

## 尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒感染 3 年分析

浦洁<sup>1</sup>, 杨挺<sup>1</sup>, 张滨<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属无锡市人民医院皮肤科, <sup>2</sup>中心实验室, 江苏 无锡 214023)

**[摘要]** 目的:对本院 2010~2012 年尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒(HPV)感染现状进行分析,探讨 HPV 亚型的分布特点。方法:采用基因芯片检测法,对尖锐湿疣的皮损组织进行 HPV 检测和分型。结果:773 例标本检出率为 95.1%,依次为低危型 HPV6、11、43、42 和高危型 HPV16、18、52、66、33。各年度 HPV 亚型分布变化不大。高危型占 24.0%,混合感染占 37.8%。30 岁以内的患者发生高危型、混合感染显著增加。女性患者发生高危型 HPV16、66 高于男性。结论:HPV6、11、16 型感染是尖锐湿疣发病的主要基因型,高危型感染和混合感染趋于年轻化。

**[关键词]** 尖锐湿疣;人乳头瘤病毒;基因型;基因芯片

**[中图分类号]** R752.53

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2013)09-1305-03

doi:10.7655/NYDXBNS20130931

尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)是由人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染引起的一种会阴、生殖器和肛门部位上皮乳头瘤样增生为表现的性传播疾病。全世界 HPV 感染已十分普遍,并且其发病率逐年上升。由于 HPV 的致病性与其型别密切相关,且 HPV 感染型别存在地域差异,因此对 HPV 的分型检测及评价具有临床意义<sup>[1]</sup>。现对南京医科大学附属无锡市人民医院 2010~2012 年皮肤科 CA 患者进行基因检测的结果总结如下。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

选取临床诊断、病理确诊为会阴、外生殖器和肛门部位 CA 的患者共 771 例为研究对象。

HPV 基因分型检测试剂盒(亚能生物技术有限公司,深圳),该试剂盒能同时分型检出 18 种高危型(HPV-16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73,83,MM4)和 5 种低危型(HPV-6,11,42,43,44);Mastercycler ep gradient 银制梯度 PCR 扩增仪与高速低温离心机(Eppendorf 公司,德国);FYY-3 型分子杂交仪(兴化市分析仪器厂);XL-2000 SERIES 超声粉碎仪(美国)。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 HPV 基因分型检测

采集 CA 组织样本放置于 1.5 ml 离心管并立即送检,或放置-30℃冰箱保存待检。采用 PCR 体外扩增和 DNA 反向点杂交相结合的 DNA 芯片技

术进行检测:利用 HPV 的基因特点设计特异引物,可以扩增出包含 23 种 HPV 基因型的目标片段,再将扩增产物与固定在膜条上的分型探针进行杂交,依据杂交信号的有无来判断是否有各种 HPV 的存在。

##### 1.2.2 DNA 的提取及 PCR 扩增

将样本从冰箱取出,解冻,在 1.5 ml 离心管中加入 1 ml 生理盐水,用超声粉碎仪探头持续低功率条件下,超声粉碎组织块,将组织粉碎呈细胞悬液,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 50 μl DNA 裂解液,混匀,100℃沸水浴加热 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,取待测样本 DNA 5 μl 加入 PCR 反应管中,进行 PCR DNA 扩增。PCR 反应条件为:50℃ 15 min,95℃ 10 min,然后进行 40 个循环的 94℃ 30 s、42℃ 90 s、72℃ 30 s;最后 72℃ 延伸 5 min。每次同时设定一个阴性对照(纯水)和一个阳性对照。

##### 1.2.3 杂交、洗膜、显色

取 15 ml 塑料离心管,放入标有样本编号的膜条,加入 A 液 5 ml 及所有(25 μl)的 PCR 产物,稍拧紧。将离心管放入沸水浴加热 10 min,取出并拧紧管盖,放入杂交箱 51℃ 杂交至少 1.5 h。另取 50 ml 塑料离心管,加入 500 ml B 液,于杂交箱预热至 51℃。取出膜条,移至装有预热 B 液的 50 ml 离心管中,于 51℃ 轻摇洗涤 5 min。按 A 液:POD = 2 000:1 配制孵育液,室温轻摇孵育膜条 30 min,弃去孵育液。用 A 液室温轻摇洗两次,每次 5 min。用 C 液室温洗膜 2 min,同时配制显色液。将膜条浸泡于显色液避

光显色至少 30 min 后,转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计处理,定量资料两样本均数比较采用 *t* 检验,率的比较采用  $\chi^2$  检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CA 患者 HPV 检出率及基因型分布

