

• 临床检验研究论著 •

肛门直肠常见病变中 HPV 感染基因型比较^{*}

吴崑崙¹, 张金浩¹, 耿建祥^{2△}, 王小峰¹, 王宏景², 刘忠伦², 李海², 王晓红², 赵雪²

(南京中医药大学第三附属医院:1. 全国肛肠医疗中心;

2. 病理科/江苏省 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

摘要:目的 比较肛门直肠常见病变组织中人乳头瘤病毒(HPV)感染的基因型分布情况及其临床意义。方法 采用基因扩增结合基因芯片技术对 302 例肛门直肠常见病变组织标本进行 23 种 HPV 基因分型检测。结果 302 例肛门直肠常见病变 HPV 总阳性率为 40.73%(123/302), 一重感染阳性率为 27.48%(83/302), 多重感染阳性率为 13.25%(40/302), 两性 HPV 总阳性率、一重和多重感染率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 基因扩增结合基因芯片检测技术可应用于肛门直肠组织 HPV 分型检测, 对肛门直肠常见病变 HPV 感染的分子流行病学研究具有重要意义。

关键词: 乳头状瘤病毒科; 基因型; 分子生物学; 肛管; 直肠

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)19-2516-03

A comparative study of HPV infective genotypes in common anorectal lesions^{*}

Wu Kunlan¹, Zhang Jinhao¹, Geng Jianxiang^{2△}, Wang Xiaofeng¹, Wang Hongjing²,

Liu Zhonglun², Li Hai², Wang Xiaohong², Zhao Xue²

(1. National Treatment Center for Anal and Colorectal Diseases; 2. Department of Pathology/HPV Collaboration of Jiangsu Province, Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: **Objective** To compare the clinical distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in common anorectal lesions and its clinical significance. **Methods** Polymerase chain reaction and gene-chips technology were utilized for the detection of 23 kinds of HPV genotypes in tissue specimens from 302 cases of common anorectal lesions. And related materials of all subjects were analyzed. **Results** The total HPV positive rate was 40.73%(123/302) in all specimens, the positive rates of single genotype infection were 27.48%(83/302), the positive rates of multiple genotypes infection were 13.25%(40/302). The positive rates of the total HPV, single and multiple infection in two genders were not significantly different among these common anorectal lesions($P>0.05$). **Conclusion** PCR and gene chip technology can detect single and multiple HPV genotypes in tissue samples of common anorectal lesions with high sensitivity and specificity, especially fit for study on molecular epidemiology of HPV infection in tissues of common anorectal lesions.

Key words: papillomaviridae; genotype; molecular biology; anal canal; rectum

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)主要分为高危和低危型两大类^[1-4], 因高危型 HPV 感染与宫颈癌、肛周癌、口腔癌等肿瘤的发生发展密切相关, 随着 HPV 基因检测设备及试剂的不断改进和优化, 对其研究逐步深入。由于 HPV 在肛周癌发生发展中起着重要的作用, 近年来, HPV 感染与肛门直肠病变的关系已引起人们的广泛关注和重视。本文采用基因扩增及基因芯片检测技术, 以 23 种常见的 HPV 作为感染源, 对 302 例肛门直肠组织进行 HPV 基因分型检测, 并对其感染基因谱分布情况进行比对研究。

1 资料和方法

1.1 一般资料 收集南京中医药大学第三附属医院全国肛肠医疗中心 2011 年 2 月 2013 年 2 月的 302 例肛门直肠常见病变的石蜡组织标本, 男性 197 例, 女性 105 例; 年龄 10~78 岁, 平均 42.79 岁, 其中, 10~19 岁 12 例, 20~29 岁 53 例, 30~39 岁 57 例, 40~49 岁 86 例, 50~59 岁 51 例, 60~69 岁 34 例,

70~79 岁 9 例。病理诊断由两位经验丰富的病理主治医师进行阅片诊断, 并复习其临床及病理资料。

1.2 仪器与试剂 HPV 基因分型检测试剂盒由深圳亚能生物技术有限公司提供, 基因扩增仪为新加坡生产的 Gene Amp 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。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 取 302 例肛门直肠常见病变的石蜡组织标本, 每例石蜡组织标本先去除其病变组织周边多余的石蜡, 将其石蜡组织切成 4 μm 厚的切片, 切 3~5 片石蜡组织即可。用专用的镊子轻轻夹取, 放入小离心管中, 切第 2 例石蜡组织前, 用次氯酸钠溶液擦刀片及镊子各 3 次。

