临床研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1407-04

重庆永川地区妇科门诊人乳头瘤病毒亚型分布的研究

张晓静[1],袁 瑞[2],代红莹[3]

(1. 重庆医科大学附属永川医院妇产科,重庆 402160;2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016;3. 重庆医科大学附属永川医院检验科,重庆 402160)

【摘 要】目的:了解 23 种人乳头瘤病毒(Human papillo maviruses,HPV)型别在永川地区人群中的感染情况及分布特点,为本地区人乳头瘤病毒感染诊断及其相关疾病的防治提供重要依据。方法:应用基于反向膜杂交的基因芯片技术对 665 例临床送检标本进行分型检测,所得数据用 SPSS 等软件进行统计分析。结果:HPV 总感染率为 37.65%,23 种基因型检出 20 种,其中单一型别感染率为 27.25%,两型混合感染率为 7.22%,3 型(包括 3 型)以上混合感染率为 3.18%。HPV 亚型分布情况为:HPV16 型 9.92%、HPV6 型 5.74%、HPV11 型 4.36%、HPV33 型 1.32%、HPV58 型 1.05%、HPV43 型 1.02%、HPV18 型 0.75%, 其余型别 3.29%;高危型 HPV 在 ≤20、21 ~ 30、31 ~ 40、>40 年龄组的感染率依次为 14.1%、15.2%、17.2%、17.3%(χ^2=3.0,P>0.05),组间比较差异无显著性;低危型 HPV 在各年龄组的感染率依次为 20.3%、11.7%、10.1%、10.1%(χ^2=23.28,P<0.01),组间比较差异具有显著性。结论:本地区人群 HPV 感染率较高,且以单一亚型感染为主,其中 HPV16 为高危型 HPV 感染主要的型别,低危型 HPV 感染以 HPV6 和 HPV11 为主;HPV 各型别的感染率与年龄有一定的关系,该结果为防治宫颈癌、尖锐湿疣等其它 HPV 相关疾病提供了理论依据。

【关键词】人乳头瘤病毒;型别分布;宫颈癌;尖锐湿疣

【中国图书分类法分类号】R711.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-01

作者介绍:张晓静(1970-),女,硕士,
研究方向:妇科肿瘤。

通讯作者:袁 瑞,女,教授,E-mail:yrui96@126.com。

参 考 文 献

[1] 高根五,何言家,张金祖.外科患者合并糖尿病的诊治[J].中国实用外科杂志,1999,19(3):131-132.

[2] Petersa,Kernerw. Perioperative management of the diabetic patient [J].Exp Clin Endocrinol Diabetes,1995,103(4):213-218.

[3] 黄筵庭.重视合并高血糖外科病人的处理[J].中国实用外科杂志,2006.26(2):81-82.

[4] 杨 泽.中国中老年人糖尿病和糖耐量异常的流行病学研究[J].中华流行病学杂志,2003,24(5):410-411.

[5] Ren X,Zhang X, Zhang X,et al. Type 2 diabetes mellitus associated with increased risk for colorectal cancer:evidence from an international ecological study and population-based risk analysis in China [J].Public Health,2009,123(8):540-544.

[6] Vinikoor L C,Long M D,Keku T O,et al. The association between diabetes,insulin use,and colorectal cancer among Whites and African Americans[J].Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2009,18(4):1239-1242.

[7] Lohsiriwat V,Pongsanguansuk W,Lertakyamanee N,et al. Impact of metabolic syndrome on the short-term outcomes of colorectal cancer surgery [J]. Dis Colon Rectum, 2010, 53(2):186-191.

[8] Little S A,Jarnagin W R,De Matteo R P,et al. Diabetes is associated with increased perioperative mortality but equivalent long-term outcome after hepatic resection for colorectal cancer[J]. J Gastrointest Surg,2002,6(1):88-94.

[9] Ghafoori A F,Twite M D,Friesen R H.Postoperative hyperglycemia is associated with mediastinitis following pediatric cardiac surgery[J]. Paediatr Anaesth,2008,18(12):1202-1207.

[10] Ramos M,Khalpey Z,Lipsitz S,et al. Relationship of perioperative hyperglycemia and postoperative infections in patients who undergo general and vascular surgery[J]. Ann Surg,2008,248(4):585-591.

[11] Leahy J L.Insulin management of diabetic patients on general medical and surgical floors[J].Endocr Pract,2006,12(s3):86-90.

