

# 原发性与继发性不孕症患者人乳头状瘤病毒感染状况分析

何晶晶 刘杰\*

(徐州市妇幼保健院检验科 江苏徐州 221009)

**摘要:** 目的 了解原发性与继发性不孕症患者人乳头状瘤病毒(HPV)的感染状况、亚型分布。方法 采集 2017-2018 年 101 例原发性、104 例继发性不孕症患者及 315 例健康体检者宫颈脱落细胞,应用流式荧光杂交技术检测 HPV27 种亚型(低危亚型 10 种、高危亚型 17 种)。结果 不孕症患者 HPV 总感染率高于对照组(19.5% vs 17.8%,  $P>0.05$ )。单一感染率高于多重感染(15.1% vs 4.4%,  $P<0.05$ ),共检出 20 种型别,高危亚型累积感染率高于低危亚型(75.5% vs 24.5%,  $P<0.05$ ),以 HPV52、16、35 型为主。继发性不孕症患者 HPV 感染率高于原发性不孕症 (23.1% vs 15.8%,  $P>0.05$ )。继发组检出 15 种 HPV 型,高危型累积感染率高于低危型(71.9% vs 28.1%,  $P<0.05$ ),以 HPV35、16、58 型为主;原发组检出 10 种 HPV 型,高危型累积感染率亦高于低危型(80.0% vs 19.0%,  $P<0.05$ ),以 HPV52、18、33 型为主。结论 HPV 感染与女性不孕症存在一定相关性,与继发性不孕症的关系可能更为密切,可建议对不孕症患者进行 HPV 筛查。

**关键词:** 人乳头瘤病毒;原发性不孕症;继发性不孕症;流式荧光杂交;基因型

Human Papillomavirus infection in primary or secondary infertile female

He Jingjing Liu Jie

(Department of Clinical Laboratory, Xuzhou Maternity and child Health Care Hospital, Xuzhou Jiangsu 221009, China)

corresponding author:Liu Jie, Email: liujie36372929@163.com

**[Abstract]** Objective The aim is to explore the prevalence rate and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) infection among primary or secondary infertile patients in xuzhou. Methods 101 primary infertility, 104 secondary infertility and 315 healthy control were collected from 2017 to 2018. 27 HPV genotypes (including 10 low risk types and 17 high risk types) were detected by flow fluorescence hybridization technique. Results The overall HPV prevalence rate of infertile patients was higher than that of healthy control (19.5% vs 17.8%,  $P>0.05$ ). Single infection rate was higher than multiple infection rate (15.1% vs 4.4%,  $P<0.05$ ). 20 HPV genotypes were identified. The cumulative positive rate of high-risk types (HR-HPV) was higher than that of low-risk types (LR-HPV) (75.5% vs 24.5%,  $P<0.05$ ), majored in HPV 52, 16, 35. HPV infection rate of secondary infertility was higher than that of primary infertility and healthy control (23.1% vs 15.8%, 23.1% vs 17.8%, both  $P>0.05$ ). 15 and 10 HPV genotypes were identified in secondary and primary infertility group. The cumulative prevalence of HR-HPV were both higher than that of LR-HPV in the two groups (71.9% vs 28.1% and 80.0% vs 19.0%, both  $P<0.05$ ), majored in HPV 35, 16, 58 and HPV52, 18, 33, respectively. Conclusion HPV infection is associated with female infertility in xuzhou, with more closely relationship with secondary infertility. HPV screening may be recommended to infertile patients.

**[Keywords]** Human Papillomavirus; Primary Infertility; Secondary Infertility; Flow Fluorescent Hybridization; Genotype

不孕定义为未避孕、有正常性生活、同居 1 年及以上而未受孕者,近年来发病率呈上升趋势。不孕症病因复杂,其中性传播性感染对生殖道的影响占病理性因素的主要部分,如淋病奈瑟菌<sup>[1]</sup>、苍白密螺旋体<sup>[2]</sup>、沙眼衣原体<sup>[3]</sup>感染等。人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)也是常见的性传播性病原体之一。HPV 感染导致相关肿瘤的发生已明确造成全球健康负担<sup>[4,5]</sup>,但其与特发性生育力低下的关系尚无定论。研究表明,HPV 可能是引起男性及其配偶不孕不育的一种因素<sup>[6]</sup>,HPV 通过降低男性精子质量,尤其是动力,或减少精细胞数量从而影响男性生育能力<sup>[7,8,9]</sup>。目前国内关于女性不孕症与 HPV 感染之间的关系研究相对欠缺,为了解本原发性、继发性不孕症患者 HPV 流行情况,进行如下分析。

