

兰州地区女性感染 HPV 及其基因类型分析

杨 燕¹ 刘会玲² 虎 镛³ 高飞艳⁴ 杨毓琴^{2△}

(1 兰州大学第一临床医学院 甘肃 兰州 730000; 2 甘肃省人民医院妇产科 甘肃 兰州 730000;

3 甘肃省中医学院 甘肃 兰州 730000; 4 兰州大学病原生物学研究所 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的: 了解兰州地区成年女性感染人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)及其基因类型分布状况, 为本地区 HPV 分子流行病学研究提供理论依据。方法: 利用 PCR 技术分别对 100 例妇科门诊就诊者进行 HPV 基因亚型检测。结果: 100 例样品中, HPV DNA 检出率为 19%(19/100), 其中 HPV16 DNA 感染率 15%(15/100), HPV58 DNA 感染率 3%(3/100), HPV18 DNA 感染率 2%(2/100), HPV 16 与 HPV18 双重感染 1 例。结论: 本地区成年女性 HPV 感染主要以 HPV16 多见, 而 HPV16 与恶性肿瘤密切相关, 因此对 HPV DNA 阳性者定期随访, 有利于宫颈癌的防治。

关键词: 人乳头瘤病毒(HPV); 分型; PCR

中图分类号: Q95-3, R737.33, R392.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)21-4069-03

Study on the Human Papillomavirus (HPV) Infection and Genotypes Distribution Pattern of Women in Lanzhou Area

YANG Yan¹, LIU Hui-ling², HU Zhuo³, GAO Fei-yan⁴, YANG Yu-qing^{2△}

(1 First Clinical Medical College of Lanzhou University, Gansu, Lanzhou 730000; 2 People's Hospital of Gansu Province, Gansu, Lanzhou 730000; 3 Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Gansu, Lanzhou 730000; 4 Institute of Pathogenic Biology of Lanzhou University, Gansu, Lanzhou 730000)

ABSTRACT Objective: This is an epidemiological study on the distribution pattern of HPV genotypes in Lanzhou area. **Methods:** One hundred samples were detected for HPV genotyping by using PCR technique. **Results:** In 100 samples, the positive rate of HPV DNA was 19%. HPV16 DNA was 15 % (15/100). HPV58 DNA was 3%(3/100) and HPV18 DNA was 2 %(2/100). And one case infected both HPV16 and HPV18. **Conclusion:** The most prevalent HPV genotypes in Lanzhou area were HPV 16 which is closely related with the malignancy. Therefore peoples who suffered HPV DNA positive should be regularly followed-up, which is useful for the prevention and treatment of cervical cancer.

Key Words: Human papillomavirus (HPV) ; Genotyping; PCR

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R737.33, R392.7 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)21-4069-03

前言

1937 年由 Shope 在棉尾兔乳头瘤中发现并分离出病毒, 这种病毒可使家兔产生乳头瘤并导致癌症的发生^[1]。1949 年 Strauss 在电镜下第一次发现人乳头瘤病毒。人乳头瘤病毒(human papillomavirus HPV) 是一组形态和基因结构相似的嗜上皮细胞的 DNA 病毒, 主要感染皮肤以及粘膜^[2]。HPV 基因组是双链环状 DNA, 长 7 500~8 000 bp, 含 8 个开放阅读框(Open reading frames, ORFs), 按其功能不同分为 3 个功能区, 即早期区(Early region, E 区)、晚期区(Late region, L 区) 和非编码区(Uncoding region, UCR)。E 区编码 E1、E2、E4、E5、E6、E7 等蛋白, 与病毒 DNA 复制、转录、翻译调控及转化有关, E6、E7 蛋白为细胞发生变异所必需的; L 区编码主要包括衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2, 在病毒复制晚期表达, 形成病毒的外壳, 产生完整的病毒颗粒; 非编码区含有病毒基因复制起

