论著

文章编号:1000-5404(2005)21-2154-03

尖锐湿疣皮损人乳头瘤病毒基因分型的研究

吕晓萍[1],李体远[2],戴 勇[2],童秋生[1],熊 峰[1],李放娟[1],季 卉[1],许小庄[1] (深圳市人民医院暨南大学医学院第二附属医院:[1]皮肤科,[2]临床医学研究中心,深圳 518020)

提 要:目的 探讨外生殖器及子宫颈尖锐湿疣患者皮损脱落细胞或组织中人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)11种基因型别的分布状况及临床意义。**方法** 取子宫颈及生殖器尖锐湿疣疣体脱落细胞或尖锐湿疣组织,经PCR扩增后其产物与11种常见HPV亚型探针进行导流快速反斑点印迹杂交。**结果** 132例尖锐湿疣患者标本中,经PCR扩增并通过通用探针杂交分析后,有123例标本HPV DNA阳性93%。PCR阳性标本中,112例成功分型。高危型HPV16、18、31、33、52、58和66分别检出42例(31.8%)、22例(16.7%)、9例(6.8%)、6例(4.5%)、18例(13.6%)、17例(12.9%)和5例(3.8%)。低危型HPV6、11、53型分别检出55例(41.7%)、75例(56.8%)和7例(5.3%)。危险度待定HPV亚型CP8304检出率为4.5%(6/132)。有63.9%患者存在2~5型、高危/低危型HPV交叉感染,二重、三重、四重和五重型别感染检出率分别为31.8%(42/132)、26.5%(35/132)、4.5%(6/132)和1.5%(2/132)。**结论** HPV感染趋于多重化;HPV 11、6、16型感染仍然是尖锐湿疣发病的主要型别。

关键词:尖锐湿疣;人乳头状瘤病毒

中图法分类号:R373.9;R394.2;R752.53 **文献标识码**:A

HPV genotypes in patients with condyloma acuminata

LU Xiao-ping[1], LI Ti-yuan[2], DAI Yong[2], TONG Qiu-sheng[1], XIONG Feng[1], LI Fang-juan[1], JI Hui[1], XU Xiao-zhuang[1] ([1]Department of Dermatology, [2]Research Center of Laboratory Medicine, Shenzhen People's Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518020, China)

Abstract: Objective To assess the prevalence of 11 HPV genotypes in specimens from 132 patients with condyloma acuminata. **Methods** DNA was isolated from specimens including desquamate cells of sexual organs, secretion or cervical condyloma tissues and used for PCR amplification. 11 types of probes for different HPV genotype were used for hybridization to detect HPV DNA. **Results** After PCR amplification and hybridization, 123 of 132 samples were HPV positive, 9 were negative. After reverse dot blot analysis, the infection rates of 7 high risk HPV genotypes(16,18,31,33,52,58,66) were respectively 31.8%(42/132), 16.7%(22/132), 6.8%(9/132), 4.5%(6/132), 13.6%(18/132), 12.9%(17/132) and 3.8%(5/132), while the infection rates of 3 low risk HPV genotypes(6, 11, 53) were 41.7%(55/132), 56.8%(75/132) and 5.3%(7/132). For CP8304, it was 4.6%(6/132). 2-5 different multi-genotype HPV infection was detected in most of the patients. The multi-HPV-genotype infection rates were 31.8%(42/132) in two-type infection, 26.5%(35/132) in three-type infection, 4.5%(6/132) in four-type infection and 1.5%(2/132) in five-type infection. **Conclusion** Patients with HPV infection showed a young age and multiple-genotype infection tendency. HPV 6,11,16 are still the important genotypes for condyloma acuminata.