^{*} 基金项目: 南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介: 吴崑崙, 女, 副主任中医师, 主要从事肛门直肠疾病 HPV 感染基因研究。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

1.3.2 DNA 的提取 将切下的石蜡组织片放入 1.5 mL 离心管中,加入裂解液 150 μ L,充分振荡混匀,在金属浴中加热 100 $^{\circ}$ C 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 μ L)3 000 r/min 离心 4 s后依次编号,分别加入 2 μ L 矿物油和已提取的 DNA 样品、空白对照、阳性对照各 5 μ L,反应体系总体积 27 μ L,3 000 r/min 离心 4 s,上机扩增。扩增条件为 50 $^{\circ}$ C 15 min;95 $^{\circ}$ C 10 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;42 $^{\circ}$ C 90 s;72 $^{\circ}$ C 30 s;共 40 个循环,72 $^{\circ}$ C 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 液和所有 27 μ L PCR 产物,拧紧管盖,将离心管放入沸水浴中变性 10 min,取出并立即放入 51 $^{\circ}$ C 杂交箱内杂交 1.5 h,同时取 50 mL 离心管,加入 50 mL B 液,于杂交箱预热。取出膜条,转移至已预热的 B 液中,51 $^{\circ}$ C 轻摇洗涤 5 min,将膜条转移至孵育液中室温孵育 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 液轻摇洗涤 2 min;显色液中显色至少 30 min;转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

1.3.5 统计学分析 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。

2 结 果

302 例肛门直肠常见病变组织中检出 HPV 阳性感染者 123 例,阴性者 179 例,总的 HPV 感染率为 40.73%(123/302)。一重感染率为 27.48%(83/302),多重感染率为 13.25%(40/302),其中,一重感染 83 例(6 型 2 例、11 型 1 例、16 型 12 例、18 型 41 例、31 型 11 例、33 型 7 例、35 型 3 例、52 型 1 例、56 型 1 例、58 型 2 例、59 型 1 例、81 型 1 例);二重感染 19 例(16+18 型 1 例、16+33 型 4 例、16+58 型 1 例、18+31 型 5 例、18+33 型 2 例、18+43 型 1 例、18+56 型 1 例、18+81 型 1 例、31+33 型 2 例、33+43 型 1 例);三重感染 10 例(11+16+31 型 1 例、16+18+33 型 3 例、16+31+33 型 1 例、18+31+33 型 4 例、18+33+52 型 1 例);四重感染 5 例(11+16+18+33 型 1 例、11+18+31+33 型 1 例、11+18+33+43 型 1 例、16+18+31+33 型 2 例);五重感染 5 例(11+16+18+33+43 型 1 例、16+18+31+33+43 型 2 例、16+18+31+33+58 型 1 例、16+31+33+35+43 型 1 例),六重感染 1 例(16+18+31+33+43+58 型 1 例)。302 例男性和女性肛门直肠常见病变 HPV 总感染阳性率、一重感染阳性率和多重感染阳性率比较差异无统计学意义(χ^2 为 0.00~2.35, $P>0.05$)。302 例两性 HPV 总阳性人数、一重和多重感染人数及百分比对比见表 1,7 种肛门直肠常见病变中 HPV 感染率之间比较差异无统计学意义(χ^2 为 0.01~4.11, $P>0.05$)见表 2,肛门直肠常见病变中 13 种 HPV 感染基因型别出现频率见表 3。对多重感染者,各型别的阳性率重复计算。

表 1 302 例男性和女性肛门直肠常见病变 HPV 检测阳性结果比较[n(%)]				
性别	<i>n</i>	总阳性数	一重人数	多重人数
男性	197	74(37.56)	50(25.38)	24(12.18)
女性	105	49(46.67)	33(31.43)	16(15.24)
总计	302	123(40.73)	83(27.48)	40(13.25)

表 2 302 例肛门直肠常见病变 7 种不同病变中 HPV 感染率的比较				
病变种类	<i>n</i>	阳性数	阴性数	阳性率(%)
肛瘘	91	34	57	37.36
内痔	21	12	9	57.14
肛乳头状瘤	11	6	5	54.55
外痔	60	25	35	41.67
肛裂	17	8	9	47.06
混合痔	71	29	42	40.85
肛周脓肿	31	9	22	29.03
总计	302	123	179	40.73

