

徐州市2 696例女性患者宫颈人乳头瘤病毒感染状况及基因分型

王莉娜 丁芹 潘玉 宋正霞 秦亚楠 张言超 颜学兵

【摘要】目的 探讨本地区妇科患者宫颈人乳头瘤病毒(HPV)感染状况和基因型分布情况,为宫颈癌防治提供可靠依据。**方法** 采用PCR斑点杂交技术对不同年龄段的女性宫颈脱落细胞标本进行HPV基因分型检测,根据基因型分为高危组、中高危组、低危组,分析HPV在女性人群中的感染率、基因型和年龄分布特点。**结果** 2 696例患者共有HPV阳性1 272例,阳性率为47.18%。阳性病例中单一感染者780例(61.32%),重叠感染者492例(38.68%)。共检测到阳性例次2 053例次,其中高危型1 307例次(63.66%),中高危型271例次(13.20%),低危型475例次(23.14%)。HPV感染的阳性率以20岁及以下组患者为最高(66.67%),>60岁组患者最低(39.06%),差异具有统计学意义($\chi^2 = 28.619, P < 0.001$)。21~30岁组患者感染例次构成比为29.17%,31~40岁组患者为32.31%,41~50岁组患者为25.86%,患者高于其他各组,差异具有统计学意义($\chi^2 = 885.1, P < 0.001$)。高危型中16、52、58型为主要的感染型别,低危型中6、11型为主要的感染型别,差异具有统计学意义($\chi^2 = 1678, P < 0.001$)。**结论** 本地区妇科患者HPV感染以单一感染和高危感染为主,感染率最高的亚型是高危16型;不同年龄分层的感染率略有不同。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 基因型; 宫颈癌

Cervical human papillomavirus infection and genotype distribution of 2 696 gynecological patients in Xuzhou Wang Li'na, Ding Qin, Pan Yu, Song Zhengxia, Qin Ya'nan, Zhang Yanchao, Yan Xuebing. Department of Infectious Diseases, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, China
Corresponding author: Ding Qin, Email: kgylan163@163.com

【Abstract】Objective To investigate the prevalence of cervical human papillomavirus (HPV) infection and genotype distribution in this region, and to provide reliable basis for cervical cancer prevention. **Methods** The genotypes of HPV among women of different ages cervical exfoliated cells specimens were detected by PCR and hybridization technique. According to the genotype, patients were divided into high-risk group, middle-risk group and low-risk group. The infection rate, genotype and age distribution of HPV in the female population were analyzed, respectively. **Results** The positive rate was 47.18% (1 272/2 696). Among the positive 1 272 cases, the percentage of single HPV infection and multiple HPV's infection were 61.32% (780/1 272) and 38.68% (492/1 272). Positive cases was detected 2 053 cases, high-risk genotypes were found 1 307 times (63.66%) which was higher than 475 times in low risk (23.14%) and 271 (13.20%) times in middle-risk group. The positive rate of HPV infection in patients who were 20 or younger than 20 years old was 66.67%, meanwhile, it was 39.06% in patients older than 60 years old, with significant differences ($\chi^2 = 28.619, P < 0.001$). As to constituent ratio of positive cases, patients of 21 to 30 years old was 29.17%, patients of 31 to 40 years old was 32.31% and patients of 41 to 50 years old was 25.86%, which were higher than other groups, with significant differences ($\chi^2 = 885.1, P < 0.001$). Among the high-risk genotypes, HPV 16, 52, 58 were found more common than other genotypes. Among the low-risk genotypes, HPV 6, 11 were found more common than other genotypes, with significant difference ($\chi^2 = 1 678, P < 0.001$). **Conclusions** Single infection and high-risk infection took the main part in the HPV infection in the region of department of gynaecology patients, subtype of the highest infection rates are high risk 16 genotypes. There existed a slight difference in infection rates of different age groups.

