

- 脏微血管内皮细胞 eNOS 脱偶联的影响[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(1): 82-87
- 8 Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C - dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells[J]. Diabetes, 2000(49): 1939-1945
- 9 丁丽, 张锦, 张绍维, 等. 胰高血糖素样肽 1(9-36) 对人脐静脉内皮细胞内皮型一氧化氮合酶的影响[J]. 中华医学杂志, 2012, 92

(42): 3003-3011

- 10 Srivastava AK. High glucose - induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes[J]. Int J Mol Med, 2002(9): 85-89

(收稿日期: 2014-06-24)

(修回日期: 2014-07-09)

昆明地区 571 例门诊患者 HPV 感染情况分析

陈俊英 潘 玥 龙海亭 岳耀斐 杨丽娟 孙强明

摘 要 **目的** 探讨昆明地区女性宫颈感染人乳头瘤病毒(human Papillomavirus, HPV)的基因型分布和感染率情况。为预防 HPV 感染和宫颈癌防治提供依据。**方法** 以 MY09/ MY11 为外引物, GP5⁺/ GP6⁺ 为内引物, 通过巢式 PCR(nPCR) 检测妇科门诊样本 571 例, 并将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将在 150bp 处有条带的样本送测序, 测序结果通过 NCBI 网站 blast 功能开展核酸比对, 并进行基因分型。**结果** 535 例门诊患者中阳性病例 111 例, 阳性率 20.75%, 其中高危型 77 例, 占总阳性率 69.37%, 低危型 34 例, 占总阳性率 30.63%。**结论** 昆明地区女性宫颈感染 HPV 最常见的亚型依次为 16、58、33、35、18 和 31。低危型最常见的亚型依次为 6、81、11、91。高危型为常见类型, 占总阳性率的 69.37%, 16 型和 58 型为主要高危感染亚型, 6 型为主要低危感染亚型。

关键词 宫颈癌 人乳头状瘤病毒 基因型

中图分类号 R183

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.023

Investigation of Genotype and Infection Rate of Human Papillomavirus in Kunming City. Chen Junying, Pan Yue, Long Haiting, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To investigate the genotype and infection rate of human Papillomavirus (HPV) in Kunming city, and provide theoretical basis for preventing and treating uterine cervical cancer. **Methods** Using MY09/ MY11 as outer primer, GP5⁺/GP6⁺ as inner primer, 571 gynecological outpatient samples were detected by nested PCR (nPCR), PCR products were detected through agarose gel electrophoresis followed by nucleotide sequencing. **Results** A total of 111 of 535 outpatient's samples were HPV positive, with the positive rate of 20.75%. Among 111 positive samples, 77 cases were high risk type (69.37% of the total positive rate), 34 cases were low risk type (30.63% of the total positive rate). The most common HPV subtype in the cervical infected population in Kunming area were subtype 16, 58, 33, 35, 18 and 31 in turn. The most common subtypes of low risk were subtype 6, 81, 11, 91 in turn. **Conclusion** Type 16 and type 58 were the main high risk subtypes, and type 6 was the main low risk subtype in Kunming city. High risk type was the common type among the total positive samples.

Key words Cervical cancer; Human papillomavirus (HPV); Genotype

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一组在人类广泛传播的疾病。已有 120 多个亚型被确

定, 其中约有 40 种涉及生殖道感染, 约有 20 余种与肿瘤有关。HPV 感染可引起头颈癌、乳腺癌、肛门癌、阴茎癌、外阴癌和宫颈癌, 尤其是宫颈癌^[1-4]。在世界范围内宫颈癌的发生率为女性恶性肿瘤发生率的第 2 位, 每年我国宫颈癌的新发病例 > 30 万, 占全球的 1/4 ~ 1/3, 且发病年龄趋于年轻化。人们根据其致癌性把 HPV 分为高危型和低危型, 高危型 HPV 主要有 16、18、58、45、31、33、39、51、52、56、59、68 型; 低危型 HPV 主要有 6、11、42、43、44 型^[5,6]。高危型

