

· 实验研究 ·

应用液相基因芯片技术筛查山东地区 高危人群人乳头瘤病毒基因型

刘敏 王传新 邓小梅 王立水 张建 李伟 郑桂喜 王金凤

【摘要】 目的 评价 Luminex XMAP 系统的液相芯片技术在女性生殖道人乳头状瘤病毒 (HPV) 感染检测中的临床价值, 调查山东地区女性生殖道 HPV 感染情况及最常见的基因型。方法 取妇科门诊就诊者宫颈脱落细胞 2925 例, 采用液相芯片技术进行 HPV 基因型检测, 96 孔板操作, 26 种亚型 1 次呈现。639 例患者同时做病理诊断, 按组织病理学分为细胞学正常组、炎症组、宫颈上皮内瘤变 (CIN) I 组、CIN I-II 组、CIN II 组、CIN III 组和宫颈癌组。通过 HPV DNA 亚型分布结合病理诊断, 分析山东地区 HPV 感染基因型与宫颈病变程度的关系。结果 HPV 总感染率 36.0% (1054/2925), 26 种基因型检出 23 种, 按感染率从高到低依次为 HPV-16 (26.75%), HPV-52 (25.75%), HPV-58 (10.47%), HPV-18 (8.87%) 和 HPV-11 (6.94%)。其中高危型感染占 87.32%, 低危型 13.68%; 单一型感染 698 例 (66.22%), 多重感染 356 例 (33.78%), 低危亚型 11, 6 多与高危型多重感染。1054 例 HPV 阳性患者中, 261 例 (24.8%) 为 21~25 岁女性, 随年龄增大阳性例数减少, 52 例 (4.9%) 为 51~67 岁女性。各病理组 HPV 阳性率及多重感染率依次为正常组 23.37%、4.89%, 炎症组 33.08%、7.14%, CIN I 组 54.54%、18.18%, CIN I-II 组 57.14%、28.57%, CIN II 组 82.61%、41.30%, CIN III 组 91.30%、43.37%, 宫颈癌组 100%、38.46%。以组织病理学为确诊标准, 液相芯片 HPV DNA 检测 CIN II、III 和宫颈癌的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值依次为 88.57%、76.63%、68.89% 和 92.16%。结论 所选山东地区高危人群 HPV 感染的常见基因型是 16、52、58、18、11、6、56、31。随宫颈病变程度加重, HPV 感染率及多重感染有增加趋势, HPV 阳性以年轻女性多见。液相芯片 HPV DNA 检测在宫颈病变临床诊断及大规模筛查中有重要价值。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 宫颈癌; 宫颈上皮内瘤变; 基因型

Study on the genotyping of human papillomavirus using a new DNA liquid chip in women of high-risk group of Shandong province LIU Min, WANG Chuan-xin, DENG Xiao-mei, WANG Li-shui, ZHANG Jian, LI Wei, ZHENG Gui-xi, WANG Jin-feng. Department of Clinical Laboratory, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China

Corresponding author: WANG Chuan-xin, Email: wx6601@126.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the diagnostic applicability of human papillomavirus (HPV) liquid chip assay which is based on Luminex XMAP System, and perform a HPV epidemiologic study with the liquid chip in women of Shandong province. **Methods** To detect HPV genotypes on a 96-well plate with the liquid chip which can simultaneously detect and identify 26 common HPV genotypes in a total of 2925 cervical scrapes obtained from gynecological outpatients as well as to analyze the relationship between HPV types and different cervical diseases by studying the distribution of HPV genotypes and pathologic diagnosis. **Results** Among 639 cases who performed pathologic/cytological and histological diagnoses, 184 cases are in group of normal cytology, 266 cases in group of, 77 cases in group of cervical intra-epithelial neoplasia (CIN) I, 7 cases in group of CIN I-II, 46 cases in group of CIN I-II, 46 cases in group of CIN I-II and 13 cases in group of cervical cancer. The overall incidence of HPV in our samples is 36.0% (1054/2925) and 23 types of all 26 types on liquid chip are found. The most common genotypes found are HPV-16 (26.75%), HPV-52 (25.75%), HPV-58 (10.47%), HPV-18 (8.87%) and HPV-11 (6.94%). Among all the positive types, 87.32% are high-risk HPV and 13.68% are low-risk HPV genotypes. Both single and multiple types are easily identified, showing 66.22% ($n=698$) single type and 33.78% ($n=356$) multiple types. Of all

