

应用 PCR-RDB 杂交技术检测人类乳头瘤病毒基因型的临床意义

李步荣¹, 寻 萌², 段 钊³, 袁景奕⁴, 张 彤¹, 李丽华¹ (1. 西安交通大学第二附属医院检验科 710004; 2. 西安交通大学医学院病原生物学系 710061; 3. 西安交通大学第二附属医院妇产科 710004; 4. 西安交通大学第二附属医院皮肤性病科 710004)

【摘要】 目的 采用聚合酶链反应(PCR)和反向斑点杂交(RDB)技术检测西安地区人类乳头瘤病毒(HPV)感染流行状态和 HPV 基因型分布特征。**方法** 共收集 266 例脱落细胞标本,其中尖锐湿疣 86 例、宫颈上皮内瘤变 144 例、宫颈癌 36 例,应用 PCR-RDB 杂交技术进行 23 种 HPV 基因型分型检测。**结果** 全部标本 HPV 总阳性率为 71.43%(190/266),宫颈癌 HPV 阳性率明显高于其他疾病,差异有统计学意义($\chi^2=6.297, P<0.05$); HPV 阳性标本基因分型全部成功, HPV16 型为主要感染基因型,其次为 HPV18、6、11 型;单基因型总感染率 91.58%(174/190),多基因型总感染率 8.42%(16/190)。不同疾病单基因型感染和多基因型感染构成比差异无统计学意义($\chi^2=0.3511, P>0.05$)。**结论** HPV16 型是西安地区主要感染基因型,应用 PCR-RDB 技术检测 HPV 基因型对 HPV 感染的防治具有一定临床意义。

【关键词】 人类乳头瘤病毒; 基因分型; 聚合酶链反应; 反向斑点杂交技术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.028 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)24-3684-03

Clinical significance of genotyping detection of human papillomavirus by using PCR-RDB LI Bu-rong¹, XUN Meng², DUAN Zhao³, YUAN Jing-yi⁴, ZHANG Tong¹, LI Li-hua¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China; 2. Department of Pathogenic Biology, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China; 4. Department of Dermatology and Venereal Disease, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China)

【Abstract】 Objective To study the HPV infection situation and its genotype distribution characteristics in Xi'an by using polymerase chain reaction (PCR) and reverse dot blot (RDB) technology. **Methods** 266 samples of exfoliative cells were collected, including 86 cases of condyloma acuminatum, 144 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 36 cases of cervical cancer. 23 kinds of HPV genotyping detection were performed by using PCR-RDB. **Results** The total positive rate of HPV in all of the samples was 71.43%(190/266). The HPV positive cases in cervical cancer was significantly higher than that in the other diseases ($\chi^2=6.297, P<0.05$). Genotyping in the HPV positive samples was successfully conducted. HPV16 was the most predominant genotype, the next genotypes were HPV18, 6 and 11. The overall infection rate of single HPV genotype was 91.58%(174/190), which of multiple HPV genotypes was 8.42%(16/190). There was no statistically significant difference of the constituent ratio between single genotype infection and multiple genotype infection in different diseases ($\chi^2=0.3511, P>0.05$). **Conclusion** HPV16 is the main infection genotype in Xi'an area. Detection of HPV genotypes by using PCR-RDB technology has certain significance to the prevention and treatment of HPV infection.

【Key words】 human papillomavirus; genotyping; PCR; reverse dot blot

人类乳头瘤病毒(HPV)感染主要引起人皮肤和黏膜上皮细胞增生性病变,常见有尖锐湿疣、宫颈上皮内瘤变和宫颈癌等疾病。依据 HPV 致病性不同将其分为高危型(HR)和低风险型(LR)两种。LR-HPV 为尖锐湿疣主要致病因子,以 HPV6 型为主,其次是 HPV11 型。HR-HPV 是宫颈癌的主要发病因素,其中 HPV16、18 型是最为常见的基因型^[1-2]。HPV 基因型流行分布有地区差异性,不同基因型具有不同的病毒生物学特性,易感人群也不尽相同^[3-4]。因此,有必要对 HPV 感染患者进行基因分型,及时掌握西安地区 HPV 感染基因型分布特征,对 HPV 的防治和疫苗研发具有重要意义。聚合酶链反应(PCR)和反向斑点杂交(RDB)技术在病毒基因型检测中具有