点, 其功能调控 HPV 基因的表达。

目前已鉴定出的 100 多种 HPV 亚型中, 约有 40 多种与生殖道感染有关, 根据其致病力分为高危型和低危型, 高危型 HPV 包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、58 等型别, 高危亚型感染细胞后, 以整合形式存在于人类基因组内, 引起感染细胞基因组的不稳定和 DNA 损伤的积累, 并通过 E6 和 E7 癌蛋白的作用^[3], 与宿主体内的抑癌基因 P53 和 Rb 相结合, 逃逸免疫监视, 导致细胞周期控制失常发生癌变, 多与鳞状上皮恶性肿瘤相关。高危型 HPV 感染可引起多种恶性肿瘤, 如喉癌、消化道肿瘤、膀胱癌、宫颈癌、皮肤癌、骨癌、肉瘤等^[4]。低危型主要包括 HPV6、11、42、43、44 等型别, 多以非整合形式存在于人类基因组, 常引起湿疣等良性病变^[5]。德国病毒学家 Zur Hausen 通过大量的流行病学研究和分子生物学研究, 证实 HPV 感染为宫颈癌癌前病变和宫颈癌发生、发展的必要条件之一^[6,7]。Walboomers 等人报道 90% 以上的宫颈癌及其癌前病变组织中可以检测到 HPV DNA^[8]。本文采用 PCR 技术对本地区 100 例妇科门诊就诊者进行 HPV 基因亚型检测。

1 资料与方法

作者简介: 杨燕(1981-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 妇科肿瘤, 电话: 13919004522, E-mail: yy1900@126.com

△通讯作者: 杨毓琴(1955-), E-mail: yangyuqin3212@sina.com

(收稿日期: 2011-03-09 接受日期: 2011-03-31)

1.1 材料

1.1.1 研究对象及取材 2010 年 4 月~2010 年 9 月甘肃省人民医院门诊就诊者 100 例,年龄在 30-60 岁,用无菌生理盐水棉球擦去宫颈外分泌物,再用无菌棉拭子插入宫颈管内,停 5 秒后旋转棉拭子采集宫颈分泌物后将棉拭子置入无菌玻璃管,-20℃保存待测。

1.1.2 主要材料 Taq DNA Polymerase, dNTP , DNA 提取试剂盒购自 Takara,蛋白酶 K,无 DNase 的 RNase,蛋白酶 K,乙醇,醋酸钾,异丙醇均购自鹏程生物科技有限公司;DNA marker 购自广州东盛生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器设备 东盛龙 PCR 仪 (北京东盛创新生物科技有限公司);ZF-5258 凝胶成像仪 (上海嘉鹏科技有限公司);

H1650-W 台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);S648 电热水浴锅(上海医疗器械七厂);CDZX 高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);Forma-86C 超低温冰箱(Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的提取 在装有宫颈分泌物棉拭子的无菌管中加入 1ml 的生理盐水,充分震荡后转入到离心管中,10000 rpm/min,离心 1 min 后,吸弃上清,然后按照 DNA 提取试剂盒说明提取 DNA。

1.2.2 引物设计及合成 PCR 分型引物采用 HPV 型特异性引物,序列参照文献^[9,10]设计,HPV16、18、33、58 型别引物均由华大基因合成。引物核苷酸序列及产物长度见表 1。

表 1 各高危型 HPV 引物序列及扩增产物的长度
Table 1 High-risk HPV primers sequence and the length of amplification products

HPV 型别(HPV type)	引物序列 (Primer sequence)	扩增产物长度 (The length of amplification products)
HPV16	上游引物 (Sense primer) : GGTCGGTGGACCGGTCGATG	96 碱基对(bp)
	下游引物 (Anti-sense primer) : GCAATGTAGGTGTATCTCCA	
HPV18	上游引物 (Sense primer) : CCTTGGACGTAAATTTTGG	115 碱基对 (bp)
	下游引物 (Anti-sense primer) : CACGCACACGCTTGGCAGGT	
HPV33	上游引物 (Sense primer) : CCACCACTGCTTCTTACCTC	117 碱基对 (bp)
	下游引物 (Anti-sense primer) : ACCATTTTCATCAAATGGGA	
HPV58	上游引物 (Sense primer) : CTGTAACAACGCCATGAGAG	336 碱基对 (bp)
	下游引物 (Anti-sense primer) : TCAGGGTCATCCATTGCAGA	

1.2.3 HPV DNA 的扩增 选用 50 ul 扩增体系,内含 ddH2O34.0 ul , 10× buffer5.0 ul,dNTP 2.5 ul,Sense primer (10uM) 2.5 ul , Anti-sense primer (10uM) 2.5 ul, DNA 模板 2.5 ul,Taq DNA Polymerase 1.0 ul ;PCR 反应条件:94℃预变性 5 min; 94℃变性 45 s, 57℃复性 45 s, 72℃延伸 90 s; 共 35 个循环,最后 72℃延伸 5 min 。