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672010)

作者单位: 250012 济南, 山东大学齐鲁医院检验科

通讯作者: 王传新, Email: wx6601@126.com

the 1054 HPV-positive cases, 261 (24.8%) is occupied by women 21 to 25 years of age and progressively lower by older age groups, reaching 4.9% by women between 51 to 67 years old. The incidence of HPV in our samples is 23.37%, 33.08%, 54.54%, 57.14%, 82.61%, 91.30% and 100% for normal cytology, inflammation, CIN I, CIN I-II, CIN II, CIN III, and carcinomas specimens, respectively. Infections with more than one virus are common, accounted for 4.89%, 7.14%, 18.18%, 28.57%, 41.30%, 43.37% and 38.46% for normal cytology, inflammation, CIN I, CIN I-II, CIN II, CIN III, and carcinomas specimens, respectively. Based on the criteria of histology and pathology, the sensitivity, specificity, positive-predictive value and negative-predictive value of HPV liquid chip assay for detecting all cases of CIN II, III are 88.57%, 76.63%, 68.89% and 92.16% respectively. **Conclusion** The common types of HPV infection are 16, 52, 58, 18, 11, 6, 56 and 31. The HPV-positive rate increased along with the increase of grading on cervical lesions. There are more younger women among all the HPV-positive ones. Multiplex HPV genotyping by liquid chip appears to be highly suitable for diagnostic screening as well as the conduction of large-scale epidemiological studies.

[Key words] Human Papillomavirus; Cervical carcinoma; Cervical intra-epithelial neoplasia; Genotyping

人乳头瘤病毒(HPV)是宫颈癌及其癌前病变发生发展的必要条件^[1],其亚型众多,已知 40 多种感染于人生殖道,依其致病能力不同分为高危型和低危型^[2]。HPV 检测已成为宫颈癌筛查的重要方法之一^[3],基因芯片技术检测与分型同时进行,是目前 HPV 基因型研究的主要技术。HPV DNA 分型液相芯片(亦称为悬浮微阵列),是一种基于 Luminex XMAP 系统的优于固相芯片的新技术,96 孔板操作,1 次呈现 26 种亚型(19 种高危型和 7 种低危型),包含了除国际癌症研究中心(IARC) 2005 年会议结论中明确指出的 13 种高危型外的几乎所有亚洲型。本研究采用 HPV 液相芯片分型技术初步调查山东地区宫颈癌患者及门诊高危人群生殖道 HPV 感染状况及亚型分布,探讨液相芯片技术在 HPV 感染检测中的临床价值。

资料与方法

1. 研究对象:病例来源于 2006 年 1-10 月山东大学齐鲁医院妇科门诊、自愿接受生殖道 HPV 感染筛查的就诊者宫颈脱落细胞 2925 例,年龄 17~67 岁,平均年龄(33.6±8.4)岁。从≤20 岁开始,以 5 岁为一龄段,到≥51 岁,分为 8 个年龄组。639 例患者同时做病理诊断,按组织病理学分为细胞学正常组(184 例)、炎症组(266 例)、宫颈上皮内瘤变(CIN) I 组(77 例)、CIN I-II 组(7 例)、CIN II 组(46 例)、CIN III 组(46 例)、宫颈癌组(13 例)。

2. 标本采集和处理: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,4℃保存待检。

3. 仪器与试剂:宫颈脱落细胞 DNA 抽提试剂盒(QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAGEN);生物素

