

## · 短篇论著 ·

## 液态芯片检测妇女 HPV 感染及基因亚型分布

熊玉娟 刘本荣 朱庆义

**【摘要】 目的** 探讨广州地区女性人乳头瘤病毒(HPV)的感染情况及其与年龄的关系。**方法** 取妇女宫颈脱落细胞,利用液态芯片技术检测26种HPV亚型。**结果** 在743例女性标本中,检出HPV阳性297例,检出率39.97%,其中单纯高危型HPV阳性211例,检出率28.40%;单纯低危型HPV阳性55例,检出率7.40%;高低危混合型HPV阳性31例,检出率4.17%。所有阳性标本中,单一感染232例(78.11%),二重感染61例(20.54%),三重感染4例(1.35%)。单一感染主要以HPV16和HPV52为主;多重感染中以HPV52合并HPV16、33亚型感染,以及HPV16合并HPV6、11亚型感染最为多见。单一HPV亚型的感染率在20岁以下年龄段明显高于其他年龄段( $P < 0.01$ );而HPV亚型双重感染主要发生在21~25岁年龄段,这个年龄段的双重感染率显著高于其他年龄段( $P < 0.0001$ )。HPV各亚型感染在年龄上的分布差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 广州地区妇女宫颈HPV感染常见型别为HPV52、16、6、11、58,HPV感染与女性年龄密切相关,但HPV亚型的分布与年龄无关。

**【关键词】** 人乳头瘤病毒; 液态芯片; 人乳头瘤病毒亚型

近年来,宫颈癌已发展为危害女性健康的第三大肿瘤杀手。据统计,全世界仅2008年就有53万新发病例,27万妇女死于宫颈癌,而人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是宫颈癌的主要致病因素,99%以上的宫颈癌中可以检测到HPV感染<sup>[1-2]</sup>。HPV是一种乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒,能引起人体皮肤黏膜的鳞状上皮增殖。不同亚型HPV感染对宫颈细胞的恶性病变的发生、发展有不同的影响,高危亚型主要与宫颈上皮内高度病变的发生有关,低危亚型主要引起外生殖器湿疣和宫颈上皮内低度病变等疾病<sup>[3-4]</sup>。不同HPV亚型感染对宫颈上皮致病力存在较大差异,并且HPV亚型分布存在明显的地域差异。本次调查利用液态芯片技术,对2010年1月1日至2011年12月31日在本院采集的宫颈脱落细胞标本进行HPV基因分型检测,从而分析广州地区女性HPV感染及其在各年龄段分布的情况,可为妇女HPV感染和宫颈癌的防治提供依据。

### 一、资料与方法

1. 研究对象:选取2010年1月1日至2011年12月31日在广东省中医院门诊就诊并自愿接受生殖道HPV感染筛查的妇女作为研究对象,年龄15~68岁,平均年龄33岁。从这些受试者中共收集到宫颈脱落细胞标本743份。

2. 试剂和仪器: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),Biometra Tgradient PCR扩增仪(德国Whatman Biometra公司),Luminex 200多功能流式点阵仪(美国Luminex公司)。

3. 方法:(1)宫颈脱落细胞的收集:宫颈脱落细胞取样步骤和要求按宫颈细胞学取材常规进行,采集标本置于盛有细胞保

存液的小瓶中,保存于4℃冰箱,基因亚型检测于2d内完成。(2)HPV DNA提取:吸取细胞悬液标本,离心沉淀后进行HPV DNA抽提,具体步骤按试剂盒说明书进行。(3)HPV PCR扩增:扩增HPV DNA的引物是MY09/MY11的改进型,引物为生物素标记,扩增靶区为HPV L1区,产物长度约480 bp。此外,还包括扩增人β珠蛋白编码基因的引物,用于特异性扩增β珠蛋白DNA片段。取5 μl DNA抽提液,按比例加入PCR反应试剂及Taq酶,按照试剂盒说明书的扩增步骤进行HPV DNA扩增。(4)杂交检测:向检测板的每孔中加入微球/探针杂交液22 μl、PCR产物3 μl,震荡充分混匀;PCR仪中95℃变性5 min,48℃30 min使探针与扩增产物结合;向每孔中加入75 μl链霉亲和素标记的藻红蛋白(SA-PE),48℃孵育15 min;Luminex200多功能流式分析仪检测。操作和结果判读按试剂盒说明书进行,一次性可检测26种基因型,包括19种高危型(HPV16、18、31、33、35、39、45、52、58、26、51、55、56、59、53、66、68、82、83)和7种低危型(HPV6、11、40、42、44、61、73)。

