

潍坊地区女性 HPV 的感染情况及基因亚型分析

裴景亮¹, 齐立中², 李建花¹, 李 猛¹, 耿会娟¹ (1. 潍坊医学院附属医院, 山东省“十二五”高校临床检验诊断学重点实验室, 山东潍坊 261031; 2. 山东省潍坊市中心医院 261041)

【摘要】 目的 研究潍坊市女性人群人乳头瘤病毒(HPV)的感染情况、年龄特征及基因型分布, 为 HPV 感染的防治提供理论依据。方法 采用核酸分子导流杂交分型技术对 1 358 例女性患者进行 HPV 分型检测, 并对感染情况及基因亚型分布进行统计学分析。结果 (1) 1 358 例女性中 HPV 阳性 424 例, 阳性率为 31.22%, 感染者中单一感染 365 例占 86.08%, 二重以上感染 59 例占 13.92%。<30 岁和大于或等于 51 岁女性是 HPV 感染高峰, 与其他年龄段比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。 (2) 424 例阳性标本共检出 HPV 519 株, 分为 19 个亚型。分离率高的前 5 个基因型是 HPV16(16.28%)、HPV58(11.63%)、HPV6(10.08%)、HPV33(9.30%)、HPV52(8.53%)。结论 HPV 感染具有一定的地域性, 开展 HPV 基因型的检测对宫颈疾病的防治具有重要意义。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 基因亚型; 多重感染

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.01.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)01-0007-03

Female infection status and genetic subtypes analysis of human papillomavirus in Weifang area PEI Jing-liang¹, QI Li-zhong², LI Jian-hua¹, LI Meng¹, GENG Hui-juan¹ (1. Affiliated Hospital, Weifang Medical College, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics in Universities of Shandong, Weifang, Shandong 261031, China; 2. Weifang Central Hospital, Weifang, Shandong 261041, China)

【Abstract】 Objective To study the female infection status, age characteristics and genotypes distribution of human papillomavirus (HPV) in Weifang area, and to provide a theoretic basis for therapy and prevention against HPV infection. **Methods** 1 358 female patients were detected for HPV DNA genotypes by DNA hybridization genotyping technique and performed the statistical analysis on the infection status and genetic subtypes distribution. **Results** (1) Among 1 358 female patients, 424 cases were positive HPV with the positive rate of 31.22%. The rate of single infection with HPV was 86.08% (365/424) and the multiple infections rate was 13.92% (59/424). Females < 30 years old and ≥ 51 years old were HPV infection peaks, showing significant difference compared with other age groups ($P < 0.05$). (2) 519 strains of HPV were isolated from 424 positive samples, including 19 subtypes. The highest isolation rates of genotypes were in turn HPV16(16.28%), HPV58(11.63%), HPV6(10.08%), HPV33(9.30%) and HPV52(8.53%). **Conclusion** HPV infections have certain regional character. Conducting the genotypes detection of HPV has important significance in the prevention and treatment of cervical diseases.

【Key words】 human papillomavirus; genetic subtypes; multiple infections

人类乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一类能特异感染人皮肤和黏膜的双链闭环状 DNA 病毒。早期流行病学和基础研究已经证实 HPV 感染是宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌的主要原因。DNA 序列分析发现 HPV 至少有 200 多个基因型^[1], 不同的 HPV 亚型的感染其致病性和后果也有差异, 另有研究证实不同地域 HPV 流行的基因型有所差异, 因此本文旨在了解潍坊地区 HPV 分子流行病学状况, 明确感染的型别, 期望对监控 HPV 感染疫情及制备相关性疫苗起到指导作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象 潍坊医学院附属医院 2009 年 6 月至 2010 年 8 月妇科门诊及住院疑似 HPV 感染的高危人群 1 358 例, 年龄 19~66 岁。

1.2 标本采集 取材前先用消毒棉拭子将宫颈口的分泌物擦去, 然后用凯普专用的宫颈刷贴宫颈口黏膜稍用力转动 3 周, 将取样后的棉拭子放入有细胞保存液的小瓶内。

1.3 仪器与试剂 美国 ABI9700 型聚合酶链反应(PCR)扩增仪, 医用核酸分子快速杂交仪、DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒及杂交试剂盒均购自凯普生物科技有限公司。