标记 MY09-MY11 通用引物 PCR、生物素标记 β-globin 引物 PCR、Luminex 悬浮微球杂交探针和荧光标记 SA-PE 均为上海透景生命科技有限公司产品;Master Cycler Gradient PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司);Luminex 100 多功能流式点阵分析仪。

4. HPV 分型检测:①宫颈脱落细胞 HPV DNA 提取;② HPV PCR 扩增;③液体杂交;④ Luminex 100 HPV 分型,读取结果。96 孔板操作,一次性可检测 26 种基因型,包括 19 种高危型(16、18、31、33、35、39、45、52、58、26、51、55、56、59、61、66、68、73、83)和 7 种低危型(6、11、40、42、44、53、54)。操作和结果判读按试剂盒要求进行。

5. 统计学分析:使用 SPSS 13.0 软件,列联表资料分析,以百分率作为 HPV 感染评价指标,各病理组间 HPV 检出率差异用 R×C 的 χ^2 检验,各组间两两比较,统计学显著性为 $P < 0.05$ 。以病理为参照计算液相芯片 HPV 检测的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。

结 果

1. HPV 感染的基因型分布、感染类型及年龄分布:2925 例标本中 HPV 总感染率为 36.0%,不同基因型感染率从高到低依次为:HPV-16 (26.75%), HPV-52 (25.75%), HPV-58 (10.47%), HPV-18 (8.87%), HPV-11 (6.94%), HPV-6 (6.00%), HPV-31 (4.00%), HPV-56 (3.07%), HPV-45 (1.93%), HPV-66 (1.33%), HPV-33 (1.00%), HPV-39 (0.80%), HPV-70 (0.60%), HPV-51 (0.60%), 其他型: HPV-53、68、59、35、61、54、44 (1.87%), HPV-35 和 HPV-61 各 3 例阳性, HPV-44

和HPV-54各2例阳性,HPV-42和HPV-26均只有1例阳性,HPV-40、73、55(3/26)没有发现阳性感染(表1)。其中高危型感染占87.32%,低危型13.68%;单一型感染698例(66.22%),多重感染356例(33.78%)。1054例HPV阳性患者中,261例(24.8%)为21~25岁女性,随年龄增大阳性例数减少,52例(4.9%)为51~67岁女性(表2)。

表1 山东地区高危人群 HPV 基因型分布

型别	HPV 基因型	例数	构成比
高危型	16	401	0.267 512
	52	386	0.257 505
	58	157	0.104 736
	18	133	0.088 726
	31	60	0.040 027
	56	46	0.030 687
	45	29	0.019 346
	66	20	0.013 342
	33	15	0.010 007
	39	12	0.008 005
	70	9	0.006 004
	51	9	0.006 004
	68	5	0.003 336
	59	4	0.002 668
	35	3	0.002 001
	61	3	0.002 001
	26	1	0.000 667
	73	0	0.000 000
	55	0	0.000 000
低危型	11	103	0.069 380
	6	90	0.060 040
	53	7	0.004 670
	54	2	0.001 334
	44	2	0.001 334
	42	1	0.000 667
	40	0	0.000 000
合计		1499	1.000 000

注:698例单一型感染,356例混合型感染,HPV各基因型阳性共计1499次

表2 不同年龄组 HPV 阳性患者在所有 HPV 阳性患者中的构成比

年龄组(岁)	阳性例数	构成比
17~	17	0.016 129
21~	261	0.247 628
26~	226	0.214 421
31~	149	0.141 366
36~	134	0.127 135
41~	101	0.095 825
46~	114	0.108 159
51~67	52	0.049 336
合计	1054	1.000 000

