

文章编号: 1673-8640 (2021) 11-1121-04 中图分类号: R373.9 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2021.11.006

健康人血液中人乳头瘤病毒 DNA 检测及定量分析

刘宏钱, 宋朝晖, 梁巧米

(浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: **目的** 分析健康献血人群人乳头瘤病毒 (HPV) DNA 载量, 评估其潜在的临床意义。**方法** 采集 207 名健康献血者的血液, 提取基因组 DNA, 采用 GP5+/GP6+ 引物进行定量聚合酶链反应 (PCR), 同时对扩增的 HPV L1 基因 140 ~ 150 bp 的特异性片段进行测序, 并进行基因分型。**结果** 207 名献血者中, 有 14 名 (6.8%) 献血者 HPV DNA 阳性, 其中 7 名为单一型别 HPV 感染, 7 名为混合感染。所有阳性样本病毒载量为 12.4 ~ 39.3 拷贝/mL。**结论** 小部分健康人血液中存在低载量的 HPV DNA, 血液可能是 HPV 传播的新途径, 不排除健康献血者存在潜在的生殖道或其他部位的 HPV 感染。

关键词: 人乳头瘤病毒; 血液; 定量聚合酶链反应; 基因分型

Determination and quantitation of blood human papillomavirus DNA in healthy subjects LIU Hongqian, SONG Chaohui, LIANG Qiaomi. (Hangzhou First People's Hospital, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, Zhejiang, China)

Abstract: Objective To study blood human papillomavirus (HPV) DNA load of healthy subjects, and to evaluate its potential clinical significance. **Methods** The blood samples from 207 healthy subjects were collected, and genomic DNA was extracted. GP5+/GP6+ primers were used for quantitative polymerase chain reaction (PCR). Simultaneously, 140-150 bp specific fragment of HPV L1 gene was sequenced to classify genotypes. **Results** HPV DNA was determined in 14 (6.8%) blood donors in the 207 healthy subjects. The 7 cases were single type HPV infection, and 7 cases were mixed infection. The viral load of all the positive samples was 12.4-39.3 copies/mL. **Conclusions** There is a low load of HPV DNA in the blood of some healthy subjects, and the blood may be a new way of HPV transmission. It is not excluded that some healthy blood donors have potential HPV infection in the reproductive tract or other parts, or have a history of HPV infection.

Key words: Human papillomavirus; Blood; Quantitative polymerase chain reaction; Genotyping

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是宫颈癌的重要致病因子^[1]。目前, 已经发现的 HPV 亚型有 200 多种^[2], 其中 14 种与生殖道癌高度相关, 被称为高危型 HPV^[3]。全球范围内 70% 的宫颈癌是由 HPV 16 型和 HPV 18 型导致的^[4]。另外, HPV 感染也与口咽癌、生殖器疣和皮肤疣等密切相关; HPV 可感染上皮细胞, 其复制周期与宿主细胞分化密切相关^[5-7]。高危型 HPV 感染宫颈上皮细胞时, 病毒通过子宫内膜和外子宫颈之间的单层鳞状细胞到达目标上皮细胞^[8]。多项对于有高度病变症状的患

者的研究表明, HPV DNA 广泛存在于生殖道感染患者、宫颈癌患者、口咽鳞状细胞癌患者、头颈部癌症患者和肛门鳞状细胞癌患者血液中^[9-13]。此外, 也有 HPV DNA 在人类免疫缺陷病毒感染的儿童外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中被检出的报道^[14]。这些发现均提示, 在癌症患者的血细胞中检测到的 HPV 可能来源于病变晚期的转移细胞, 或 PBMC 释放。健康和无症状感染者 PBMC 中也能检测到 HPV DNA。CHEN 等^[15]在 8.3% 的澳大利亚献血者的血液中检出 HPV DNA, 提示