Key words: condylomata acuminata; papillomavirus

不同型别的人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是尖锐湿疣、宫颈癌及肛门生殖器部位其他肿瘤发生的重要病因。Chan等[1]报道,9种不同亚型HPV6、11、16、18、31、33、53、58和CP8304感染占中国香港HPV感染人群的85%。我们采用导流杂交反斑点印记(reverse dot blot, RDB)快速基因分型方法,研究了深圳地区尖锐湿疣患者包括上述9种基因型别在内的11型HPV感染状况,并探讨了不同基因型的临床意义。

基金项目:深圳市科学基金资助项目(200304017)
Supported by the Natural Science Foundation of Shenzhen city(200304017)

作者简介:吕晓萍(1955-),女,浙江省宁波市人,主任医师,主要从事皮肤和性病临床等方面的研究,发表论文20余篇。电话:(0755)82292247

收稿日期:2004-09-24;**修回日期**:2004-12-12

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　仪器及试剂　　PE 9600 扩增仪(Perkin-Elmer)，DNA 导流快速杂交仪。DNA 提取试剂盒为 QIAgen 产品。DNA 导流快速杂交试剂盒由香港医学分子诊断中心研制并提供。

1.1.2　标本采集及制备　　132 份标本取自 2003 年 9－12 月在我院皮肤科、妇科就诊的尖锐湿疣患者，年龄 18～55 岁，平均 28.9 岁。其中男 49 例，病变在冠状沟 18 例，系带 8 例，阴茎部 18 例，肛周 3 例，尿道口 2 例。女 83 例，病变在子宫颈 24 例，阴道壁 3 例，大、小阴唇 23 例，阴道口 20 例，会阴联合部 10 例，肛周 3 例。采集生殖器、肛周、子宫颈脱落细胞样本或尖锐湿疣组织，冻存于－20 ℃待用。

1.2　方法

1.2.1　DNA 分离　　标本首先与 3 ml PreservCyt™溶液(Cytyc Corporation)混合，然后将细胞悬液样本 13 000 × *g* 离心 15 min。200 μl PBS 重悬细胞沉淀，使用 QIAamp DNA Blood Mini 试剂盒及血液/体液方法提取 DNA。然后，取 5 μl DNA 抽提液直接做 PCR 扩增反应。

1.2.2　HPV 检测　　使用 Coutlee 等[2]的 MY09/11 引物(5′-生物素标记)进行 HPV 检测。取 5 μl 分离的 DNA 与 45 μl PCR 试剂混合。PCR 体系包括 50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl，6 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTP，各 50 pmol 的生物素标记的上下游引物和 7 U Ampli*Taq* Gold 聚合酶。扩增反应条件为：95 ℃，5 min(活化 Ampli*Taq* Gold 聚合酶)；95 ℃变性 20 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，共扩增 40 个循环；最终 72 ℃延伸 5 min。

通过扩增 β-珠蛋白 基因作为质控内参，产物长度 103 bp。50 μl PCR 体系包括 50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl，1.5 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTP，各 0.2 μmol/L 生物素标记的上、下游引物和 2.5 U 的 Ampli*Taq* Gold 聚合酶。引物序列为，上游：5′-CTGCCTATTGGTCTATTTTCC-3′，下游：3′-AACAG-CATCAGGAGTGGAC-5′。

扩增条件为：95 ℃，5 min(活化 Ampli*Taq* Gold 聚合酶)；95 ℃变性 10 s，56 ℃

退火 10 s，72 ℃延伸 20 s，共扩增 40 个循环；最终 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物

进行 1.5% 琼酯糖凝胶电泳，然后用溴化乙啶显色，分析结果。

1.2.3　HPV 基因分型　　采用基于导流杂交法的反斑点印迹杂交进行 HPV 基因分型。本研究共检测 11 种不同的 HPV 亚型，包括 3 种低危亚型 HPV6、11 和 53；7 种高危亚型：HPV16、18、31、33、52、58 和 66；另一种亚型 CP8304 危险性未知。使用靶位点位于 MY09/11 引物扩增产物区内的通用探针排除 PCR 扩增的假阳性结果，β-珠蛋白探针作为内部对照。使用 Gravitt 等[2]人的寡核苷酸特异性探针进行基因分型。所有探针 5′末端经过氨基酸修饰。在 2.0 cm × 3.3 cm 的膜上，每个探针点特异性检测一种 HPV 亚型，且每个点内均为双检测探针，每个检测探针分别位于待测亚型在 MY09/11 区域内的两个不同位置。按照文献[3]的方法在 Biodyne C 膜上固定氨基酸修饰的探针。

