

• 论 著 •

膜杂交法检测人乳头瘤病毒结果分析

李雷生, 杨海霞, 李文娟, 邵泽伟

(济宁医学院法医学与医学检验学院医学检验教研室, 山东济宁 272067)

摘 要:目的 探讨女性感染人乳头状瘤病毒(HPV)的情况及其亚型分布规律,提出诊断和预防疾病的措施。方法 采用核酸杂交检测某医院 12 422 例门诊和住院患者的宫颈脱落细胞 HPV 的亚型,分析不同患者的 HPV 感染情况。结果 HPV 感染率为 17.058 4%,其中不同年龄组 HPV 感染率不同,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 HPV 亚型检测可用于子宫颈癌的筛查及病情判断,对 HPV 阳性人群关键措施是早诊断,早治疗,以阻断 HPV 的持续性感染,预防子宫颈癌的发生。

关键词:子宫颈癌; 人乳头状瘤病毒; 核酸杂交; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)07-0911-02

Analysis on results of membrane hybridization for detecting HPV

Li Leisheng, Yang Haixia, Li Wenjuan, Shao Zewei

(Teaching and Research Section of Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China)

Abstract:Objective To investigate the human papillomavirus(HPV) infection situation among female patients and its subtypes distribution rule for providing the measures of diagnosis and prevention. **Methods** The nucleic acid hybridization was adopted to detect HPV subtypes of cervical exfoliated cells in 12 422 female outpatients and inpatients in a hospital. The HPV infection situation among different patients were analyzed. **Results** The HPV infection rate was 17.0584%, the HPV infection rate had statistical difference among different age groups ($P<0.01$). Totally 20 subtypes of HPV were identified. HPV16, HPV52 and HPV58 were the most prevalent high-risk subtypes. **Conclusion** The HPV subtype detection can be used in the screening and condition judgment of cervical cancer. The key for the HPV positive population is early diagnosis and early treatment for blocking the HPV persistent infection and preventing the cervical cancer occurrence.

Key words:cervical cancer; HPV; nucleic acid hybridization; genotype

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)属于乳头瘤病毒科乳头瘤病毒属。该病毒广泛存在于自然界。人乳头瘤病毒只能感染人的皮肤和黏膜的上皮细胞,引起皮肤黏膜异常增生,使宿主组织发生疣状或乳头状瘤病变,是尖锐湿疣的病原体^[1-2]。尖锐湿疣种是最常见的一种性传播疾病。在我国,近年来尖锐湿疣发病人数急剧增长,仅次于非淋菌性尿道炎和淋病,居第三位。1995 年国际癌症研究中心公布的研究结果证实,人乳头瘤病毒与子宫颈癌有密切的因果关系^[3]。因此,研究人乳头瘤病毒的感染情况和规律已成预防疾病的重要依据。HPV 目前还不能在组织细胞内分离培养,也没有动物模型可成功接种。实验室常用的 HPV 感染诊断方法是核酸杂交试验^[4-5]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 用宫颈刷采集 2010 年 12 月至 2012 年 12 月某医院妇科门诊患者和妇科住院患者的宫颈刷片标本共 12 422 例,患者年龄 3~88 岁,平均年龄(37.1±9.5)岁。

1.2 仪器与试剂 凯普 DNA 细胞裂解液提取试剂盒、DNA 扩增试剂盒和 HPV 核酸分型检测试剂盒(潮州凯普生物化学有限公司)、PCR 扩增仪(PK-TC48)、凯普 Hybribio 医用核酸分子快速杂交仪。

1.3 标本采集 医师通过宫颈刷细胞采集器完成采集。扩阴器暴露宫颈口后,宫颈刷顺时针刷转 5 圈,取出后放入已加有专用细胞保存液的取样管中,立即送检或 4℃保存时间少于 2 周或-20℃保存少于 3 月检测。

1.4 方法

1.4.1 DNA 分离提取 取临床标本 500 μL 宫颈细胞保存液,14 000 r/min 离心 1 min,去上清液。沉淀加入 45℃的 400 μL 溶液 I,振荡混匀,100℃加热 15 min。再加入 400 μL 溶液 II,振荡混匀,室温放置 2 min,14 000 r/min 离心 1 min,去上清液,室温放置 2 min。加入 60 μL 溶液 III 溶解充分溶解,静置 10 min,14 000 r/min 离心 1 min。