【Key words】 Human papillomaviridae; Genotypes; Uterine cervical neoplasms

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.05.007

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81371867); 江苏省高校自然科学基金面上项目(No. 08KJD320012)

作者单位: 221002 徐州市, 徐州医科大学附属医院感染性疾病科

通信作者: 丁芹, Email: kgylan163@163.com

人类乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染是宫颈癌的主要致病因素, 99.7%宫颈癌患者存在HPV感染, 并且HPV的感染使宫颈癌的相对危险性增加250倍^[1]。有文献报道^[2], 全球每年有13.2万新宫颈癌病例发生, 其中我国约占28%。目前, 宫颈癌的发病率显著增加并呈年轻化的趋势^[3]。世界各国的妇产科学会均推荐将HPV检测用于宫颈癌的早期筛查, 以便于对高危人群进行有效的监控、早期发现宫颈癌。文献报道, HPV基因型分布存在明显的地区差异和种族差异^[4-6]。本研究通过分析江苏徐州地区妇科患者宫颈人乳头瘤病毒基因分型检测结果, 旨在指导本地区监控、早期发现宫颈癌提供参考, 现报道如下。

资料与方法

一、病例来源

收集2012年3月至2014年4月于徐州医学院附属医院妇科门诊就诊的女性患者共2 696例, 年龄为16~88岁, 平均年龄为(37±10)岁。

二、HPV标本的采集

用窥阴器暴露宫颈, 干棉签擦拭干净子宫颈口分泌物, 宫颈刷置于宫颈口内, 轻轻搓动宫颈刷使其顺时针旋转5圈, 取出宫颈刷, 将其放入已加有专用细胞保存液的取样管中, 拧紧瓶盖。立即检测或者-20℃保存, 1周内完成检测。

三、主要试剂与仪器

潮州凯普生物化学有限公司人乳头状瘤病毒(HPV)分型检测试剂盒(PCR+膜杂交法)、美国ABI公司的ABI 7500实时荧光定量PCR系统、凯普导流杂交仪等。

四、检测方法

1. DNA的分离提取: 使用凯普公司提供的细胞裂解液。充分洗脱宫颈刷, 取500 μl样本, 转移到1.5 ml离心管中, 14 000 r/min离心1 min去上清液。加入已经在45℃水浴中预热的溶液I 400 μl, 振荡混匀, 100℃加热15 min。加入400 μl溶液II, 振荡混匀后, 室温下放置2 min, 14 000 r/min离心5 min, 去上清液。室温放置2 min, 加入60 μl溶液III充分溶解。静置10 min, 14 000 r/min离心5 min, 保留上清液待用。

2. PCR扩增: 按凯普公司试剂盒说明书进行。按每个反应加入HBV PCR反应液23.25 μl, Taq酶0.75 μl, DNA模板1 μl。反应条件: 95℃、9 min; 然后95℃、20 s, 55℃、30 s, 72℃、30 s, 40个循环; 72℃、5 min, 4℃保存。

3. PCR产物杂交: 取PCR产物25 μl在95℃加热5 min, 然后立即冰水浴2 min。在杂交孔内加入1 ml预热至45℃的杂交液, 温浴2 min, 排出预杂交的杂交液。将已变性的DNA样品溶液加入0.5 ml预热至45℃的杂交液, 混匀, 然后加在薄膜上, 盖上盖板温育10 min, 开泵进行导流杂交。45℃条件下, 用预热至45℃的杂交液冲洗膜3次, 0.8 ml/次, 关掉水泵。

4. 显色: 用0.5 ml封阻液封闭膜2次。在温度为25℃时加入0.5 ml酶标液, 温育3.5 min, 泵出所有溶液。设定温度36℃, 用溶液A每次0.8 ml彻底洗膜4次。加入0.5 ml BNT/BCIP溶液, 盖上盖板显色3~5 min, 泵出BNT/BCIP溶液。用溶液B每次1 ml洗膜3次, 再用2 ml蒸馏水漂洗。取出杂交膜放于吸水纸上, 1 h内分析结果。

五、统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件分析, 患者的感染状况、基因分型分布情况为计数资料, 采用例数和率表示, 率的比较用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、HPV感染状况与基因分型

2 696例患者中HPV阴性者1 424例, 阳性者1 272例, 阳性率为47.18%。阳性病例中单一感染者780例(61.32%), 重叠感染者492例(38.68%)。共检测到阳性患者2 053例次(包括多重感染的重复计算), 重叠感染病例感染HPV亚型数2~10个。其中高危型1 307例次(构成比为63.66%), 中高危型271例次(构成比为13.20%), 低危型475例次(构成比为23.14%), 构成比差异具有统计学意义($\chi^2 = 1 320$ 、 $P < 0.001$)。高危型中最常见的为16、52、58型, 低危型中最常见的为6、11型, 构成比差异具有统计学意义($\chi^2 = 1 678$ 、 $P < 0.001$)。

