

· 临床研究 ·

## 重庆永川地区人乳头瘤病毒感染亚型、年龄分布及多重感染影响的研究\*

代红莹, 张晓静<sup>△</sup>

(重庆医科大学附属永川医院检验科 402160)

**摘要:**目的 了解 23 种常见人乳头瘤病毒(HPV)在重庆永川地区的亚型分布、多重感染及不同年龄段感染的比例。方法 运用反向膜杂交技术对 2007 年 1 月至 2010 年 10 月在该院就诊的患者进行 HPV 亚型检测,然后运用 SPSS 软件分析。结果 最为常见高危型感染是 HPV-16、58、52,低危型感染是 HPV-43、11、6。多重感染占总感染的 26.08%,其中 HPV-16 合并的二重感染最常见。>30~40 岁年龄段具有较高的感染率,占总感染的 39.27%。结论 多重感染占有较大比例,提示多重感染与宫颈癌的进程有一定关系,>30~40 岁年龄段是 HPV 感染的高发阶段,需高度警惕。

**关键词:**年龄分布;人乳头瘤病毒;亚型分布;多重感染

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.06.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)06-0619-03

Study on subtype, age distribution and multiple infection of human papilloma virus(HPV) in Yongchuan area of Chongqing<sup>\*</sup>

Dai Hongying, Zhang Xiaojing<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

**Abstract:** Objective To investigate the subtype distribution of 23 common HPV, ratio of multiple infections, and different age paragraph infection rates in Chongqing Yongchuan area. **Methods** HPV subtype was detected from Jan. 2007 to Oct. 2010 with reverse film hybrid technology. The data was analyzed by using SPSS software. **Results** The results showed that the most common subtype of high-risk infection HPV were HPV-16, 58 and 52. The most common subtype of low-risk infection HPV were HPV-43 and 11. The ratio of multiple infections was 26.08%, and HPV-16 merger double infection was the most common. There was relatively high infection rate among >30-40 years old women, accounting for 39.27% of the total infection. **Conclusion** HPV-16 infection is high-risk pattern in this area, while HPV-42 infection is the low-risk pattern. Multiple infections accounted for comparatively large ratio, indicated it related to the procession of cervical cancer. Age >30-40 is high-risk stage of HPV infection for females, and vigilance is needed.

**Key words:** age distribution; human papilloma virus; subtype distribution; multiple infection

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是一种嗜黏膜和皮肤上皮的双链闭合环状的小 DNA 病毒,相对分子质量约为  $8 \times 10^3$ 。目前 100 多种亚型已被鉴定,其中约 40 余种与人类生殖器皮肤黏膜病变相关<sup>[1]</sup>。HPV 亚型可分为高危型和低危型两类,低危型以 HPV-6、11 最为常见,主要引起尖锐湿疣等良性病变;高危型以 HPV-16、18、31、52、58 最为常见,常引起宫颈癌等恶性病变<sup>[2]</sup>。HPV 亚型在不同地区不同人群分布情况不一<sup>[3]</sup>。目前,HPV 在非洲和拉丁美洲的感染率较高,绝大多数性活跃女性至少感染了一种 HPV。本研究主要对重庆永川地区的适龄妇女进行 23 种常见亚型检测,以确定重庆永川地区 HPV 感染的常见类型,为后续研究打下基础。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究所有样本均来源于重庆医科大学附属永川医院,采集对象为 2007 年 1 月至 2010 年 10 月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,少数来不及处理的样品置于 -20℃ 冰箱中保存,1 周内进行处理。

**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)、其他试剂(国产分析纯)。

## 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,安全丢弃。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,沸水浴 10 min,13 000 r/min 离心 10 min, -20℃ 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,根据 HPV L1 基因设计 23 种亚型的特异性探针,针对这一片段设计通用引物,同时以人类基因组的看家基因 beta-globin 作为 PCR 对照。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 个循

\* 基金项目:重庆市卫生局课题资助项目(2008-2-344)。 作者简介:代红莹(1961~),副主任技师,本科,主要从事优生、优生分子诊断研究。 △ 通讯作者, Tel:13500313200; E-mail:312227940@qq.com。

环,72 ℃ 5 min。PCR 反应体系为:ddH<sub>2</sub>O 14.2 μL,反应缓冲液(含 MgCl<sub>2</sub>) 2.5 μL,三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)2 μL,引物 0.5 μL/条,样品 DNA 5 μL,Taq 酶 0.3 μL,反应总体积 25 μL。