作者简介: 刘宏钱, 男, 1986 年生, 学士, 检验师, 主要从事临床血液检验工作。

通信作者: 刘宏钱, E-mail: 348802134@qq.com。

PBMC可能是HPV的一个储存库和一个潜在的新的传播途径。然而,这些初步结果并没有被新的研究证实。因此,对于HPV DNA在健康献血者PBMC中是否存在,仍需要更加广泛的研究。本研究旨在通过对献血人群的PBMC进行HPV DNA定量检测和评估,为血液作为HPV传播途径的可能性提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 样本来源

采集2019年10—12月杭州市第一人民医院血液中心207名健康献血者的血液,献血者中男94名、女113名,年龄18~60岁。所有献血者人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和梅毒螺旋体血清学筛查结果均为阴性。

1.2 试剂与仪器

LightCycler480荧光定量PCR仪(瑞士罗氏公司),DNeasy Blood & Tissue Kit(德国Qiagen公司),10×SYBR Green qPCR buffer(美国伯乐公司),Taq酶、dNTPs[宝生物(大连)工程有限公司]。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 DNA抽提

取1 mL全血放入含1 mL 0.9%氯化钠溶液的洁净玻璃管中,混匀,吸取混匀液,沿管壁缓慢加入到含0.5 mL Ficoll溶液的洁净玻璃管中。2 300×g离心20 min,吸取中间层白色细胞(单核细胞)于1.5 mL离心管中,13 800×g离心5 min,弃上清液,提取沉淀中的DNA,严格按照试剂盒说明书要求进行操作。

1.4 HPV-DNA定量检测

采用LightCycler480荧光定量PCR仪进行HPV DNA定量检测,采用通用引物GP5+/GP6+扩增HPV L1基因约150 bp的片段,同时扩增内参基因 β -globin上长度为268 bp的片段,内参基因扩增引物参照文献^[16-18]进行设计。PCR体系为50 μ L,包括10×SYBR Green qPCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂), 1.5 U Taq DNA聚合酶, 0.2 mmol/L dNTPs, 正、反向引物各0.06 μ mol/L, 2 μ L DNA模板。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C

30 s, 循环40次; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。每个样本均同时做HPV和内参基因平行检测。

标准曲线用10倍梯度稀释的、携带完整HPV-16基因的SiHa细胞(分别包含 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 和 1×10^1 病毒拷贝)。病毒载量计算公式为: $\log(\text{拷贝数}) = -0.2776 \times Ct + 11.005$; $r^2 = 0.9973$ 。该方法的灵敏度为 1×10^1 病毒拷贝。HPV病毒载量以每毫升血液中病毒拷贝数表示。

1.5 HPV-L1基因的扩增和测序

使用通用引物GP5+(5'-TTTGTACTGTG-GTAGATACTAC-3')和GP6+(5'-GAAAATAA-ACTGTAAATCATTC-3')扩增HPV-L1基因140~150 bp特异性片段。在反应体系为25 μ L的Go-Taq Master mix(Promega)中进行。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 40 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。将测序结果与美国国立生物技术信息中心(the National Center for Biotechnology Information, NCBI)核酸数据库进行Blast比对。

2 结果

2.1 献血者流行病学特征

207名健康献血者均未报告明显或无症状的HPV感染。有14名(6.8%)献血者HPV DNA定量检测阳性,其中男5名、女9名,年龄(38.7 \pm 12.4)岁。

2.2 HPV DNA检测及分型结果

用GP5+/GP6+引物从阳性样本HPV L1基因中扩增出140~150 bp的基因组区域,对扩增的特异性片段进行Sanger测序,测序结果与NCBI核酸数据库进行比对。结果显示,14例阳性样本中有7例为单一型别HPV感染,7例为混合感染。单一感染中有3例为16型,其余分别为33型、51型、70型和82型(各1例)。多重混合感染包括5例16型和18型双重感染,1例51型和59型混合感染,1例16型、32型、35型和66型4重感染。见表1。

