不同类型宫颈标本人乳头瘤病毒感染及亚型分布

张咏梅, 周 晶, 龚志红(湖南省湘潭市二医院检验科 411100)

【摘要】 目的 探讨不同类型宫颈标本(指宫颈细胞刷标本和宫颈环切标本)人乳头瘤病毒(HPV)感染及亚型分布。方法 采用 HPV 通用引物对 482 例宫颈组织标本中可能存在的 HPV 基因进行 PCR 扩增,对扩增产物采用导流杂交基因芯片技术进行 HPV 分型。结果 482 例标本共检出 HPV 阳性 124 例,总感染率为 25.73% (124/482),21 种亚型共检出 18 种,低危型 42、43、44 未检出。宫颈细胞刷标本组 267 例中共检出 HPV 阳性 97 例,感染率为 36.33%;宫颈环切标本组 215 例中共检出 HPV 阳性 27 例,感染率为 12.56%,两组差异有统计学意义($\chi^2=35.22, P<0.01$)。宫颈细胞刷标本组多重感染率(包括同时感染两种或两种以上不同亚型)为 9.36% (25/267),宫颈环切标本组多重感染率为 1.86% (4/215),两组差异有统计学意义($\chi^2=11.86, P<0.01$)。结论 宫颈细胞刷标本和宫颈环切标本 HPV 检出率存在统计学意义,临床在采取标本时应尽可能采集宫颈细胞刷标本,以防止漏检;HPV 亚型分布存在一定的地域差异,针对不同地区不同亚型的疫苗研究,将是防治宫颈癌的一个重要方向。

【关键词】 乳头状瘤病毒科; 基因型; 宫颈肿瘤; 乳头状瘤病毒感染; 子宫颈

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.01.021 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)01-0047-02

Human papillomavirus infection and their subtypes distribution in different cervical specimens ZHANG Yong-mei, ZHOU Jing, GONG Zhi-hong (Department of Clinical Laboratory, Xiangtan Second Hospital, Xiangta, Hunan 411100, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the status of human papillomavirus(HPV) infection and subtypes distribution in different cervical specimens (cervical brush specimens and cervical loop excision specimens). **Methods** To use general primer of HPV to PCR amplificate genes of HPV which may exist in 482 cases of cervical specimens, then to select the products for HPV type analysis using flow-through hybridization. **Results** From 482 cases, 124 cases were infected with HPV, the total infection rate was 25.73% (124/482), 18 kinds subtypes were found in all 21 kinds, the low-risk kinds of 42, 43, 44 were not found. In 267 cases of cervical brush specimens, 97 cases were tested positive with the positive rate of 36.33%, in 215 cases of cervical loop excision specimens, 27 cases were tested positive with the positive rate of 12.56%, showing statistical difference between them ($\chi^2=35.22, P<0.01$). In cervical brush specimens, the multiple infection rate (simultaneous infection with two subtypes and more) was 9.36% (25/267), but in loop excision specimens of cervical, the multiple infection rate was 1.86% (4/215) also with statistical difference ($\chi^2=11.86, P<0.01$). **Conclusion** The detection rate between cervical brush specimens and loop excision specimens of cervical is different in statistics, so we should collect cervical brush specimens in clinic to avoid undetection; the distribution in HPV subtypes is different in different areas, so the research of vaccine should aimed at different subtypes in different areas, which can become an important direction in prevention of HPV.

【Key words】 papillomavirus; genotype; uterine neoplasms; papilloma virus infections; cervix uteri

近年来,在生物、社会、行为等因素的综合影响下,宫颈癌逐步演变成危害女性健康的第二大肿瘤杀手。流行病学和基础研究已证实,人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈上皮内瘤变和宫颈癌的主要病因^[1-2],不同 HPV 亚型感染其致病性和预后也存在差异。而 HPV 高危型作为宫颈癌的主要病因,其检测也越来越受到更多人的关注,但不同类型宫颈组织标本(主要指宫颈环切标本和宫颈细胞刷标本)的感染率及其亚型分布是否存在差异却少见报道。为探讨不同类型宫颈组织标本 HPV 感染率及其亚型分布是否存在差异,本文对 482 例不同宫颈组织标本进行了对比分析,现将结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 以 2009 年 5 月至 2010 年 6 月在湘潭市二医院妇产科门诊就诊的慢性宫颈炎,阴道异常出血、流液及疑为 HPV 感染或自愿申请作 HPV 感染分型筛查的 482 例妇女为研究对象,年龄 15~69 岁,平均(37±10)岁。根据标本类型不同将其分为两组,Ⅰ组:宫颈细胞刷标本组 267 例,年龄 15~69 岁,平均(36±10)岁。Ⅱ组:宫颈环切标本组 215 例,年龄

