

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.008

新疆地区人乳头瘤病毒感染的基因型研究

李 辉¹, 卞文安², 赵 旌¹, 于 宁¹

(新疆医科大学 1. 第二附属医院检验科; 2. 附属肿瘤医院检验科, 乌鲁木齐 830011)

【摘要】目的:应用 PCR-反向点杂交(PCR-reverse dot blot, PCR-RDB)技术对新疆地区人乳头瘤病毒(Human papilloma virus-HPV)进行基因分型。方法:收集疑似 HPV 感染病例标本 335 例,提取 HPV 基因组 DNA,应用 PCR-RDB 技术扩增 HPV 的 L1 基因并进行分型,计算不同基因型 HPV 的感染率,组间率的比较采用 χ^2 检验。结果:335 例病例标本中检出 HPV 阳性标本 108 例,阳性率为 32.2%,共检出 HPV16、18、33、45、56、68、6、11 和 66 共 9 种基因型,其中 HPV16、18 和 56 亚型的感染较高。分组统计结果显示,HPV 阳性率和高危型 HPV 的检出率在不同类型疾病患者中是不同的,在尖锐湿疣、高度子宫颈上皮内瘤变 II/III 和宫颈癌患者中 HPV 阳性率和高危型 HPV 的检出率均显著高于宫颈炎组和宫颈糜烂疾病组($P<0.05$),而随着年龄的不断增长,HPV 感染率降低。HPV 的感染率在 19~36 年龄组较高,随着年龄的增加,HPV 感染率有降低趋势。结论:在本地区宫颈病变患者中 HPV 的感染率较高,而基于 PCR-RDB 的基因分型可为 HPV 感染的诊断、治疗和随访提供依据。

【关键词】人类乳头瘤病毒;PCR-反向点杂交;妇科疾病**【中国图书分类法分类号】**R446.69**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-03-29

Genotype of human papilloma virus infection in Xinjiang

LI Hui¹, BIAN Wenan², ZHAO Jing¹, YU Ning¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the genotypes of human papilloma viruses (HPV) in women with different gynecologic diseases in Xinjiang by PCR-reverse dot blot (PCR-RDB). **Methods:** Clinical specimens from 335 women with suspected symptoms of gynecologic disorders were collected and HPV DNA (L1) was isolated and subjected to genotyping by PCR-RDB. HPV infection rates were calculated and statistical analysis of χ^2 test was performed to compare the HPV infection rates among different groups. **Results:** Totally 108 specimens were identified to be HPV positive and the positive rate was 32.2% (108/335). Nine kinds of HPV genotypes (HPV 16, 18, 33, 45, 56, 68, 6, 11, 66) were identified by PCR-RDB and HPV 16, 18, 56 had higher infection rates than other HPV genotypes. Statistic analysis showed that patients with condyloma, cervical intraepithelial neoplasia II/III and cervical cancer had significantly higher HPV positive rates and high-risk HPV infection rates than those with cervicitis or cervical erosion ($P<0.05$). Additionally, HPV infection rates were decreased with the increasing of age. **Conclusions:** HPV infection is common in patients with different uterine-cervical diseases in Xinjiang and HPV genotyping by PCR-RDB could provide epidemiological evidence for the diagnosis, treatment and follow-up of HPV infection.

【Key words】human papillomaviruses; PCR-reverse dot blot; gynecological disease

人类乳头瘤病毒(Human papilloma viruses, HPV)是一种 DNA 双链病毒,目前已经发现的 100 余种亚型,其中约 40 种可特异性感染人的皮肤和黏膜鳞状上皮细胞,诱发宫颈上皮等部位的良、恶性病变^[1]。本文采用 PCR-反向点杂交(PCR-reverse dot blot, PCR-RDB)技术对新疆地区疑似 HPV 感染标

本进行 HPV 基因分型,旨在为不同基因型 HPV 感染的诊断、治疗、随访提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

PCR-RDB 试剂盒、宫颈脱落细胞采集器均购自亚能(深圳)生物技术有限公司,其中,每张膜条均事先预固定有针对 15 种高危型 HPV 和 8 种低危型 HPV 的杂交探针,可同时鉴

作者介绍:李 辉(1969-),女,副主任检验师,

研究方向:临床免疫学检验。

通信作者:卞文安,男,副主任检验师,Email:bianwenan@sina.com。

定 23 种 HPV 基因型。

1.2 标本采集

纳入知情同意选择 HPV 筛查的女性共计 335 例(年龄 19~51 岁),临床诊断有一种或几种宫颈疾患,包括宫颈炎、宫颈糜烂、尖锐湿疣、高度子宫颈上皮内瘤变(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN) II/III 或宫颈癌。使用宫颈脱落细胞采集器或棉拭子采集宫颈表皮脱落细胞或疣体表皮脱落细胞,置含洗脱液的套管中保存备用。

1.3 DNA 提取及基因型

1.3.1 样本处理 将棉拭子漂洗液或洗脱液转移到 1.5 ml 微量离心管中,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 50 μ l 细胞裂解液,悬浮沉淀,100 $^{\circ}$ C 加热 10 min。13 000 r/min 离心 10 min,保留上清备用。