1.4.2 PCR 扩增 用 PCR 扩增试剂盒进行扩增,反应体系为:每个反应管 23.25 μL 的 PCRMix、0.75 μL 的 DNA Taq 酶和 1 μL 的 DNA 模板样本,混匀,总体积为 25 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 9 min,95℃、20 s,55℃、30 s,72℃、30 s,总计 40 个循环,72℃延伸 5 min,4℃保存反应产物。

1.4.3 杂交和显色过程 按照仪器使用说明打开杂交仪,用镊子将杂交膜放置在塑料薄膜对应开孔上。取 25 μL PCR 产物在 95℃加热 5 min,然后立即冰浴至少 2 min。在杂交仪准备好的条件下,于 45℃进行杂交。在杂交孔内加入 1 mL 预热的 45℃的杂交液,盖上盖板后至少温育 2 min。把已变性 DNA 样品溶液加入 0.5 mL 预热至 45℃的杂交液,混匀后加在薄膜上,盖上盖板温育至少 10 min,开泵并进行导流杂交。用预热至 45℃的杂交液冲洗膜 3 次,每次用量 0.8 mL。用 0.5 mL 封阻液封闭薄膜至少 5 min,用 A 液冲洗薄膜 4 次,每次 0.8 mL。加入 0.5 mL 显色液,盖上盖板显色 3~5 min。用 B 液冲洗薄膜 3 次,每次 1 mL,再用 2 mL 蒸馏水漂洗干净。

1.4.4 结果判断 检测结果阳性为清晰可见的蓝紫色圆点,

根据薄膜条 HPV 分型分布图,判断阳性点为何种 HPV 病毒的类型。

1.5 统计学处理 使用 SPSS17.0 软件进行率的比较,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基本情况分析 这次研究的患者为 2010 年 12 月至 2012 年 12 月门诊和住院 12 422 例进行 HPV 检查的患者,具体情况见表 1。

表 1 患者年龄情况表					
项目	总人数	最小年龄	最大年龄	平均年龄	标准差
阳性年龄	2 119	12.00	83.00	36.338 2	9.648 61
阴性年龄	10 303	3.00	88.00	37.266 8	9.403 69
合计	12 422	3.00	88.00	37.109 5	9.451 66

2.2 HPV 基因型情况分析 共检出 20 种 HPV 型,分为单一亚型感染(只感染一种亚型)和多重亚型感染(感染 2 中或 2 种以上亚型),见表 2。16 型感染率最高,多重亚型感染病例感染亚型数目最多是同时感染 7 种亚型(11 型、16 型、18 型、31 型、33 型、53 型、58 型)。

表 2 感染类型			
项目	单一亚型感染	多重亚型感染	合计
阳性人数	1 680	439	2 119
阳性率	13.524 4%	3.534 1%	17.058 4%

2.3 年龄分组差异分析 按照年龄不同分为 5 个年龄组,计算不同年龄组阳性率,并用采用 χ^2 检验,结果 $\chi^2=25.625$, $P<0.001$,差异有统计学意义,见表 3。

表 3 年龄分组阳性率			
年龄分组	阳性数	阴性数	阳性率(%)
19~<20	13	19	40.625
20~<30	570	2 421	19.057
30~<40	780	3 886	16.717
40~<50	610	3 243	15.832
≥50	146	734	16.591
合计	2 119	10 303	17.058

3 讨 论

HPV 只能感染人的皮肤和黏膜上皮细胞,引起皮肤黏膜异常增生,使宿主组织发生疣状或乳头状瘤病变。通过性接触可导致生殖器肛门部位的感染,是尖锐湿疣(condyloma acuminatum,CA)或肛门生殖器疣(anogeital warts)的病原体。人们早在 1907 年就认识到 HPV 是皮肤疣的病原,但由于该病毒不能在体外细胞中培养,延缓了对其研究。1995 年国际癌症研究中心(IARC)公布的研究结果证实,HPV 与子宫颈癌有密切的因果关系。因此,HPV 已成为严重危害人类健康的重要病原体^[6]。