20~61 岁,平均(38±9)岁。

1.2 试剂 采用凯普 HPV DNA 抽提试剂盒和凯普医用核酸分子快速杂交基因分型试剂盒(HybriMax™)进行病毒基因分型,该试剂盒采用低密度基因芯片和导流杂交技术(flow-through hybridization),基本原理是先将病毒基因的 DNA 进行扩增,然后利用核酸分子快速导流杂交技术,使目的分子导流穿过固定有 DNA 探针的低密度基因芯片薄膜,从而发生快速杂交。可一次性检出 15 种高危亚型,包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68;6 种低危亚型,包括 HPV6、11、42、43、44 及 CP8304(中国人特有的低危亚型)。

1.3 标本采集 (1)宫颈细胞刷标本:用宫颈细胞刷在宫颈口稍用力顺时针旋转 5 圈,取宫颈脱落细胞,然后放入装有专用细胞保存液的瓶中,于 4℃ 保存,一周内测定。(2)宫颈环切标本:由本院妇产科医生行宫颈环形电切术(LEEP),将环切组织置于装有专用细胞培养液的瓶中,于 4℃ 保存,一周内测定。

1.4 实验步骤

1.4.1 HPV DNA 提取 (1)宫颈细胞刷标本:将宫颈细胞刷

标本充分震荡混匀,吸取细胞保存液 800 μ L 于 1.5 mL 无菌离心管内,以 14 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。(2)宫颈环切标本:用 1 mL 加样器吸嘴将宫颈环切组织反复用力戳破,以获取足够多的宫颈细胞成分,吸取充分震荡混匀的保存液 800 μ L 于 1.5 mL 无菌离心管内,以 14 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 1 mL 无菌蒸馏水充分洗涤沉淀,14 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,以去除胆红素的干扰,用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。以上两组提取操作均在生物安全柜中进行,所有试验用品均经过无菌处理,提取完毕,取 1 μ L 样品作 PCR 扩增。

1.4.2 PCR 扩增 采用 HPV 通用引物扩增,引物序列 5' 端标记生物素。将 23.25 μ L PCR-MIX、0.75 μ L Taq 酶及 1 μ L DNA 模板混匀,设置阴、阳性对照。扩增程序如下:20 $^{\circ}$ C 作用 10 min,95 $^{\circ}$ C 预变性 9 min;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 5min。

1.4.3 导流杂交分型 采用 HybriMaxTM 检测 21 种 HPV 亚型,导流杂交前,先将扩增产物进行 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,变成单链 DNA,马上放入冰浴,不少于 2 min。杂交过程:预变性后的单链 DNA 与薄膜上的探针结合,产物标记的生物素与碱性磷酸酶结合,加入底物,碱性磷酸酶催化底物发生颜色反应。

1.4.4 结果判断 通过肉眼观察检测结果,阳性点为清晰可见的蓝紫色圆点,多个圆点即为多重感染。根据杂交膜探针分布示意图判断阳性点为何种 HPV 亚型。每张芯片上均设有 IC 点(内对照点)和 Biotin 点(生物素对照点)各一个。

2 结 果

2.1 两组 HPV 感染结果比较 见表 1。

表 1 两组 HPV 感染结果比较

组别	阳性	阴性	总数	感染率[% (n/n)]
宫颈细胞刷标本	97	170	267	36.33(97/267)
宫颈环切标本	27	188	215	12.56(27/215)
合计	124	358	482	25.73(124/482)

2.2 两组 HPV 感染不同亚型分布 见表 2。

表 2 两组 HPV 感染不同亚型分布

亚型	总数		单独感染		合并感染		感染率(%)	
	I组	II组	I组	II组	I组	II组	I组	II组
高危亚型								
HPV52	24	3	18	2	6	1	8.99	1.39
HPV58	22	6	14	6	8	0	8.24	2.79
HPV16	15	7	8	6	7	1	5.62	3.25
HPV53	12	1	7	0	5	1	4.49	0.47
HPV39	10	1	6	0	4	1	3.75	0.47
HPV33	8	1	5	1	3	0	3.00	0.47
HPV68	7	4	3	2	4	2	2.62	1.86
HPV31	5	1	2	0	3	1	1.87	0.47
HPV18	4	2	0	2	4	0	1.50	0.93
HPV59	4	0	1	0	3	0	1.50	—
HPV66	3	1	2	1	1	0	1.12	0.47
HPV51	3	0	0	0	3	0	1.12	—
HPV35	2	0	0	0	2	0	0.75	—
HPV56	1	0	0	0	1	0	0.37	—
HPV45	0	1	0	1	0	0	—	0.47

