·论　　著·

徐州地区女性宫颈细胞中人乳头瘤病毒感染基因型的分析*

夏　林[1]，龚培尧[2]，耿建祥[2△]，王宏景[2]，谭　进[2]，肖　蔚[2]，马文元[2]，龙秀荣[2]，赵　雪[2]
（1. 江苏省扬中市人民医院病理科，江苏杨中 212200；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　本文旨在探讨徐州地区女性宫颈细胞中人乳头瘤病毒（HPV）感染基因谱的分布情况及其临床意义。**方法**　从 8 010 份徐州地区宫颈细胞标本中提取 23 种 HPV DNA，使用聚合酶链式反应和反向点杂交相结合的基因芯片技术对宫颈细胞 23 种 HPV 型别进行测定，同时分析受检者的相关资料。**结果**　8 010 例女性中有 1 852 例 HPV 感染者，总的 HPV 感染率为 23.12%，其阳性检出率一重型别为 17.17%，一重中最主要感染型别是 HPV16 型为 4.35%，其次为 HPV58 型 2.12%、52 型 1.82%。阳性检出率多重 HPV 感染为 5.96%；其中 16＋58 型、16＋52 型、11＋16 型，分别占多重感染的 4.40%、2.94% 和 2.52%，是多重感染的主要型别。**结论**　一重 HPV16、58 和 52 型及多重 16＋58、16＋52 和 11＋16 型是感染徐州地区女性宫颈细胞的主要基因型，此基因芯片检测技术适用于宫颈细胞标本，一次可检测 23 种 HPV 基因型，其特异性强，敏感性高，对我国女性宫颈 HPV 感染基因型分布的分子流行病学调查研究具有重要的意义。

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.1673-4130.2015.07.008　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2015)07-0882-03

Genotypes analysis of HPV infection in cervical cell samples among women in Xxuzhou region*

Xia Lin[1], *Gong Peiyao*[2], *Geng Jianxiang*[2△], *Wang Hongjing*[2], *Tan Jin*[2], *Xiao Wei*[2], *Ma Wenyuan*[2], *Long Xiurong*[2], *Zhao Xue*[2]
(1. *Department of Pathology, Yangzhong Municipal People's Hospital, Yangzhong, Jiangsu* 212200, *China*; 2. *Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine/Jiangsu Provincial HPV Collaboration Group, Nanjing, Jiangsu* 210001, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the distribution situation of human papillomavirus (HPV) genotypes profile in cervical cells among women in Xuzhou area and its clinical significance. **Methods**　23 kinds of HPV DNA were extracted in cervical cell samples from 8 010 women in Xiuzhou area. The gene-chips technique of PCR combined with reverse dot blot was adopted to detect the HPV genotypes. **Results**　Among 8010 cervical cell samples, there were 1 852 HPV infected cases, the total HPV infection rate was 23.12%, the HPV infection rates of single type accounted for 17.17% and its predominant types were 16 type (4.35%), followed by 58 type (2.12%) and 52 type (1.82%), The detection rate of multiple HPV infection was 5.96%, in which the predominant types were HPV16＋58(4.40%), 16＋52(2.94%), 11＋16(2.52%). **Conclusion**　The single HPV infection of HPV16, 58, 52 and the multiple HPV infection of HPV16＋58, 16＋52, 11＋16 are the main genotypes of cervical cells among women in Xuzhou area, this gene chip technique is suitable for the cervical cell sample, its once detection can detect 23 kinds of HPV genotypes with high specificity and high sensitivity, which has an important significance for the molecular epidemiologic survey study of HPV genotypes distribution among women in our country.

