

• 临床检验研究论著 •

男性尿道口细胞 HPV 感染基因型分布的研究*

夏思钧¹, 龚培尧², 耿建祥^{2△}, 平春敏², 靳春萍², 龙秀荣², 施启丰², 夏林², 王宏景², 王晓红²

(1. 江苏省射阳县人民医院病理科, 江苏盐城 224300;

2. 南京中医药大学附属第三医院病理科 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

摘要:目的 探讨男性尿道口细胞中人乳头瘤病毒(HPV)不同基因型别的感染情况及其临床意义。方法 从 304 例男性尿道口细胞标本中提取 23 种 HPV DNA, 采用基因扩增结合基因芯片杂交技术对其进行 HPV 基因检测, 并对受检者行基因型的分析。结果 304 例男性受检者中检出 HPV 感染者 117 例, 总阳性率为 38.49%(117/304)。其中单一型别的 HPV 感染者 75 例, 占 24.67%(75/304), 单一型别的感染中, HPV6 型感染者 26 例, 阳性率为 34.67%(26/75), 是单一型别最主要的感染类型, 其次分别为 HPV11 型 10 例、16 型 7 例、58 和 81 型各 6 例、33 型 5 例, 感染率分别为 13.33%(10/75)、9.33%(7/75)、8.00%(6/75)、8.00%(6/75)、6.67%(5/75)。多型 HPV 感染者 42 例, 占 13.82%(42/304), 其中二重感染者 34 例, 占多型感染的 80.95%(34/42), 三重感染者 6 例, 占多型感染的 14.29%(6/42)。HPV 感染的年龄组分布比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 HPV 6 型、11 型、16 型、58 型、81 型、33 型是男性尿道口细胞感染的主要基因型别, 基因扩增结合基因芯片检测技术是一种比较适合临床对男性进行 HPV 分型检测的敏感性高、特异性强的诊断方法, 尤其适合开展男性尿道口细胞 HPV 感染的分子流行病学的研究。

关键词: 乳头状瘤病毒科; 尿道; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)17-2231-03

A study of HPV infective genotypes distribution in urethral mouth cells of male cases*

Xia Sijun¹, Gong Peiyao², Geng Jianxiang^{2△}, Ping Chunmin², Jin Chunping²,

Long Xiurong², Shi Qifeng², Xia Lin², Wang Hongjing², Wang Xiaohong²

(1. Department of Pathology, the People's Hospital of Sheyang County, Yancheng, Jiangsu 224300, China;

2. HPV Collaboration of Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: **Objective** To study the genotypes of human papillomavirus(HPV) and its clinical significance in urethral mouth cells of male genitalia. **Methods** Polymerase chain reaction(PCR)and gene-chips technology were utilized for the detection of 23 kinds of HPV genotypes in urethral mouth cells from 304 male cases and the related HPV genotypes of 304 cases were analyzed. **Results** In 304 male subjects, HPV positive were 117 cases, total infection rate of HPV was 38.49%(117/304). single genotypes were 75 cases, the infection rate of single genotypes was 24.67%(75/304), the predominant type of single infection with HPV was HPV 6 (34.67%, 26/75), Followed By HPV11(13.33%, 10/75), HPV16(9.33%, 7/75), HPV58 and 81(8.00%, 6/75), HPV33(6.67%, 5/75), respectively. The infection rate of multiple genotypes was 13.82%(42/304), the infection rate of two genotypes was 80.95%(34/42) and the infection rate of three genotypes was 14.29%(6/42) in multiple genotypes. Age distribution of HPV infection showed no statistically significant($P>0.05$). **Conclusion** HPV 6, 11, 16, 58, 81, 33 types were the main genotypes in urethral mouth cells from 304 male cases. PCR and gene-chip technology can detect single and multiple HPV genotypes in cell samples of male urethral mouth with high sensitivity and specificity, especially fit for study on molecular epidemiology of HPV infection in cells of male urethral mouth.