## 1 资料与方法

**1.1 资料** 收集 2017 年 1 月至 2018 年 12 月就诊于徐州市妇幼保健院生殖门诊不孕症患者 205 例,年龄(29.3±4.00)岁,其中原发性不孕 101 例、继发性不孕 104 例,诊断标准参考文献<sup>[10]</sup>。同期行健康体检者 315 例,年龄(29.5±3.87)岁,不孕组与健康对照组年龄差异无统计学意义( $P=0.596$ )。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 征得患者同意采集宫颈脱落细胞标本,并承诺保护患者隐私。先用棉拭子轻轻拭去宫颈口分泌物,再用专用采样刷插入宫颈内 1-2cm,紧贴宫颈口,稍用力转动 3 圈,将采样刷放入标本保存液中,轻摇洗涤数次,以便得到尽可能多的宫颈脱落

细胞。

**1.2.2 HPV-DNA 提取** 核酸提取采用基于 Pre-NAT 全自动核酸提取系统的磁珠法。将标本充分混匀后吸取 600μl 至样本管。样本首先裂解释放 DNA,在磁珠的吸附作用和电磁场作用下,经过两次充分洗涤去除杂质,最后经洗脱液使 DNA 与磁珠分离,使用含有 DNA 的洗脱液进行 PCR 扩增。

**1.2.3 HPV-DNA 扩增** 取 5μl HPV-DNA 模板加入扩增试剂,使总体积为 20μl,按下列条件进行多重 PCR 扩增:95℃ 5 分钟;95℃ 30 秒,58℃ 30 秒,68℃ 30 秒 5 个循环;95℃ 30 秒,55℃ 30 秒,68℃ 30 秒,总计 30 个循环。

**1.2.3.1 杂交与检测** 将扩增后的 DNA 产物与探针进行杂交,不同型别的 HPV 结合到不同的探针上去,待测的 DNA 产物再与荧光物质 SA-PE(藻红蛋白标记的链霉亲和素)结合,进行流式分析检测,通过判断何种编码微球及荧光强度,得到数字化结果,通过专用软件分析确定 HPV 型别。条件:取扩增产物 3μl,加入 22μl 微球杂交液 95℃ 5 分钟,48℃ 30 分钟;加入 SA-PE 75μl,48℃ 孵育 15 分钟。17 种高危亚型包括 HPV 16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、82;低危亚型有 HPV 6、11、40、42、43、44、55、61、81、83。

**1.2.4 试剂与仪器** 核酸提取试剂来自陕西西安天隆科技有限公司;HPV 核酸扩增试剂、流式荧光杂交法 HPV 分型试剂盒及宫颈脱落细胞保存液来自西安天隆科技有限公司。仪器有 Pre-NAT 全自

动核酸提取系统(美国 Perkin Elmer 公司); Verriti 96 孔梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司)及 Luminex200 流式荧光点阵仪(上海普迪生物技术有限公司)等。

1.2.5 统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行两组年龄均值的独立样本  $t$  检验, 率的比较用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不孕症患者与健康对照 HPV 感染情况 205 例不孕症患者

表 1 不孕症患者与健康对照 HPV 感染状况分析

Tab 1 Analysis of HPV prevalence in infertile patient or healthy control

|      | 例数  | HPV 感染率 (%) | HPV 感染类型 (%) |          | $\chi^2 (P)$          | HPV 感染危险度 (%)        |                        |                      |
|------|-----|-------------|--------------|----------|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
|      |     |             | 单一感染         | 多重感染     |                       | 低危型                  | 高危型                    | 低危合并高危               |
| 不孕症  | 205 | 40 (19.5)   | 31 (15.1)    | 9 (4.4)  | 13.408 ( $P < 0.05$ ) | 8 (3.9) <sup>a</sup> | 28 (13.7) <sup>b</sup> | 4 (2.0) <sup>c</sup> |
| 健康对照 | 315 | 56 (17.8)   | 39 (12.4)    | 17 (5.4) | 9.486 ( $P < 0.05$ )  | 9 (2.9)              | 35 (11.1)              | 12 (3.8)             |

注: 与对照组相比, a:  $\chi^2=0.247$ ; b:  $\chi^2=0.582$ ; c:  $\chi^2=2.194$ ,  $P$  均大于 0.05。