4. 统计学分析:使用SPSS 16.0软件,以百分率作为HPV感染评价指标,统计学显著性为 $P < 0.05$ 。两组对象年龄差异统计学意义比较采用 $t$ 检验;两个率、多个率的差异统计学检验采用Yates' continuity corrected chi-square test。

### 二、结果

在743例女性中,检出HPV阳性297例,总检出率39.97%,其中单纯高危型HPV阳性211例,检出率28.40%;单纯低危型HPV阳性55例,检出率7.40%;高低危混合型HPV阳性31例,检出率4.17%。检出HPV高危亚型中以52、16、58、39和68亚型的频率最高,其检出率分别为9.02%、8.21%、2.96%、2.69%和2.29%;而HPV18和33亚型的检出率较低,分别为1.08%和1.88%。检出HPV低危亚型中以6和11亚型最多,其检出率分别为5.79%和5.25%,占低危亚型HPV阳性者总数的50%和45.3%。所有HPV亚型的检出情况见表1。各种单一HPV亚型感染者为232例,占感染人数的78.11%,单一亚型感染主要以HPV16和52亚型为主;双重感染61例,占感染人数的20.54%,双重感染中以HPV52合并HPV16、33亚型,以及HPV16合并HPV6、11亚型最为多见;三重感染4例,占感染人

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.13.105

基金项目:国家自然科学基金(81100244/H2501);广东省优秀博士学位论文作者资助项目(sybzxm201127);广州医学院博士启动基金(303005002-0361)

作者单位:510105 广州,广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)检验科(熊玉娟);广州医学院第二附属医院心血管病研究所(刘本荣);广州金域医学检验中心(朱庆义)

通讯作者:刘本荣,Email:gyliubenrong@gmail.com

表1 HPV亚型分布

基因型	总例数	检出率(%)	单一感染		双重感染		三重感染	
			例数	% <sup>a</sup>	例数	% <sup>b</sup>	例数	% <sup>c</sup>
高危亚型								
16	61	8.21	39	16.81	22	36.07	0	0.00
18	8	1.08	4	1.72	3	4.92	1	25.00
26	4	0.54	3	1.29	1	1.64	0	0.00
31	9	1.21	4	1.72	4	6.56	1	25.00
33	14	1.88	6	2.59	8	13.11	0	0.00
35	5	0.67	4	1.72	1	1.64	0	0.00
39	20	2.69	12	5.17	5	8.20	3	75.00
45	2	0.27	1	0.43	1	1.64	0	0.00
51	10	1.35	6	2.59	4	6.56	0	0.00
52	67	9.02	40	17.24	25	40.98	2	50.00
53	5	0.67	4	1.72	1	1.64	0	0.00
56	12	1.62	8	3.45	4	6.56	0	0.00
58	22	2.96	16	6.90	6	9.84	0	0.00
59	7	0.94	4	1.72	3	4.92	0	0.00
66	7	0.94	6	2.59	1	1.64	0	0.00
68	17	2.29	13	5.60	3	4.92	1	25.00
82	7	0.94	5	2.16	1	1.64	1	25.00
83	1	0.13	0	0.00	1	1.64	0	0.00
低危亚型								
6	43	5.79	30	12.93	11	18.03	2	50.00
11	39	5.25	22	9.48	16	26.23	1	25.00
40/42/44	1	0.13	1	0.43	0	0.00	0	0.00
61/73	5	0.67	4	1.72	1	1.64	0	0.00

注:<sup>a</sup> 每个 HPV 亚型占单一感染的百分比;<sup>b</sup> 每个 HPV 亚型占双重感染的百分比;<sup>c</sup> 每个 HPV 亚型占三重感染的百分比

表2 不同年龄段患者 HPV 感染情况

年龄段	筛查例数	阳性例数	筛查占比(%)	阳性检出率(%)	单一感染		双重感染		三重感染	
					例数	阳性率(%)	例数	阳性率(%)	例数	阳性率(%)
总体统计										
	743	297		39.97	232	31.22	61	8.21	4	0.54
年龄组										
≤20岁	34	19	4.58	55.88 <sup>a</sup>	16	47.06 <sup>b</sup>	3	8.82	0	0.00
21~25岁	99	49	13.32	49.49 <sup>a</sup>	28	28.28	20	20.20 <sup>c</sup>	1	1.01
26~30岁	218	84	29.34	38.53	66	30.28	16	7.34	2	0.92
31~35岁	139	50	15.21	35.97	40	28.78	10	7.19	0	0.00
36~40岁	113	35	15.21	30.97	30	26.55	5	4.42	0	0.00
41~45岁	65	26	8.75	40.00	22	33.85	3	4.62	1	1.54
46~50岁	36	15	4.85	41.67	12	33.33	3	8.33	0	0.00
>50岁	39	19	5.25	48.72	18	46.15 <sup>b</sup>	1	2.56	0	0.00