1.4 HPV 基因亚型检测步骤 DNA 提取、聚合酶链反应(PCR)扩增、导流杂交等步骤, 均严格按照试剂盒说明书进行操作。在一张低密度基因芯片薄膜上一次性检测 21 种 HPV 病毒的亚型。包括 13 种高危亚型: 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68; 5 种低危亚型: 6、11、42、43、44; 3 种中国人常见亚型: 53、66、CP8304。

1.5 结果判定 阳性点为清晰可见的蓝紫色圆点。根据膜条 HPV 分型分布图, 判断阳性点为何种 HPV 病毒类型。Biotin 对照点为酶与显色液的质控点; 内对照点(IC)为 PCR、热变性及杂交过程质控点, 在检测中这两个对照点均应为阳性。

1.6 统计学处理 组间比较采用 F 检验, 如方差不齐采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV 检测结果 在研究的 1 358 例女性中, HPV 感染者 424 例, 感染率为 31.22%, 在感染者中单一感染 365 例(86.08%), 二重感染 40 例(9.43%), 三重感染 11 例(2.59%), 四重感染 5 例(1.18%), 五重感染 2 例(0.47%), 八重感染 1 例(0.24%)。

2.2 HPV 感染的年龄分析 1 358 例女性在各年龄段 HPV

感染率见表 1。可见潍坊地区小于 30 岁女性是 HPV 感染的高峰,与其他年龄段比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。 ≥ 51 岁女性是另一个感染高峰,与 31~40,41~50 岁年龄组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 HPV 感染年龄分布情况

年龄(岁)	n	阳性例数	阳性率(%)
<30	213	85	39.91*
31~40	355	95	26.76
41~50	425	118	27.76
≥ 51	365	126	34.52**
合计	1 358	424	31.22

注:与其他三组比较,* $P < 0.05$;与 31~40 岁,41~50 岁年龄组比较,** $P < 0.05$ 。

2.3 HPV 感染亚型分析 424 例阳性标本中共检出 516 株 HPV 病毒,共 19 个亚型,其中高危型 367 株,占 71.12%,低危型 86 株,占 16.67%,中国人常见亚型 63 株,占 12.21%。具体分布情况见表 2。

2.4 单一感染和混合感染的 HPV 基因亚型分布 见表 3。结果显示:HPV 感染最常见的 5 个亚型是 HPV16(16.28%)、HPV58(11.63%)、HPV6(10.08%)、HPV33(9.30%)、HPV52(8.53%)。

表 2 516 株 HPV 病毒亚型分布

型别	n	阳性率(%)
高危型	16	16.28
	58	11.63
	33	9.30
	52	8.53
	68	7.75
	31	6.78
	59	5.04
	18	2.52
	39	1.55
	35	0.97
低危型	56	0.39
	51	0.39
	6	10.08
	11	5.43
中国人常见亚型	42	0.78
	44	0.39
	CP 8304	4.84
	66	3.88
	53	3.49

表 3 单一感染和混合感染的 HPV 基因亚型分布

感染情况	株数	第 1 位		第 2 位		第 3 位		第 4 位		第 5 位	
		亚型	占百分比(%)								
单一感染	365	16	18.08	58	10.96	6	9.86	33	9.32	52	8.77
多重感染	151	58	13.25	16	11.92	6	10.60	52	7.95	31	5.96
合计	516	16	16.28	58	11.63	6	10.08	33	9.30	52	8.53

