

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.35.013

重庆地区 12 196 例妇科门诊患者 HPV 亚型感染情况分析*

鄢春晖, 陈林, 袁蔓莉, 周晓[△]
(重庆市第四人民医院妇产科 400014)

摘要:目的 通过对妇科门诊患者人乳头瘤病毒(HPV)感染情况的研究,为该地区 HPV 流行病学的研究提供理论依据。**方法** 对 2011 年 1 月至 2013 年 12 月,来该院妇产科门诊就诊的 12 196 例患者进行登记,采集宫颈分泌物作为标本,利用 PCR 对 HPV 进行分型检测,对患者的年龄分布、感染型别及多重感染的情况进行统计。**结果** 本研究 12 196 例患者中检出 HPV 阳性 3 754(30.8%)例,其中高危型感染率为 61.67%,排在前三位的为 HPV58、HPV16 和 HPV52;低危型感染率为 21.23%,低危型感染以 HPV6 和 HPV43 为主。多重感染患者中以二重感染为主。各年龄段 HPV 感染率之间差异有统计学意义($\chi^2 = 129.76, P < 0.05$),不同年龄段 HPV 感染率呈现出“U”形曲线。**结论** 重庆地区妇科门诊患者 HPV 感染具有明显的地区特异性和年龄差异性,临床诊断中应特别关注感染率较高的 HPV58、HPV16 和 HPV52 亚型, ≤ 25 、 ≥ 46 年龄段是 HPV 感染的 2 个高峰,应加强对这 2 个年龄段 HPV 的筛查。

关键词:人乳头瘤病毒;多重感染;年龄;感染型别

中图分类号:R737.33

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)35-4746-03

Research of HPV infection situation of 12 196 gynecological clinic patients in Chongqing*

Yan Chunhui, Chen Lin, Yuan Manli, Zhou Xiao[△]

(Department of Gynecology, the 4th People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

Abstract: **Objective** To learn the HPV infection situation of gynecological patients, so as to provide a scientific basis for the epidemiological studies in Chongqing area. **Methods** Totally 12 196 gynecology clinic patients in January 2010 to December 2013 were registered whose cervical secretions was collected as specimens, was type testing was carried on by PCR-reverse dot hybridization, age distribution, infected type and multiple infection of the patients were counted. **Results** There were 3 745(30.8%) patients with a positive test specimen of 12 196 patients detected in this study, the high-risk HPV infection rate was 61.67%, the top three high-risk HPV subtype were HPV58, HPV16 and HPV52; the low-risk HPV infection rate was 21.23% and the main subtypes were HPV6 and HPV43. The majority of multiple infections was double infection. There were significant differences between each age groups ($\chi^2 = 129.76, P < 0.05$), the paragraph of HPV infection rate present as "U" shaped curve. **Conclusion** The HPV infection of gynecology clinic patients in Chongqing area has obvious regional specificity and age differences. HPV58, HPV16 and HPV52 should be pay attention in clinical diagnosis. The age group ≤ 25 and ≥ 46 years old are two peaks of HPV infections, and it should be strengthen the screening of the two age groups.

Key words: human papillomavirus; multiple infection; age; infection type

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)属于乳多空病毒科的乳头瘤空泡 DNA 病毒,定向感染人类皮肤及黏膜组织,能引起人体皮肤黏膜的鳞状上皮增殖,表现为寻常疣、生殖器疣(尖锐湿疣)等症状。目前已鉴定出 100 多种亚型,其中 40 多种与生殖器皮肤黏膜的病变有关,根据其致癌性分为高危型和低危型 2 类,前者常引起宫颈癌等恶性病变,后者常引起尖锐湿疣等良性病变。流行病学研究表明,高危型 HPV 的持续感染是引起宫颈癌的主要原因^[1]。1999 年,国际癌症研究机构(IARC)通过对 22 个国家一项研究显示,在 99.7% 的宫颈癌组织中检测到 HPV-DNA^[2]。

HPV 基因序列的多样性造成各地区 HPV 亚型的分布存在着一定的差异^[3],这些差异导致病毒 DNA 的结构域或功能域发生变化,从而影响宿主对病毒的免疫应答。因此,了解 HPV 亚型在不同地区的分布及感染情况,对 HPV 感染的诊断和防治具有重要意义。本文旨在通过对重庆地区 12 196 例妇科门诊患者 HPV 亚型感染情况的研究,为重庆地区 HPV