Key words: papillomaviridae; urethra; genotype

目前, HPV 是人类肿瘤发病中惟一可以完全确认的致癌致瘤病毒。HPV 感染与宫颈癌有着明确的关系, 预防 HPV 感染就可以预防宫颈癌, 没有 HPV 感染就可以不罹患宫颈癌^[1]。女性又如何感染上 HPV, 从传染病的角度来看, 宫颈癌是一种“性传播性疾病”, 也可以说是一种“传染病”。男性在 HPV 传播上负有主要的责任, 也就是说, 男性既是 HPV 的传播者, 也是 HPV 的播种者。男性在女性 HPV 感染过程中起到了 HPV 传播的“载体”作用, 或者说起到了“桥梁”作用, 男性可通过性传播方式把 HPV 传染给一个又一个与其有性生活的女性^[1-6]。从这个意义上来说, 对男性开展多中心、大样

本、多角度的 HPV 基因分型研究具有十分重要的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 1 月至 2013 年 1 月南京中医药大学附属第三医院和徐州市妇幼保健院男科的 304 例男性的尿道口上皮细胞标本, 男性受检者其配偶患生殖器尖锐湿疣或女性性伴侣患有生殖器尖锐湿疣, 年龄 18~69 岁, 平均 32.63 岁。其中 20 岁以下的 4 例、20~<30 岁 128 例、30~<40 岁 99 例、40~<50 岁 65 例、50~<60 岁 5 例、60~<70 岁 3 例。由 2 位经验丰富的技术员按照说明书规范操作。

1.2 仪器与试剂 基因扩增仪为新加坡生产的 Gene Amp

* 基金项目:南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介:夏思钧,男,主治医师,主要从事 HPV 感染相关疾病研究。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

PCR system 2400 型;分子杂交仪为江苏省兴化市分析仪器厂生产的 FYY-3 型;高速冷冻离心机为德国生产的 eppendorf 5810R 型;生物安全柜为江苏省苏州市安泰空气技术有限公司生产的 BHC-1300 II A2 型;青岛海尔有限公司生产的一 20 ℃ 冰箱等。HPV 基因分型检测试剂盒,由亚能生物技术(深圳)有限公司提供。显色液须新鲜配制,使用时所需浓度加蒸馏水配制。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集及保存 检查者用戴有无菌手套的手指将受检者尿道口充分撑开暴露,用一次性男性专用拭子置于尿道口,顺时针旋转拭子 4~5 圈(稍加侧压力),以获得足够的尿道口上皮细胞标本,缓慢抽出拭子,将其头部放入洗脱管中,旋紧洗脱管盖,做好标本标识,保持采集管直立,放入 -20 ℃ 冰箱保存待测。

1.3.2 DNA 的提取 将拭子头充分漂洗后,把洗脱液全部转移至 1.5 mL 的离心管中,13 000 r/min 离心 10 min 后,弃去上清液,保留管底的细胞。随后加入裂解液 50 μL,充分振荡混匀,在金属浴中加热 100 ℃ 10 min,立即 13 000 r/min 离心 10 min 后,取中间层 DNA 溶液待用。

1.3.3 PCR 扩增 将 PCR 反应管(20 μL)3 000 r/min 离心 4 s 后依次编号,分别加入 2 μL 矿物油和已提取的 DNA 样品、空白对照、阳性对照各 5 μL,反应体系总体积 27 μL,3 000 r/min 离心 4 s,上机扩增。扩增条件为 50 ℃ 15 min;95 ℃ 10 min;94 ℃ 30 s;42 ℃ 90 s;72 ℃ 30 s;共 40 个循环,72 ℃ 5 min。

1.3.4 杂交、孵育和显色 取 15 mL 离心管,放入标有样本编号的膜条,加入 5~6 mL A 液(2×柠檬酸钠盐缓冲溶液,0.1%十二烷基磺酸钠溶液)及所有 27 μL PCR 产物,拧紧管盖,将离心管放入沸水浴中变性 10 min(确保 A 液液面完全位于沸水浴液面之下),取出并立即放入 51 ℃ 杂交箱内杂交 1.5 h,同时取 50 mL 离心管,加入 50 mL B 液(0.5×柠檬酸钠盐缓冲溶液,0.1%十二烷基磺酸钠溶液),于杂交箱预热。取出膜条,转移至已预热的 B 液中,51 ℃ 轻摇洗涤 5 min,将膜条转移至孵育液(A 液:链霉素和素辣根过氧化物酶=2 000:1,4 张膜可用 6 μL 链霉素和素辣根过氧化物酶配制成 12 mL 孵育液)中室温孵育 30 min,弃去孵育液,用 A 液室温轻摇洗涤 2 次,每次 5 min,再用 C 液(0.1 mol/L 柠檬酸钠)轻摇洗涤 2 min;显色液(C 液 19 mL,TMB 1 mL,30% H₂O₂ 2 μL)中显色至少 30 min;转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