表 2 不孕症患者与健康对照 HPV 亚型累积分布

Tab 2 The cumulative distribution of HPV types in infertile patient or healthy control

| 不孕症    |        | 健康对照   |        |
|--------|--------|--------|--------|
| 型别     | 阳性 (n) | 型别     | 阳性 (n) |
| 高危     |        |        |        |
| HPV-52 | 7      | HPV-53 | 8      |
| HPV-16 | 6      | HPV-52 | 7      |
| HPV-35 | 6      | HPV-59 | 6      |
| HPV-18 | 4      | HPV-33 | 6      |
| HPV-82 | 4      | HPV-68 | 4      |
| HPV-33 | 3      | HPV-58 | 4      |
| HPV-58 | 3      | HPV-16 | 4      |
| HPV-53 | 2      | HPV-39 | 3      |
| HPV-59 | 2      | HPV-18 | 3      |
| HPV-26 | 1      | HPV-45 | 2      |
| HPV-31 | 1      | HPV-26 | 2      |
| HPV-51 | 1      | HPV-82 | 1      |
|        |        | HPV-66 | 1      |
|        |        | HPV-56 | 1      |
|        |        | HPV-55 | 1      |
|        |        | HPV-35 | 1      |
| 低危     |        |        |        |
| HPV-81 | 3      | HPV-81 | 5      |
| HPV-55 | 2      | HPV-44 | 5      |
| HPV-43 | 2      | HPV-61 | 4      |
| HPV-11 | 2      | HPV-43 | 4      |
| HPV-83 | 1      | HPV-42 | 3      |
| HPV-6  | 1      | HPV-40 | 3      |
| HPV-44 | 1      | HPV-51 | 1      |
| HPV-40 | 1      | HPV-11 | 1      |

### 2.2 原发性与继发性不孕患者 HPV 感染情况 原发性不孕症

HPV 感染率为 15.8% (16/101) 低于继发性 HPV 感染率 (23.1%, 24/104),  $\chi^2=1.708$ ,  $P > 0.05$ 。原发组检出 10 种 HPV 型, 高危型累积感染率高于低危型(80.0% vs 19.0%,  $P < 0.05$ ), 以 HPV52、18、33 型为主; 继发组检出 15 种 HPV 型, 高危型累积感染率亦高于低危型(71.9% vs 28.1%,  $P < 0.05$ ), 以 HPV35、16、58 型为主。各亚

者 HPV 感染率为 19.5% (40/205), 高于健康对照组的 17.8% (56/315), 但差异无统计学意义( $\chi^2=0.248$ ,  $P > 0.05$ )。不孕症组共检出 20 种型别, 单一感染率高于多重感染; 高危亚型累积感染率高于低危亚型(75.5% vs 24.5%,  $\chi^2=27.51$ ,  $P < 0.05$ ), 以 HPV52、16、35 型为主。见表 1, 表 2。健康对照组共检出 24 种型别, 单一感染率高于多重感染; 高危亚型累积感染率高于低危亚型(67.5% vs 32.5%,  $\chi^2=19.60$ ,  $P < 0.05$ ), 以 HPV53、52、59 型为主, 见表 1, 表 2。

型及频率分布见表 3。

表 3 原发性与继发性不孕患者 HPV 感染亚型累积分布

Tab3 The cumulative distribution of HPV types in primary or

| secondary infertile patient |        |        |        |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| 原发性不孕                       |        | 继发性不孕  |        |
| 型别                          | 阳性 (n) | 型别     | 阳性 (n) |
| 高危                          |        |        |        |
| HPV-52                      | 5      | HPV-35 | 5      |
| HPV-18                      | 4      | HPV-16 | 4      |
| HPV-33                      | 3      | HPV-58 | 3      |
| HPV-16                      | 2      | HPV-82 | 3      |
| HPV-82                      | 1      | HPV-59 | 2      |
| HPV-35                      | 1      | HPV-53 | 2      |
| HPV-31                      | 1      | HPV-52 | 2      |
|                             |        | HPV-26 | 1      |
|                             |        | HPV-51 | 1      |
| 低危                          |        |        |        |
| HPV-55                      | 2      | HPV-81 | 3      |
| HPV-40                      | 1      | HPV-43 | 2      |
| HPV-11                      | 1      | HPV-6  | 1      |
|                             |        | HPV-83 | 1      |
|                             |        | HPV-11 | 1      |
|                             |        | HPV-44 | 1      |