2010~2012 年分别有患者 176、354、241 例,总 771 例,HPV 阳性者共 733 例,阳性率为 95.1%。在 733 例阳性患者中,平均年龄:(33.26 ± 12.34)岁,最小 1 岁,最大 87 岁,18 岁以内有 20 例,占 2.7%,其中 10 岁以内儿童 12 例。20~40 岁 531 例,占

72.44%。男 409 例(55.8%),女 324 例(44.2%),男性患病年龄(35.63 ± 12.55)岁明显大于女性(30.27 ± 11.40)岁( $t = 5.971, P < 0.001$ )。各年度年龄、性别均无显著差异。

733 例中,低危型 557 例,高危型(包括高低危混合)176 例,占 24.0%。由表 1 可见共检出了 20 种 HPV 亚型,HPV39、44、MM4 未检测出。由于例数限制,仅对符合卡方检验的高、低危排名前 4 的 HPV 亚型进行分析。各年度 HPV 亚型检出率变化不大,仅 HPV6、43、52 波动有显著差异,但无明显上升或下降趋势;30 岁以内的患者 HPV11、16、52、66 型更多见,30 岁以上的患者 HPV6 型更常见;女性患者 HPV16、66 型比男性多见,以上比较差异均具有统计意义。

表 1 HPV 阳性患者各种亚型检出情况

[n(%)]

分型	总数(%) (n=733)	年份			年龄		性别	
		2010 年 (n=176)	2011 年 (n=354)	2012 年 (n=241)	≤30 岁 (n=370)	>30 岁 (n= 363)	男性 (n=409)	女性 (n=324)
低危型								
6	439(59.9)	87	217	135*	206	233*	242	197
11	395(53.9)	93	178	124	214	181*	226	169
43	36(4.9)	7	11	18*	20	16	18	18
42	17(2.3)	2	11	4	12	5	9	8
高危型								
16	73(10)	20	31	22	49	24*	29	44*
18	23(3.1)	7	10	6	12	11	9	14
52	21(2.9)	4	4	13*	16	5*	9	12
66	18(2.5)	7	4	7	14	4*	5	13*
33	15(2.0)	2	4	9	11	4	9	6
58	13(1.8)	2	6	5	11	2	4	9
56	12(1.6)	5	5	2	10	2	5	7
59	11(1.5)	1	6	4	7	4	7	4
其他	32(4.4)	4	18	10	16	16	16	16

其他高危型包括:31、35、45、51、53、68、73、83。\* $P < 0.05$ 。

### 2.2 HPV 混合感染状况分析

733 例中,277 例为混合感染,占 37.8%,其中二重感染 201 例(27.4%),三重感染 61 人(8.3%),四重感染 12 例,五重感染 2 例,六重感染 1 例。双重感染以 HPV6/11 (94 例,12.8%),HPV11/16 (19 例,2.6%)、HPV6/43(13 例,1.8%)、HPV6/16 (9 例,1.2%)最常见,三重感染以 HPV6/11/16(11 例,1.5%)、HPV6/11/43 与 HPV6/11/18(各 4 例,0.5%)最常见。由表 2 可见,30 岁以内的患者发生混合感染明显超过 30 岁以上的患者。女性发生混合感染多于男性但无显著差异。单一感染几乎都是低危型,而混合感染则以高危型为主,二者具有显著差异。

## 3 讨论

作为宫颈癌首要发病因素,HPV (尤其是 HPV16)已经引起了人们的高度重视,研究证明,女性外阴 HPV 感染与女性宫颈 HPV 感染密切相关<sup>[2]</sup>,二者可互为因果。有报道指出,绝大部分 CA 病例外阴皮损和宫颈的 HPV 型别具有高度一致性,近 1/4 患

表 2 HPV 单一感染与混合感染的分布情况 (n)

	单一感染	混合感染	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
≤30 岁/>30 岁	207/249	163/114	12.471	0.000
男性/女性	267/189	142/135	3.712	0.054
低危/高危	438/18	119/158	266.222	0.000