续表 2 两组 HPV 感染不同亚型分布

亚型	总数		单独感染		合并感染		感染率(%)	
	I组	II组	I组	II组	I组	II组	I组	II组
低危亚型								
HPV-CP8304	9	0	3	0	6	0	3.37	—
HPV11	6	2	2	1	4	1	2.25	0.47
HPV6	6	1	1	1	5	0	2.25	0.47

注:多重感染按感染亚型重复计数。—表示无数据。

2.3 两组 HPV 单一、多重感染比较 见表 3。

表 3 两组 HPV 单一、多重感染比较

组别	单一感染		多重感染		
	低危型	高危型	低危+低危	高危+低危	高危+高危
宫颈细胞刷标本	6	66	1	12	12
宫颈环切标本	2	21	0	1	3

3 讨 论

据统计,全世界每年约有 50 万例新发宫颈癌病例,每年约有 20 万妇女死于宫颈癌,而 HPV 高危亚型作为宫颈癌的主要病因,其检测也越来越受到更多的关注。然而不同类型宫颈标本检测结果有无差异却鲜有报道。通过对 482 例不同类型宫颈标本 HPV 分型检测,本研究有如下发现。

3.1 宫颈细胞刷标本组 267 例,检测阳性 97 例,感染率为 36.33%(97/267)。宫颈环切标本组 215 例,检测阳性 27 例,感染率为 12.56%(27/215),两组差异有统计学意义($\chi^2 = 35.22, P < 0.01$)。究其原因可能与下列因素有关:(1)宫颈细胞刷为一类似长圆柱形毛刷,在取宫颈细胞标本时,与宫颈接触面积较大,能取到较多的单个宫颈细胞;而宫颈环切标本取材局限,标本均为较厚、较大的血性组织,虽经 1 mL 吸嘴尖反复用力戳破,但单个宫颈细胞数量和宫颈细胞刷标本相比,仍不够充足。(2)宫颈环切标本经过碘酒、乙醇等消毒和高温电切刀烧灼,这些均可能不利于病毒核酸的释放和提取。(3)宫颈环切标本血液成分较多,虽经多次洗涤,但胆红素的干扰抑制作用可能未完全去除,造成对 PCR 扩增的抑制而出现阳性率低。

3.2 482 例标本共检出 HPV 感染 124 例,总感染率为 25.73%(124/482),21 种亚型共检出 18 种,低危亚型 HPV42、43、44 两组均未检测出。此外,宫颈细胞刷标本组高危亚型 HPV 45 未检测出,宫颈环切标本组高危亚型 35、51、56、59 和低危亚型 CP8304 未检测出。据资料报道,在我国山西,HPV 感染率为 14.8%,深圳感染率为 18.4%,台湾省南部为 19.3%^[3],本研究总感染率为 21.79%,与文献报道有所差异。这可能与被检人群性质有所差异有关,也与医生掌握检查指征尺度有关。两组均以高危亚型占明显优势。宫颈细胞刷标本组常见亚型从高到低依次为 HPV 52、58、16、53、39,宫颈环切标本组常见亚型依次为 HPV 16、58、68、52、18、11,两组常见亚型存在一定差别。482 例标本中,HPV 亚型感染率居前 6 位的依次为 HPV58(28 例,5.81%)、HPV52(27 例,5.60%)、HPV 16(22 例,4.56%)、HPV53(13 例,2.70%)、HPV39(11 例,2.28%)、HPV68(11 例,2.28%)。据报道,HPV 基因型分布存在明显的地区差异,由国际癌症研究中心公布的 15 种最常见的亚型依次为(递减):HPV 16、18、45、31、33、52、58、35、59、56、73、68、66,除 HPV 16、18 外,HPV 45 在北美和欧洲居第 3 位,而南美的第 3 位为 HPV 31;在亚洲国(下转第 51 页)