湿邪在所处环境的活动影响了机体内在功能。研究认为在高湿环境能够对细胞增殖过程产生影响,且处于高湿环境中的时间越长,其影响将更加明显。

TK-1是使胸腺嘧啶核苷转化为单磷酸胸腺嘧啶的关键酶,与细胞增殖生长密切相关,可作为一种细胞增殖标志物来检测细胞的增殖活性,也可作为一种有价值的肿瘤标志物来检测恶性肿瘤的增殖度及判断疗效^[4-5]。TK-1水平取决于细胞增殖度,在非增殖性细胞中TK-1浓度很低,而在增殖性细胞和肿瘤细胞细胞周期的G1晚期、S晚期和G2前期,TK-1浓度会迅速的上升^[6]。因此,高水平的TK-1反映了细胞活跃的增殖度^[7]。在平行条件下,相同湿度环境对不同性别人群细胞增殖度的影响未见报道。本结果显示,在高湿环境下51例正常体检者中女性的血清TK-1阳性率明显高于男性($P < 0.05$),提示高湿环境所致的细胞增殖度的变化存在男、女性别差异,高湿环境所引起的细胞增殖度的改变程度,女性较男性更为明显。

检测血清TK-1水平能够用于人类恶性肿瘤的筛查和监测,也可作为肿瘤疾病进展的预示指标^[8]。TK-1作为评价指

标,在肿瘤预后评价中,患者TK-1低水平要比高水平的预后要好^[9-10]。因此,可通过进一步随访以探讨了解在高湿环境下肿瘤患者是否会出现明显的性别差异。

参考文献

- 刘佳琪. 血清TK1检测在非小细胞肺癌诊断中的临床意义[J]. 实用肿瘤杂志, 2013, 28(1): 61-63.
- 马晓东, 李扬, 梁永平. 高温高湿环境对大鼠创伤性脑水肿的影响[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(1): 66-70.
- 钟梁, 呼永河. 浅谈高湿环境对人体生理心理的影响[J]. 西南国防医药, 2011, 21(10): 1114-1116.
- Chen Z, Zhou H, Li S, et al. Serological thymidine kinase 1 (STK1) indicates an elevated risk for the development of malignant tumours[J]. Anticancer Res, 2008, 28(6B): 3897-3907.
- He E, Xu XH, Guan H, et al. Thymidine kinase 1 is a potential marker for prognosis and monitoring the response to treatment of patients with breast, lung, and esophageal cancer and non-Hodgkin's lymphoma[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2010, 29(4/6): 352-358.
- Huang ZH, Tian XS, Li R, et al. Elevated thymidine kinase 1 in serum following neoadjuvant chemotherapy predicts poor outcome for patients with locally advanced breast cancer[J]. Exp Ther Med, 2012, 3(2): 331-335.
- 袁航, 朱宝, 吴翼伟, 等. 肺癌患者血清TK1检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(3): 301-302.
- Aufderklamm S, Todenhöfer T, Gakis G, et al. Thymidine kinase and cancer monitoring[J]. Cancer Lett, 2012, 316(1): 6-10.
- Xu Y, Shi QL, Ma H, et al. High thymidine kinase 1 (TK1) expression is a predictor of poor survival in patients with pT1 of lung adenocarcinoma[J]. Tumour Biol, 2012, 33(2): 475-483.
- Benz MR, Czernin J, Allen-Auerbach MS, et al. 3'-deoxy-3'-[18F] fluorothymidine positron emission tomography for response assessment in soft tissue sarcoma: a pilot study to correlate imaging findings with tissue thymidine kinase 1 and Ki-67 activity and histopathologic response[J]. Cancer, 2012, 118(12): 3135-3144.

(收稿日期:2013-09-08)

(上接第3128页)

组织病理学检查)来进行宫颈癌及癌前病变的筛查,可最大限度的把女性宫颈癌阻止在癌前病变阶段^[10-13]。

参考文献

- 耿建祥,王旭波.人乳头瘤病毒感染及其临床应用[M].北京:人民卫生出版社,2009:381-427.
- 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感染及其临床意义[J].医学研究生学报,2010,23(4):391-393.
- 张金浩,耿建祥,吴崑崙,等.结直肠肿瘤中人乳头瘤病毒感染的基因分析[J].医学研究生学报,2011,24(2):154-157.
- 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.
- 林仲秋,卢淮武.子宫恶性肿瘤诊治研究—子宫颈癌[J].国际妇产科学杂志,2012,39(4):322-326.
- 郎景和.迎接子宫颈癌预防的全球挑战与机遇[J].中华妇产科杂志,2002,37(3):129-131.
- 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.

- 任晓慧,耿建祥,李海,等.某市2109例女性宫颈细胞中HPV基型别的研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(13):1542-1544.
- 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 Suppl 10(1): K17-K28.
- 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.
- 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.
- 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.
- McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2): 195-208.

(收稿日期:2013-09-03)