

• 调查报告 •

PCR-反向点杂交技术在女性下生殖道人乳头瘤病毒感染分型检测的应用研究

向华国,黎 国,曾锦婷,刘镜光

(广东省深圳市宝安区福永人民医院 518103)

摘 要:目的 探讨 PCR-反向点杂交分型技术在临床人乳头瘤病毒(HPV)感染基因分型中的应用。方法 采用 PCR-反向点杂交分型技术,对 1 702 例女性进行下生殖道 23 种 HPV 亚型感染筛查。结果 HPV 总感染率为 17.6%(300/1 702),有 21 种亚型被检出,感染率最高的为低危 HPV43 型(3.82%),其他亚型分别为 HPV16(3.70%)、52(2.70%)、6(2.47%)、58(1.88%)、18(1.76%)、56(1.53%)、68(1.29%)、11(0.88%)、33(0.82%)、66(0.71%)、59(0.59%)、53(0.53%)、42(0.53%)、31(0.35%)、73(0.24%)、51(0.18%)、35(0.18%)、83(0.12%)、45(0.06%)和 39(0.06%),高危型感染 13.9%(237/1 702),低危型感染 6.4%(109/1 702),多型感染 3.5%(59/1 702);1 702 例 HPV 感染高峰年龄为大于或等于 50 岁(29.41%),各年龄段 HPV 感染检出率差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 PCR-反向杂交分型技术能够同时检测高危和低危 HPV,可判断多型感染,在临床诊断和普查方面均有重要意义。

关键词:人乳头瘤状病毒; 基因亚型; 核酸杂交; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)08-0916-02

Application of PCR-based reverse blot hybridization assay for the subtype detection of human papillomavirus infection in the lower genital tract of women

Xiang Huaguo, Li Guo, Zeng Jintong, Liu Jingguang

(Department of Laboratory Medicine, Fuyong Hospital of Bao'an District, Shenzhen Guangdong 518103, China)

Abstract: Objective To evaluate the application of PCR-based reverse blot hybridization assay (PCR-RDB) for detecting human papillomavirus (HPV) subtype, and screen the infection status of HPV in female outpatients. **Methods** A total of 1 702 cases of female outpatients were detected for 23 types of HPV DNA by PCR-RDB during May 2011 and September 2011. **Results** The total infection rate of HPV was 17.6%(300/1 702). 21 subtypes could be detected, including 3.82% for HPV43, which was the most common type, and the other common types, in descending order of frequency, were HPV16(3.70%), 52(2.70%), 6(2.47%), 58(1.88%), 18(1.76%), 56(1.53%), 68(1.29%), 11(0.88%), 33(0.82%), 66(0.71%), 59(0.59%), 53(0.53%), 42(0.53%), 31(0.35%), 73(0.24%), 51(0.18%), 35(0.18%), 83(0.12%), 45(0.06%) and 39(0.06%). The overall prevalence of high-risk, low-risk and multiplex infection was 13.9%(237/1 702), 6.4%(109/1 702) and 3.5%(59/1 702), respectively. The prevalence of HPV infection peaked in patients more than or equal with 50 years old. There was significant difference of HPV-positive rates between different age groups($P<0.05$). **Conclusion** The low-risk HPV43 and high-risk HPV16 could be the most common phenotypes in this area, with higher infection rate of high-risk HPV genotypes and existence of multiple-genotypes infection. The prevalence of HPV infection peaked in females more than or equal with 50 years old. PCR-RDB could be an effective method to detect HPV subtype in clinical.

Key words: human papillomavirus; genotyping; nucleic acid hybridization; polymerase chain reaction

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈上皮内瘤病变和宫颈癌的主要致病原因,其中 40 种亚型可以感染生殖道,有大约 13~19 个亚型与浸润性宫颈癌的发生密切相关^[1]。文献报道 HPV16 型和 HPV18 型是最常见的,其与 70%的浸润性宫颈癌有关,低危型感染则与尖锐湿疣有关。目前 HPV 疫苗研究多是针对 HPV16 和 HPV18 型,对其他亚型的感染并不具有保护性。而不同国家和地区 HPV 的流行存在地域性差异。本研究应用 PCR-反向点杂交法检测患者宫颈组织中 HPV 的流行状况和感染亚型分布,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 5~9 月该院门诊就诊的 1 702 例女性。年龄 17~68 岁,平均年龄 29.4 岁。从小于或等于 20 岁开始,以 5 岁为一个年龄段,到大于或等于 50 岁,分为 8 个年龄段。