注:<sup>a</sup> 与26~50岁年龄段比较, $P$ 均 $<0.01$ ;<sup>b</sup> 与21~50岁年龄段比较, $P$ 均 $<0.01$ ;<sup>c</sup> 与其他年龄段比较, $P$ 均 $<0.0001$

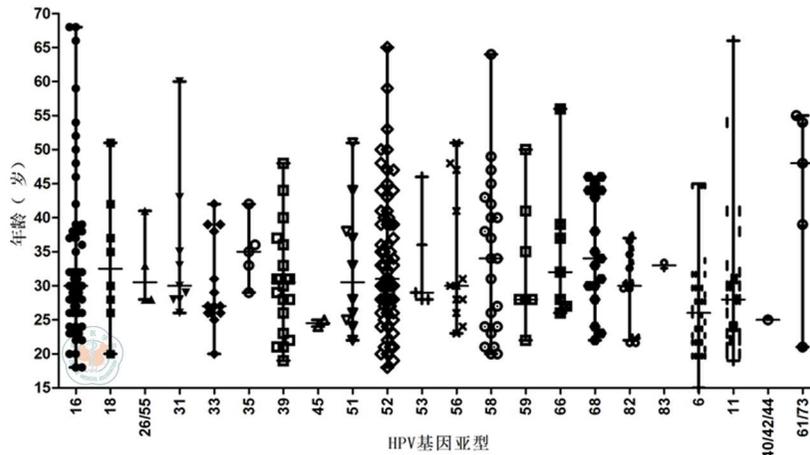


图1 HPV亚型随年龄的分布情况。横坐标代表各HPV亚型亚型别，纵坐标代表年龄，图中的短横线表示中位数

数的1.35%。HPV33亚型单一感染率明显低于33亚型合并其他亚型的感染率( $P=0.0091$ )；HPV11亚型单一感染率也明显低于11亚型合并其他高危亚型的感染率( $P=0.0023$ )。

在HPV筛查人群中,以21~40岁的妇女为主,占总筛查人数的73.08%(569/743),41岁以上年龄段的人数较少。在25岁以下年龄段HPV的感染率达49%以上,明显高于其他年龄段的平均感染率(37.50%)( $P=0.0051$ )(表2)。20岁以下年龄段的单一HPV亚型感染率最高,其次为50岁以上年龄段,与其他年龄段相比差异具有统计学意义( $P<0.01$ )(表2)。双重HPV亚型感染则主要发生在21~25岁年龄段,感染率远高于其他年龄段( $P<0.0001$ )；而50岁以上年龄段的双重感染率(2.56%)则低于其他年龄段(表2)。

高危亚型感染率较高的52、16、58、39、68亚型感染在年龄上的分布没有显著差别,主要集中在21~40岁之间；低危亚型感染率较高的6亚型和11亚型在年龄上的分布也没有差别,主要发生在30岁以前(图1)。

### 三、讨论

早期研究显示,HPV感染的高危亚型分布具有一定的地域性差异,全球范围主要是16亚型,其次是18亚型,再次是33、52、58亚型<sup>[5]</sup>,在亚洲主要以16、18、33亚型为主,而在中国主要以16、18、52、58亚型最为常见<sup>[1]</sup>。然而,本研究结果显示在我们的研究群体中感染率最高的高危HPV亚型为52亚型,其次为16亚型和58亚型,18和33亚型的频率则较低,与河南省、浙江丽水及北京地区的高危HPV亚型频率分布存在差异<sup>[6-8]</sup>,提示HPV高危亚型的频率分布存在明显的地域差异。低危亚型感染则主要以HPV6及11亚型为主,占有所有低危亚型的93.18%。Liu等<sup>[9]</sup>也发现在广州及香港地区HPV16和52亚型的感染率最高,与我们的结果一致。也有报道指出在亚洲的某些国家和地区(如台湾地区)HPV52和58亚型与16亚型一样流行<sup>[10-11]</sup>。程艳香等<sup>[12]</sup>报道在CIN I和CIN II级中HPV52的检出率最高,而在CIN III中,HPV16亚型的检出率最高,其次为HPV52型,在宫颈癌中检出的HPV亚型中频率最高的为16亚型,其次为18亚型,再次为52亚型。以上研究结果说明HPV52是所有HPV亚型中最易感染的亚型,但在宫颈癌的发生发展中HPV52亚型的危险性不及18亚型,尽管18亚型在某些人群中的感染率比52、33亚型低,但一旦感染上,很容易发展成为宫颈癌。本研究