2. 各病理组 HPV 阳性率及多重感染率:依次为正常组23.37%、4.89%,炎症组33.08%、7.14%,CIN I组54.54%、18.18%,CIN I-II组57.14%、28.57%,CIN II组82.61%、41.30%,CIN III组91.30%、43.37%,宫颈癌组100%、38.46%(表3)。HPV感染率随宫颈病变级别升高均呈上升趋势,正常组、炎症组、CIN I、II、III、癌组6组(CIN I-II组样本量太小)两两比较结果:除外正常组与炎症组、CIN II与CIN III、CIN II与癌组以及CIN III与癌组4对的差异无统计学意义外,其余11对两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HPV多重感染率随宫颈病变级别升高亦呈趋势性增加,但仅炎症组与CIN II、CIN III有统计学意义($P < 0.05$)。CIN III组和宫颈癌组55例阳性标本中最常见基因型(多重感染统计在内)为:HPV-16(47.91%)、HPV-52(24.63%)、HPV-18(12.91%)、HPV-58(10.91%)、HPV-31(3.63%),HPV-16、HPV-18所占比例较总样本中明显增大。以组织病理学为确诊标准,液相芯片HPV DNA检测CIN II、III的灵敏度是88.57%,特异度是76.63%,阳性预测值68.89%,阴性预测值92.16%。

表3 各病理组 HPV 单一型、多重感染阳性率及总感染率

分组	感染类型					阳性	阴性	合计
	单一	多重	二型	三型	四型			
正常	34(18.48)	9(4.89)	9(4.89)	0(0)	0(0)	43(23.37)	141(76.63)	184
炎症	68(25.94)	17(7.14)	13(4.89)	4(1.50)	0(0)	85(33.08)	178(66.92)	266
CIN								
I	28(36.36)	14(18.18)	13(16.88)	1(1.30)	0(0)	42(54.54)	35(45.45)	77
I-II	2(28.57)	2(28.57)	2(28.57)	0(0)	0(0)	4(57.14)	3(42.86)	7
II	19(41.30)	19(41.30)	14(30.43)	4(8.70)	1(2.17)	38(82.61)	8(17.39)	46
III	22(47.83)	20(43.37)	15(32.61)	5(10.87)	0(0)	42(91.30)	4(8.70)	46
宫颈癌	8(61.54)	5(38.46)	3(23.07)	2(15.39)	0(0)	13(100.00)	0(0)	13
合计	181(28.32)	88(13.77)	69(10.80)	16(2.50)	1(0.16)	269(42.10)	370(57.90)	639(100.00)

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比(%);HPV感染率随宫颈病变级别升高均呈趋势性增加,除外正常组与炎症组、CIN II与CIN III、CIN II与癌组以及CIN III与宫颈癌组4对差异无统计学意义外,其余11对两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)

讨 论

2005 年 2 月 IARC 明确提出宫颈癌筛查检测 HPV DNA 时必须考虑不同高危亚型间的致癌能力差异。分型与检测并行的基因芯片是目前国内外研究的热点,李瑞珍等^[4]、Maaik 等^[5]、Choi 等^[6]均有报道。基于 Luminex XMAP 系统的液相芯片技术是惟一得到美国 FDA 批准的芯片类技术。

流行病学资料显示 HPV 基因型分布存在明显的地域差异^[7],在某个国家或地区进行 HPV 筛查时首先需要了解该国家或地区的 HPV 基因型分布特点。香港地区 2080 例中国籍妇女 HPV 感染常见类型是 HPV-16、58、11、33、18、6 和 53 型^[8]。Huang 等^[9]发现台湾地区阳性率最高的 5 个基因型为 HPV-52 (15.1%)、HPV-58 (9.5%)、HPV-16 (8.5%)、HPV-18 (5.5%) 和 HPV-33 (5.5%)。Huang 等^[10]报道,HPV-52、58 在上海地区宫颈癌患者中的阳性率(47.5%)高于 HPV-16、18(37.5%)。北京地区感染型别依次为 HPV-16、58、52、53、33、6、11、31 和 18 型^[11]。我们发现山东地区高危人群最常见的基因型为 HPV-16、52、58、18、11、6、31 和 56, HPV-6、11 多见于多重感染。结果与国内外报道不尽相同,又一次证实 HPV 型特异性感染率因人群、社会经济、文化、地域等不同而改变^[12]。