特异、敏感和高通量等优点,本研究选用深圳亚能公司生产的可检测 HPV23 种基因型反向杂交试剂盒进行 HPV 基因型检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 1~12 月于西安交通大学第二附属医院皮肤性病门诊及妇科门诊患者送检的脱落细胞标本 266 例,其中男 51 例,年龄 17~76 岁,平均(38.94±14.30)岁;女 215 例,年龄 19~78 岁,平均(44.71±14.72)岁。经病理学确诊,尖锐湿疣 86 例,宫颈上皮内瘤变 144 例,宫颈癌 36 例。

1.2 仪器与试剂 采用 TC-412 型 TECHNE 通用 PCR 仪(英国 Bibby Scientific Limited 公司),YN-H16 型分子杂交仪

(深圳亚能生物技术有限公司生产), TGL-16g 高速低温离心机(上海安亭科学仪器厂); HPV 基因分型检测试剂盒购自亚能生物技术有限公司, 包括 18 种 HR-HPV 基因型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4 等)和 5 种 LR-HPV 基因型(6、11、42、43、44)。

1.3 取材方法 充分暴露病变部位, 常规清洁消毒, 用无菌棉拭子反复用力擦拭病变部位表面获取脱落细胞, 将取样后的棉拭子放入装有 1 mL 生理盐水的无菌管中, 做好标记立即送检。

1.4 PCR-RDB 杂交技术

1.4.1 HPV-DNA 提取 充分洗脱棉拭子上黏附的脱落细胞。加 1 mL 洗脱液于离心管中, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 50 μ L 裂解液充分裂解悬浮沉淀, 100 $^{\circ}$ C 恒温 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 保留上清液待用。

1.4.2 PCR 扩增 取上清液 5 μ L 加入装有 PCR 反应体系的反应管中, 放入扩增仪, 按以下参数进行扩增: 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) \times 40 Cycles; 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.4.3 分子杂交 取 15 mL 塑料离心管, 加入标记膜条, 加入 A 液(0.3 mol/L NaCl, 0.03 mol/L 枸橼酸钠及 0.003 μ mol/L SDS) 5~6 mL 及 PCR 扩增产物 25 μ L, 100 $^{\circ}$ C 恒温水浴 10 min, 51 $^{\circ}$ C 杂交至少 1.5 h。

1.4.4 洗膜 取出膜条, 移至装有预热 B 液(0.075 mol/L NaCl, 0.008 mol/L 枸橼酸钠及 0.003 μ mol/L SDS) 的 50 mL 管中, 于 51 $^{\circ}$ C 轻摇洗涤 5 min。

1.4.5 孵育 取出膜条, 置于孵育液中, 室温轻摇孵育 30 min, 弃去孵育液, 换 A 液重复 2 次, 每次 5 min。用 0.1 mol/L 枸橼酸钠洗膜 1~2 min。

1.4.6 显色和结果判读 新鲜配制显色液。将膜条浸泡于显色液中避光显色 30 min 后, 转移至去离子水, 按试剂说明书观察判断结果, 必要时可借助仪器进行结果阅读。

1.5 统计学处理 用 GraphPad Prism 5.0 进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同疾病中 HPV 检测结果 见表 1。全部 266 例标本中 190 例 HPV 阳性, 阳性率 71.43%。尖锐湿疣 HPV 阳性率 69.77(60/86), 宫颈上皮内瘤变阳性率 68.06%(98/144), 宫颈 HPV 阳性率 88.89%(32/36), 宫颈癌 HPV 感染阳性率明显高于其他疾病; 不同疾病组 HPV 感染率差异有统计学意义($\chi^2 = 6.297, P < 0.05$)。

表 1 不同疾病中 HPV 检测结果[n(%)]

疾病种类	n	HPV 阳性	HPV 阴性
尖锐湿疣	86	60(69.77)	26(30.23)
宫颈上皮内瘤变	144	98(68.06)	46(31.94)
宫颈癌	36	32(88.89)	4(11.11)
合计	266	190(71.43)	76(28.57)