1.4 统计学处理 应用统计软件包 SPSS 13.0,对相关数据进行统计学处理,率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结果分析 304 例男性受检者尿道口上皮细胞标本中,检出 117 例 HPV 感染阳性者,总阳性率为 38.49% (117/304)。其中单一型别的 HPV 感染者 75 例,占 24.67% (75/304),单一型别的感染中,HPV6 型感染者 26 例,阳性率为 34.67% (26/75),是单一型别最主要的感染类型。多重型别 HPV 感染者 42 例,占 13.82% (42/304),其中二重感染者 34 例,占多重感染的 80.95% (34/42),三重感染者 6 例,占多重感染的 14.29% (6/42),四重感染者 2 例,占多重感染的 4.76% (2/42)。

2.2 HPV 感染的年龄组分布 见表 1。由于 20 岁以下、50~<60 岁、60~<70 岁组人数很少,不参与比较和统计学分析。

表 1 304 例男性尿道口细胞中 HPV 感染的年龄组分布[n(%)]

年龄组	n	阳性率	阴性率
20 岁以下组	4	2(50.00)	2(50.00)
20~<30 岁组	128	51(39.84)	77(60.16)
30~<40 岁组	99	37(37.37) *	62(62.63) *
40~<50 岁组	65	23(35.39) *	42(64.61) *
50~<60 岁组	5	3(60.00)	2(40.00)
60~<70 岁组	3	1(33.33)	2(66.67)

*: $P > 0.05$,与 20~<30 岁组比较。

3 讨论

HPV 是一类双链环状 DNA 病毒,它们可引起人类皮肤和黏膜的异常增生,并导致宿主组织疣性病变、乳头状瘤及癌瘤性病变。因宫颈癌都是女性发病,但是无论女性本身,还是男性,都对宫颈癌的发生负有不可推卸的责任。男女性生活过早、性伴侣过多一直被认为是宫颈癌高发的两大高危因素。因此,如何阻断 HPV 在两性之间的传播,尤其阻断男性在 HPV 传播上的“桥梁”作用,意义深远^[1,4,7]。本文采用高通量的基因分型芯片检测技术对 304 例的男性尿道口细胞标本进行 23 种 HPV 基因分型的研究,并对其基因型别所占的比率作一比较和分析。

本研究表明,304 例男性尿道口上皮细胞中 HPV 阳性感染者 117 例,阴性者 187 例,总的 HPV 感染率为 38.49% (117/304)。提示:(1)本研究男性尿道上皮细胞中即有单一型别的 HPV 感染,也有多重型别的 HPV 感染,以单一型感染为主,多重感染为辅,单一型(75 例)和多重型别(42 例)之比为 1.79:1,超过女性宫颈一般人群 HPV 感染单一型和多型之比 3:1 的比例,说明男性尿道上皮细胞中 HPV 单一型和多型之比的比值差距在缩小。由于尖锐湿疣属于性传播性疾病,女性感染了 HPV 可传染给男性,而男性 HPV 感染者的增加,又会使得女性 HPV 感染率也随之增加,以致宫颈癌和癌前病变的数量也呈现出上升的趋势。有研究表明 HPV 感染正呈现出不断增加的态势^[8]。(2)本研究表明男性尿道口是又一个 HPV 易感染部位(储存部位)。所有 117 例 HPV 阳性的男性中除 39 例一重感染、9 例二重感染及 1 例三重感染外都伴有 6 型或 11 型 HPV 感染,其中 70 例受检者有高危型别的 HPV 感染(59.83%,70/117),占感染者的半数以上,而高危型别的 HPV 感染往往是人类上皮性恶性肿瘤的重要诱发因素,也是引发宫颈癌、肛门癌及外生殖器癌的重要诱因。因此,一旦男性成为 HPV 感染者,就可成为 HPV 的重要传染源。原则上女性一旦检测出 HPV 感染,就应该对女性的男伴进行 HPV 检测,如男性也检出 HPV,就应对其行 HPV 管理和干预治疗。因为给男性治疗要比对女性治疗更方便易行,且男性在 HPV 传播中起到主动的作用,如能很好的解决男性 HPV 传播问题,女性宫颈癌及 HPV 感染相关疾病的发病率都会自然下降和减少,这是研究者今后要重点关注和研究的领域。(3)由于高危持续性 HPV 感染是宫颈癌发病的主要因素。然而女性的 HPV 感染又来自于何方,研究已发现男性在 HPV 传播过程中起到非常重要的作用。因此,如何切断男性在 HPV 传播过程中的作用是降低女性宫颈癌发病率和病死率的关键^[1,4,9]。男性的 HPV 感染不解决,女性的 HPV 感染也解决不了,女性宫颈癌也很难完全控制。如能打断男性这条 HPV 传播链,这将对宫颈癌的防治起到事半功倍的作用。(4)本研究单一型别的感染中,HPV6 型感染者 26 例,阳性率为 8.55% (26/304),是单一型别最主要的感染类型,其次分别为 HPV11