年龄是宫颈癌和 HPV 感染的相关因素,法国、加拿大均有报道年轻性活跃妇女 HPV 感染率最高,其流行状态随年龄增加逐渐降低^[13,14]。北京地区筛查的人群感染高峰年龄在 30~34 岁(11.25%)^[12],考虑到研究对象为门诊高危人群,本研究未进行不同年龄组感染率比较,仅就构成比发现,所有 HPV 阳性人群中 21~25 岁女性所占比例最大,随年龄增大阳性例数减少,年轻女性感染多于年老女性,与国内外报道一致。

通过两两比较不同病理组 HPV 感染率,我们发现随宫颈病变级别升高 HPV 感染率呈上升趋势,其中 11 对感染率比较差异均有统计学意义,与国内外研究结果一致^[4,9]。HPV 多重感染率随宫颈病变级别升高亦呈趋势性增加,但仅炎症组与 CIN II、CIN III 差异有统计学意义,可能与样本量不足有关。以组织病理学为确诊标准,液相芯片 HPV DNA 检测方法的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值均符合临床要求。

HPV 感染早于细胞学异常,对 HPV 感染的早期检测和分型是处理宫颈病变的重要依据。我国地域宽广,人口众多,HPV 亚型分布复杂,明确一个地区 HPV 流行的主要型别,对预测病变进展,评估预后,治疗后的随访,HPV 流行状况的分析以及基因疫苗的研制都有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Ho GYF, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87: 1365-1371.
- [2] zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122: 3-13.
- [3] Chao A, Lin CT, Hsueh S, et al. Usefulness of human papillomavirus testing in the follow-up of patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190: 1046-1051.
- [4] 李瑞珍, 石菊芳, 周庆芝, 等. 应用基因芯片技术检测高危型人乳头瘤病毒在宫颈癌筛查中的评价. *中华医学杂志*, 2006, 86(5): 307-311.
- [5] Maaik APC van Ham, Judith MJE Bakkers, Gonneke KH, et al. Comparison of two commercial assays for detection of human papillomavirus (HPV) in cervical scrape specimens: validation of the roche amplicor HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with a higher risk of cervical disorders. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(6): 2662-2667.
- [6] Choi YD, Jung WW, Nama JH, et al. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing, 2005, 98(3): 369-375.
- [7] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 2003, 88: 63-73.
- [8] Chan PK, Chang AR, Cheung JL, et al. Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high and low oncogenic risk types. *J Infect Dis*, 2002, 185(1): 28-35.
- [9] Huang SL, Angel Chao, Swei Hsueh, et al. Comparison between the hybrid capture II test and an SPF1/GP6+ PCR-based assay for detection of human papillomavirus DNA in cervical swab samples. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(5): 1733-1739.
- [10] Huang SL, Afonina I, Miller BA, et al. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancer from Chinese women. *Int J Cancer*, 1997, 73: 775-776.
- [11] 杨英捷, 赵健, 李雪倩, 等. 2285 例女性下生殖道人乳头状瘤病毒感染筛查结果分析. *中国实用妇科与产科杂志*, 2006, 22(6): 444-445.
- [12] Rosa L, Alastair G, Jane W, et al. Lifetime effects, costs, and cost effectiveness of testing for human papillomavirus to manage low grade cytological abnormalities: results of the NHS pilot studies. *BMJ*, 2006, 332(7533): 79-85.
- [13] John WS, James BM, Janusz K, et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. *CMAJ*, 2000, 163(5): 503-508.
- [14] Beby DA, Bourgoin A, Ragot S, et al. Human papillomavirus infection of the cervix uteri in women attending a health examination center of the French Social Security. *J Med Virol*, 2004, 73(2): 262-268.

(收稿日期: 2007-01-12)

(本文编辑: 张林东)