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81171946); 云南省自然科学基金资助项目(2009ZC187M, 2012FB188); 云南省科技厅社会发展科技计划项目(2011CA016)

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所、云南省重大传染病疫苗研发重点实验室

通讯作者: 孙强明, 研究员, 博士生导师, 电子信箱: msun08@ yahoo.com

HPV 与宫颈癌关系密切,低危型 HPV 常在湿疣患者中发现。在不同国家、地区 HPV 感染率及其型别分布存在统计学差异。通过对昆明地区女性子宫颈感染人乳头瘤病毒(HPV)的基因型分布和感染率情况的调查,有助于为笔者所在地区宫颈病变的防治提供重要依据。本研究通过建立巢式 PCR 检测人乳头状瘤病毒的方法,对 571 例门诊患者进行 HPV DNA 检测,并进行基因分型,旨在了解昆明地区妇女 HPV 感染率及基因型分布情况,为研究 HPV 流行病学和预防 HPV 感染提供数据和依据,提高人群对宫颈癌预防知识的知晓率,也为宫颈癌疫苗的研发提供数据^[7]。

材料与方法

1. 研究对象:收集昆明医学院第一附属医院妇产科门诊自愿进行 HPV 检测的患者 571 例,年龄分布在 20~75 岁,无长期外地居住史。

2. 标本采集及保存方法:由医生以窥阴器暴露宫颈,用宫颈刷置于宫颈口,轻轻搓动宫颈刷 2~3 圈,取得宫颈脱落细胞。将采集标本放在盛有细胞保存液的收集瓶中。保存于 4℃ 医用冰箱内,于 1 周内进行检测。

3. 主要试剂及仪器:蛋白酶 K 裂解液(美国 Sigma 公司);Tris-HCl 缓冲液(pH 8.1);PCR 扩增试剂 2×power tap PCR Master Mix(大连 TaKaRa 公司);PCR 扩增仪,2720 型 PCR 扩增仪(ABI 美国公司);核酸水平电泳系统(美国 Bio-rad 公司)。

4. 病毒 DNA 的提取:根据美国国家癌症研究所(NCI)的标准操作程序来提取细胞样本中的病毒 DNA。其操作过程简述如下:将细胞悬液于 13000r/min 离心 5min,然后分别用去离子水和 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.1)进行漂洗数次。然后在 50℃ 条件下将细胞用蛋白酶 K 裂解液消化过夜,随后 95℃ 变性 10min,大于 12000r/min 离心,保留上清弃沉淀,上清液即可用于下一步检测。所提取的 DNA 样品需通过 PCR 扩增 β-globin(内参照)验证质量,引物序列见表 1。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5min,4℃ 冷却 1min,随后进入 PCR 循环(95℃ 变性 45s→50℃ 退火 45s→72℃ 延伸 1min,共 35 个循环,72℃ 再延伸 10min,中止反应)。

表 1 HPV 型别鉴定及 DNA 质量鉴定引物($\bar{x} \pm s$)

靶基因	引物名称	正向引物/反向引物(5'→3')	扩增片段长度(bp)	退火温度(℃)
HPV L1	MY09/MY11	cgctcaaaaggaaactgagc gcacaggggacataacaatgg	450	54
HPV L1	GP5 ⁺ /GP6 ⁺	ttgttactgtggtagatactac gaaaataaaactgtaaatcatatc	150	52
β-globin	β-globin	acacaactgtgttcactage caacttcactccagcttacc	110	51

MY09/MY11 为型别鉴定巢式 PCR 第 1 步引物,GP5⁺/GP6⁺为型别鉴定巢式 PCR 第 2 步引物,β-globin 为提取 DNA 质量鉴定引物