2.3 HPV 阳性原发性与继发性不孕症患者年龄分布 原发性不孕症患者平均年龄显著低于继发性不孕症[(28.13 ± 4.13) vs (30.46 ± 3.51),  $t=4.359$ ,  $P < 0.05$ ]。16 例 HPV 感染的原发性不孕症患者, 其平均年龄亦显著小于 24 例 HPV 感染的继发性不孕症患者[(27.94 ± 3.00) vs (31.04 ± 3.36),  $t=2.987$ ,  $P=0.005$ ]。两组年龄分布特征如图 1。

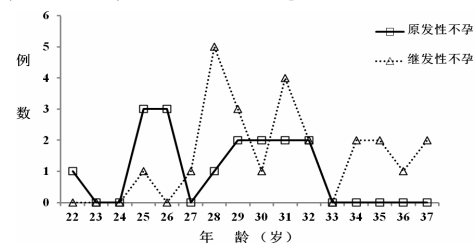


图 1 HPV 阳性原发性与继发性不孕症患者年龄分布

Fig.1 Age distribution of HPV infected primary or secondary infertile patient

## 3 讨论

生殖道特异性微生物感染如衣原体和支原体感染与不孕症的关系已得到证实, HPV 也是常见的性传播病原体之一<sup>[1]</sup>, 男性或女性感染皆可导致配偶继发感染, 除了引起各种良恶性病变, HPV 感染还被报道可能影响人类的生育能力及辅助生殖成效<sup>[2]</sup>, 但目前尚无直接证据证明 HPV 感染导致女性生育能力降低。张立冬等<sup>[3]</sup>较早报道不孕症患者高危型 HPV 感染率显著高于正常妇女(25.38% vs 11.33%,  $P < 0.01$ ), 表明高危型 HPV 感染与女性不孕症存在一定相关性。贾红丽等<sup>[4]</sup>对 500 例不孕症患者进行 HPV-DNA 分析, 得出相同结论。本研究中 205 例不孕症患者 HPV 感染率虽高于同龄正常人群, 但差异无统计学意义, 提示宫颈 HPV 感染可能并非引起不孕的独立因素。根据病因将不孕症分为原发性和继发性不孕症, 得出继发性不孕症患者 HPV 感染情况严重于原发性不孕症患者, 与年龄无明显相关性, 提示高危型 HPV 感染可能与继发性不孕症间关系更为密切, 由于样本量较少, 组间差异未达到统计学意义。不同学者得出不同结论与方法学、实验设计及纳入人群差异等有关。

HPV-DNA 感染可损伤男性精子<sup>[5]</sup>, 并具有型别相关性。研究表明, HPV 16、31 型 DNA 导致精子 DNA 碎片化的强度大于 HPV 18、33、6/11 型。Lee 等报道, 在 HPV 6/11、16、18、31 及 33 型 DNA 感染情况下, 精子总体运动能力显著下降<sup>[6]</sup>。研究还指出, 对于精子已被 HPV-DNA 感染的夫妇行体外受精, HPV 感染的女性人工授精后怀孕几率远远低于 HPV 未感染者<sup>[7]</sup>。另外, HPV 感染的精子能够携带病毒 DNA 至卵母细胞, 进而增加滋养层细胞凋亡, 减少其在子宫内膜着床, 在理论上能够增加流产风险。体外实验已证实, 转染含有 HPV 16 型基因组的质粒至滋养层细胞, 其凋亡率是对照组的 3-6 倍<sup>[8]</sup>, 这种凋亡可能致使胎盘功能失调、胚胎植入子宫壁能力下降, 终致早期流产或胎膜早破<sup>[9]</sup>。有学者提出, HPV 分型检测可能对不孕症, 特别是特发性不孕症诊断有重要的参考价值。目前仍缺少大规模的流行病学调查, HPV 对卵母细胞及胚胎发育过程的影响仍需进一步研究。

生理病理方面, 宫颈管是精子上行到达子宫腔的通道, 宫颈腺体分泌的粘液为精子活动提供了良好环境。若宫颈存在炎症合并 HPV 感染<sup>[10]</sup>, 则宫颈黏液的成分和性状会发生变化, 出现分泌物增多、黏稠鼻涕状等, 从而导致宫颈管堵塞, 干扰精子在女性生殖道内的运行和输送, 引发不孕。

