

## • 调查报告 •

## 采用液态芯片技术调查重庆地区妇女 HPV 感染及亚型分布\*

张 燕, 黄恒柳, 段 梦, 何建维, 邓少丽<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042)

**摘要:**目的 调查重庆地区女性人乳头状瘤病毒(HPV)感染状况及亚型分布特点。方法 采用液态芯片技术对重庆地区 424 例妇女进行 HPV 基因分型检测以分析 HPV 感染情况。结果 424 例患者中共检出 HPV 阳性者 114 例, 阳性率为 26.89%。检出率较高的高危型有 HPV16(11.84%), HPV52(11.18%), HPV31(10.53%), HPV58(7.89%); 检出率最高的低危型是 HPV6(12.50%)。HPV 单一感染占 70.18%, 多重感染占 29.82%; 不同年龄段人群 HPV 阳性率有差异, 20~29 岁年龄段妇女 HPV 阳性率最高(31.82%, 42/132)。结论 本地区 HPV 感染在亚型及年龄分布上具有一定的特点, 且与其他地区存在差异。

**关键词:**人乳头状瘤病毒; 液态芯片; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)20-2703-02

## Liquid-chip technique in investigation of HPV infections and genotyping of female patients in Chongqing

Zhang Yan, Huang Hengliu, Duan Meng, Deng Shaoli<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital,  
Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To study the situation of human papilloma virus(HPV) infection and genotype distribution among women in Chongqing. **Methods** The infection status of HPV in 424 outpatients was examined with liquid-chip technique. **Results** 114 positive cases were detected among the 424 women and the positive rate was 26.89%. The top four high-risk genotypes were HPV16(11.84%), HPV52(11.18%), HPV31(10.53%) and HPV58(7.89%), and the highest low-risk genotype was HPV6(12.50%). In all positive cases, 70.18% were found with single infection, and 29.82% were found with multiple infection. The prevalence of HPV infections was significantly different among different age groups, with the 20-29 age group had the highest prevalence(31.82%, 42/132). **Conclusion** HPV infection not only has its own characteristics both in the distribution of genotype and age, but also differs apparently from that of other areas.

**Key words:** human papilloma virus; liquid-chip; genotypes

人乳头状瘤病毒(HPV)是一种导致女性生殖系统病变的主要病原体, 尤其应注意的是, 高危型 HPV 的持续感染是宫颈癌及癌前病变的主要致病因素。临床 HPV 感染检测对发现宫颈癌高危患者及其早期防治有重要意义。HPV 感染情况有一定的地域分布差异, 本文采用液态芯片技术, 通过对在本院妇科就诊的 424 例患者标本进行 HPV 基因分型检测, 以了解 HPV 在本地区的感染分布情况, 有助于建立本区特异性的 HPV 分子流行病学资料, 为 HPV 的感染预防提供依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 标本来源于 2007 年 4 月至 2013 年 2 月在第三军医大学大坪医院妇科就诊并接受生殖道 HPV 感染筛查的 424 例疑似 HPV 感染患者, 年龄 17~71 岁, 在 20~39 岁的人数占总人数的 75.2%。剔除二次复查数据, 424 例均进行 HPV 基因分型检测。

**1.2 仪器与试剂** BIO-RAD C1000 PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司), Luminex 200 多功能流式点阵仪(美国 Luminex 公司), BECKMAN X-22R 高速离心机(美国 BECKMAN 公司), BIOER HB-100 恒温金属浴(杭州博日科技有限公司), 采样刷及细胞保存液(上海透景生命科技有限公司), HPV DNA 抽提试剂盒(上海透景生命科技有限公司), 人乳头瘤病毒核酸扩增分型检测试剂盒(上海透景生命科技有限公司)。