的HPV阳性检出率为39.97%,远高于Liu等报道的10%。在Liu等<sup>[9]</sup>的研究群体中,受过高中以上教育的女性占85%以上,而在我们的研究群体中并未考虑教育背景;另外,他们的研究群体从20至60岁以上,每个年龄段的样本数相近,而HPV感染率最高的年龄段为20~29岁,随着年龄增长呈下降趋势,而我们的研究群体年龄分布主要集中在20~40岁。以上两点可能是导致在我们的研究群体中HPV阳性检出率很高的主要原因。我们的研究结果显示在广州地区同时感染3种以上HPV亚型的情况并不常见,只占总感染人数的1.35%,然而,同时感染2种亚型的比例较高,占20.54%,双重感染主要以52并16、33亚型以及16并6、11亚型为主,可能与这几种亚型在人群中的分布频率高有关。广州地区的双重感染率与杨志伟等<sup>[13]</sup>报道的浙江省象山地区的双重感染率相近,然而,多重感染率比象山地区低。值得关注的是33亚型和11亚型的单一感染率明显低于其合并其他亚型的感染率,提示33亚型和11亚型可导致受感染者对其他HPV亚型的易感性增强。混合感染多发生在20~25岁年龄段的主要原因可能与该年龄段的女性大多数未婚,性伴侣不固定,易导致多种HPV亚型从不同个体传染至同一个体。本研究中,HPV阳性检出率最高的年龄段为16~25岁及50岁以上年龄段,可能是由于该年龄段来院就诊的女性多数都有临床症状,导致该年龄段的样本选取存在偏差。本研究表明广州地区HPV的感染率较高,其主要流行的亚型为HPV52、16、58、39、68等高危亚型及HPV6、11等低危亚型。另外,20~25岁的女性不但HPV感染率高,而且有近四分之一的个体携带2种以上HPV亚型,因此,对于20~25岁的女性来说,HPV感染的预防及感染后的治疗都应受到特别重视。

### 参考文献

- [1] Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, et al. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. Arch Gynecol Obstet, 2012, 285: 771-777.
- [2] 鲁选文,肖长义,叶红. 细胞因子与人类乳头瘤病毒及宫颈癌相关性的研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5: 4163-4166.
- [3] Castellsague X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. Gynecol Oncol, 2008, 110: S4-7.
- [4] 刘红杏,庞伟鸿,宁学玲,等. 生殖道尖锐湿疣患者HPV的基因分型检测及评价. 检验医学与临床, 2009, 6: 1079-1080.
- [5] Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, et al. Against which human papil-

- lomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*, 2004, 111:278-285.
- [6] 汤福想,刘玉玲,王会娟. 妇女宫颈 HPV 感染及基因亚型分布. *实用预防医学*, 2010, 17:1717-1719.
- [7] 蒋卫平,丁茂文,张晓梅. 丽水地区人乳头状瘤病毒基因型分布. *现代实用医学杂志*, 2009, 21:837-839.
- [8] 赵健,杨英捷,廖秦平. 导流杂交基因芯片技术在人乳头状瘤病毒感染分型检测中的临床应用. *中华检验医学杂志*, 2006, 29:1148-1151.
- [9] Liu SS, Chan KY, Leung RC, et al. Prevalence and risk factors of Human Papillomavirus (HPV) infection in southern Chinese women-a population-based study. *PLoS One*, 2011, 6:e19244.
- [10] Lin H, Ma YY, Moh JS, et al. High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan. *Gynecol Oncol*, 2006, 101:40-45.
- [11] Inoue M, Sakaguchi J, Sasagawa T, et al. The evaluation of human papillomavirus DNA testing in primary screening for cervical lesions in a large Japanese population. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16:1007-1013.
- [12] 程艳香,江敬红,史玉霞,等. HPV 亚型在各型宫颈病变中的分布差异. *中国妇幼保健*, 2010, 25:3405-3408.
- [13] 杨志伟,夏振海,朗敏芳. 象山地区女性感染 HPV 基因类型分析. *中国优生与遗传杂志*, 2011, 19:25-26, 49.

(收稿日期:2012-03-21)

(本文编辑:戚红丹)

熊玉娟,刘本荣,朱庆义. 液态芯片检测妇女 HPV 感染及基因亚型分布[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(13):3768-3771.