[12] 于健春.控制血糖水平对外科危重患者预后的影响[J].中国普外基础与临床杂志,2009,16(12):956-957.

[13] Matthews D R,Hosker J P,Rudenski A S,et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β-cell function from fasting p lasma glucose and insulin concentrations in man [J]. Diabetologia,1985,28(7):412-419.

[14] Lee S,Muniyappa R,Yan X,et al. Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice[J].Am J Physiol Endocrinol Metab,2008,294(2):261-270.

[15] 贾建国,陈 宏,薛纪秀,等.腹部择期手术患者胰岛素抵抗临床观察.中国临床营养杂志,2008,16(3):152-155.

(责任编辑:张学颖)

The distribution of HPV infections in women seeking for examination in Chongqing yongchuan area

ZHANG Xiao-Jing, et al

(*Department of Gynecology and Obstetrics, the Yongchuan Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To comprehend the status of infection as well as distribution of types of Human papillomaviruses (HPV) and provide evidence for diagnosis and prevention. *Methods*: 665 samples were detected and genotyped with the technology of gene chips. The data was analyzed with the statistical software SPSS13.0. *Results*: ①37.65% of those samples were detected positive for HPV infection and 20 HPV genotypes were detected successfully. Among them, 27.25% were infected by single HPV genotype, 7.22% were infected by two genotypes and 3.18% were infected by three genotypes. In the single infection of HPV, the percentages of 16, 6, 11, 33, 58, 43, 18 were 9.92%, 5.74%, 4.36%, 1.32%, 1.05%, 1.02%, 0.75% respectively, and the rate of others of other genotypes were 3.29%. ②The rates of different age group of high risk HPV were 14.1% (≤20), 15.2% (21 ~ 30), 17.2% (31 ~ 40), 17.3% (>40) (χ^2=3.0, P>0.05). The rates of different age group of low risk HPV were 20.3% (≤20), 11.7% (21 ~ 30), 10.1% (31 ~ 40), 10.1% (>40) (χ^2=23.28, P<0.01), a statistically significant difference between the groups. *Conclusion*: ①In the area of Sichuan, HPV infection situation was comparatively severe and most were single infection. Among the high risk HPV infections, HPV16 prevalence was highest, and among the low risk HPV infections, types 6 and 11 were the most prevalent. ②Age had certain something to do with HPV infection. ③The present study palyed an important role in preventing and treating the diseases caused by HPV, such as cervical cancer, condylomata acuminate.

【Key words】Human papillomaviruses; Types distribution; Cervical cancer; Condylomata acuminate

人乳头瘤病毒(Human papillomaviruses, HPV)是一种具有种属特异性的嗜上皮病毒,属双链闭环的小 DNA 病毒,包含约 8 000 个碱基对。目前已经确定的 HPV 型别大约有 200 余种, 多于 40 种的型别可感染肛门生殖道和其他部位的上皮和粘膜[1,2]。生殖器 HPV 根据其导致宫颈癌发生的能力大小分为低危型 HPV 和高危型 HPV,对有关资料的统计显示,在鳞状细胞宫颈癌中总共鉴定出 15 种高危型 HPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、82) 和 12 种低危型 HPV(6、11、40、42、43、44、54、61、70、72、81、CP6108),高危型 HPV 与肛门生殖器部位的癌变及癌前病变密切相关,低危型 HPV 则很少引发宫颈癌[3]。由于 HPV 各基因型在世界不同地区不同人群分布情况不一[4],因此对世界各地各人群进行 HPV 的型别分布的研究意义十分重大。

1 材料与方法

1.1 样本采集

所有样本均来源于重庆医科大学附属永川医院妇科门诊,采集对象为随机前来医院就诊的患者。样本采集后隔离保存于宫颈脱落细胞收集管中,并尽可能于样本到达后的当天进行 DNA 分离处理, 少数当日来不及处理的样品置于−20℃冰箱中保存直至第 2 d 处理。

1.2 仪器和试剂

FYY-3 型分子杂交仪(兴化市分析仪器厂),PCR 扩增仪(杭州朗基有限公司),HPV DNA 分型基因芯片检测系统(亚能生物技术有限公司),组织 DNA 提取试剂盒(OMIGA 公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品 HPV DNA 获取和处理 用宫颈脱落细胞采集器取得宫颈表皮脱落细胞,对于生殖器或肛周疣体增生(怀疑为尖锐湿疣)患者,用湿棉拭子采集疣体表皮脱落细胞或疣体组织。将取样后的棉拭子或采集器放入备有 1 ml 无菌生理盐水的试管中,充分漂洗后将棉拭子贴壁挤干丢弃。将漂洗过的生理盐水或洗脱液全部转移到 1.5 ml 微量离心管中,13 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,保留管底的细胞块,加入 50 ml 细胞裂解液悬浮沉淀,100℃加热 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,保留上清待用。疣体组织 DNA 的提取用组织 DNA 提取试剂盒按使用说明书方法提取。