1.2.4 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳 用 1× TAE 缓冲液配制 2.5 % 低熔点琼脂糖凝胶 (含浓度为 0.5 ug/ml 的溴化乙锭),取 PCR 产物 5 ul, 与 1 ul 的 6× loading Buffer 混匀后上样,120 V

电泳 25 min 后,在凝胶成像系统中紫外灯下分析电泳结果。

1.2.5 扩增产物阳性结果判断 根据 marker,被溴化乙锭染色的 DNA 在相应位置上出现荧光即为阳性,出现空带或是涂抹状背景均认为无 DNA 扩增,阴性对照无特异性的条带。

2 结果

2.1 分型核酸电泳

在紫外灯下,参照 marker 可见 HPV16、18、58 在相应位置上有目的条带出现,可见目的片段扩增成功,具体详见图 1-3。

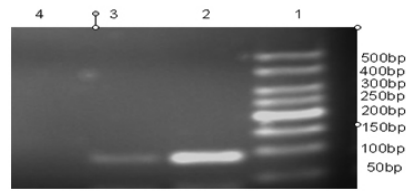


图 1. HPV16 PCR 产物图
Fig.1: HPV16 PCR product diagram
1:marker 2、3: HPV16 阳性标本 4: HPV16 阴性标本
1: marker 2、3: HPV16 positive sample 4: HPV16 negative sample

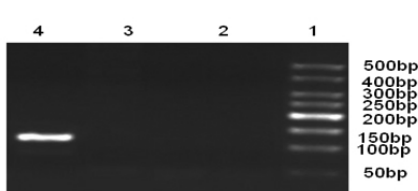


图 2. HPV18 PCR 产物图
Fig.2 : HPV18 PCR product diagram
1:marker 2、3: HPV18 阳性标本 4: HPV18 阴性标本
1: marker 2、3: HPV18 positive sample 4: HPV18 negative sample

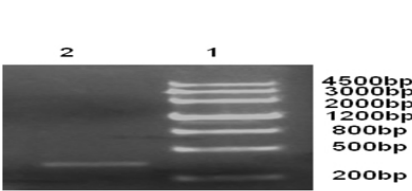


图 3. HPV58 PCR 产物图
Fig.3: HPV58 PCR product diagram
1:marker 2: HPV58 阳性标本
1: marker 2: HPV58 positive sample

2.2 分型结果

在 100 例患者中共检出 19 例 HPV 阳性, HPV DNA 总阳性检出率为 19 %, HPV 感染率由高到低依次为: HPV16 DNA、

HPV58 DNA、HPV18 DNA。其中 HPV 16 与 HPV18 双重感染 1 例。具体结果详见表 2。

表 2 HPV 分型检测结果
Table 2 The results of HPV genotyping

组别(Group)	HPV 感染(HPV infection)	HPV16 阳性(HPV16 infection)	HPV18 阳性 (HPV18 infection)	HPV33 阳性 (HPV 33 infection)	HPV58 阳性 (HPV 58 infection)
人数(Number)	19	15	2	0	3
感染率 (Infection rate)	19 %	15 %	2 %	0 %	3 %

注: 双重感染一例 (HPV16、HPV18)
Note: there was 1case of dual infection (HPV16, HPV18)

3 讨论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤, 发病率居女性恶性肿瘤第二位, 据世界范围统计每年均有 46.6 万宫颈癌新发病例^[1], 其中 80% 的病例在发展中国家。我国宫颈癌患病率和病死率均约占世界三分之一, 是威胁妇女健康和生命的恶性肿瘤之一。高危型人乳头瘤病毒 (HPV) 的持续感染与宫颈癌的发生密不可分, 国内外大量研究表明 HPV16 是 HPV 感染的主要型别, 其与恶性肿瘤关系尤为密切^[12], Tommasino 等人在 HPV16 感染的宫颈癌中, 检测到抑癌蛋白 p53 的含量比正常细胞低 2~3 倍^[13], 这是因为在宫颈癌组织中, 可持续检测到 HPV16 以及 HPV18 的 E6、E7 原癌蛋白, 而 E6、E7 原癌蛋白可分别与抑癌蛋白 p53、Rb 结合, 从而使使其降解, 使细胞完整性受损, 细胞周期调控点失常, 致细胞永生性, 导致癌变。