5. HPV 基因分型:用于 HPV 分型的 HPV L1 高变区 150bp 相应基因的扩增采用巢式 PCR,第 1 次 PCR 扩增采用 MY09/MY11 引物(表 1),扩增片段为 450bp 的 HPV L1 区基因片段,反应条件与 β-globin 基因扩增条件相同。第 2 次 PCR 扩增采用 GP5⁺/GP6⁺(表 1),预期获得 150bp 的 HPV L1 区基因片段,PCR 扩增反应条件同上。PCR 反应结束后,取扩增产物 5μl 到上样孔,经 2% 琼脂糖电泳后,根据 Marker 位置对扩增片段进行确认,并选出阳性样本送北京三博生物技术有限公司进行纯化和序列测定。

6. 数据分析:通过测序获得的基因序列通过美国生物技术信息中心(NCBI)进行序列比对分析 HPV-DNA 亚型(BLAST)(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)。计算获得 HPV 感染率、亚型分布和年龄分布情况。

结 果

1. 所提 DNA 质量鉴定:所提 DNA 经 β-globin 引物扩增验证 DNA 质量,经 2% 琼脂糖凝胶电泳,在 110bp 处有明显特异性条带的表面所提 DNA 质量良好,在相应位置没出现特异条带的样品则表明其质量不好,或者提取失败(图 1)。

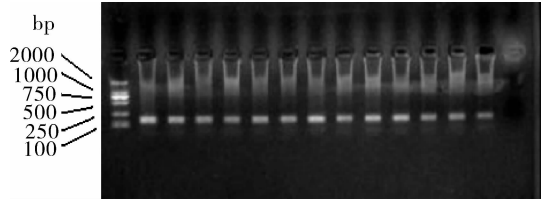


图 1 所提 DNA 经 β-globin 引物扩增进行质量验证的结果(部分)

2. HPV 病毒感染检测结果:使用巢式 PCR 对所有质量良好的样品进行 PCR 扩增,扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定。以引物 MY09/MY11 扩增获得的巢式 PCR 第 1 步反应的目的条带大小为 450bp,扩增样品经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定后,由于目的条带的拷贝数较低,所以 450bp 的特异条带较难分辨(图 2)。经过两步巢式 PCR 和 2% 琼脂糖凝胶电泳后,出现清晰的 150bp 条带的样品即为阳性样品(图 3)。将出现特异扩增条带的样品拿去测序,获得测序结果后经生物学在线软件 blast 对所测序列进行 HPV 比对分型。在 571 例妇科门诊样本中 HPV 阳性者 111 人,检出率为 19.44%,其中高危亚(HPV16、18、31、33、35、58 型)检出 77 例,约占感染者的 69.37%,低危亚型(HPV6、11、81、91 型)34 例,约占感染者的 30.63%。

3. HPV 亚型分布:111 例女性 HPV 感染者各亚型分布中以与宫颈癌相关的高危亚型 HPV16 型最

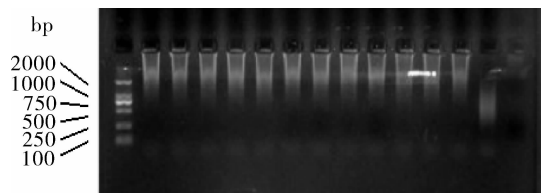


图2 以引物 MY09/MY11 扩增获得的巢式 PCR
第1步反应样品的2%琼脂糖凝胶电泳结果

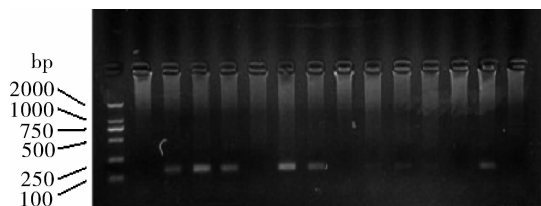


图3 以引物 GP5/GP6 扩增获得的巢式 PCR
第2步反应样品的2%琼脂糖凝胶电泳结果

多,共29例,占感染者26.13%;其次为HPV58型,共22例,占感染者的19.82%;再其次是33型,共14例,占感染者的12.61%,其他35型7例(6.31%),18型3例(2.70%),31型2例(1.80%)。低危亚型分布以6型最多见,共19例,占感染者17.12%;其次是81型和11型,81型8个,11型6个分别占感染者7.21%和5.41%,91型最少仅1例,占0.9%。