1.3.2 HPV DNA 片段的 PCR 扩增 取 PCR 反应管于 5 000 r/min 离心 2 s,分别加入已提取的待测样品 DNA 5 μl,反应总体系为 25 μl。按以下条件进行扩增:50℃ 15 min;95℃ 10 min;94℃ 30 s,42℃ 90 s,72℃ 30 s,40 cycles;72℃ 5 min。

1.3.3 杂交和显色 (1)取 15 ml 塑料离心管,标明编号,放入标有同样编号的膜条,加入 A 液 6 ml 及所有 PCR 产物。将塑料管放入沸水浴中加热 10 min,放入杂交箱 51℃杂交 1.5 h。同时取 50 ml 塑料管,加入 40 ml B 液于杂交箱或水浴箱中预热至 51℃。(2)取出膜条,移至装有预热 B 液的 50 ml 管中,于 51℃轻摇洗涤 15 min。(3)A 液配制 1:2 000 的 POD (Peroxidase,过氧化物同工酶) 溶液,室温轻摇浸泡膜条 30 min。弃去 POD 溶液。用 A 液室温轻摇洗 2 次,每次 5 min。然后再用 C 液室温洗膜 1 ~ 2 min。同时配制显色液,将膜条浸泡于显色液中避光显色 10 min 左右即可见斑点显现,若显色较弱可适当延长显色时间,显色完毕将膜条浸泡在水中清洗,最后取出膜条于 4℃保存。

1.3.4 结果判定 膜条上有 24 个方格,依次排列着 23 种 HPV 型别,另一个方格为质控点。结果判定时,首先看膜条的质控点是否有蓝色圆点出现,若有则判本次实验成功,然后看哪些方格有蓝色圆点出现,哪个方格有蓝色圆点出现则判定与其相对应的 HPV 型别阳性,每次实验都设有阴性和阳性对照。

1.3.5 统计方法 用 Micro EXCEL 软件建立数据库,制作表单进行数据的双录入,最后得到成型的数据库,用 SPSS 1.0 软件进行统计分析,对目前公认的 18 种高危型,5 种低危型在不同人群中的分布进行统计描述和分析。

2 结 果

2.1 HPV 感染的型别分布

2.1.1 总感染率 665 例送检样本中,共检出阳性 250 例,感染率为 37.21%。在 23 种 HPV 基因型别中除 35、83 和MM4 等 3 种基因型外,其它 21 种基因型均有检出,其中单一亚型感染者 181 例(27.25%),两型混合感染者 48 例(7.22%),3 型及以上混合感染 21 例(3.18%)。

2.1.2 HPV 各型别感染率 在 105 例高危型别感染中,以 HPV 16 型最多共 66 例,占总感染率的 9.92%,占高危型总检出数的 62.62%。其次为 HPV33 型和 HPV58 型,分别为 9 例和 7 例,占高危型总检出数的 8.57%和 6.67%。在 76 例低危型别感染中,以 HPV 6 型和 HPV11 型为最多,分别为 38 例、29 例,占低危型总检出数的 50.40%和 38.26%。见表 1。

表 1 HPV 感染的型别分布

HPV 型别	单一感染例数	混合感染例数	总感染率 (n=665)(%)
16	66	32	14.7
33	9	15	3.6
58	7	19	3.9
18	4	11	2.3
31	3	7	1.5
59	3	4	1.1
45	2	5	1.1
52	2	0	0.3
66	2	0	0.3
39	2	0	0.3
51	1	0	1.1
53	1	0	1.1
56	1	3	0.2
68	1	0	0.2
73	1	3	0.6
6	38	28	9.9
11	29	25	8.1
42	6	5	1.7
43	2	2	0.6
44	1	1	0.3