**1.3.3 杂交和显色** 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 5 mL(2×SSC,0.1%SDS,pH 7.4)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(0.5×SSC,0.1%SDS,pH 7.4)于杂交箱或水浴箱中预热至 51 ℃。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。A 液配制 1:2 000 的过氧化物同工酶(POD)溶液,室温轻摇浸泡膜条 15 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 15 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 型阳性,每次实验都设有阴性和阳性对照。

**1.4 统计学处理** 用 Micro EXCEL 软件建立数据库,制作表单进行数据的录入,最后得到成型的数据库,用 SPSS13.0 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** 在检测出的 955 例阳性标本中,除 HPV-44、MM4 未检测出来外,其他各型均有检出。其中高危型感染 HPV-16 最多为(34.45%),其次为 HPV-58(11.52%);低危型感染 HPV-43 为首(9.84%),其次为 HPV-11(8.69%)。高危型检出数是低危型检出数的 3.5 倍。

表 1 HPV 亚型感染情况

HPV 亚型	检出数(n)	总检出率(%)	高危型/低危型检出率(%)
高危型	1 007	—	100.00
16	329	34.45	32.67
58	110	11.52	10.92
52	105	10.99	10.43
33	70	7.33	6.95
18	69	7.23	6.85
66	53	5.55	5.26
56	50	5.24	4.97
31	49	5.13	4.87
68	36	3.77	3.57
59	30	3.14	2.98
53	26	2.72	2.58
35	19	1.99	1.89
45	17	1.78	1.69
73	15	1.57	1.49
51	12	1.26	1.19
83	9	0.94	0.89

续表 1 HPV 亚型感染情况

HPV 亚型	检出数(n)	总检出率(%)	高危型/低危型检出率(%)
39	8	0.84	0.79
MM4	0	0.00	0.00
低危型	286	—	100.00
43	94	9.84	32.87
11	83	8.69	29.02
6	69	7.23	24.13
42	40	4.19	13.99
44	0	0.00	0.00

—:此项无数据。

**2.2 HPV 各型感染情况** 在混合感染的 249 例标本中,两种亚型的混合最为常见,占感染检出率的 19.27%;3 种及以上亚型感染检出率仅占总感染的 6.81%。高危型和低危型混合感染 110 例,占总感染 11.52%;高危型混合感染 118 例,占总感染的 12.36%;低危型混合感染 13 例,占总感染的 1.36%。

表 2 HPV 感染情况

感染类型	阳性数	检出率(%)
单一感染	706	73.93
两种亚型感染	184	19.27
多种感染	65	6.81
高危型感染	582	60.94
低危型感染	132	13.82
高危型混合感染	118	12.36
高危型与低危型感染	110	11.52
低危型混合感染	13	1.36

**2.3 HPV 感染的年龄分布** 本研究将感染者分为≤20 岁、>20~30 岁、>30~40 岁、>40 岁 4 个年龄组,其 HPV 的感染率依次为 6.49%、22.93%、39.27%、31.31%,>30~40 岁年龄组是 HPV 感染的主要年龄阶段。

表 3 不同年龄 HPV 感染情况

年龄组	阳性数(n)	HPV 感染率(%)
≤20	62	6.49
>20~30	219	22.93
>30~40	375	39.27
>40	299	31.31
合计	955	100.00

## 3 讨 论

**3.1 HPV 感染状况** HPV 是一种通过性生活传播的病毒,通常感染没有明显症状。据统计,至少有 50% 的妇女其一生都会感染 HPV,而 50 岁之前感染 HPV 的几率高达 80%。非洲 HPV 感染率约 22.1%,亚洲 8.0%,北美洲 11.3%,中美洲和墨西哥 20.4%,欧洲 8.1%<sup>[4]</sup>,不同地区有一定差异,这可能是由于 HPV 本身的地域性差异及不同的研究者选择的目标人群和采用的检测方法不同引起的。

**3.2 HPV 亚型分布特点** 研究表明,HPV 亚型分布也存在地域性差异,不同亚型 HPV 感染致癌性及其后果不同<sup>[5]</sup>。

Bao 等<sup>[6]</sup>研究的中国宫颈癌常见亚型为 HPV-16、18、58、33、52、45、31 及 35 型;宫颈癌前病变中常见亚型为 HPV-16、58、52、18、33、31。