感染的流行病学研究提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 1 月至 2013 年 12 月来本院妇产科门诊就诊的 12 196 例女性患者为研究对象,291 人年龄不详,其余年龄 15~68 岁,其中, ≤ 25 岁 6 266 例,26~35 岁 3 107 例,36~45 岁 1 842 例, ≥ 46 岁 690 例。纳入标准:患有 1 种或几种宫颈疾病,没有做过宫颈切除手术,标本采集时不处于月经期,除去复查患者。全部标本采集均由医师征得患者同意并承诺保护患者隐私。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 标本采集前 3 d 不得冲洗阴道,24 h 内不得有性行为,未处于经期。用棉拭子将宫颈口过多的分泌物擦去,取出宫颈刷于宫颈口单向旋转 4~5 周,以获得足量的上皮细胞,然后将其放入盛有生理盐水的采集管中,2~8℃ 保存,7 d 内检测,-20℃ 保存不超过 3 个月。

1.2.2 主要仪器与试剂 HPV 基因分型(23 型)检测试剂盒

* 基金项目:重庆市卫生局资助项目(2009-2-084)。作者简介:鄢春晖(1963-),本科,副主任医师,主要从事妇产科研究工作。△ 通讯作者, Tel: (023)63692139; E-mail: zhouxiao418@aliyun.com。

(深圳亚能生物技术有限公司),MG96+型 PCR 扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司),FYY-3 型分子杂交仪(兴化市分析仪器厂)。

1.2.3 检测方法 (1)HPV DNA 提取:取宫颈细胞采集液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。加入 50 μ L 细胞裂解液,混匀,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,保留上清液备用。(2)PCR 扩增:PCR 反应体系(深圳亚能生物技术有限公司提供),PCR 反应液 20 μ L,加入模板 DNA 5 μ L,反应前每管滴加 1 滴矿物油。PCR 温控体系,50 $^{\circ}$ C 15 min,95 $^{\circ}$ C 10 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,42 $^{\circ}$ C 90 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。(3)反向膜杂交:取 15 mL 离心管,放入标有样本编号的膜条(应在膜条编号处用中性笔标记),加入 8 mL 杂交液[2 \times 标准枸橼酸盐水(SSC),0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)]和 25 μ L PCR 产物,沸水浴 10 min,取出,拧紧瓶盖,50 $^{\circ}$ C 杂交 90 min。取出膜条,放入盛有 50 mL 洗涤液(0.5 \times SSC,0.1% SDS)的离心管,50 $^{\circ}$ C 洗膜 10 min,阴性质控品和阳性质控品同步处理。(4)洗膜:按杂交液:过氧化物酶(POD)=2 000:1 配制孵育液(2 张膜条需 4 mL POD,配制成 8 mL 孵育液,4 张膜可用 6 μ L POD 母液,配制成 12 mL 孵育液),室温轻摇孵育 30 min,弃掉孵育液。用杂交液室温轻摇 2 次,每次 5 min。用 0.1 mol 柠檬酸钠溶液室温轻洗 1~2 min,同时配制显色液,显色液需新鲜配制,0.1 mol 柠檬酸钠溶液:四甲基联苯胺(TMB):30% H₂O₂=19 mL:1 mL:2 μ L)。将膜条浸泡于显色液中,避光显色至少 30 min,转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

1.2.4 质量控制 所有检验人员均经过专业的培训,拥有 PCR 上岗证件;实验前对操作区进行 30 min 紫外灯照射,检验设备和检验试剂均通过国家临检中心认证;每次实验均设有阴性对照和阳性对照。

1.2.5 结果判定 膜条上有 24 个圆形斑点,其中 PC 点为显色质控点,其他 23 个斑点均有相应 HPV 亚型所对应的探针。每张膜条 PC 位点处均应有蓝色斑点出现,此时结果的判读视为成功,PC 位点不显现蓝色斑点则提示实验失败。阴性质控的杂交膜条除 PC 位点有蓝色斑点外,其他位点均不出现显色信号;阳性质控品处 PC 位点出现显色信号外,必须在相应 HPV 基因型位点出现显色信号,否则说明实验失败,提示 PCR 扩增或杂交失败。