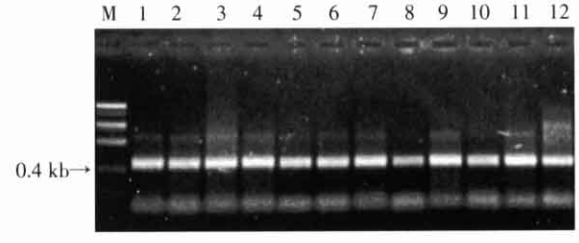
10 μl 生物素标记的 PCR 产物，变性后与 0.5 ml 预热至 45 ℃的杂交缓冲液(2 × SSC，0.1% SDS)混合，在导流杂交仪 HybriMax™上 45 ℃孵育 5 min，然后进行导流杂交。杂交后，用 1 ml 冲洗缓冲液(2 × SSC，0.1% SDS)冲洗 3 次。在 25 ℃条件下，用封闭液封闭。封闭后，加入 0.5 ml 碱性磷酸酶结合物，孵育 3 min。然后用冲洗缓冲液(0.1 mol/L NaCl，0.1 mol/L Tris-HCl，3 mmol/L $MgCl_2$，0.5% 吐温 20 V/V，pH 7.5)直接冲洗杂交膜，去除未结合的结合物。之后加入 1 ml NBT/BCIP 底物(Roche)在 37 ℃孵育 2～5 min 或者直到显色完成为止。显色后 1 h 内观察分析结果。用冲洗缓冲液漂洗探针膜，然后用去离子水漂洗。所有杂交和显色步骤利用导流杂交仪在 30 min 内完成。

导流杂交与杂交捕获实验的对照分析　采集 24 例经 Digene 杂交捕获实验证实 HPV 高危阳性标本，使用上述导流杂交法进行 HPV 基因分型。

2　结果

2.1　HPV 检测结果

使用 Coutlee 等的 MY09/11 引物(5′-生物素标记)扩增 HPV DNA(图 1)，采用通用探针杂交排除 PCR 扩增假阳性产物。结果 132 例的标本中，有 123 例 HPV 阳性，9 例 HPV 阴性。HPV 的检出率为 93.2%。



M：Marker；1－12：HPV specimen

图 1　PCR 扩增产物分析

Fig 1　Electropherogram of HPV DNA PCR products

2.2　HPV 分型结果

用导流杂交法进行 HPV 基因分型。132 例中，HPV16、18、31、33、52、58、66 的检出率分别为 31.8%(42 例)、16.7%(22 例)、6.8%(9 例)、4.5%(6 例)、13.6%(18 例)、12.9%(17 例)及 3.8%(5 例)；HPV 6、11、53 型检出率分别为 41.7%(55 例)、56.8%(75 例)和 5.3%(7 例)；CP8304 亚型检出率为 4.5%(6 例)。

2.3　HPV 多重感染状况分析

研究表明，多数患者(63.9%)同时存在 2～5 型、高危型/低危型 HPV 交叉感染，二重型别检出率为 31.8%(42/132)，三重为 26.5%(35/132)，四重为 4.5%(6/132)，五重为 1.5%(2/132)。

2.4　HPV CP8304 亚型感染特点

研究共检测到 6 例 CP8304 感染(4.5%)，且均为多重型别感染。其中，3 例伴随 16、11 型感染，1 例伴随 31 型感染，1 例伴随 53 型感染，1 例伴随 6、18、52、58 型感染。6 例患者中，2

例同时合并复发性生殖器疱疹及非淋菌性尿道炎,3 例同时合并非淋菌性尿道炎及念珠菌性阴道炎(龟头炎),1 例未检测。疣体多为菜花状融合成团块状分布,2 例复发 5 次以上,2 例复发 3 次以上,2 例为初发。

2.5 导流杂交与杂交捕获实验的对照分析

24 例经 Digene 杂交捕获实验证实 HPV 高危阳性标本,使用导流杂交法进行 HPV 基因分型。结果表明,除 3 例 PCR 阴性外,其余均为 HPV 高危型感染或者多重型别感染。

3 讨论

目前用于 HPV 基因分型的方法主要有杂交法、型特异 PCR 检测、杂交(DNA-RNA)捕捉法及 DNA 序列分析。国内也有学者将荧光偏振技术及限制性内切酶长度多态性方法用于 HPV 的分型[4,5]。本实验使用基于导流杂交的快速 HPV DNA 分型,杂交及检测过程可在 30 min 内完成。可以同时检测多个 HPV 基因型别,并且成本低,速度快。与 DIGENE 杂交捕获实验进行的对比实验证实,二者结果一致。