2.3 HPV病毒载量检测结果

所有阳性样本病毒载量为12.4~39.3拷贝/mL,平均为(21.30 \pm 8.27)拷贝/mL。单一型别感染HPV病毒载量为16.8~39.3拷贝/mL;多重混

合感染中HPV病毒载量为7.8~24.6拷贝/mL。见表1。

表1 健康献血者HPV DNA阳性样本型别分布和病毒载量

献血者编号	HPV感染型别	HPV载量/(拷贝/mL)
1	16、18	15.3
2	16、32、45、66	16.8
3	70	25.1
4	16	20.2
5	33	20.1
6	16、18	16.8
7	16、18	17.8
8	82	18.3
9	51	39.3
10	16	23.7
11	16、18	12.4
12	16、18	16.4
13	16	16.8
14	16、51、59	39.2

3 讨论

众所周知，上皮细胞是HPV感染的靶细胞，病毒复制与细胞分化紧密相关。此外，有研究发现，宫颈癌患者血液细胞中也存在HPV DNA^[19]。PAO等^[20-21]首次在52% (13/25) 的泌尿生殖道感染妇女的血液样本中检测到多种型别的HPV DNA，在宫颈癌患者的血液中也检测到HPV DNA。在宫颈癌前病变、头颈部鳞状细胞癌和口咽癌患者的血清或血浆中都检测到HPV DNA^[22]。这些患者血液中的HPV DNA可能来源于转移性的感染细胞，或者是HPV感染细胞存在于血液中，即HPV感染的细胞会从局部感染部位进入患者血液。

有学者发现，14% (8/57) 的人类免疫缺陷病毒阳性的婴幼儿HPV-16 DNA阳性^[14]。这些患儿HPV DNA阳性不能用HPV感染的肿瘤细胞的存在来解释。在这种情况下，HPV DNA大概率是通过输血传播或者母婴传播，提示HPV可通过血液传播。

目前，仅有2项研究报告了健康人外周血中存在HPV DNA^[14-15]。BODAGHI等^[14]检测了19名健康献血者，其中HPV-16 DNA阳性3名，阳性率为15.8%；他们推测HPV DNA是以游离DNA的形式存在于这些献血者血液中的。但他

们研究中纳入的样本数偏少，相关结论尚需更多样本和研究来证实。澳大利亚的1项研究结果显示，有8.3% (15/180) 的健康献血者外周血白细胞中存在HPV DNA，其中高危型占1.7% (3/180)^[15]。本研究在健康献血者的PBMC中检出了6.8% (14/207) 的HPV DNA阳性，其中高危型占92.9% (13/14)，远高于澳大利亚的研究数据^[15]。高危型所占比例的差异可能源于不同国家、不同地区HPV型别的流行性差异。

目前，关于宫颈癌患者血液中HPV病毒载量的研究比较少，有研究报道的平均值为586拷贝/mL^[23]，也有研究报道的平均值为253拷贝/mL^[24]，DONG等^[25]在血浆样本中检测到的平均值为183拷贝/mL。提示HPV病毒载量作为一个潜在指标，可应用于监测宫颈病变进程和宫颈癌转移、复发等。

本研究主要对健康献血者血液样本中的HPV载量进行了定量分析，之前针对献血者血液中HPV的研究主要是定性的，未对HPV DNA进行定量分析。本研究结果显示，献血者HPV DNA阳性样本的病毒载量比较低，为12.4~39.3拷贝/mL，平均为(21.3±8.27)拷贝/mL。血液中低病毒载量在临床上的意义目前尚不清楚，不排除部分健康献血者存在潜在的生殖道或者其他部位的HPV感染，亦或存在HPV感染史，还需要进一步研究。

参考文献

- [1] GRAHAM S V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131 (17): 2201-2221.
- [2] International human papillomavirus (HPV) reference center[EB/OL]. (2019-03-01) [2019-04-03]. <http://www.hpvcntr.se/html/refclones.html>.
- [3] MUÑOZ N, BOSCH F X, DE SANJOSÉ S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348 (6): 518-527.
- [4] BOUVARD V, BAAN R, STRAIF K, et al. A review of human carcinogens-part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10 (4): 321-322.
- [5] PYEON D, PEARCE S M, LANK S M, et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression[J]. PLoS Pathog, 2009, 5 (2): e1000318.