1.3 统计学处理 HPV 感染具有显著的年龄差异性,为了更好地反应不同年龄段间 HPV 感染的情况,参照文献[4]发布的世界人口统计标准,将年龄分成 4 组, ≤ 25 、26~35、36~45、 ≥ 46 岁。所有数据通过 SPSS19.0 和 Excel 2003 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;计数资料以率或百分比表示,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各年龄段 HPV 感染情况 在受检的 12 196 例标本中,共检测出 3 754 例 HPV 阳性患者,检出率为 30.8%。 ≤ 25 、26~35、36~45、 ≥ 46 岁受检者 HPV 检出率分别为 31.6%、28.5%、28.8%和 37.5%,不同年龄段 HPV 感染率呈现出“U”形曲线(图 1)。4 个年龄段中, ≥ 46 年龄段 HPV 感染率最高,与其他 3 组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 29.67, P < 0.05$),见表 1。

2.2 各年龄段 HPV 感染构成比 3 754 例阳性标中,各年龄段 HPV 单重感染率和多重感染率之间有差异有统计学意义

($\chi^2 = 129.76, P < 0.05$)。每个年龄组的主要感染构成均为单重感染,其中 36~45 岁年龄段单重感染率(78.15%)显著高于其他年龄段;各年龄段多重感染患者中,以二重感染为主, ≤ 25 岁年龄段的三重和四重感染率显著高于其他年龄段;在 26~45 岁年龄段,多重感染率的分布呈下降趋势,46 岁以后多重感染有所回升,见表 2。

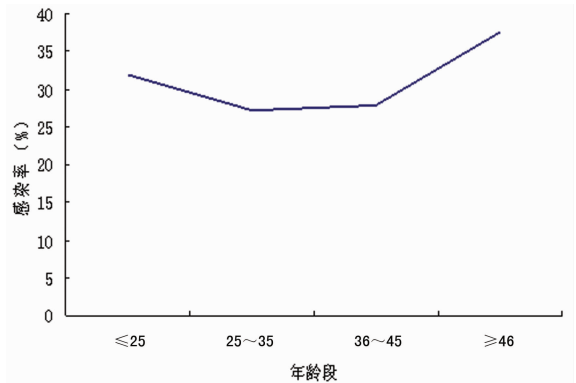


图 1 各年龄段 HPV 感染曲线

表 1 各年龄段 HPV 感染情况统计表[n(%)]

项目	阳性	阴性	合计
年龄不详	101(34.7) ^{abc}	190(65.3)	291
≤ 25	1 978(31.6) ^c	4 288(68.4)	6 266
26~35	885(28.5) ^b	2 222(71.5)	3 107
36~45	531(28.8) ^{bc}	1 311(71.2)	1 842
≥ 46	259(37.5) ^a	431(62.5) ^a	690
合计	3 754(30.8)	8 442(69.2)	12 196

表 2 各年龄段 HPV 感染构成比 (%)

年龄(岁)	单重感染	二重感染	三重感染	四重及以上感染
≤ 25	69.06	17.67	6.37	4.90
26~35	73.22	19.32	4.75	2.71
36~45	78.15	15.44	4.71	1.69
≥ 46	72.59	18.92	5.41	3.09

2.3 HPV 阳性标本主要型别分布 本次研究检测出全部 23 种亚型,其中高危型 18 种,低危型 5 种。3 754 例 HPV 阳性标本中,高危型感染数为 2 315(61.67%)例,排在前 6 位的分别为 HPV58(10.34%)、HPV16(10.24%)、HPV52(10.09%)、HPV56(6.49%)、HPV33(5.66%)、HPV18(4.56%);低危型感染数为 797(21.23%)例,前 3 位为 HPV6(10.70%)、HPV43(7.31%)、HPV11(4.60%);高低危混合感染数为 642(17.10%),见表 3。

表 3 阳性标本中各主要型别 HPV 的分布

HPV 型别	检出数(n)	检出率(%)
高危型		
58	488	10.34
16	483	10.24
52	476	10.09

续表 3 阳性标本中各主要型别 HPV 的分布

HPV 型别	检出数	检出率(%)
56	306	6.49
33	267	5.66
18	215	4.56
66	187	3.96
68	182	3.86
31	172	3.65
59	148	3.14
53	146	3.09
35	115	2.44
51	114	2.42
其他	194	4.11
低危型		
6	505	10.70
43	345	7.31
11	217	4.60
42	155	3.29
81	3	0.06