总之, 目前对于宫颈 HPV 感染与女性不孕症之间的关系尚无定论, 仍需大量样本深入研究, 本研究提示高危型 HPV 感染与继发性女性不孕症间关系更为密切。HPV 的存在, 特别是高危型, 无论是通过作用于胚胎还是影响精子上行通道环境, 均不利于受孕, 因此建议不孕症女性及其配偶应同时进行 HPV 筛查。

#### 参考文献

- [1] Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, et al. Genital tract infections and infertility[J]. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*. 2008; 140(1):3-11.
- [2] Bachir BG, Jarvi K. Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility[J]. *Urol Clin North Am*, 2014; 41(1):67-81.
- [3] Motrich RD, Cuffini C, Oberti JP, et al. Chlamydia trachomatis occurrence and its impact on sperm quality in chronic prostatitis patients[J]. *J Infect*. 2006; 53(3):175-183.
- [4] Farhad Ghasemi, Morgan Black, Ren X. Sun, et al. High-throughput testing in head and neck squamous cell carcinoma identifies agents with preferential activity in human papillomavirus-positive or negative cell lines. *Oncotarget*. 2018; 9:26064-26071.
- [5] Khan A, Liu Q, Chen X, Stucky A, et al. Detection of human papillomavirus in cases of head and neck squamous cell carcinoma by RNA-seq and VirTect. *Mol Oncol* 2018 Dec 30.
- [6] Gizzo S, Ferrari B, Noventa M, et al. Male and couple fertility impairment due to HPV-DNA sperm infection: update on molecular mechanism and clinical impact-systematic review[J]. *Biomed Res Int*, 2014; 2014: 230263.
- [7] Yang Y, Jia CW, Ma YM, et al. Correlation between HPV sperm infection and male infertility[J]. *Asian J Androl*, 2013; 15(4):529-532.
- [8] Garolla A, De Toni L, Bottacin A, et al. Human Papillomavirus Prophylactic Vaccination improves reproductive outcome in infertile patients with HPV semen infection: a retrospective study. *Sci Rep* 2018 01 17;8(1).
- [9] Moghimi M, Zabihi-Mahmoodabadi S, Kheirkhah-Vakilabad A, et al. Significant Correlation between High-Risk HPV DNA in Semen and Impairment of Sperm Quality in Infertile Men. *Int J Fertil Steril* 2019 Jan;12(4).
- [10] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008:351.
- [11] Ge Y, Zhong S, Ren M, et al. Prevalence of human papillomavirus infection of 65,613 women in East China. *BMC Public Health* 2019 Feb 11;19(1).
- [12] Çağlar GS, Garrido N, The implications of male human papilloma virus infection in couples seeking assisted reproduction technologies. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2018 03 01;19(1).
- [13] 张立冬, 张慧敏, 裴静, 等. 不孕患者中宫颈 HPV 高危型别感染率及病毒载量的调查[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2007; 21(2):159-161.
- [14] 贾红丽, 刘东艳, 罗保斌. 500 例不孕症妇女宫颈高危型 HPV-DNA 检测结果分析[J]. *河北北方学院学报*, 2016; 32(6):44-46.
- [15] Boeri L, Capogrosso P, Ventimiglia E, Pederzoli F, et al. High-risk human papillomavirus in semen is associated with poor sperm progressive motility and a high sperm DNA fragmentation index in infertile men. *Hum. Reprod*. 2019 Feb 01;34(2).
- [16] Lee CA, Huang CT, King A, et al. Differential effects of human papillomavirus DNA types on p53 tumor-suppressor gene apoptosis in sperm[J]. *Gynecol Oncol*, 2002; 85(3):511-516.
- [17] Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, et al. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes[J]. *Fertil Steril*, 2011; 95(5):1845-1848.
- [18] Gomez LM, Ma Y, Ho C, et al. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery[J]. *Hum Reprod*, 2008; 23(3):709-715.
- [19] Hornychova H, Kacerovsky M, Musilova I, et al. Cervical human papillomavirus infection in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS ONE* 2018;13(11).
- [20] Chao XP, Sun TT, Wang S, et al. Correlation between the diversity of vaginal microbiota and the risk of high-risk human papillomavirus infection. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2019 Jan;29(1).

#### 作者简介:

何晶晶 (1982 年 1 月), 男, 安徽淮南人, 汉族, 学士, 主管技师, 主要从事免疫学检验