3 讨 论

HPV 是一组 DNA 内切酶谱各异,外壳蛋白质抗原性不同的嗜上皮细胞的一类病毒的总称。目前确定的型别大约有 200 余种,其中大约有 30 余种可以从生殖道组织细胞中分离出来。根据 HPV 型别与癌发生危险性的不同分为低危型 HPV 和高危型 HPV。低危型 HPV 如 HPV6、11、42、43、44 等常引起外生殖器湿疣等良性病变。高危型 HPV 如 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 等,与宫颈癌及 CIN 的发生有关。加强女性 HPV 检查,了解 HPV 感染的情况及 HPV 亚型分布,对于发现 HPV 感染的高危人群,积极控制 HPV 感染及有效治疗 CIN,降低宫颈癌的发生率,具有重要意义。传统的 HPV 分型方法普遍存在操作复杂,杂交效率低等问题,目前临床上公认的 HPV 检测法当属第二代杂交捕获法(hybridcapture II, HC-II),但不能具体对 HPV 基因型分型,并且不能同时检测高危型和低危型,也不能判定多重感染^[2],而导流杂交法克服了上述一些缺点,能同时对 21 种 HPV 基因型进行快速分型,且可判断多重感染。

本研究结果显示 1 358 例女性中 HPV 感染者 424 例,感染率为 31.22%(424/1 358),在感染者中单一亚型感染比例最高,为 365 例占 86.08%(365/424)。424 例感染者中共检出 516 株病毒,可分为 19 个 HPV 基因型,其中高危型的感染率(71.12%)明显高于低危型(16.67%)和中国人常见亚型

(12.21%)($P < 0.05$),与相关报道一致^[3]。感染率高的 5 种高危型 HPV 分别是 HPV16(16.28%)、HPV58(11.63%)、HPV33(9.30%)、HPV52(8.53%)、HPV68(7.75%)。关于常见 HPV 高危型目前世界范围最常见的 HPV 基因型是 16,其他常见基因型存在地区差别。欧洲地区的型别分布以 HPV16、31、18 为主,南美地区以 HPV16、58、18 为主^[4]。多数亚洲国家的研究提示 HPV52、58 的感染率高于欧洲和南美地区^[5-7]。本研究发现,HPV16 是最常见的高危型,HPV58、33、52 仅次于 HPV16,基本符合亚洲人群研究结果。而 HPV18 的感染率低于其他国家。目前国内的一些报道感染率最高的 5 种高危型 HPV 是 16、52、58、33、18 型^[8-9],前 4 种与本研究结果是基本一致的,HPV18 型在本研究中排在感染的第 13 位,显示出 HPV18 亚型具有一定的人群和地域特点。

本研究发现 HPV 在小于 30 岁和大于或等于 51 岁年龄段有两个感染高峰。在年青人中 HPV 的感染多数是一过性的,且低危型的感染较多见,但小于 30 岁年龄组妇女是孕妇妇女,高 HPV 感染率可能导致宫颈疾病,从而影响到生育,此年龄组高感染率原因可能由以下几点:不注意卫生,早期症状不能引起重视,对宫颈疾病了解太少等。而大于或等于 51 岁年龄组妇女宫颈疾病的发病率明显提高,更有发生宫颈肿瘤的危险。此年龄组高感染率原因可能是因为:绝经期到来,雌激素水平下降,机体免疫力下降等。以上提示小于 30 岁和大于或等于

51 岁年龄组是高危年龄组,应作为重点预防年龄段,应当开展 HPV 常规筛查,而且应定时跟踪检测。

本研究中 HPV 多重感染的比例为 13.92%,以二重感染为主,与相关文献结果^[10]一致。最常见的基因型是 HPV58、16、6、52、31。有学者认为多重感染与宫颈病变有关。Ho 等^[11]认为 HPV 多重感染者出现持续感染的危险性更大,而 HPV 的持续感染是宫颈病变发生的原因,因此多重感染易导致宫颈病变。Lee 等^[12]认为,多重感染发生宫颈癌的概率比单一型别感染者增加约 1.5 倍。本研究中检出 1 例非常罕见的八重感染,提示机体免疫机制清除病毒不利,应引起重视。

参考文献

[1] 张学东,何春年. 人乳头瘤病毒与子宫颈癌的研究进展 [J]. 国外医学:妇产科学分册,2006,33(2):113-116.
 [2] 陶萍萍,卞美璐,欧华,等. 导流杂交基因芯片技术在人乳头状瘤病毒检测中应用的研究 [J]. 中华妇产科杂志,2006,41(1):43-47.
 [3] 陆少颜,朱坤仪,陈泳言. 导流杂交基因芯片技术检测高危型人乳头瘤病毒在宫颈癌筛查中的应用 [J]. 中国妇幼保健,2007,22(36):5215-5216.
 [4] Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis [J]. Lancet,2005,366 (9490):991-998.
 [5] Lo WK, Wong YF, Chan KM, et al. Prevalence of human

papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in China [J]. Int J Cancer,2002,100(3):327-331.