**1.3 方法** (1)宫颈脱落细胞的采集: 将采样刷插入宫颈, 轻轻搓动采样刷使其沿顺时针方向转动 5 圈, 取出采样刷后立即置于专用的细胞保存液中, 轻轻摇动液体洗涤采样刷以获得更多的宫颈脱落细胞用于检测。标本保存于 -20℃, 并于 3d 内完成基因分型检测。(2)HPV DNA 抽提: 吸取 200~400 μL 宫颈脱落细胞悬液至 1.5 mL EP 管, 15 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 200 μL 抽提缓冲液, 彻底混匀; 恒温金属浴 100℃干浴 15 min; 15 000 r/min 离心 5 min, 保留上清以备 DNA 上样。(3)HPV PCR 扩增: 按比例(PCR 预反应液 10 μL+引物 5 μL+酶 0.8 μL)配制反应液, 加入 5 μL 抽提的 HPV DNA 上机进行扩增, 扩增程序: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 5 times; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 s; 72℃ 3 min。(4)杂交: 检测孔中加入 22 μL 微球杂交液、PCR 扩增产物 3 μL, 混匀; PCR 仪中 95℃变性 5 min, 48℃ 30 min 使探针与扩增产物结合; 再加入 75 μL 链霉亲和素标记的藻红蛋白(SA-PE), 48℃孵育 15 min; Luminex 200 多功能流式点阵仪检测。所有操作和结果判读都按照试剂盒说明书进行, 共检测 26 种 HPV 亚型, 具体包括高危亚型: 16、18、31、33、35、39、45、52、58、26、51、55、56、59、53、66、68、82、83; 低危亚型: 6、11、40、42、44、61、73。

**1.4 统计学处理** Excel 建立数据库, 采用 SPSS 13.0 统计软

件分析,不同年龄段间感染率的比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。对多重感染者,各基因型阳性率重复计算。

## 2 结 果

**2.1 HPV 检测结果** 在 424 例研究对象中,HPV 感染阳性例数为 114 例,感染率为 26.89%。其中,单一亚型感染有 80 例,所占比重为 70.18%;多重亚型感染有 34 例,所占比重为 29.82%,说明 HPV 感染以单一亚型感染居多。HPV 单一亚型感染率为 18.87%,以单一高危型别感染最常见,有 61 例,感染率为 14.39%,而单一低危型别感染率较低,为 4.48%;HPV 多重亚型感染率为 8.03%,以高危型别混合和低危型别混合常见,高低危型别混合感染只有 6 例,感染率为 1.42%。

**2.2 HPV 亚型分布** 在所检测的 26 种 HPV 亚型中,有 20 种亚型被检出,其中包括 13 种高危型(HPV16、18、31、33、39、51、52、53、55、56、58、66、83)和 7 种低危型(HPV6、11、40、42、44、61、73),HPV26、35、45、59、68、82 未被检出。在检出的阳性标本中,HPV 低危亚型占 40.79%,HPV 高危亚型占 59.21%;检出率较高的 HPV 高危型有 HPV16(11.84%),HPV52(11.18%),HPV31(10.53%),HPV58(7.89%),低危型有 HPV6(12.50%),其次为 HPV40、42(7.89%),此两型均出现于低危型别多重感染中。

**2.3 不同年龄段 HPV 感染率** 各年龄段 HPV 感染检出率见表 1。HPV 感染率在 20~29 岁最高,达 31.82%,其次是 30~39 岁年龄段,感染率为 31.18%,40 岁以上年龄段 HPV 感染率相对较低。

表 1 不同年龄组 HPV 感染比较

年龄(岁)	病例数(n)	感染阳性例数(n)	感染率(%)	感染构成比(%)
<20	1	0.00	0.00	0.00
20~29	132	42	31.82	36.84
30~39	187	58	31.18	50.88
40~49	80	8	10.00	7.02
≥50	24	6	25.00	5.26
合计	424	114	100.00	100.00

## 3 讨 论

宫颈癌在妇科肿瘤中仅次于乳腺癌,是导致女性死亡的第 2 位恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。流行病学以及病毒学资料已经证实,高危 HPV 感染是宫颈癌的主要原因,宫颈癌患者多数存在高危 HPV 亚型的持续性感染<sup>[2]</sup>,因此,HPV 检测是早期发现宫颈癌前病变的有效方法。本研究利用液态芯片技术进行 HPV 基因分型检测,可检测聚合酶链式反应后的产物,并通过杂交分析对 HPV 的 DNA 进行分型<sup>[3]</sup>。杂交过程在封闭液态下完成,可以在一个反应管内完成近百种不同生物学反应<sup>[4]</sup>,不仅有效减少了受到污染的可能性,而且省时省力。此技术具有操作简单、灵敏度高、特异性强、样本容量需求少、反应速度快、精确度高等优点<sup>[5]</sup>。