者合并宫颈高危型 HPV 感染<sup>[3]</sup>。另据报道,女性 CA 患者宫颈中存在 HPV 病毒感染的潜在病灶可能是导致 CA 复发的原因之一<sup>[4]</sup>。因此,识别和监测 CA 患者 HPV 感染的分布规律,对预防宫颈癌的发生具有重要的流行病学价值。在全世界范围内,由于地理位置及种族不同,感染 HPV 基因类型会有差异,但 HPV6 和 11 仍是导致 CA 的主要型别,占感染的 90%以上<sup>[5]</sup>。此次 733 例患者中,HPV6、11 也是检出最多的,检出率分别达 59.9%、53.9%。外阴 CA 的病原体以低危型 HPV 占绝对优势,一般认为高危型 HPV 阳性率多低于 10%<sup>[6]</sup>,而本研究高危型占 24.0%,与国内报道(25.8%)类似,属于较高水平<sup>[3]</sup>。在低危型中,HPV16 检出率最高(10%),HPV18 次之(3.1%),31、35、45、51、53、68、73、83 型偶尔可见,39、44、MM4 型未检出。近几年不断有新的 HPV 基因型在 CA 中发现,2005 年国内首次发现 cp6108 可致 CA<sup>[7]</sup>,甚至导致屠夫疣的 HPV7 也可产生尖锐湿疣样皮损<sup>[8]</sup>。经统计发现 30 岁以内高危型 HPV 似乎更常见,具有统计意义者有 16、52、66 型,30 岁以上的患者低危型 HPV6 更常见,但 HPV11 例外;女性患者高危型 HPV16、66 型较男性显著增加。由此可见,30 岁以内的年轻女性 CA 更易发生高危 HPV 感染,这在临床上是不容忽视的。

与单一的 HPV 感染相比,混合感染增加了宫颈病变的发生率。高危 HPV 同时感染可加快宫颈上皮内瘤变及癌症的发展。经统计发现,此次混合感染占 37.8%,二重感染从高到低依次为 HPV6/11, HPV11/16, HPV6/43, HPV6/16, 三重感染依次为 HPV6/11/16, HPV6/11/43, HPV6/11/18, 与既往报道有所不同<sup>[9]</sup>,在所有混合感染中 16/18 的组合偶见。分析混合感染的特点,30 岁以内人群发生混合感染明显高于 30 岁以上人群,女性高于男性(尚无统计学意义),而且,混合感染显著增加了高危型 HPV 阳性率,与国内某报道 CA 患者低危型中单一感染占 94.4%,高危型中混合感染占 86%情况类似<sup>[3]</sup>。因此,30 岁以内的年轻人,尤其是年轻女性的 CA,临床上需格外受到重视并且应长期随访。

从纵向看,国内曾有报道在 HPV 感染普查中发现 3 年内 HPV16 和 HPV18 感染率呈现逐年增高的趋势<sup>[10]</sup>,而本次研究除了 3 年中患病人数及部分 HPV 亚型有所波动外,高危型分布变化不大,因此还需要更长的观察期来监测 HPV 的动态变化。值得一提的是,此次共检出了 20 例 18 岁以内未成年人 CA(占 2.7%),其中女性 14 例,占 70.0%,远远超过

成年女性,高危型 HPV 占 25.0%,与总体水平(24.0%)相当,这些小患者的传染途径如何,今后其发生宫颈癌的概率是否高于其他人群,有待于进行长期随访并值得社会关注。

此次研究表明,虽然 3 年来 CA 患者的 HPV 基因型分布变化不大,但高危型 HPV 的比例处于较高水平,尤其是 30 岁以内的年轻人高危 HPV 亚型多,混合感染多,女性高危型 HPV 更为常见,这对实施治疗方案、疗效追踪、复发监测和宫颈癌的防治都具有重要的临床意义。

#### [参考文献]

- [1] Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, et al. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(5): 1157-1164
- [2] Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(11): 1459-1466
- [3] 王秀丽, 王宏伟, 杨连娟, 等. 上海地区女性外阴尖锐湿疣患者宫颈 HPV 感染及分型研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2010, 42(11): 739-741
- [4] 栾红, 姜丽亚, 孟宪敏. 女性尖锐湿疣患者宫颈亚临床感染与复发关系的研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2011, 44(5): 356-357
- [5] Hsueh PR. Human papillomavirus, genital warts, and vaccines [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2009, 42(2): 101-106
- [6] Croon P, Sonnex C. Frequently asked questions about genital warts in the genitourinary medicine clinic: an update and review of recent literature [J]. *Sex Transm Infect*, 2008, 84(1): 3-7
- [7] 蒋萌军, 王书崎, 龚向东, 等. 尖锐湿疣皮损中人乳头瘤病毒基因分型研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38(5): 262-264
- [8] Matsukura T, Mitsuishi T, Sugase M, et al. Human papillomavirus type 7-associated condyloma [J]. *Dermatology*, 2010, 221(1): 5-8
- [9] Zhang J, Yan X, Sun J, et al. A high throughput assay for human papillomavirus genotypes with fluorescence polarization [J]. *Chin Med J*, 2003, 116(8): 1137-1140
- [10] 刘俊峰, 冯素花, 陈传华, 等. 2006 至 2008 年英德市 HPV 16、18 型病毒感染现状分析 [J]. *国际医药卫生导报*, 2009, 15(22): 8-10