HPV 在人群中的感染率很高, 并存在明显优势型别和感染地区的差异性, 一般妇女的感染率可从 5%~44% 不等^[14], 且大多数的 HPV 感染是隐性、潜伏、短暂、无症状的感染, 可能是由于不同亚型 HPV 其编码外壳蛋白的基因变异很大, 基本上没有交叉保护抗体, 容易造成不同高危型 HPV 多重感染或多次感染。Lee 等人研究了多重 HPV 感染与宫颈癌的关系, 结果发现单一 HPV 感染使宫颈癌的患病风险增加 19.9 倍, 而多重 HPV 感染使该风险增加到 31.8 倍^[15]。根据全世界 78 个 HPV 流行病相关研究统计, HPV 总感染率为 10.41%, 70% 的新发病例在一年中通过机体免疫消除感染, 大约 90% 的感染会在两年消除^[16], 只有少部分为持续感染, 有文献报道高危亚型 HPV 的持续或反复感染已被确定为宫颈癌发生的最主要原因。发现高危型 HPV 持续感染人群、早期诊断宫颈癌癌前病变及宫颈癌, 并加以有效的治疗是降低宫颈癌发病率及死亡率的有效途径, 因此, HPV 检测就显得至关重要。

目前 HPV 的检测主要依赖于形态学和分子生物技术的检测, 本研究采用 pcr 技术对兰州地区 100 例妇科门诊就诊者进行 HPV 基因亚型检测, 其结果为, 本地区成年女性 HPV DNA 阳性率为 19% (19/100), 其中 HPV16 DNA 阳性率为 15% (15/100), HPV18 DNA 阳性率为 2% (2/100), HPV58 DNA 阳性率 3% (3/100), 表明本地区女性 HPV 感染主要以 HPV 16 型为主, 这也与世界范围内的报道相一致。本研究中仅发现 1 例 HPV16、18 型双重感染, 可能为标本数有限所致, 尚需扩大标本数以便进一步研究。

对成年女性进行 HPV DNA 的基因分型检测, 其结果对临床诊断与判断预后均有重要意义, HPV 的检测已成为筛查和预防宫颈癌的关键问题, 分型检测对宫颈细胞学异常的评估、临床 CIN 筛查, 以及人群 HPV 流行病学研究和 HPV 疫苗的研究

制都有重要价值。

参考文献(References)

[1] Shope R.E. Immunization of rabbits to infectious papillomatosis [J]. J Exp Med, 1937, 65: 607-624

[2] Herrington C.S. Human papillomaviruses and cervical neoplasia I. Classification, virology, pathology, and epidemiology [J]. J Clin Pathol, 1994, 47(12): 1066-1072

[3] Senior K. Cervical cancer research focuses on the HPV E7 gene[J]. Lancet Oncol, 2002, 3(10): 585

[4] Parkin D.M, Bray F, Chapter 2. The burden of HPV-related cancers[J]. Vaccine, 2006, 31(24): Suppl 3:S3/11-25

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

[6] Zur Hausen J. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1977, 78: 1-30

[7] Zur Hausen J. Attempt to detect virus-specific DNA in human tumors I Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus[J]. Int J Cancer, 1974, 13(5): 650-656

[8] Walboomers J.M, Jacobs M, V, Manos M. M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19

[9] Baay M.F, Quint W.G, Koudstaal J, et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(3): 745-747

[10] Chan P.K, Lam C.W, Cheng T. H, et al. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer [J]. Natl Cancer Inst, 2002, 94(16): 1249-1253

[11] Parkin D.M, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 [J]. Int J Cancer, 2001, 94(2): 153-156

[12] Munoz N, Castellsague X, Gonzalez A B, et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer[J]. Vaccine, 2006, 24 Suppl 3: S3/1-10

[13] Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, et al. The role of TP53 in cervical carcinogenesis[J]. Hum Mutat, 2003, 21: 307-312

[14] Trottier H, Franco E.L, et al. The epidemiology of genital human papillomavirus infection[J]. Vaccine, 2006, 24(Suppl 1): s4-s15

[15] Lee S.A, Kang D, Seo S.S, et al. Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNA Chip [J]. Cancer Lett, 2003, 198(2): 187-192

[16] Ho G.Y, 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