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

宫颈癌位居妇科恶性肿瘤的第一位，人乳头瘤病毒（HPV）感染是关键和必要的致病因子[1-3]。由于 HPV 感染存在着种族和地域的差异性。因此，世界卫生组织建议各国应开展多地区大样本 HPV 感染率及其基因谱分布的研究工作，尤其是在尚未使用 HPV 疫苗的国家[4]。由于我国地域辽阔，人口和民族众多，弄清楚我国各地区、各民族 HPV 感染率及其基因谱分布情况非常重要。这将为我国各地区、各民族女性宫颈 HPV 感染的分子流行病学调查、HPV 疫苗研发、宫颈 HPV 感染率和基因谱的比对研究提供极其宝贵的标杆和大样本数据资料，也可为政府部门对公共卫生政策的决策提供重要的依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2013 年 1～10 月在徐州市妇幼保健院妇科和体检中心就诊和体检的 8 010 例行宫颈上皮细胞检测的女性，年龄 18～85 岁，平均年龄 36.49 岁，其中年龄 20 岁以下 50 例，20～＜25 岁 789 例、25～＜30 岁 1 254 例、年龄 30～＜35 岁 1 450 例、35～＜40 岁 1 448 例、年龄 40～＜45 岁 1 457例、45～＜50 岁 928 例、年龄 50～＜55 岁 338 例、55～＜60 岁 144 例、60～＜65 岁 67 例、65 岁以上 85 例。操作员按说明书规范操作。同时回顾分析其相关资料。

1.2　仪器与试剂　Gene Amp PCR system 2400 型扩增仪购置新加坡；FYY-3 型分子杂交仪由江苏兴化市分析仪器厂制造；eppendorf 5810R 型高速冷冻离心机产于德国；BHC-1300 ⅡA2 型生物安全柜由苏州市安泰空气技术有限公司提供；－20 ℃冰箱是青岛海尔有限公司的产品等。深圳亚能生物技

*　基金项目：南京市卫生局中医专项资助项目（2009-92）。　作者简介：夏 林，男，副主任医师，主要从事临床人乳头瘤病毒研究。　△　通讯作者，E-mail：dyc720 @ 163.com。

术有限公司提供 HPV 基因分型检测试剂盒。使用的显色液须按需要的浓度加蒸馏水即配即用。

1.3　方法

1.3.1　标本的收集及存放　使用窥阴器暴露宫颈，再除去宫颈口的分泌物，将取样刷放置宫颈口，按顺时针方向转动刷子 4～5 圈，刷子抽出时要慢，抽出后在刷柄折痕处折断刷头，并将其刷头丢入保存管中，旋紧管盖，对标本进行编号，将保存管直立，存放于－20 ℃冰箱以备用。

1.3.2　DNA 的提取　从－20 ℃冰箱中取出保存管，充分漂洗刷头后，将保存液全部移至 1.5 mL 的小管中，吸去上清液，留下管底的细胞。接着把 50 μL 裂解液加入小管中，在振荡器上混匀后，放入 100 ℃的金属浴中 10 min，拿出后放入高速离心机 13 000 r/min 离心 10 min 后，吸出 DNA 溶液的中间层后用。依据说明书开始 PCR 扩增，对扩增后的产物循序杂交、孵育和显色。实验完成后，观察膜条上的显色点，作出判断。除 PC 位点外如看到一个显色圆点为一重感染，如观察到 2 个以上的显色点为多重感染。

1.4　统计学处理　各年龄段 HPV 感染率及各 HPV 型别的比例采用 HPV 分型统计软件(南京倍宁医疗器械有限公司提供)进行分析，对分析出来的相关数据，应用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学处理，计数资料以百分率表示，率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法。

2　结　　果

8 010 例行宫颈上皮细胞检测的女性中检出 HPV 感染者 1 852 例，总的 HPV 感染率为 23.12%(1 852/8 010)，其中一重型别的阳性检出率为 17.17%(1 375/8 010)。一重型别的感染中 HPV16 型为 348 例、58 型 170 例、52 型 146 例、6 型 112 例、11 型 101 例、53 型 83 例、33 型 68 例、68 型 58 例、18 型 52 例、31 型 49 例、MM4 型 39 例、39 型 38 例、66 型 24 例、59 型 20 例、44 型 13 例、51 型 12 例、56 型 11 例、45 型 10 例、73 型 6 例、42 型 5 例、83 型 5 例、35 型 4 例和 43 型 1 例，其中 HPV16 型阳性检出率为 4.35% (348/8 010)，是最主要的感染型别，其次为 HPV58 型 170 例和 52 型 146 例，其阳性检出率分别为 2.12% (170/8 010)和 1.82% (146/8 010)。多重 HPV 感染 477 例，其阳性检出率为 5.96%(477/8 010)，多重感染中 HPV 二型感染者 372 例、三型感染者 82 例、四型感染者 15 例、五型感染者 5 例和六型感染者 3 例，其中 16＋58 型 21 例、16＋52 型 14 例和 11＋16 型 12 例，分别占多重感染的 4.40%(21/477)、2.94%(14/477)和 2.52%(12/477)，是多重感染的主要型别。比较 11 组不同年龄段 HPV 感染情况，20 岁以下和 20～＜25 岁两组与各年龄组比较 χ^2 值为 5.05～163.48，其感染率差异有统计学意义($P<0.05$)，25 岁及以上各年龄段比较 χ^2 值为 0.00～2.19，各组比较其感染率差异无统计学意义($P>0.05$)。不同年龄组女性宫颈细胞 HPV 感染情况(见表 1)(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)，HPV 感染基因型别出现频率(见表 2)(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3　讨　　论