表 3 13 种 HPV 型别在肛门直肠常见病变中的感染分布情况					
HPV 型别	阳性数(<i>n</i>)	百分比(%)	HPV 型别	阳性数(<i>n</i>)	百分比(%)
18	70	34.65	35	4	1.98
33	36	17.82	6	2	0.99
16	32	15.84	52	2	0.99
31	32	15.84	56	2	0.99
43	8	3.96	81	2	0.99
11	6	2.97	59	1	0.50
58	5	2.48	总计	202	100.00

3 讨 论

HPV 是一类庞大且古老的病毒,现已发现 HPV 有 200 多个型别、亚型及变异体^[5]。由于人们都把目光主要集中在女性生殖道疾病的 HPV 研究上,迄今为止,直肠、肛管及肛门区 HPV 感染的专题研究非常少见,全世界尚无确切可靠的肛门直肠 HPV 感染的分子流行病学的大样本的研究资料。目前 HPV 基因检测是捕获 HPV 感染的最好的方法,基因扩增结合基因芯片检测技术是所有 HPV 基因检测方法中通量高分型的一项检测技术。至今为止,HPV 是人类肿瘤发病中惟一可以完全确认的致瘤致癌病毒。现今的研究已经证实,肛周癌与宫颈癌具有非常相似发病原因,都与 HPV 感染密切相关^[1,6-7]。因此,弄清楚肛门直肠病变中 HPV 感染率及基因型分布情况非常重要,这对肛周癌的防控具有非常深远的意义。

HPV 的传播途径一般分为直接和非直接性接触传染两大传播途径。性接触部位微小的创伤就可促进感染,人类的 3 种上皮(皮肤、黏膜、化生上皮)对 HPV 感染都敏感。当含有大量 HPV 颗粒的脱落表层细胞或角质蛋白碎片进入易感的上皮裂隙中时,感染就可发生。研究表明,HPV 感染在健康人群及性活跃的男女中是常见的,男女之间可通过性活动和皮肤或间接接触,以至于相互传播而感染。HPV 感染与肛门直肠尖锐湿疣、低-高级别的上皮内瘤变和浸润性鳞状细胞癌的发生密切相关^[1,8]。

从本文的研究结果来看,302 例肛门直肠常见病变组织中 23 种 HPV 基因型检出了 13 种型别(包括 6、11、16、18、31、33、35、43、52、56、58、59、81 型)。提示:(1)302 例肛门直肠常见病

变中有单一型别的 HPV 感染,也有混合型别的 HPV 感染,以一重感染为主,多重感染为辅,说明肛门直肠常见病变男女患者中一重感染类型较丰富,而多重感染呈现出不断增加的趋势,出现了较为少见的六重感染。(2)肛门直肠常见病变中一重(83 例)和多重(40 例)感染之比为 2.08 : 1,比国内一般女性群体宫颈一重和多重 HPV 感染之比 3 : 1 要低得多,这说明肛门直肠常见病变中多重感染的增加超过了一重感染的增加,HPV 感染多重化的趋势在不断上升。(3)肛门直肠常见病变中一重感染前 12 位依次为 18 型(41 例),16 型(12 例),31 型(11 例),33 型(7 例),35 型(3 例),6 和 58 型(各 2 例),11 型、52 型、56 型、59 型和 81 型(各 1 例),说明肛门直肠常见病变中一重 HPV 感染 18 型是最优势型别,占一重感染的 49.40%(41/83),约半数。从各型别 HPV 感染出现频率来看,前 5 位 HPV 型别分别是 18、33、16、31、43 型,它们占总出现频率的 88.12%,因此,我国在研制疫苗时应考虑包括 31、33 和 43 型,这样就可保护 88.12%肛门直肠常见病变的易感人群,绝大多数患者可从中受益。(4)由于 HPV 的致病型别在不同的国家和地区以及各民族之间都存在着一定的差异性,而且 HPV 在一般人群中也有着存在着一个感染流行的平衡问题,也就是说 HPV 感染由高流行区域向低流行区域流动。这种 HPV 感染的差异性值得笔者对江苏省各地区肛门直肠常见病变 HPV 感染率进行逐一对比研究,以弄清楚 HPV 在各地区的感染率及其规律。以便为 HPV 流行趋势的预测、HPV 疫苗及试剂的研发,甚至政府部门对公共卫生政策的决策提供数据资料和参考。(5)因 HPV 感染诱发人体鳞状细胞上皮内瘤变(SIL)的病理组织学表现最常发生在肛管和宫颈管上皮的移行区,即柱状上皮(腺上皮)和鳞状上皮交界处,肛管和宫颈管都属于腔道系统,同时又具有温暖潮湿的环境、容易发生损伤和破溃而感染 HPV,这就给 HPV 感染提供了极佳的环境和条件,这可能与这些部位具有共同的组织胚胎学起源有关。当 HPV 感染破损的皮肤黏膜时,大多数 HPV 感染是一过性的,只有少数为持续性的,对持续性 HPV 感染者来说,一旦机体免疫力下降或遇到协同的致癌致瘤因子时,潜伏的 HPV 被激活,恢复活动,致瘤致癌^[6,9]。(6)123 例肛门直肠常见病变 HPV 感染患者中有 120 例(除 6 型 2 例,11 型 1 例外)都有或伴有高危型 HPV 型别,占受检者 HPV 感染者的 97.56%(120/123),为绝大多数,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、肛门直肠癌及外生殖道癌的重要诱因。因此,对肛门直肠开展 HPV 检测,尤其是对高危型别 HPV 行追踪检测就显得非常必要。一旦他(她)们成为持续性 HPV 感染者,就可成为 HPV 的重要传染源。原则上一旦检测出持续性 HPV 感染者,就应对其行 HPV 管理和干预治疗。