二、HPV感染与不同年龄段患者的关系

总的检测样本分6个年龄段, 即≤20岁组、21~30岁组、31~40岁组、41~50岁组、51~60岁组以及>60岁组, 各种中阳性率患者构成比分别为3.30%、29.17%、32.31%、25.86%、7.39%和1.97%。各年龄段阳性率差别有统计学意义($\chi^2 = 28.619$ 、 $P < 0.001$), 各年龄段构成比差别有统计学意义($\chi^2 = 885.1$ 、 $P < 0.001$); 各年龄段不同型别HPV感染分布详见表1。

讨 论

目前已有120多种HPV基因型被确定,其中40多种基因型与生殖道感染有关,不同类型的HPV感染可导致不同的临床病变。与宫颈癌相关程度较为清楚的HPV归为高危型HPV和疑似高危型HPV^[7-8],与尖锐湿疣等良性疾病相关的HPV被归入低危型HPV^[9]。低危型HPV包括HPV 6、11、42、43、44等型别,常引起外生殖器湿疣等良性病变包括宫颈上皮内低度病变(CIN I),高危型HPV包括HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68等型别,与宫颈癌及宫颈上皮内高度病变(CIN II/III)的发生相关,尤其是HPV 16和18型^[10-11]。检测妇科患者所感染HPV的具体基因型,是HPV高危感染还是低危感染,可以为下一步的治疗和疗效评估提供有价值的参考信息。

HPV基因型中最常见的为HPV 16^[12-13]其他常见基因亚型存在地域差异。阻止HPV持续感染的疫苗可

从根本上减少宫颈癌的发病率,目前已上市的预防性疫苗都是针对发达国家或者其他国家的HPV优势型别研发的,主要预防HPV 16和18型^[14]。到2014年,超过57个国家已经将HPV疫苗纳入国家卫生计划^[15]。本研究结果显示,本地区HPV高危型中16、52、58型为主要的感染型别,与沈阳地区^[16]、成都地区^[17]及甘肃地区^[18]等的报道一致,与长沙^[19]52、58、16型及常熟^[20]16、52、68型等报道有差别,但是,都提示HPV 18感染率较低,不是我国HPV感染的主要基因型,HPV感染基因型存在地理区域差异,有必要研制针对我国及本地区的多价HPV疫苗。

2008年中国疾病预防控制中心和北京市卫生局合作,首次在我国的发达城市进行大规模的HPV分子流行病学调查,初步结果分析,全人群的HPV感染率为8.6%,其中高危型HPV感染率为7.0%。研究报道,浙江嘉湖地区^[21]健康对照组检出HPV感染率为10.32%,长沙^[19]471名女性公务员HPV感染率为12.70%。高危人群感染率显著高于健康对

表1 HPV各基因型感染情况分布[例(%)]

基因型	阳性率						阳性例数 合计	构成比 (%)
	≤20岁 (63例)	21~30岁 (701例)	31~40岁 (912例)	41~50岁 (768例)	51~60岁 (188例)	>60岁 (64例)		
HPV阳性率	42 (66.67)	371 (52.92)	411 (45.07)	329 (42.84)	94 (50.00)	25 (39.06)	2 053	100.00
HPV高危型								
16	10 (15.87)	83 (11.84)	115 (12.61)	102 (13.28)	28 (14.89)	9 (14.06)	347	16.90
52	8 (12.70)	55 (7.85)	59 (6.47)	38 (4.95)	20 (10.64)	2 (3.13)	182	8.87
58	12 (19.05)	41 (5.85)	52 (5.70)	45 (5.86)	21 (11.17)	6 (9.38)	177	8.62
31	5 (7.94)	21 (3.00)	20 (2.19)	27 (3.52)	11 (5.85)	4 (6.25)	88	4.29
33	4 (6.35)	29 (4.14)	26 (2.85)	19 (2.47)	6 (3.19)	4 (6.25)	88	4.29
68	6 (9.52)	28 (3.99)	25 (2.74)	18 (2.34)	3 (1.60)	1 (1.56)	81	3.95
66	3 (4.76)	27 (3.85)	27 (2.96)	16 (2.08)	3 (1.60)	0 (0.00)	76	3.70
18	5 (7.94)	15 (2.14)	26 (2.85)	13 (1.69)	4 (2.13)	3 (4.69)	66	3.21
39	5 (7.94)	16 (2.28)	17 (1.86)	8 (1.04)	4 (2.13)	2 (3.13)	52	2.53
56	0 (0.00)	12 (1.71)	11 (1.21)	13 (1.69)	8 (4.26)	2 (3.13)	46	2.24
59	4 (6.35)	15 (2.14)	9 (0.99)	7 (0.91)	1 (0.53)	2 (3.13)	38	1.85
51	1 (1.59)	9 (1.28)	11 (1.21)	8 (1.04)	5 (2.66)	1 (1.56)	35	1.70
35	0 (0.00)	6 (0.86)	4 (0.44)	1 (0.13)	4 (2.13)	1 (1.56)	16	0.78
45	0 (0.00)	4 (0.57)	5 (0.55)	5 (0.65)	0 (0.00)	1 (1.56)	15	0.73
HPV中高危型								
53	8 (12.70)	37 (5.28)	53 (5.81)	44 (5.73)	11 (5.85)	2 (3.13)	155	7.55
CP8304	5 (7.94)	33 (4.71)	33 (3.62)	30 (3.91)	11 (5.85)	4 (6.25)	116	5.65
HPV低危型								
6	19 (30.16)	102 (14.55)	57 (6.25)	35 (4.56)	14 (7.45)	3 (4.69)	230	11.20
11	15 (23.81)	89 (12.70)	54 (5.92)	28 (3.65)	10 (5.32)	6 (9.38)	202	9.84
42	0 (0.00)	5 (0.71)	7 (0.77)	6 (0.78)	0 (0.00)	2 (3.13)	20	0.97
44	0 (0.00)	3 (0.43)	3 (0.33)	7 (0.91)	1 (0.53)	0 (0.00)	14	0.68
43	0 (0.00)	1 (0.14)	1 (0.11)	4 (0.52)	3 (1.60)	0 (0.00)	9	0.44