HPV 是一类小双链环状 DNA 病毒，是诱发女性宫颈癌及癌前病变的主因。2007 年欧洲生殖系感染和肿瘤组织(EUROGIN)提出以检测 HPV 作为子宫颈癌筛查的第一步，尤其是 30 岁以上的女性[5]。由于我国幅员辽阔，人口众多，经济文化卫生发展很不均衡，因此，要使得我国女性宫颈癌发病率和病死率同步降低必须有赖于有效的早期筛查。本文使用 PCR 和反向点杂交相结合的基因芯片检测技术，以 23 种常见的 HPV 作为感染源，对 8 010 例徐州地区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。

宫颈癌发病率的 80%发生在发展中国家。高危型 HPV 持续感染是女性宫颈癌发病重要诱因，因此，弄清楚我国各地女性宫颈 HPV 感染率、高危型分布情况以及确定持续高危型 HPV 感染者非常重要，因为只有持续性高危型 HPV 感染者才可能发生宫颈瘤变和癌变，因此追踪检测持续性高危型 HPV 感染就显得尤其重要。从宫颈上皮内瘤变(CIN)到原位癌再到浸润性癌是一个连续发展的过程，大约需要 10 年左右的时间。如果能尽早检测出持续性高危型 HPV 感染者或早期发现宫颈鳞状上皮内瘤变，同时采取干预治疗或采用得当的治疗措施，就有阻止和阻断宫颈致瘤致癌因子及其癌变的可能性，可见宫颈癌是一种可以预防和治愈的疾病[6-8]。

本研究表明：(1)地处我国华东地区的徐州地区女性宫颈上皮细胞中以一重型别感染为主，多重型别感染为辅，一重感染前 5 位依次是 16、58、52、6 和 11 型，而多重感染前 5 位依次是 16＋58 型、16＋52 型、11＋16 型、52＋53 型(11 例)和 6＋58 型(10 例)，这些型别都是徐州地区最主要的优势型别，除 18 型外，与亚洲地区 16、18、52 和 58 型 HPV 高检出率相一致。因此，我国在研发 HPV 疫苗时，应该充分考虑到这些型别，以提高其疫苗的覆盖面，最大限度地保护易感人群。(2)徐州地区 8 010 例一般女性人群中 HPV 总的感染率为 23.12%，表明 HPV 感染在徐州地区一般女性人群中呈中流行度，应进行更大标本量流行病学的调查研究工作，以建立起徐州地区一般女性 HPV 感染率以及优势型别的标杆，同时也要密切关注其动态流行趋势的变化(流行度和基因谱的变化)。(3)目前，我国宫颈癌发病率为 3/20 000 万，每年新发病例 13 万以上，占世界新发病例的 1/4 以上，防控任务相当艰巨。由于宫颈癌的主因是 HPV 感染，因此，了解我国女性一般群体中不同年龄组中 HPV 感染的比例和优势型别对宫颈癌的防控意义非常重大。本研究以 5 岁为一组分为 11 组来比较每组的 HPV 感染率，20 岁以下组为 50.00%、20～＜25 岁组为 30.04%、25～＜30 岁组为 22.97%、30～＜35 岁组为20.62%、35～＜40 岁组为 22.79%、40～＜45 岁组为 22.31%、45～＜50 岁组为 22.95%、50～＜55 岁组为 20.12%、55～＜60 岁组为 20.83%、60～＜65 岁组为 26.87%、65 岁以上组为 22.35%。近年来，我国宫颈癌发病趋势明显年轻化，且早期患者增多，发病年龄多为 35～50 岁，平均发病年龄是 44.7 岁，60～70 岁又出现一个高峰。宫颈癌患者年龄均值比 2000 年前年轻了5～10 岁。从本文 HPV 感染分组来看，HPV 感染曲线在 30 岁以下组虽逐渐下降，但仍保持在较高的水平，符合宫颈癌瘤发病年龄年轻化的趋势，30～＜35 岁组感染曲线逐渐降低到较低点，35～＜50 岁组感染曲线上升到较高水平近似水平前移，符合宫颈癌在 35～＜50 岁聚集发病的现象，50～＜60 岁组感染曲线又回到较低的水平，60 岁及以上组感染曲线又上升到较高的水平，与宫颈癌 60～70 岁又出现一个高峰相吻合。本研究展现出的徐州地区女性各年龄段宫颈 HPV 感染曲线比较合理的解释了我国当前宫颈癌的发病分布规律和年轻化的趋势。(4)宫颈癌呈年轻化趋势的主要原因包括生活方式的改变以及初次性生活的提前，宫颈癌早期患者比例明显增多，原因包括城镇化进程加快、妇女防病意识的加强，筛查方法的不断改进。男女性生活过早、性伴侣过多一直被认为是宫颈癌高发的两大