本研究显示 HPV 高危型感染中常见的亚型为 HPV-16、58、52、33、18、66、56,与前人的研究有所偏差,原因可能归结为 HPV 亚型分布的地域性差异;低危型感染中 HPV-43、11、6、42 均占有较大比例,与前人结果比较 6、11 没有占有主导地位,但是 4 种亚型均是广范围报道的 HPV 低危型亚型。

**3.3 单一感染与多重感染** 本研究中 HPV 多重感染的比例为 26.08%,低于 Bachtary 等<sup>[7]</sup>(43.9%),与其他文献一致<sup>[8]</sup>。不少学者认为 HPV 的多重感染并不少见,检出率高低除与研究人群有关外,还与检测方法有关。在本研究中,多重感染主要是二重感染,最常见的为 HPV-16 合并的感染。Ho 等<sup>[9]</sup>学者认为 HPV 多重感染者出现持续感染的危险性更大,支持本研究结果。

**3.4 HPV 与宫颈癌的关系** 宫颈癌发病率高,在女性恶性肿瘤的发病率中位居第 2。研究表明,HPV 的持续感染是宫颈癌及宫颈上皮内瘤变(CIN)的主要病因。高危型 HPV 的持续感染是宫颈癌及其癌前病变发生、发展的必要条件。宫颈癌患者的高危型 HPV 感染阳性率为 100%,CIN II 和 CIN III 为 97%,CIN I 为 61.4%。

不同 HPV 亚型的致病力不同,据 Munoz 等<sup>[10]</sup>统计,虽然各级别病变感染型别存在差异,但高危型 HPV-16、58、18、56、33 在各级别病变组均占有一定优势,本研究亦支持上述结果。HPV 多重感染率随病变级别增加而增加,一定程度上说明多重感染对宫颈病变的发生、发展起促进作用。结果与 Fife 等<sup>[11]</sup>的研究一致,但也有不少学者提出反对意见<sup>[10]</sup>。

**3.5 HPV 与年龄的关系** HPV 与年龄具有相关性,据 de Sanjose 等<sup>[4]</sup>的研究显示:HPV 感染高峰在 34 岁之前,35~44 岁的 HPV 感染率随之降低,而对于大于 45 岁组,除亚洲外其他地区的感染率又有所增加。本研究结果有所不同,原因在于,统计的标本量有限,不能客观反映 HPV 感染年龄本身,也存在患者来源集中的问题,HPV 感染一般症状不明显,很多年轻妇女忽略了 HPV 的常规检查也是一个很大的因素。

#### 参考文献:

[1] Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infec-

tion; epidemiology and pathophysiology[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 107(2): 2-5.

[2] Paavonen J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias [J]. *Int J Infect Dis*, 2007, 11(2): 3-9.

[3] Clifford GM, 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.

[4] de Sanjose S, Diaz M, Castellsague 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.

[5] Clifford GM, Swith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis [J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(1): 63-73.

[6] Bao YP, Li N, Smith JS, et al. Human papillomavirus type-distribution in the cervix of Chi-nese women; a meta-analysis [J]. *Int J STD AIDS*, 2008, 19(2): 106-111.

[7] Bachtary B, Obermair A, Dreier B, et al. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer [J]. *Int J Cancer*, 2002, 102(3): 237-243.

[8] Huang LW, Chao SL, Wang JL, et al. Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma [J]. *Cancer*, 2004, 100(2): 327-334.

[9] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women [J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(7): 423-428.

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

[11] Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, et al. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia [J]. *J Med Virol*, 2001, 64(4): 550-559.

(收稿日期:2012-10-07 修回日期:2012-12-01)

(上接第 618 页)

Blood urea nitrogen concentrations in low-birth-weight preterm infants during parenteral and enteral nutrition [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010, 51(2): 213-215.

[11] 孙晓丽,周晓玉. 极低出生体质量儿的早期全静脉营养的临床探讨 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2008, 28

(7): 921-924.

[12] 贝斐,孙建华,叶秀霞,等. 早期应用氨基酸对极低出生体质量儿胃肠外营养相关性胆汁淤积的影响 [J]. *中国新生儿科杂志*, 2011, 26(2): 83-86.

(收稿日期:2012-11-13 修回日期:2012-12-08)