照,浙江杭嘉湖地区^[21]研究报道宫颈病变组HPV感染率为27.28%,秦皇岛地区^[22]研究报道妇科门诊患者HPV感染率为24.03%,浙江桐庐地区^[23]妇科门诊患者HPV感染率为36.7%。本研究中,江苏徐州地区妇科门诊患者的感染率为47.18%,与常熟^[20]的感染率(44.9%)较为接近,高于浙江杭嘉湖地区^[21]、桐庐地区^[23]及秦皇岛地区^[22],可能与本院HPV检测主要针对高危人群,而非所有妇科门诊患者有关,也不排除本地区经济生活相对落后、卫生习惯不好,感染率确实高于其他地区。

HPV感染率具有年龄分布特点,Smith等^[24]认为≤25岁是女性HPV感染的高峰期,随年龄的增加,感染率有所下降,本研究中≤20岁组患者阳性率为66.67%、21~30岁组患者阳性率为52.92%、31~40岁组阳性率45.07%、41~50岁组患者阳性率为42.84%,提示HPV感染率确实有随年龄下降趋势,51~60岁组患者阳性率为50.00%,其回升有可能与更年期以后体内激素水平变化、绝经后无怀孕负担、很多女性50岁退休生活压力减轻从而性生活增加有关,>60岁组患者阳性率为39.06%,可能与老年妇女生活习惯改变,性生活减少有关。

20岁及20岁以下组中仅有低危型感染者12例,仅有中危型感染者2例,其他28例中单一高危型感染6例,高危加低危12例,高危加中危3例,高中低危混合感染7例。高危型感染占阳性病例的2/3,这些高危型感染是否会自我清除并恢复细胞学变化至正常有待进一步研究。

另外,本研究还注意到从阳性病例的构成比上看,21~50岁病例最多,达87.34%,提示生育年龄妇女活跃的性生活与HPV感染有关,提高患者健康意识、改善卫生习惯,可能降低HPV感染率。

一般从HPV最初感染到癌前病变、最终演变为宫颈浸润癌需要10~15年,HPV基因分型阴性预测值高达99.9%^[25],即检测结果阴性者在3年内患宫颈癌风险几乎为零。若HPV阳性妇女重视早期症状,及时进行宫颈上皮脱落细胞学检查,有利于早期发现宫颈癌并及时治疗、改善预后。故对本地区妇科患者HPV基因型分布情况进行分析对于宫颈癌等疾病的早期预警和诊断及降低本地区宫颈癌的发病率和病死率具有重大意义。

参 考 文 献

[1] Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to

clinical application[J]. *Nat Rev Cancer*,2002,2(5):342-350.