高危因素，这也是导致女性宫颈 HPV 感染率、持续性感染和多重混合感染增加的关键所在。本研究 45 岁以下(20 岁以下除外)女性 HPV 感染率明显高于 45 岁以上的女性，提示 HPV 高感染率与宫颈癌发病呈现年轻化的趋势密切相关。据统计，没有保护措施与 HPV 阳性感染者有性接触史的人，平均 3 个人中将有 2 个人在随后的几个月里会发生感染[9]。一旦男性或女性被查出 HPV 感染，除积极正确的治疗外，在行性事时都应该使用避孕套，以便最大程度地降低 HPV 在两性之间的传播。如何切断 HPV 在两性之间的传播，尤其切断男性在 HPV 传播上的“桥梁”作用，对宫颈癌的防控具有深远的意义[10-12]。因此，宫颈癌的预防不仅仅是女性的事，而是男性和女性的共同责任。(5)从本研究前 5 位高危 16、58、52、53 和 33 型 HPV 感染出现频率与年龄分布来看，16 型在 30～<35 岁组最高、58 型在 35～<40 岁组最高、52 型在 30～<35 岁组最高、53 型在 35～<40 岁组最高、33 型在 40～<45 岁组最高，这 5 种是致瘤致癌的主要优势型别，其感染频率在 35～<50 岁之间均呈现出一个高位近似弧顶曲线，与宫颈癌此年龄发病聚集性相一致，提示致癌的 HPV 高感染率与此年龄段宫颈癌高发病率相吻合。但 16 型和 52 型感染高峰稍提前一个年龄段，而 33 型则后移一个年龄段，这种差异性还需要大标本的进一步的研究。(6)由于 HPV 感染的存在，就预示着宫颈癌瘤病变的存在，高危型 HPV 感染使得宫颈癌的相对危险性增加 250 倍，高危型 HPV 持续感染可使宫颈 CINⅢ级持续并进展[13]。妇科医师应该根据 HPV 分型检测的结果来判断女性 HPV 感染情况，并采取针对性的干预治疗措施。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，尤其是多重高危型 HPV 感染，应建议行阴道镜检查。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；若为高危型持续性 HPV 感染，对 CINⅡ级以上病变均应立即干预治疗。(7)目前全球已有 100 多个国家获准使用宫颈癌预防性疫苗，主要为二价疫苗(HPV16 和 18 型)和四价疫苗(HPV6、11、16、18 型)，其疫苗对宫颈癌瘤具有预防作用。根据 HPV 属种分类原则，种内的型别之间有着共同的生物学和病理学特征。HPV16 型与 HPV31、33、35、52、58 和 67 型同属第 9 种，HPV18 型与 HPV39、45、59、68 和 70 型同属第 7 种，种内之间应该具有免疫保护性，四价疫苗对本文一般女性 HPV 感染者预防作用为 32.07%(594/1 852)，如把种内的型别免疫保护性作用考虑在内，则这种预防作用为85.53%(1 584/1 852)，对一般 HPV 感染女性人群保护覆盖面提高了 53.46%。(8)世界卫生组织指出：在所有癌症中，宫颈癌占发展中国家妇女全部癌症死亡的 11%，早期发现和治愈具有巨大的潜力，这也是人类远离宫颈癌的关键所在。宫颈癌是一种感染性疾病，其发病与 HPV 感染的型别有关。因此，对一般女性群体行 HPV 分型检测对宫颈癌防控具有非常重要的意义。目前，常用的 HPV 检测方法多数都不能区分持续一重或多重 HPV 感染，也不能进行分子流行病学和基因谱分布的研究。高通量的 HPV 分型基因芯片技术克服了以上检测方法的不足。因此，HPV 分型检测对宫颈癌的筛查、监控、预后和 HPV 型别危险性的评估以及分子流行病学调查意义重大。