子宫颈癌在女性恶性肿瘤发病率占第二位,直接影响女性身体健康。因此,临床 HPV 检查对于早期发现子宫颈癌高危人群显得非常重要,并有利于采取有效地临床措施去预防宫颈癌的发生有着重要的临床意义^[7-8]。因此,快速有效地进行

HPV 分型检查在临床诊断中就显得非常重要^[9]。近年来,核酸分子杂交方法检测 HPV 感染成功应用于临床检测,其特点是快速高效,能够进行大范围的普查和筛查^[10-11]。本研究所采用的就是核酸分子杂交技术^[12]。

本研究的 HPV 感染总阳性率为 17.058 4%,其中感染率最高的 3 种亚型分别为 16 亚型(4.226 3%)、58 亚型(1.432 9%)、52 亚型(1.279 9%)。HPV16 型是全世界最常见的亚型,本研究也是发病率最高的一个亚型,是子宫颈癌的首要高危因素。该组病例中 HPV58 和 HPV52 感染率仅次于 HPV16,名列检出率第 2、3 位。

HPV 感染率在不同年龄组之间差别有统计学意义。阳性率最高的 2 组为,<20 岁组(40.625%)与 20~29 岁组(19.057 2%)。也是最年轻的 2 个组,说明感染趋于年轻化。其中感染亚型最多的一个女性年龄为 22 岁,她感同时感染 7 种亚型(11 型、16 型、18 型、31 型、33 型、53 型和 58 型)。这说明病毒感染可能性生活比较活跃有关,这个年龄是性生活活跃期。发病率年轻化,说明普及疾病相关知识和健康教育非常重要。

综上所述,子宫颈癌 HPV 基因分型有利于确定子宫颈癌发生的高危因素及筛查高危人群,对宫颈癌的早期诊断和早期治疗都有重要现实意义。

参考文献

[1] 杨越波,刘冬,曾海涛.广州地区女性 HPV 感染及分型影响因素分析[J].中国公共卫生,2012,28(3):365-367.

[2] 李芳,李炎,吴韶清,等.尖锐湿疣患者宫颈高危型人乳头状瘤病毒分布[J].中华医院感染学杂志,2012,22(1):210-212.

[3] 吴如英.宫颈糜烂患者人乳头状瘤病毒感染状况分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(5):1083-1084.

[4] Siriaungkul S,Settakon J,Sukpan K,et al. HPV detection and genotyping in vulvar squamous cell carcinoma in northern thailand[J].Asian Pacific J Cancer Prevention,2014,15(8):3773-3778.

[5] Panigoro R,Susanto H,Novel SS,et al. HPV genotyping linear assay test comparison in cervical cancer patients;implications for HPV prevalence and molecular epidemiology in a limited-resource area in bandung,indonesia[J] Asian Pacific J Cancer Prevention,2013,14(10),5843-5847.

[6] 曹清香,高红,唐清,等.衡阳地区女性感染 21 种型别人乳头瘤病毒现状分析[J].国际检验医学杂志,2014,35(14):1830-1832.

[7] 全进毅,程琪辉,孙丽萍. T 细胞亚群及 Ki67 在宫颈人乳头状瘤病毒感染进程中的变化及意义[J].中华医院感染学杂志,2012,22(6):1126-1128.

[8] 宣飞兰.高危型人乳头状瘤病毒感染与卵巢癌预后的关系[J].中华医院感染学杂志,2012,22(8):1636-1637.

[9] 赵瑾,贺超奇,吕磊,等.杭州萧山区妇女人乳头瘤病毒感染情况分析[J].中国公共卫生,2012,28(3):387-388.

[10] 赵东岩,侯霞,陈弟,等.妇科门诊宫颈糜烂患者 1 980 例 HPV 感染状况分析[J].中国皮肤性病杂志,2014,28(8):814-816.

[11] 王焕妮,王慧儒,胡鹏,等.宫颈上皮内瘤变Ⅱ~Ⅲ级患者 HPV 感染的分型及特点[J].广西医科大学学报,2014,31(2):220-222.

[12] 隋珍,吴元元.妇科门诊维吾尔族患者 HPV 感染情况分析[J].新疆医学,2014,44(1):59-61.