1.3.2 HPV 基因扩增及反向点杂交(PCR-RDB) 严格按试剂盒说明书,PCR 扩增 HPV 衣壳蛋白基因 L1 并进行基因分型。其中,PCR 反应条件为:50 $^{\circ}$ C 15 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,42 $^{\circ}$ C 90 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。然后将 PCR 产物和预先固定有 23 种 HPV 分型探针的硝酸纤维素膜条进行变性、液相杂交、洗涤和显色,根据杂交点的有无及分型探针类别判断是否存在 HPV 感染并确定 HPV 基因亚型。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。分别统计不同组别的 HPV 感染率及基因型,不同组别间 HPV 感染率的比较采用 χ^2 检验, $\alpha=0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 HPV 的基因型比较

统计结果显示,从 335 例疾病组标本中检出 HPV 阳性标本 180 例,总阳性率为 53.7%。HPV 基因分型结果表明,从 335 例疑似 HPV 感染病例标本中共检出 9 种 HPV 基因型,分别是高危型的 HPV16、18、33、45、56、68 和低危型的 HPV6、11、66(表 1)。

表 1 不同宫颈疾患患者 HPV 的基因型

HPV 基因型	宫颈炎	宫颈糜烂	尖锐湿疣	CIN II/III	宫颈癌
HPV16	12	30	28	6	5
HPV18	2	8	6	2	1
HPV33	6	6	3	1	0
HPV45	1	3	2	0	0
HPV56	9	13	0	2	2
HPV68	5	4	1	3	0
HPV6	3	3	0	0	0
HPV11	1	3	0	0	0
HPV66	4	4	1	0	0
合计	43	74	41	14	8

注:表中数据以各基因型的累计检出频数计

其中,单纯性 HPV16、18、33、45、56、68、6 和 HPV66 的感染率依次为 45.0%(81/180)、10.6%(19/180)、8.9%(16/180)、3.3%(6/180)、14.4%(26/180)、7.2%(13/180)、3.3%(6/180)和 2.2%(4/180)和 5.0%(9/180)。合并 HPV16/33、16/56、16/68、18/33、18/56、56/11 的感染率分别为 1.1%(2/180)、4.4%(8/180)、3.3%(6/180)、2.2%(4/180)、3.3%(6/180)和 1.6%(3/180)。另分别检出 HPV16/56/68 和 HPV16/68/11 三重感染标本各 1 例 0.5%(1/180)(表 1)。

2.2 不同疾病类型 HPV 感染率比较

在不同疾病类型患者中,HPV 阳性率和高危型 HPV 检出率总体比较差异有统计学意义, P 值分别为 0.000 0 和 0.000 0;即总体上来说不同疾病类型患者的 HPV 阳性率和高危型 HPV 检出率不同。其中在宫颈炎和宫颈糜烂类型疾病患者中 HPV 阳性率和高危型 HPV 检出率均明显低于尖锐湿疣、CIN II/III 和宫颈癌类型疾病患者, $P<0.005$ (分别为 0.000 0、0.001 4、0.002 5、0.000 1、0.001 1、0.002 3 和 0.000 0、0.000 1、0.000 2、0.000 0、0.000 1、0.000 3),差异具有统计学意义。在宫颈炎和宫颈糜烂 2 种类型疾病患者之间 HPV 阳性率和高危型 HPV 检出率无明显差异, P 值分别为 0.935 0 和 0.701 9;在尖锐湿疣、CIN II/III 和宫颈癌 3 种类型疾病患者中 HPV 阳性率和高危型 HPV 检出率亦无明显差异, P 值均大于 0.05(分别为 0.712 6、0.217 7、0.296 3 和 0.586 8、0.186 5、0.296 3)(表 2)。

表 2 不同宫颈疾患患者 HPV 的阳性率

Tab.2 HPV positives rates among patients with different cervical disorders

疾病类型	例数 (n)	阳性例数 (n)	阳性率 (%)	高危例数及检出率[n (%)]
宫颈炎	97	43	44.3	33 (34.0)
宫颈糜烂	165	74	44.8	60 (36.3)
尖锐湿疣	49	41	83.6	40 (81.6)
CIN II/III	16	14	87.5	14 (87.5)
宫颈癌	8	8	100.0	8 (100.0)

2.3 不同年龄段人群 HPV 的阳性率

以年龄因素对 335 例受检对象进行分组,计算各组的 HPV 阳性率,结果显示:各年龄组 HPV 阳性率比较总体有统计学差异, $\chi^2=9.939 4, P=0.019 1$;即总体来说不同年龄组人群 HPV 阳性率有差异;其中 19~25 年龄组和 26~36 年龄组 HPV 阳性率均明显高于 37~47 年龄组, $P<0.008 33$,具有统计学意义。其余各年龄组之间 HPV 阳性率比较无统计学意义, P 值分别为 0.751 3、0.083 6、0.103 7 和 0.931 7(表 3)。