总之，宫颈癌的防控是一个系统工程，应根据我国具体情况，尽可能开展区域性的筛查。尽快弄清楚我国各地区、各民族 HPV 感染率及其基因谱分布情况，以便绘制出全国性的女性宫颈 HPV 感染状况和基因型分布图谱，这将为我国 HPV 疫苗的研制以及后 HPV 疫苗时代其疫苗的改进，提供重要的依据和比对的大标本多地区多民族的基因数据资料。如何控制好 HPV 在两性之间的传播是我们今后工作重点之一，通过给女孩和男孩都接种宫颈癌疫苗，对性活跃期的男女行性事时采用安全套等措施，可最大限度地降低男性和女性的 HPV 感染率，宫颈癌瘤及其他 HPV 感染相关癌瘤的发病率也会随之下降[14-15]。宣传加预防，再加上筛查加普查的早诊、早治原则，是确保妇女免受宫颈癌危害的最好措施。如果这些预防措施都能够落实到位的话，可使绝大多数妇女能够有效地预防而远离宫颈癌[16]。

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] 张金浩，耿建祥，吴崑岚，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.

[3] 周 伟，耿建祥，韩惦梅，等. 原位杂交 HPV DNA 检测技术应用及体会[J]. 临床与实验病理学杂志，2009，25(4)：446-447.

[4] Cai HB，Ding XH，Chen CC. Prevalence of single and multiple human papillomavirus types in cervical cancer and precursor lesions in Hubei，China[J]. Oncology，2009，76(2)：157-161.

[5] 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.

[6] 邹 琳，兰建云，耿建祥，等. 47 例宫颈腺癌中人乳头瘤病毒感染基因分型的研究[J]. 国际检验医学杂志，2013，34(4)：393-394，397.

[7] 王巧燕，杜菊兰，万汝根. 人乳头状瘤病毒 DNA 检测在宫颈病变筛查中的价值[J]. 中华医院感染学杂志，2010，20(1)：145-146.

[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)：1542-1544.

[9] 魏 谨，耿建祥，朴正爱，等. 已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒感染的基因分型研究[J]. 中华医院感染学杂志，2012，22(23)：5202-5205.

[10] 王宏景，刘忠伦，耿建祥，等. 苏州两医院女性宫颈 HPV 感染基因型别的对比研究[J]. 国际检验医学杂志，2013，34(4)：404-406.

[11] 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.

[12] 冷秀兰，范雪梅，耿建祥，王宏景，等. 宫颈鳞癌及腺癌组织中 HPV 感染基因型分布的比较研究[J]. 中国妇幼保健，2014，29(10)：1594-1596.

[13] 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)：817-818，820.

[14] Etienney I，Vuong S，Si-Mohamed A，et al. Value of cytologic papanicolaou smears and polymerase chain reaction screening for human papillomavirus DNA in detecting anal intraepithelial neoplasia[J]. Cancer，2012，15(12)：6031-6038.

[15] McLaughlin-Drubin ME，Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res，2009，143(2)：195-208.

[16] 龙秀荣，王志蕙，耿建祥，等. 健康妇女及宫颈上皮癌瘤患者 HPV 感染基因型分布特征研究[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(24)：2958-2959，2962.

(收稿日期：2014-11-18)