2.1.3 HPV 高危和低危混合感染率 在 250 例阳性感染中,高危型感染率和低危型感染率分别为 42.09%、30.27%(多重感染未计算在内故两数相加少于 100%),提示目前 HPV 感染以高危型为主,特别是 HPV16。在混合感染中,高危型和低危型混合感染 40 例,占总混合感染的 58.38%;均为高危型感染 23 例,占总混合感染的 33.53%;均为低危型感染 6 例,占总混合感染的 8.09%。在混合型感染中,出现较多的为 HPV6、11 双重感染(15 例);HPV16、HPV18 双重感染(8 例);HPV16、6 双重感染(6 例)。三型感染较多的为 HPV6、11、16(6 例);HPV16、58、11(3 例)。

2.2 HPV 感染的年龄分布

各年龄段的总例数以及感染率见表 2。

表 2 HPV 感染的年龄分布

年龄	阳性数	受检人数	HPV 感染率(%)
≤20	49	106	46.2
21 ~ 30	86	215	40.0
31 ~ 40	71	230	30.9
>40	44	114	38.6
Total	250	665	37.6

2.2.1 高危型 HPV 的年龄分布 高危型 HPV 在 ≤20 岁、21 ~ 30 岁、31 ~ 40 岁、>40 岁年龄组的感染率依次为 14.1%、15.2%、17.2%、17.3%(χ^2=3.0,P>0.05),组间比较差异无显著性。

2.2.2 低危型 HPV 的年龄分布 低危型 HPV 在各年龄组的感染率依次为 20.3%、11.7%、10.1%和 10.1%(χ^2=23.28,P<0.01),组间比较差异具有显著性。

3 讨 论

3.1 HPV 感染状况

目前,HPV 感染已成为最常见的性传播疾病[2],至少有 50%的人其一生会感染生殖器 HPV,而高达 80%的妇女在 50 岁之前会感染 HPV[3],据世界各地统计,仅在美国每年估计有 62 万年龄在 14~44 岁之间的人新感染上 HPV[3],非洲 HPV 感染率 22.1%,欧洲 8.1%,亚洲 8.0%[5]。据国内报道,深圳 24.9%,山西 27.5%,北京 57.1%[6-8],在我们的研究中发现永川地区总感染率为 37.65%,与国内其他地区均有一定差异,这可能是由于不同的研究者筛查时选择的目标人群以及采用的检测方法不同造成的。

3.2 HPV 的型别分布特点

G M Clifford 等人[4]在 2005 年通过汇总国际肿瘤研究协会对 HPV 的流行调查数据得出,全世界最常见的高危 HPV 型别为:HPV16、HPV58、HPV31、HPV18、HPV56、HPV81、HPV35、HPV33、HPV45。HPV 型别分布有地区差异,不同的地区,不同的人群其流行的 HPV 型别不尽相同,全世界各地 HPV16 的感染率几乎是其他任何一种高危型 HPV 的两倍,

但在南非,HPV35 的感染率与 HPV16 相当。除 HPV16 之外,其他的重要高危型别也存在较明显的地域差别,如仅次于 HPV16 的流行型别,在亚洲是 HPV33 和 HPV56;在南美洲是 HPV58;在欧洲是 HPV31。

在中国大陆,各个地区 HPV 流行的型别也有差异,如在深圳感染率排前三位的高危型 HPV 是:16、18、58[6];北京常见的型别依次是:16、58、52、53、33、6、cp8304、11、31、18[8];湖州地区高危型感染率最高的 3 种型别依次是 HPV16、58、18,低危型感染率最高的是 HPV11,其次是 HPV6[9]。

在世界范围内,HPV 16 是与宫颈癌联系最紧密的基因型,并随地域变化很小[4]。HPV16 型也是 HPV 研究中最多的一型,尽管在不同国家、不同地区 HPV16 的检出率不同,但都有相对较高的水平。我们在研究中发现,本地区感染率最高的仍然是 HPV16,占阳性总感染的 26.26%,其后依次是 HPV6(14.21%)、HPV11(11.58%)、HPV33(3.51%)、HPV58(2.80%)等。这说明,本地区 HPV 感染以高危型 HPV 感染为主,HPV16 型是本地区最重要的一种型别,而低危型HPV6 和 11 型也有较大比例的检出,暗示大部分的尖锐湿疣由这两种型别引起。另值得注意的是,在高危型 HPV 感染中,HPV33 型比 58 型的检出率还要高,而国内有报道在宫颈癌组织中已检测出 HPV33 DNA[10],表明在被研究人群中 HPV33 型是又一重要亚型。