- [6] SAPP M, BIENKOWSKA-HABA M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus[J]. FEBS J, 2009, 276 (24) : 7206-7216.
- [7] FUCHS E. Finding one's niche in the skin[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4 (6) : 499-502.
- [8] HERFS M, YAMAMOTO Y, LAURY A, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2012, 109 (26) : 10516-10521.
- [9] PAO C C, LIN S S, LIN C Y, et al. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells[J]. Am J Clin Pathol, 1991, 95 (4) : 540-546.
- [10] KAY P, ALLAN B, DENNY L, et al. Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA in the blood of patients with cervical cancer[J]. J Med Virol, 2005, 75 (3) : 435-439.
- [11] AHN S M, CHAN J Y, ZHANG Z, et al. Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and surveillance of human papillomavirus-related head and neck cancer[J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2014, 140 (9) : 846-854.
- [12] CABEL L, JEANNOT E, BIECHE I, et al. Prognostic impact of residual HPV ctDNA detection after chemoradiotherapy for anal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24 (22) : 5767-5771.
- [13] CAO H, BANH A, KWOK S, et al. Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 82 (3) : e351-e358.
- [14] BODAGHI S, WOOD L V, ROBY G, et al. Could human papillomaviruses be spread through blood?[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (11) : 5428-5434.
- [15] CHEN A C, KELEHER A, KEDDA M A, et al. Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors[J]. J Med Virol, 2009, 81 (10) : 1792-1796.
- [16] DE RODA HUSMAN A M, WALBOOMERS J M, VAN DEN BRULE A J, et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR[J]. J Gen Virol, 1995, 76 (Pt 4) : 1057-1062.
- [17] JACOBS M V, DE RODA HUSMAN A M, VAN DEN BRULE A J, et al. Group-specific differentiation between high- and low- risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33 (4) : 901-905.
- [18] JACOBS M V, VAN DEN BRULE A J, SNIJDERS P J, et al. A non-radioactive PCR enzyme-immunoassay enables a rapid identification of HPV 16 and 18 in cervical scrapes after GP5+/6+ PCR[J]. J Med Virol, 1996, 49 (3) : 223-229.
- [19] KEDZIA H, GOZDZICKA-JÓZEFIAK A, WOLNA M, et al. Distribution of human papillomavirus 16 in the blood of women with uterine cervix carcinoma[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 1992, 13 (6) : 522-526.
- [20] PAO C C, HOR J J, YANG F P, et al. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis[J]. J Clin Oncol, 1997, 15 (3) : 1008-1012.
- [21] TSENG C J, PAO C C, LIN J D, et al. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis[J]. J Clin Oncol, 1999, 17 (5) : 1391-1396.
- [22] COCUZZA C E, MARTINELLI M, SINA F, et al. Human papillomavirus DNA detection in plasma and cervical samples of women with a recent history of low grade or precancerous cervical dysplasia[J]. PLoS One, 2017, 12 (11) : e0188592.
- [23] HO C M, YANG S S, CHIEN T Y, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients[J]. Gynecol Oncol, 2005, 99 (3) : 615-621.
- [24] GNANAMONY M, PEEDICAYIL A, SUBHASHINI J, et al. Detection and quantitation of HPV 16 and 18 in plasma of Indian women with cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2010, 116 (3) : 447-451.
- [25] DONG S M, PAI S I, RHA S H, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002, 11 (1) : 3-6.

(收稿日期: 2020-11-04)

(本文编辑: 李 欣)