1.2 仪器与试剂 ABI Steponeplus PCR 扩增仪(美国 ABI),FYY-3 分子杂交仪(江苏兴化分析仪器厂)。人乳头瘤病毒 PCR-反向点杂交法基因分型检测试剂盒(深圳亚能生物技术

有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本取样步骤和要求 采取宫颈脱落细胞标本,先用棉拭子将阴道或宫颈口过多的分泌物擦拭干净,再用宫颈刷紧贴宫颈口稍用力顺时针转 5 圈,然后放入有专用细胞保存液的试管中,置 4℃保存,1 周内检测。

1.3.2 HPV 分型检测步骤 (1)HPV DNA 提取;(2)PCR 扩增;(3)杂交;(4)洗膜;(5)显色 HPV 分型。操作和结果判读按试剂盒要求进行,23 种 HPV 分为高危型和低危型,高危型 18 种,包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83 和 HPV MM4;低危型 5 种,包括 HPV44、6、11、42 和 43;有两型或两型以上者为多型感染(不论是高危型还是低危型)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 HPV 感染的基因亚型别及分布 1 702 例女性 HPV 感

染总阳性率为 17.6%(300/1 702),有 21 种亚型被检出。感染率最高的是低危型 HPV43(3.82%),其他型别以感染率高低依次为 HPV16(3.70%)、52(2.70%)、6(2.47%)、58(1.88%)、18(1.76%)、56(1.53%)、68(1.29%)、11(0.88%)、33(0.82%)、66(0.71%)、59(0.59%)、53(0.53%)、42(0.53%)、31(0.35%)、73(0.24%)、51(0.18%)、35(0.18%)、83(0.12%)、45(0.06%)和 39(0.06%),HPV MM4 型和 HPV44 型未被检出。筛查人群结果中高危型偏多,占 13.9%

表 1 1 702 例各年龄段女性 HPV 基因型分布及检出率

年龄(岁)	例数(n)	百分比(%)	阳性数(n)	高危型感染数(n)	低危型感染数(n)	多型感染数(n)	检出率(%)	χ^2 值	P 值
≤20	102	5.9	24	8	17	2	23.53	14.694	0.040
21~25	499	29.2	101	72	37	10	20.24	0.556 119	0.455 828 216
26~30	510	30.1	78	66	18	10	15.29	4.150 588 2	0.041 620 063
31~35	259	15.2	33	31	9	9	12.74	6.405 433 8	0.011 377 163
36~40	179	10.5	30	27	10	10	16.76	1.9180 965	0.166 066 7
41~45	100	5.9	23	23	8	9	23.00	0.007 927	0.929 055 1
46~50	36	2.1	6	6	5	5	16.67	0.736 601 3	0.390 751 8
≥50	17	1.1	5	4	5	4	29.41	0.273 563 2	0.600 951 5
合计(n)	1 702	100	300	237	109	59	17.63	0.556 119	0.455 828 216

3 讨 论

宫颈癌是常见的女性恶性肿瘤之一,全世界每年约有 40 万新发病例,有 20 万女性死于宫颈癌,中国每年新增宫颈癌患者约占全世界的 28.8%^[2]。现已明确 HPV 感染是宫颈癌上皮内瘤病变和浸润性宫颈癌发生的必要条件^[3]。据 Munoz 等^[4]报道,HPV 基因型分布有地区差异,与宫颈癌相关的型别也不尽相同。

靳琼等^[5]报道西藏自治区子宫颈感染 HPV 型主要依次为 16、33、58、52;史娅萍等^[6]对 318 例患者的研究中报道 HPV 检出率前 5 位依次为 16、33、31、58、18;深圳市罗湖区主要流行的 HPV 亚型为 HPV16(44.3%)、58(16.4%)、52(13.4%)^[7]。而在本研究中,病例主要来源于深圳市宝安区福永片区的外来农民工,检出率前 5 位依次为 HPV43(3.82%)、16(3.70%)、52(2.70%)、6(2.47%)、58(1.88%),其中低危 HPV43 型感染率最高,低危型 HPV 感染更易表现为尖锐湿疣,高危型中以 HPV16 感染率最高。