型 10 例、16 型 7 例、58 型 6 例、81 型 6 例、33 型 5 例,感染率分别为 3.29% (10/304)、2.30% (7/304)、1.97% (6/304)、1.65% (5/304)。多重型别 HPV 感染者 42 例,占 13.82% (42/304),其中二重感染者 34 例,占多重感染的 80.95% (34/42),三重感染者 6 例,占多重感染的 14.29% (6/42),四重感染者 2 例,占多重感染的 4.76% (2/42)。提示男性尿道口细胞 HPV 感染,单一型别以低危型 HPV 感染为主,而多重型别中高危型 HPV 感染出现频率超过低危型别,且高危型多重 HPV 感染呈现出上升的趋势。(5)本研究男性 HPV 感染出现频率前 6 位的型别为 HPV6 型 47 人次、HPV11 型 22 人次、HPV 16 型 17 人次、HPV58 型 16 人次、HPV81 型 11 人次、HPV31 型 9 人次,这 6 种 HPV 型别是男性患者尿道口细胞感染出现频率最高的类型。由于高危型 HPV 致癌力是低危型 HPV 的 10 倍,因此,笔者在关注和监测低危型 HPV 的同时,更应该监控 HPV16 型、58 型、31 型,尤其是我国在研发 HPV 疫苗时,要充分考虑到 HPV58 型和 31 型在我国呈现出不断上升的流行趋势,应覆盖 HPV58 型和 31 型。(6)据报道,HPV 单一型别的感染可使宫颈癌的发病风险增加 19.9 倍,而多重型别的 HPV 感染可使宫颈癌的发病风险增加 31.8 倍^[6]。HPV 多重型别的感染载量要高于单一型别的 HPV 感染,癌变相关风险更大,是宫颈癌及其相关癌症发生的一个非常重要的危险因素,且致病力也更强,病变发展更快,复发率更高,因此,HPV 多重感染的资料对临床处理宫颈肿瘤性病变和制定有效的措施来阻止 HPV 传播具有重要的意义^[7-10]。有研究者^[11]报道妓女 HPV 感染 148 例中 78 例为 2 型以上的多重感染,表明多重感染与性活动程度和性伴侣数量有关。本研究高危 HPV16 型(10/7)、58 型(10/6)、18 型(5/2)、66 型(3/1)其多重型别的感染均超过单一型别的感染,值得重视和关注。一旦男性成为 HPV 携带者,他们将成为 HPV 传播的重要传染源,并通过性接触的方式感染不同的女性。提示临床和预防医学的医生更应该加强对男性多重型别 HPV 感染者的管理、治疗和跟踪检测工作。

由于 HPV 可在两性之间互相传播,如何阻断男性 HPV 的传播链,尽可能减少 HPV 在两性之间的传播。通过给男孩接种宫颈癌疫苗,对性活跃期的男性行 HPV 检测,对 HPV 阳性的男性给予及时管理和治疗,并在性事时采用安全套等措施,这样就可降低男性和女性的 HPV 感染率,宫颈癌及其他癌的发病率也会随之下降。如一、二级预防措施都能够落实到位,宫颈癌将会成为人类第一个可进行有效预防的恶性肿瘤,肛周癌、口腔癌及阴茎癌也随之下下降,这将造福于广大民