本文对重庆地区 424 例疑似 HPV 感染妇女宫颈脱落细胞进行 HPV 基因分型检测,其中 HPV 感染者有 114 例,阳性检出率为 26.89%,与汪欣等<sup>[6]</sup>的报道中福州地区 HPV 感染率为 25.0%和江秀娟等<sup>[7]</sup>的报道中甘肃地区 HPV 感染率为 26.7%一致。在所检测的 26 种 HPV 亚型中,共检出 7 种低危型(HPV6、11、40、42、44、61、73)和 13 种高危型(HPV16、18、31、33、39、51、52、53、55、56、58、66、83)。检出的阳性标本中,高危亚型所占比例较大,感染率较高的亚型为 HPV16、52、31、58,而 HPV18 感染率相对较低,低危亚型中以 HPV6 感染率

最高,与杨君等<sup>[8]</sup>的报道中重庆地区检出 HPV 最常见型别为 16、58、52、6 型较为相近。而刘朝圣等<sup>[9]</sup>报道的北京地区妇女 HPV 型别中检出率居前五位的依次为 16、11、6、58、33,殷晋华等<sup>[10]</sup>报道的太原地区居前 3 位的 HPV 型别分别为 16、58、53,提示 HPV 亚型的频率分布存在一定的地域差异。值得注意的是,多项研究结果显示,HPV16 型感染率均较高,且无明显地域差异,本研究中 HPV 高危亚型感染也以 16 型居首,根据 Castellsague 等<sup>[5]</sup>的报道,HPV16 型持续感染是导致宫颈癌及癌前病变最主要危险因素,因此广大妇女应定期进行高危型 HPV 检查,预防和减少宫颈癌的发生。

本研究多重 HPV 感染在阳性检出者中所占比例为 29.82%,以低危型别多重感染和高危型别多重感染为主,HPV40、42 双重感染是检出频率最高的类型,并且 40、42 型全部出现在多重感染中,这提示此两种型别的感染可能会增加其他亚型的易感性,但结论尚需进一步研究考证。

HPV 感染率与年龄存在一定的关系,本研究统计结果表明,HPV 感染率随着年龄增长呈“U”形分布,20~39 岁年龄段接受 HPV 检查的例数以及阳性检出率均为最高,40~49 岁年龄段有明显的下降( $P < 0.05$ ),而 50 岁以上年龄段阳性检出率又出现了回升。年轻妇女 HPV 感染率高可能与性生活及性卫生具有密切的关系,而老年妇女较高的 HPV 感染率一方面可能与激素水平的变化引起免疫功能衰退从而导致老年妇女的 HPV 易感性增加及清除 HPV 的能力降低;另一方面可能与本研究中老年妇女纳入例数较少有关。

通过对不同地区和不同年龄人群 HPV 感染情况进行调查,了解 HPV 感染的地域差异及人群差异,对本地区宫颈癌的早期预防、治疗,监测治疗效果有重要意义。

## 参考文献

- [1] 杨丽. 宫颈 HPV 检测在宫颈癌前病变筛选中的临床意义[J]. 中国临床研究, 2011, 24(2): 129-130.
- [2] Roden R, Wu TC. How will HPV vaccines affect cervical cancer [J]. Nature Rev, 2006, 6(10): 753-763.
- [3] Wang SS, Bratti MC, Rodriguez AC, et al. Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer [J]. J Infect Dis, 2009, 199(1): 20-30.
- [4] 俞钱, 徐红星, 米琴芳. 流式荧光杂交法检测人乳头瘤病毒基因型的临床应用[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 262-263.
- [5] Castellsague X, Drudis T, Canadas MP, et al. Human papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain [J]. BMC Infect Dis, 2009, 9(10): 1471-1474.
- [6] 汪欣, 赵素萍, 魏建成. 福州地区 935 例妇女 HPV 感染情况的分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1): 33-35.
- [7] 江秀娟, 庞杰. 696 例宫颈脱落细胞 HPV 检测结果分析[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(1): 61.
- [8] 杨君, 周德平. 重庆地区 2497 例妇科就诊患者 HPV 感染状况分析[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(4): 347-349.
- [9] 刘朝圣, 陈新. 北京地区妇女宫颈人乳头瘤病毒感染及亚型分布情况分析[J]. 中国艾滋病性病, 2012, 18(9): 604-606.
- [10] 殷晋华, 李鹏丽. 太原地区 404 例女性 HPV 感染状况及基因分型统计分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(10): 34-35.