本研究表明直肠、肛管及肛门区是又一个 HPV 高感染部位(HPV 储存部位),HPV 感染很可能是直肠、肛管及肛门区良、恶性肿瘤的致瘤致瘤因子,同时也为开展直肠、肛管及肛门区恶性肿瘤的病因学研究提供了新的思路和证据。由于 HPV

可在两性之间互相传播,所以,有学者强调应该给男孩接种宫颈癌疫苗,如果给男孩接种宫颈癌疫苗,预防的效果比只给女孩接种还要好,这是因为男人在 HPV 传播上起到非常重要的作用,因此,给男孩接种宫颈癌疫苗不仅可防止他们今后将其病毒传染给性伴侣,同时还可帮助他们预防生殖器官和肛门直肠等部位发生的癌变。通过给男孩和女孩接种宫颈癌疫苗,对性活跃期的男女行 HPV 监控,对 HPV 持续性感染者给予及时管理和治疗,并在性事时采用安全套等措施,这样就可以降低两性的 HPV 感染率。如果政府将这些措施都能够落实到位,HPV 感染相关的癌瘤将会逐渐减少,同时我们应该对肛门直肠常见病变、癌前病变及癌组织进行 HPV 感染多中心大样本的基因研究,以弄清 HPV 感染与此部位组织癌变的关系,为肛门直肠恶性肿瘤的防治提供科学的依据^[1,10-12]。

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] 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.
- [4] 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.
- [5] 魏谨,耿建祥,朴正爱,等.已婚女性宫颈细胞中人乳头瘤病毒感染的基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2012,22(23):5202-5205.
- [6] 张金浩,耿建祥,吴崑崙,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.
- [7] 张金浩,耿建祥,樊志敏,等.肛管及肛门区尖锐湿疣组织中乳头瘤病毒基因类型的研究[J].医学研究生学报,2011,24(11):1129-1132.
- [8] 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.
- [9] 刘万里,耿建祥,樊志敏,等.肛管及结直肠恶性肿瘤中人乳头瘤病毒 16/18 型感染的基因分析[J].医学研究生学报,2011,24(10):1030-1034.
- [10] Etienney I, Vuong S, Si-Mohamed A, et al. Value of cytologic papanicolaou smears and polymerase chain reaction screening for human papillomavirus DNA in detecting anal intraepithelial neoplasia[J]. Cancer, 2012, 15(12):6031-6038.
- [11] 耿建祥,樊志敏,丁义江,等.805 例肛门直肠常见病变中人乳头瘤病毒 16 型和 18 型感染率的分析[J].中华胃肠外科杂志,2011,14(12):958-960.
- [12] McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2):195-208.

(收稿日期:2013-05-20)