众^[1,4,11-14]。

参考文献

- [1] 耿建祥,王旭波.人乳头瘤病毒检测及其临床应用[M].北京:人民卫生出版社,2009:381-427.
- [2] 兰建云,邵伟伟,袁苏娟,等.外耳道乳头状瘤中的人乳头瘤病毒检测及其临床意义[J].医学研究生学报,2010,23(4):391-393.
- [3] 张金浩,耿建祥,吴崑崑,等.结直肠肿瘤中 HPV 感染的基因分析[J].医学研究生学报,2011,24(2):154-157.
- [4] 李海,邓志勇,张阳,等.人乳头瘤病毒在阴茎鳞癌组织中的表达及意义[J].现代实用医学,2010,22(9):1037-1038.
- [5] 唐永发,耿建祥,张金浩,等.196 例肛门及肛管尖锐湿疣病变中 HPV 感染的研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(11):1303-1304.
- [6] 魏谨,耿建祥,朴正爱,等.已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒感染基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2012,22(23):5202-5205.
- [7] 董云灿,耿建祥,张劲松,等.1722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒基因的分型[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):817-820.
- [8] 任晓惠,耿建祥,李海,等.某市 2109 例女性宫颈细胞中 HPV 基因型别的研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(13):1424-1426.
- [9] 严粉琴,耿建祥,肖蔚,等.已婚女性宫颈上皮细胞中人乳头瘤病毒基因分型 2000 例分析[J].实用妇产科杂志,2012,28(5):390-393.
- [10] Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions[J]. Vaccine, 2008, 26(1):17-28.
- [11] 张佳立,邵红艺,张江宇,等. HPV 多重感染与宫颈癌及癌前病变发生、发展的关系研究[J].中国妇幼保健,2010,23(25):3270-3274.
- [12] Zhao R, Zhang WY, Wu MH, et al. Human Papillomavirus infection in Beijing, People's Republic of China: a population-based study[J]. Br J Cancer, 2009, 101(9):1635-1640.
- [13] Jiang P, Liu J, Zeng X, et al. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 197(2):174-178.
- [14] 郎景和. 妇科肿瘤临床诊治的挑战与对策[J]. 中国癌症防治杂志, 2012, 4(1):1-4.
- [15] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2):195-208.

(收稿日期:2013-04-08)

(上接第 2230 页)

- [3] Tejani NR, Chonmaitree T, Rassin DK, et al. Use of C-reactive protein in differentiation between acute bacterial and viral otitis media[J]. Pediatrics, 2007, 95(8):664-669.
- [4] 杨春花,黄峰.高敏 C 反应蛋白研究进展[J].中华风湿病学杂志,2004,8(12):755-758.
- [5] 伍松娇,梁景云,张以昆,等.不同类型冠心病心绞痛患者血清 IL-18 和 hs-CRP 的检测及临床意义[J].检验医学,2009,24(1):36-39.
- [6] 岳学书. C 反应蛋白的检测及临床应用[J].河北联合大学学报:医学版,2013,15(2):171-173.
- [7] 高建钢,张彩虹,刘风华. C-反应蛋白的检测及临床应用研究进展[J].内蒙古医学院学报,2008,30(6):538.
- [8] 汪晨,吴洁,宗晨,等.化学发光免疫分析方法与应用进展[J].分

析化学,2012,40(1):3-10.

- [9] Jaye DL, Waite KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics[J]. Pediatr Infect Dis J, 1997, 16(8):735-746.
- [10] 王翔,林金明.化学发光免疫分析技术新发展[J].分析实验室,2007,26(6):111-122.
- [11] Safi MA. An overview of various labeled assays used in medical laboratory diagnosis. Immune and non-immune assays[J]. Saudi Med J, 2010, 31(4):359-368.
- [12] 魏光伟,余永鹏,魏文康,等.化学发光免疫分析技术及其应用研究进展[J].动物医学进展,2010,31(3):97-102.
- [13] 陈海斌.化学发光免疫分析技术及其进展[J].中国医学装备,2011,8(5):56-59.

(收稿日期:2013-04-08)