4. HPV感染人群的年龄分布:111例HPV感染患者的年龄分布情况见表2,感染率最高的年龄段为30~39岁。

表2 111例HPV感染患者的年龄分布情况($\bar{x} \pm s$)

年龄(岁)	检测例数	阳性数	阳性率(%)
<20	2	0	0
20~29	70	18	25.71
30~39	216	44	20.37
40~49	160	31	19.38
50~59	77	14	18.18
≥60	35	4	11.43
年龄不详	13	0	0

讨 论

大量分子流行病学研究证明,人乳头状瘤病毒(HPV)感染呈上升趋势,高危型HPV是人类绝大部分子宫颈癌的重要启动因子,而且近年来的研究更发现,高危型HPV还可能与人类其他癌症有关,如喉癌、食管癌、口腔癌、鼻窦癌、膀胱癌、肺癌等。宫颈癌发生的最主要原因为高危型HPV持续性或反复性感染。研究证实HPV病毒感染情况的大规模筛查对于

宫颈癌的早期预防和治疗具有重要的意义^[8-10]。

HPV感染的诊断依赖于临床标本中HPV的检测,本研究显示在昆明地区571例妇科门诊样本中HPV阳性者111人,检出率为19.44%。其中高危亚型检出77例,约占感染者的69.37%,低危亚型34例,约占感染者的30.63%。高危型感染占总体病例数的69.37%,可见高危型感染问题的严重性。

本研究亚型分析结果显示与宫颈癌相关的高危亚型HPV16型最多,共29例,占感染者26.13%,其次为HPV58型,共22例,占感染者的19.82%,再其次是HPV33型,共14例,占感染者的12.61%。HPV16型在世界范围内都是最为流行的型别,HPV16型的感染也与宫颈癌的发生和发展相关性最高^[11-13]。但是本研究显示在昆明市HPV58型的流行程度也比较高,仅次于HPV16型。从目前多个国家的研究数据来看,HPV58在不同国家和地区流行的情况差异非常大,HPV58在东北亚流行程度比较高,并且与宫颈上皮内瘤变(CIN)的相关性较大,但是在美洲、欧洲和非洲的流行程度非常低,与宫颈癌的相关性也较低^[11-18]。在本研究中,低危亚型分布以6型最多见,共19例,占感染者17.12%、其次是81型和11型,81型8个,11型6个分别占感染者7.21%和5.41%,与李霓等^[19]对亚洲妇女宫颈癌中HPV型别分布的Meta分析结果基本一致,但HPV18型在本研究中只有3例,占感染者2.7%,可见HPV亚型分布有一定的地理位置差异。

本研究表明,在20~29年龄段HPV感染比例达25.71%,>60岁年龄段感染比例仅占11.43%,可见宫颈癌的年轻化趋势非常明显,在年轻女性群体中存在高比例的HPV感染,HPV感染与性行为因素、受教育程度等相关。本研究对昆明地区妇女HPV感染及亚型分布情况进行了解调查,为研究HPV流行病学和预防HPV感染提供数据和依据。同时当患者被确定感染HPV后,其基因分型对治疗、疗效追踪,特别是对于宫颈癌的预防和早期治疗具有重要的临床意义。

参考文献

- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 518-527
- Westra WH. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas [J]. Oral Oncol, 2014, 50(9): 771-779