2.2 HPV 基因型分布 见表 2。本研究中 190 例 HPV 阳性标本均分型成功, 有两种和两种以上基因型阳性者为多基因型感染, 对多基因型感染者基因型阳性率进行重复计算。HPV16 型为主要流行基因型, 其中单基因型感染 53 例, 多基

因型感染 13 例。其他基因型依次为 HPV18、6、11 型。HPV51、59、73、83、MM4 型在本研究中无论是单基因型感染还是多基因型感染均未检出。

表 2 HPV 基因型分布

HPV 亚型	单基因型感染	多基因型感染	HPV 亚型	单基因型感染	多基因型感染
16	53	13	59	0	—
18	31	10	66	3	—
31	5	3	68	2	—
33	3	1	73	0	—
35	2	—	83	0	—
39	2	—	MM4	0	—
45	3	1	6	31	5
51	0	—	11	21	4
52	4	1	42	1	—
53	3	—	43	2	—
56	3	1	44	1	—
58	2	—			

注: —表示无数据。

2.3 不同疾病中 HPV 单基因型和多重基因型感染结果 见表 3。在尖锐湿疣中, 单基因型感染 56 例(93.33%), 多基因型感染 4 例(6.67%); 在宫颈上皮内瘤变中, 单基因型感染为 89 例(90.82%), 多基因型感染 9 例(9.18%); 在宫颈癌中, 单基因型感染 29 例(90.63%), 多基因型感染 3 例(9.37%)。单基因型总感染率 91.58%, 多基因型总感染率 8.42%。不同疾病单基因型和多重基因型感染情况比较, 差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.3511, P > 0.05$)。

表 3 不同疾病中 HPV 单基因型和多重基因型感染结果[n(%)]

疾病种类	n	单基因型	多基因型
尖锐湿疣	60	56(93.33)	4(6.67)
宫颈上皮内瘤变	98	89(90.82)	9(9.18)
宫颈癌	32	29(90.63)	3(9.37)
合计	190	174(91.58)	16(8.42)

3 讨 论

HPV 是一种闭合环状双链 DNA 无包膜病毒, 约 8 Kb, HPV 基因组按功能可分为早期区(E 区)、晚期区(L 区)和非编码区(NCR)3 个区域。E 区分为 E1~E7 开放阅读框架, 主要编码与病毒复制、转录、调控和细胞转化有关的蛋白。L 区分 L1 和 L2, 分别编码主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白。L1 基因既保守又具有型特异性, 是 HPV 基因分型目标区域。判定 1 个 HPV 新基因型需具备基因组全序列, 且 E6、L1、上游调控区(URR)基因与已知 HPV 相应基因同源性要小于 90%。迄今发现的 HPV 型别已经超过 100 多种, 随着研究的深入, 新的基因型不断被鉴定发现^[5]。不同基因型与所致疾病特点之间的关系逐步成为目前研究的热点和难点。

HPV 不能在体外培养, 不能通过血清学方法进行分型。PCR-RDB 分子杂交技术是一种微量 DNA 分析技术, 对实验

室和仪器设备要求相对不高,可以在分子诊断实验室广泛开展。本研究所用试剂原理是在尼龙膜上固定了 23 种 HPV 型特异性探针及一个 β 球蛋白作为对照探针,和 PCR 扩增的 DNA 片段按碱基配对原则进行核酸杂交,即可快速、准确区分 HPV 基因型。此方法不仅实现了 HPV 感染的快速检测,同时又可以进行 HPV 基因分型,还可以确定是单基因型感染还是多重基因型感染,极大简化了基因诊断的试验流程^[6]。对于试验未能区分 HPV 基因型的标本,应进行病毒基因测序,通过核酸序列比对最终确定其基因型。本研究全部标本都能成功分型,说明本试剂盒检测范围基本包含了西安地区流行的 HPV 基因型,满足了当前试验要求。