表 3 不同年龄段人群 HPV 的阳性率

Tab.3 HPV positive rates among patients with different ages

年龄组(岁)	阳性数	阴性数	合计	HPV 阳性率 (%)
19~25	37	61	98	37.8
26~36	58	104	162	35.8
37~47	10	47	57	17.5
48~51	3	15	18	16.7

注:双重或多重感染以 1 例阳性计

3 讨论

HPV 是国际公认的少数具有明确致瘤性的病毒之一。近年研究表明,可感染人类生殖道上皮的 HPV 约有 42 余种基因型,而宫颈上皮是 HPV 感染的好发部位,其中 HPV6 和 HPV11 等低危型 HPV 感染常诱发上皮细胞疣样病变,而 HPV16、18、31、33、35、58 等高危型 HPV 长期、反复感染是诱发宫颈癌的主要原因^[2]。因此,HPV 早期筛查依然是目前防控宫颈癌的重要手段之一。

目前,检测 HPV 基因分型的方法主要有:杂交法、型特异性 PCR 法,杂交(DNA-RNA)捕获法、PCR-RDB 方法等,其中,PCR-RDB 方法既具有 PCR 扩增的敏感性,又具有核酸杂交的特异性且 1 次能同时检出 23 个 HPV 型别^[3]。其基本原理依据 HPV 衣壳蛋白基因 L1 的序列变异特点,设计不同的 DNA 探针并预固定在硝酸纤维素膜上,然后以 1 对生物素标记的通用引物 PCR 扩增 HPV 的 L1 基因并与膜条进行杂交,再通过酶联反应放大信号^[4]。

本文率先利用 PCR-RDB 技术对新疆地区 HPV 进行基因分型研究,可同时鉴定 23 种 HPV 基因型,包括 15 种高危型(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、83)和 8 种低危型(HPV6、11、42、43、44、53、66、MM4)HPV, HPV 基因分型的成功率为 100%。从 335 例疾病组标本中检出 HPV 阳性标本 180 例,总阳性率为 53.7%,共检出 HPV16、18、33、45、56、68、6、11、66 共 9 种基因型,其中 HPV16、18、56 亚型感染检出率较高。单纯 HPV16 感染占 45.0%,单纯 HPV18 感染占 10.6%,单纯 HPV56 感染占 14.4%,HPV16/56 合并感染占 4.4%,HPV16/68 合并感染占 3.3%。分组统计结果显示,尖锐湿疣、CIN II/III 和宫颈癌患者中 HPV 阳性率和高危型 HPV 的检出率均显著高于宫颈炎组和宫颈糜烂等其他疾病($P=0.000$)。有研究显示,在 99.7%的宫颈癌组织中存在 HPV-DNA,且主要为 4 种高危型 HPV (16、18、31、45)感染,其中 50%的宫颈癌与 HPV16 感染有关^[5]。而且,从表 3 中可以看出,其中 19~25 年龄组和 26~36 年龄组 HPV 阳性率均明显高于

37~47 年龄组,这可能与青年女性性活跃程度较高有关。

目前,HPV 筛查和基因分型检测技术日益普及,实验室采用 PCR-RDB 技术进行 HPV 基因分型检测对于 HPV 潜伏感染、亚临床感染具有重要参考意义。然而,由于不同研究纳入标准不同,HPV 的检出率及其基因型存在差异^[6,7],因此还需要纳入更大样本量或进行多中心研究。总之,通过 HPV 基因分型筛选高风险人群,对女性生殖道感染病因学分析和肿瘤预警具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account[J]. *Virology*, 2009, 384(2): 260–265.
- [2] Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution[J]. *Virology*, 2005, 337(1): 76–84.
- [3] 杨柳光, 李卓园, 巢 薇, 等. 反向斑点杂交技术检测 HPV 基因分型在宫颈癌筛查中的应用[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2008, 29(2): 145–146.
- [4] Yang L G, Li Z Y, Chao W, et al. Application of reverse dot blot of detecting HPV DNA in cervical cancer screening[J]. *Qiqihar Medical College*, 2008, 29(2): 145–146.
- [5] 吴文苑, 段朝晖, 方红辉, 等. 多重 PCR 法和 HPV 分型基因芯片法在高危型人乳头瘤病毒感染检测中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(7): 632–634.
- [6] Wu W Y, Duan Z H, Fang H H. Multiplex PCR and HPV genotyping microarray detection in high-risk human papillomavirus infection[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2009, 30(7): 632–634.
- [7] 谭晓燕, 赵 静, 刘小宁, 等. 珠海市正常人群妇女宫颈人乳头瘤病毒感染情况分析[J]. *中国妇幼保健*, 2005, 20: 1726–1727.
- [8] Tan X Y, Zhao J, Liu X N. Analysis of cervical human papillomavirus infection among normal female population in Zhuhai City[J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2005, 20: 1726–1727.
- [9] Zhao F, Li N, Ma J, et al. Study of the association between human papillomavirus infection and cervical cancer in Xiangyuan county, Shanxi province[J]. *Chin J Epidemiol*, 2001, 22(5): 375–378.
- [10] Gargiulo F, De Francesco M A, Schreiber C, et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women[J]. *Virus Res*, 2007, 125(2): 176–182.

(责任编辑:冉明会)