本地区 HPV 多重感染主要是低危型 HPV 和高危型 HPV 混合感染,占 58.38%;其次是均为高危型 HPV 感染,占 33.53%;均为低危型 HPV 感染只占 8.1%。持续感染 HPV 会增加感染另一种型别 HPV 的可能性,但多种型别的 HPV 共感染不会影响 HPV 的持续感染。有研究显示,大部分的宫颈内皮损伤是由感染的一种 HPV 型别引起,而共感染的其他型别的 HPV 作用不大,这可能是因为:当一种 HPV 型别增殖的时候,其他型别的 HPV 处于潜伏状态。感染多种 HPV 型别会增加细胞异形增生和妇女宫颈癌的风险[11]。基因型分布的流行病学资料告诉我们,在某个国家或地区进行筛查时首先需要了解该国家或地区的基因型分布特点。由于中国地域宽广,人口众多,故这方面的资料较为缺乏,有待各个地区进一步研究。明确某地区范围内的感染类型及各自比例,可以据此设计包括该地区范围内常见类型的基因芯片用于筛查诊断,还可以根据常见感染类型研制针对性的基因疫苗。

3.3 HPV 与年龄的关系

据 Silvia de Sanjose 等人[5]对世界各地的报道进行统计,其结果显示:世界主要地区的 HPV 感染高峰在 34 岁之前,35 ~ 44 岁年龄组的 HPV 感染率随之降低,而对于老年组(45~54 岁或大于 54 岁)除亚洲地区外其他地区的 HPV 感染率又有所增加。

在本研究人群中,低危型 HPV 在≤20 岁、21~30 岁、31~40 岁、>40 岁各年龄组的感染率有显著性差异,主要体现在 HPV6 型,其感染高峰在≤20 年龄段,这可能是因为人在青少年期其免疫系统还未被致敏,导致初次性生活时极易感染 HPV。高危型 HPV 各年龄段 HPV 感染率差异无显著性意义,其主要体现在 HPV16 型,这可能跟人感染高危型 HPV 之后不易清除或易持续感染有关。而 HPV33 型随年龄的增加呈现递增的趋势,其形成原因有待进一步的研究和发现。了解 HPV 各型别在各年龄段的感染特点,有助于我们在研发和应用预防性疫苗时更有效地选择目标人群。

众多的研究已证明妇女宫颈癌的发病与 HPV 感染密切相关,宫颈癌发生的最主要原因是长期且反复的高危型 HPV 感染[12],HPV 感染早于细胞学异常,对 HPV 感染的早期检测和分型是处理宫颈病变的重要依据,中国地域宽广,人口众多,型别分布复杂,明确一个地区流行的主要型别,对预测病变进展,评估预后,治疗后的随访,流行状况的分析以及基因疫苗的研制都有重要意义。

参 考 文 献

[1] Hans-Ulrich B.The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses [J]. Journal of Clinical Virology, 2005, 32(S1): 1-6.

[2] Steben M, Duarte-Franco E.Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysi-ology[J]. Gynecologic Oncology, 2007, 107(S1): 2-5.

[3] Paavonen J.Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2007, 11 (S2): 3-9.

[4] Clifford G M, 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] de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al.Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis[J].Lancet Infect Dis, 2007, 7(7): 453-459.

[6] 蔡 虹.深圳市城区育龄妇女 HPV 感染状况调查[J]. 中国妇幼保健, 2004, 19 (17): 90-92.

[7] 沈艳红, 陈 凤, 黄曼妮, 等.我国山西省子宫颈癌高发区人乳头瘤病毒感染调查[J]. 中国医学科学院学报, 2003, 25(4): 382-385.

[8] 杨英捷, 赵 健, 李雪倩, 等.2285 例女性下生殖道人乳头状瘤病毒感染筛查结果分析[J].中国实用妇科与产科杂志, 2006, 22(6): 444-445.

[9] 蒋汉梁, 张 甦, 周林福, 等.湖州地区妇女宫颈病变人乳头瘤病毒亚型感染情况分析[J].浙江大学学报(医学版), 2007, 36(6): 549-552.

[10] 吴玉萍, 陈裕隆, 李隆玉, 等.宫颈癌患者人乳头瘤病毒(HPV)主要型别及其感染研究[J]. 病毒学报, 2005, 21(4): 269-273.

[11] Gargiulo F, Francesco M A De, Schreiber C, et al.Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women[J].Virus Research, 2007, 125 (2): 176-182.

[12] Albrecht V, Chevallier A, Magnone V, et al.Easy and fast detection and genotyping of high-risk human papillomavirus by dedicated DNA Microarrays[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 137(2): 236-244.

(责任编辑:关蕴良)