对 HPV 感染与年龄的相关性有两种观点:一种认为随年龄的增长 HPV 感染率逐渐降低;另一种认为在年轻女性与年长女性有两个 HPV 感染高峰^[8]。表 2 显示,本研究发现 HPV 总感染率在各年龄段有明显差异,不同基因型在不同年龄段中的阳性率不同。小于 35 岁女性,低危型 HPV 感染相对占优势,大于 35 岁女性中,高危型感染及多型感染率随年龄的增加而增强。有研究表明高危型 HPV 感染年龄是影响宫颈癌发生的重要因素,十年来国内外均报道宫颈癌也呈年轻化趋势^[9-12]。

目前 HPV 疫苗用于预防和治疗 HPV 感染已成为研究的热点。现已上市的 HPV 预防疫苗仅对预防 HPV16、18 型两种高危型感染有效。而不同 HPV 亚型对不同种族人群致癌性的强弱也明显不同。明确一个地区 HPV 流行的主要型别,对于评估患者预后,指导临床制定合理的治疗方案有重要意义,同时还可以为科研人员研制有针对性的基因疫苗提供可靠依据。

参考文献

[1] Bosch FX, Lorincz A, Mufloz N, et al. The causal relation between

(237/1 702),以低危型 HPV43 和高危型 HPV16 为主。低危感染占 6.4%(109/1 702),多型感染占 3.5%(59/1 702),最多达 6 种型别感染。

2.2 HPV 感染的年龄分布 筛查人群在小于或等于 20 岁年龄段感染率较高,然后至 31~35 岁年龄段下降至最低,而后又在大于或等于 50 岁达到高峰,出现双峰现象。各年龄段 HPV 感染检出率差异有统计学意义($P<0.05$),但不同基因型在不同年龄段中的阳性率不同。见表 1。

human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4):244-265.

[2] 蓝春烟,刘继红.人乳头瘤病毒感染及病毒载量与宫颈癌病变的相关性研究[J].中华肿瘤防治杂志,2007,14(1):5-8.

[3] Liu SS, Leung RCY, Chan KKL, et al. Evaluation of a newly developed genoarray human papillomavirus(HPV) genotyping assay and comparison with the roche linear array HPV genotyping assay [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(3):758-764.

[4] Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical[J]. Cancer N Engl J Med, 2003, 348(6):518-527.

[5] 靳琼,沈铿,李辉,等.西藏自治区女性子宫颈人乳头瘤病毒感染现状调查及相关因素分析[J].中华妇产科杂志,2009,44(12):898-902.

[6] 史娅萍,朱宇宁,周丽琴,等.人乳头瘤病毒基因型在宫颈疾病中的分布特点[J].中华检验医学杂志,2007,30(9):1009-1012.

[7] 韩定英,吴洁,姜碧卿,等.深圳市罗湖区 1 420 例女性生殖道人乳头瘤病毒筛查结果分析[J].中国初级卫生保健,2008,2(2):42-43.

[8] 钱建华,谢幸,叶大风.子宫颈人乳头瘤病毒感染的流行病学特征[J].中华妇产科杂志,2003,38(11):712-714.

[9] 周武,陈占国,陶志华,等.不同 HPV 亚型的多重感染和年龄因素与宫颈病变的关系[J].中国卫生检验杂志,2008,18(12):2632-2634.

[10] 黄冰玉,邹颖刚,徐耀宠.应用导流杂交基因芯片技术对 HPV 感染基因分型检测的研究[J].中国实验诊断学,2009,13(8):1065-1068.

[11] 章涛,李彦,肖瑜.宫颈疾病 HPV 亚型感染的导流杂交法检测及意义[J].中国妇幼保健,2009,24(8):1126-1129.

[12] 蒋春萍,徐洪,张淑芝.女性年龄与 HPV 感染、宫颈上皮内瘤病变的研究现状[J].中国热带医学杂志,2009,9(2):376-378.

(收稿日期:2012-01-14)