- 3 Olesen TB, Svahn MF, Faber MT, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in endometrial cancer: a systematic review and meta – analysis [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 134(1): 206 – 215
- 4 Faridi R, Zahra A, Khan K, *et al.* Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer [J]. *Viol J*, 2011, 8: 269
- 5 Tota JE, Chevarie – Davis M, Richardson LA, *et al.* Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies [J]. *Prev Med*, 2011, 53: S12 – 21
- 6 de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, *et al.* Classification of papillomaviruses [J]. *Virology*, 2004, 324(1): 17 – 27
- 7 Yang L, Yang H, Chen J, *et al.* Genetic variability of HPV – 58 E6 and E7 genes in Southwest China [J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 21: 395 – 400
- 8 Kirschner B, Poll S, Rygaard C, *et al.* Screening history in women with cervical cancer in a Danish population – based screening program [J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 120(1): 68 – 72
- 9 Naucler P, Ryd W, Törnberg S, *et al.* Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(16): 1589 – 1597
- 10 Dalianis T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6): 1799 – 805
- 11 Bosch FX, Manos MM, Muñoz Z, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group [J]. *JNCI J Nat Cancer Inst*, 1995, 87(11): 796 – 802
- 12 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
- 13 de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross – sectional worldwide study [J]. *Lancet Oncol* 2010, 11(10): 1048 – 1056
- 14 Wu Y, Chen Y, Li L, *et al.* Associations of high – risk HPV types and viral load with cervical cancer in China [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(3): 264 – 269
- 15 Sun ZR, Ji YH, Zhou WQ, *et al.* Characteristics of HPV prevalence among women in Liaoning province, China [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2010, 109(2): 105 – 109
- 16 Bae JH, Lee SJ, Kim CJ, *et al.* Human papillomavirus (HPV) type distribution in Korean women: A meta – analysis [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(4): 788 – 794
- 17 Sasagawa T, Basha W, Yamazaki HM. High – risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001, 10(1): 45 – 52
- 18 Lai CH, Chao A, Chang CJ, *et al.* Host and viral factors in relation to clearance of human papillomavirus infection: a cohort study in Taiwan [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(7): 1685 – 1692
- 19 李霓, 张思维, 陈万青, 等. 亚洲妇女宫颈癌中人乳头状瘤病毒型别分布的 Meta 分布 [J]. *中国肿瘤*, 2010, 19(3): 195 – 202

(收稿日期: 2014 – 08 – 21)

(修回日期: 2014 – 09 – 09)

探讨“三位一体”康复模式对脑卒中患者康复的影响

邓丽明 石章娥 孙绍丹 王昭君 谢 芬 李旭红

摘 要 **目的** 观察医院 – 社区 – 家庭“三位一体”康复模式用于脑卒中患者康复治疗的效果。**方法** 选择 2011 年 1 月 ~ 2013 年 6 月来笔者医院康复医学科住院治疗的急性脑卒中患者 278 例, 根据康复模式的不同将患者随机分成观察组与对照组各 139 例, 观察组采用医院 – 社区 – 家庭“三位一体”康复模式, 对照组仅采用早期医院康复模式, 对比两组患者治疗后的康复效果、满意度。**结果** 观察组的康复效果、患者满意度明显优于对照组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 医院 – 社区 – 家庭“三位一体”康复模式可明显提高脑卒中患者的康复治疗效果和生活自理能力, 值得推广应用。

关键词 三位一体 康复模式 脑卒中

中图分类号 R742

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.024

Explore the Influence of the Trinity Mode for Stroke Rehabilitation. Deng Liming, Shi Zhanghe, Sun Shaodan, *et al.* Department of Rehabilitation Medicine, The Third Xiangya Hospital of Central South University, Hunan 410013, China

Abstract Objective To observe the curative effect of hospital – community – family "the trinity" stroke rehabilitation mode.

基金项目: 湖南省科技计划项目 (2009wk3054)

作者单位: 410013 长沙, 中南大学湘雅三医院康复医学科

通讯作者: 李旭红, 电子信箱: denglimingkf@126.com