- [2] 吉耀华, 陆春雪, 周伟强, 等. 人乳头瘤病毒与宫颈疾病关系的研究[J]. *中国妇产科临床杂志*,2010,9(6):463-464.
- [3] 温旺荣, 李莉, 钟玉婷, 等. 应用改良流式杂交法检测103例妇女HPV基因型[J]. *暨南大学学报(医学版)*,2009,2(6):595-601.
- [4] Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, et al. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States[J]. *J Natl Cancer Inst*,2009,101(7):475-487.
- [5] Chen W, Zhang X, Molijn A, et al. Human papillomavirus type-distribution in cervical cancer in China; the importance of HPV 16 and 18[J]. *Cancer Causes Control*,2009,20(9):1705-1713.
- [6] Dai Y, Huang YS, Tang M, et al. Distribution and clinical significance of human papillomavirus subtypes in Shenzhen city, People's Republic of China[J]. *Int J Gynecol Cancer*,2008,1(2):295-299.
- [7] Huh WK, Ault KA, Chelmow D, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance[J]. *Gynecol Oncol*,2015,136(2):178-182.
- [8] 张敏鸽. 高危HPV与宫颈癌发生的相关性[J]. *实用癌症杂志*,2012,27(6):670-672.
- [9] 王稳, 于善萍, 刘晓虹, 等. 尖锐湿疣患者宫颈HPV分型检测[J]. *中国麻风皮肤病杂志*,2016,32(5):307-308.
- [10] Printz C. FDA approves Gardasil 9 for more types of HPV[J]. *Cancer*,2015,121(8):1156-1157.
- [11] Cuzick J. Gardasil 9 joins the fight against cervix cancer[J]. *Expert Rev Vaccines*,2015,14(8):1047-1049.
- [12] Lamos C, Mihaljevic C, Aulmann S, et al. Detection of human papillomavirus infection in patients with vaginal intraepithelial neoplasia[J]. *PLoS One*,2016,11(12):e0167386.
- [13] 米热古丽·阿克木江, 阿依米拉·艾山江, 苏莱娅·胡塞音, 等. HPV16在宫颈癌前病变及宫颈癌中的检测及临床意义[J]. *中国妇幼健康研究*,2015,26(5):1016-1018.
- [14] Kim KS, Park SA, Ko KN, et al. Current status of human papillomavirus vaccines[J]. *Clin Exp Vaccine Res*,2014,3(2):168-175.
- [15] Herrero R, González P, Markowitz LE, et al. Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation[J]. *Lancet Oncol*,2015,16(5):e206-e216.
- [16] 张新, 王纯雁, 石菊芳, 等. 沈阳市妇女人乳头瘤病毒感染型别分布的研究[J]. *中华流行病学杂志*,2007,28(10):954-957.
- [17] 李灿, 陈伟, 赵静, 等. 妇科门诊病人HPV分型检测及感染情况分析[J]. *西南军医*,2015,17(3):253-255.
- [18] 杜宏, 索兰草, 刘红贤, 等. 甘肃地区女性宫颈感染的现状研究[J]. *暨南大学学报*,2015,36(1):41-45.
- [19] 周晓花, 罗家有, 朱琳, 等. 长沙市9471名女性公务员乳头瘤病毒感染状况及亚型分布[J]. *中华流行病学杂志*,2013,34(11):1157-1158.
- [20] 崔燕红, 宛传丹, 赵一琳, 等. 常熟地区女性HPV感染及亚型分布调查研究[J]. *安徽医药*,2014,18(1):81-83.
- [21] 杨广宇, 徐美华, 崔卫东, 等. 浙江省杭嘉湖地区妇女宫颈人乳头瘤病毒感染情况分析[J]. *中华临床感染病杂志*,2013,6(4):209-212.
- [22] 俞志红, 张敏, 李艳红, 等. 秦皇岛市门诊妇女人类乳头瘤病毒感染情况分析[J]. *河北中医*,2014,36(1):154-155.
- [23] 方玉才, 王秋英, 杨燕飞, 等. 1448例妇科患者HPV感染型别分布及临床分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*,2013,27(6):449-451.
- [24] Smith JS, Melendy A, Rana RK, et al. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review[J]. *J Adolesc Health*,2008,43(Suppl 4):S5-S25.
- [25] 陈琪珍, 唐龙英, 孙延慰. HPV DNA检测及其在宫颈癌筛查中的临床价值[J]. *中华现代妇产科学杂志*,2005,2(7):600-603.

(收稿日期: 2016-09-27)

(本文编辑: 孙荣华)

王莉娜, 丁芹, 潘玉, 等. 徐州市2696例女性患者宫颈人乳头瘤病毒感染状况及基因分型[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2017,11(5):460-463.