[6] An HJ, Cho NH, Lee SY, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method [J]. Cancer,2003,97(7):1672-1680.
 [7] Kim CJ, Jeong JK, Park M, et al. HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions [J]. Gynecol Oncol,2003,89(2):210-217.
 [8] 罗招凡,王惠英,彭永排,等. 快速导流杂交法检测人乳头状瘤病毒基因分型及其临床意义 [J]. 中国热带医学,2007,7(9):1540-1541.
 [9] 陈占国,周武,许张晔,等. 导流杂交方法检测人乳头状瘤病毒分型的临床应用 [J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(9):1345-1348.
 [10] Huang LW, Chao SL, Hwang JL, et al. Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma [J]. Cancer,2004,100(2):327-334.
 [11] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women [J]. N Engl J Med,1998,338(7):423-428.
 [12] Lee SA, Kang D, Seo SS, et al. Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNA Chip [J]. Cancer Letter,2003,198(2):187-192.

(收稿日期:2011-06-07)

(上接第 6 页)

失活。本研究结果提示,PT 和 FIB 在放置过程检测结果变化程度小于 APTT 和 TT 这两个指标。PT 主要反映外源性凝血过程,不仅受因子 V 的影响,也受其他如因子 VII 等外源性凝血途径相关的凝血因子水平和活性的影响。研究显示,血浆放置过程中因子 VII 可能出现激活^[7],这可能抵消放置过程因子 V 降解或失活的影响。FIB 是血浆中含量最多的凝血因子。本研究中,血浆在正常温度和低温下放置 FIB 水平均未出现明显变化。国外 Lamboo 等^[8]研究检测结果显示血浆 FIB 6 h 内相对稳定。国内陈林兴和黄华^[2]研究结果显示,FIB 水平在标本放置 5 d 后仍未出现明显减低。联合这些研究结果和本研究结果,考虑血浆放置过程 FIB 降解较慢,而标本放置过程中水分蒸发甚至可使放置后血浆 FIB 检测结果比放置前有所增高。

综上所述,对于凝血功能 4 项指标的测定,采集标本后应及时送检和尽快分离血浆。常温下血浆标本应在 2 h 内完成测定;-4℃下血浆标本保存 24 h PT、APTT、TT 和 FIB 等指标测定结果未受影响,低温保存应注意避免标本冻融过程。

参考文献

[1] 汤荔,冯忠盈,曹文俊,等. 样本存放时间对凝血指标影响的实验评估 [J]. 检验医学,2010,25(1):8-12.

[2] 陈林兴,黄华. 时间和温度对凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、纤维蛋白原检测结果的影响分析 [J]. 汕头医学院学报,2004,17(1):42-43.
 [3] 林向华,曾华,王惠英,等. 保存温度和时间对凝血标本 APTT 和 PT 结果的影响 [J]. 现代医院,2007,7(3):68-69.
 [4] 朱力芬. 标本采样部位、放置时间和温度对 PT、APTT 测定结果的影响 [J]. 全科医学临床与教育,2008,6(2):124-126.
 [5] 梁庆华. 凝血四项标本放置时间和温度对测定结果的影响 [J]. 右江民族医学院学报,2008,30(6):1061.
 [6] 丛玉隆. 关于卫生部出凝血时间操作规程《通知》的理解 [J]. 中华检验医学杂志,2001,24(3):183-185.
 [7] 朱忠勇. 凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间测定标准化 [J]. 中华医学检验杂志,1998,21(5):308-312.
 [8] Lamboo M, Poland DC, Eikenboom JC, et al. Coagulation parameters of thawed fresh frozen plasma during storage at different temperatures [J]. Transfus Med,2007,17(3):182-186.

(收稿日期:2011-05-10)