3 讨 论

世界范围内,宫颈癌是一种较常见的妇女疾病,女性恶性肿瘤中排第 2 位,发病率高达 187/1 000 000,其中超过 85.00% 的感染者存在于发展中国家^[4-5]。大量的流行病学研究表明 HPV 的持续感染在宫颈癌变中扮演着重要的角色。HPV-DNA 检测呈阳性的妇女患上宫颈癌症风险高于呈阴性的妇女 50 倍^[6]。HPV 感染已成为最常见的性传播疾病之一,调查显示,至少有 50.00% 的人一生中至少感染 1 次生殖器 HPV,美国每年大约有 26 万人在 45 岁之前就感染过 HPV^[4]。HPV 的分布具有地域差异性,各地区感染率相差很大,世界范围内^[7]非洲感染率为 22.10%,中美洲和墨西哥为 20.40%,欧洲 8.19%,我国各地的报道显示^[8-11],北京 57.10%,湖南 44.45%,福建 36.10%。本研究中,HPV 感染率为 30.80%,与其他地区研究有一定差异,这可能是 HPV 分布的地域差异性,也可能不同研究者选择的目标人群和研究方法不同引起的。从各年龄段 HPV 感染情况看,≤25、≥46 岁年龄段显著高于其他年龄段,不同年龄段 HPV 感染率呈现出“U”形曲线,与聂芳妹等^[9]报道相似。

HPV 亚型的分布具有地域差异性,不同亚型的致病能力不同。因此,对 HPV 筛查的分型显得至关重要。本研究中,高危型 HPV 的感染率为 61.67%,低危型感染率为 21.23%,高低危亚型混合感染率为 17.10%,显示重庆地区 HPV 的感染以高危型感染为主。高危型 HPV 感染率排在前 6 位的为 HPV58 (10.34%)、HPV16 (10.24%)、HPV52 (10.09%)、HPV56 (6.49%)、HPV33 (5.66%)、HPV18 (4.56%),低危型感染率前 3 位的为 HPV6 (10.70%)、HPV43 (7.31%)、HPV11 (4.60%),这一结果与本地区的其他报道^[9,12]有一定程度程度的差异,究其原因,可能是 HPV 亚型分布在重庆地区

的一个真实表现,也有可能是研究者所选的研究对象、研究标本数量以及研究方法之间可能存在一定程度的差异引起的。

重庆地区不同年龄 HPV 亚型单重感染和多重感染构成比中,单重感染是 HPV 感染的主要形式,这可能是 HPV 感染的一个特点,与国内报道一致^[9-11]。各年龄段多重感染患者中,以二重感染为主,≤25 岁年龄段的三重和四重感染率显著高于其他年龄段。在 45 岁之前,多重感染率的分布呈下降趋势,46 岁以后多重感染有所回升,这可能与女性青春期和更年期机体内环境变化有关,这 2 个时期机体免疫力和激素水平都有所变化,可能会造成对 HPV 病毒的免疫力下降。提示,在进行 HPV 筛查时,应重视这 2 个年龄段的人群。

参考文献:

- [1] Clifford GM, Smith 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.
- [2] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.
- [3] Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods [J]. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127(8): 940-945.
- [4] Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology[J]. Gynecol Oncol, 2007, 107(2 Suppl 1): S2-5.
- [5] Bosch FX, De Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality [J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003, 31: 3-13.
- [6] Muoz N1, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in Colombia and Spain[J]. Int J Cancer, 1992, 52(5): 743-749.
- [7] De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué 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.
- [8] 杨英捷, 赵健, 李雪倩, 等. 2 285 例女性下生殖道乳头状瘤病毒筛查结果分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006, 22(6): 444-445.
- [9] 聂妹芳, 李登清, 黄民主, 等. 11 461 例妇科门诊患者 HPV 亚型感染状况的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(27): 3434-3438.
- [10] 钟伟明, 黄善忠, 韦干芬. HPV 病毒与宫颈癌的研究进展 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2011, 17(2): 95.
- [11] 杨贇平, 杨双双, 张莉萍. 重庆地区妇女高危型 HPV 感染现状及年龄的分层分布[J]. 重庆医学, 2013, 42(3): 249-250, 254.
- [12] 杨君, 周德平, 陈凤娟, 等. 重庆地区 2 497 例妇科门诊患者 HPV 感染状况分析[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(4): 347-349.