HPV 基因型的分布存在人种和地域差异,不同基因型感染其致病性不同。本研究对象包含了由 HPV 感染所引起的几种常见疾病,通过检测其基因型,基本能够反映西安地区 HPV 基因型的流行趋势和分布状况。本研究结果显示,宫颈癌 HPV 阳性率明显高于尖锐湿疣和宫颈上皮内瘤变,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.297, P < 0.05$)。单基因型总感染率 91.58%,多基因型感染率 8.42%,单基因型感染是主要感染类型。在不同疾病间单基因型感染和多基因型感染构成比差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.3511, P > 0.05$),本研究结果与国内外其他地区比较有一定差异^[7-12]。本研究并未对宫颈上皮内瘤变患者进行疾病分级比较,主要是因为标本量少,分层后研究结果不能全面反映实际情况。本研究发现,无论是高危型还是低危型 HPV,在各种疾病中都有检出,多基因型感染既可以是低危型或者高危型之间的复合感染,也可以是低危型和高危型之间复合感染。HPV16 型为本研究最常见基因型,其次为 HPV18 型,这有可能与所选研究对象中宫颈癌和宫颈上皮内瘤变患者较多有关。在尖锐湿疣中,HPV6 型和 HPV11 型是主要感染基因型,不同疾病 HPV 主要流行基因型存在一定差异。

目前,HPV 感染致病机制尚不完全明确,各种治疗手段不能完全控制和消灭 HPV 的感染和流行。我国地域辽阔、人口基数大,随着经济飞速发展,人员流动增加,HPV 感染基因型分布是一个动态变化状态。不同地区感染 HPV 基因型分布资料还不够全面,仍需通过进行 HPV 基因型检测进一步完善其流行病学资料,为人类最终消灭 HPV 感染提供科学的实验室依据。

参考文献

- [1] Gul S, Murad S, Javed A. Prevalence of high risk human papillomavirus in cervical dysplasia and cancer samples from twin cities in Pakistan[J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 34(11):14-19.
- [2] Larsson GL, Carlsson J, Karlsson MG, et al. Evaluation of

HPV genotyping assays for archival clinical samples[J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3):293-301.

- [3] Ingles DJ, Pierce Campbell CM, Messina JA, et al. Human papillomavirus virus (HPV) genotype-and age-specific analyses of external genital lesions among men in the HPV infection in men (HIM) study[J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(7):1060-1067.
- [4] Eklund C, Forslund O, Wallin KL, et al. Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(2):449-459.
- [5] Rodrigo JP, Heideman DA, Garcia-Pedrero JM, et al. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009) [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(2):487-492.
- [6] 曹友洪. 一种新型基因芯片技术在人乳头瘤病毒(HPV)高通量基因分型检测的应用研究[J]. *生物医学工程进展*, 2013, 34(3):157-164.
- [7] 沈红,程涛,王芳,等. 滇东北地区 4 682 例女性人乳头瘤病毒感染及其亚型分型分布调查[J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(3):23-25.
- [8] Yang L, He Z, Chai X, et al. Prevalence of human papillomavirus and the correlation of HPV infection with cervical disease in Weihai, China[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2015, 36(1):73-77.
- [9] Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortés-Gutiérrez EI, et al. Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: type-specific prevalence and HPV coinfections[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(5):871-884.
- [10] Yousefzadeh A, Mostafavizadeh SM, Jarollahi A, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among women attending regular gynecological visit in Tehran, Iran[J]. *Clin Lab*, 2014, 60(2):267-273.
- [11] Siriaunkgul S, Settakorn J, Sukpan K, et al. HPV detection and genotyping in vulvar squamous cell carcinoma in northern Thailand[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(8):3773-3778.
- [12] Lorenzon L, Terrenato I, Dona MG, et al. Prevalence of HPV infection among clinically healthy Italian males and genotype concordance between stable sexual partners[J]. *J Clin Virol*, 2014, 60(3):264-269.

(收稿日期:2015-04-22 修回日期:2015-07-25)

(上接第 3683 页)

historical cohort evaluation of 18-years' experience with a mesh & plug inguinal hernia repair method on about 3000 patients[J]. *BMC Surg*, 2013, 13(Suppl 2):S19.

- [12] Donati M, Brancato G, Giglio A, et al. Incidence of pain after inguinal hernia repair in the elderly. A retrospective

- [13] 苏曼莉. 腹腔镜下腹壁切口疝修补术的手术配合[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(17):2963.

(收稿日期:2015-05-18 修回日期:2015-07-12)