本研究检测了中国人群中常见的 11 种 HPV 基因亚型,所获结果与国内外报道相近[1]。我们还发现 HPV CP8304 亚型检出率为 4.5%。HPV CP8304 亚型的危险度目前尚不能确定。本实验中,132 份标本中,有 6 例存在该亚型感染。并且,6 例均为多重型别感染,且多伴随 16、11 型感染。6 例患者中,2 例同时合并复发性生殖器疱疹及非淋菌性尿道炎,3 例同时合并非淋菌性尿道炎及念珠菌性阴道炎(龟头炎)。说明 HPV CP8304 亚型常合并其他性病感染。对于感染 CP8304 亚型的患者临床特征和 CP8304 的致病特点有待于进行深入研究。

有研究表明,HPV 多重感染是子宫颈上皮细胞癌发生的一个重要危险因素[6]。本研究表明,多数患者存在 2~5 型、高危型/低危型交叉感染。我们随诊观察了 48 例外生殖器尖锐湿疣及宫颈尖锐湿疣患者,发现其中高危多重感染的患者病变发展相对较快,致病力较强,复发率较高。

参考文献:

[1] Chan P K, Mak K H, Cheung J L, *et al*. Genotype spectrum of cervical human papillomavirus infection among sexually transmitted disease clinic patients in Hong Kong[J]. J Med Virol, 2002, 68(2): 273-277.

[2] Coutlee F, Gravitt P, Richardson H, *et al*. Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the line blot assay. The Canadian Women's HIV study group[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1852-1857.

[3] Kawasaki E S, Chehab F F. Analysis of gene sequences by hybridization of PCR-amplified DNA to covalently bound oligonucleotide probes. The reverse dot blot method [J]. Methods Mol Biol, 1994, 28(2): 225-236.

[4] 蔓小红, 王家璧, 刘跃华, 等. 某些外生殖器表皮肿瘤皮损中 HPV DNA 的检测和分型[J]. 中华皮肤科杂志, 2004, 37(5): 280-282.

[5] 张 菊, 高艳娥, 闫小君, 等. 高通量人乳头瘤病毒分型基因诊断方法的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(3): 145-147.

[6] Liaw K L, Hsing A W, Chen C J, *et al*. Human papillomavirus and cervical neoplasia: a case-control study in Taiwan[J]. Int J Cancer, 1995, 62(5): 565-571.

(编辑 陈聪连)

《中国康复理论与实践》杂志 2006 年征订征稿启事

《中国康复理论与实践》杂志是由中国残疾人康复协会、中国医师协会和中国康复研究中心主办的国家级学术期刊,为国家科技部中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊,中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》执行优秀期刊,是"万方数据资源系统"和"中国学术期刊光盘版全文收录"期刊,国家药监局批准的处方药广告专业媒体。创刊于 1995 年 12 月,国际大 16 开版式,96 页,ISSN 1006-9771,CN 11-3759/R,国内外公开发行。广告经营许可证号:京丰工商广字第 0043 号。每期定价:8 元,全年定价:96 元。

该刊主要报道康复医学领域的新理论、新技术、新方法,面向从事康复医学科研、临床、教学的工作者,以及与此密切相关的临床各科医师和大专院校师生等。办刊方针为理论与实践相结合、提高与普及相结合,积极倡导百花齐放、百家争鸣,以宣传全面康复为宗旨,反映康复医学等方面的重大进展,促进学术交流。同时,不断增加社区康复内容。每期设立专题,对国家级科研课题、省部级科研课题类论文及符合专题内容的稿件,本刊采用快速通道尽快发表。同时,还会兼顾临床和基层稿件等。2006 年我们拟推出以神经系统康复为重点的基础研究和社区康复方面的专题。在稿件刊发方面,我们建立了快速通道,优先考虑国家级科研课题方面的论文;同时,还会兼顾临床和基层稿件等。

地 址:北京市丰台区角门北路 10 号中国康复理论与实践编辑部 邮 编:100068

电 话:(010)67567673,87569723 E-mail: zamzhang@263.net, cjrtp@yahoo.com.cn