

• 临床检验研究论著 •

肛门、直肠常见病变中 HPV 感染的研究*

梁晓东¹, 张莉莉², 耿建祥^{2△}, 吴崑崙², 张金浩², 张建强², 薛雅红², 王宏景², 赵 雪²

(1. 盐城市第三人民医院病理科, 江苏盐城 224001; 2. 南京中医药大学第三附属医院
病理科/江苏省 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

摘要:目的 探讨肛门、直肠常见病变组织中人乳头状瘤病毒(HPV)感染的情况。方法 采用基因扩增结合基因芯片技术对 566 例肛门、直肠常见病变组织标本进行 HPV 基因分型检测。结果 566 例肛门、直肠常见病变组织中, 总 HPV 感染率为 32.86%(186/566); 男性总 HPV 感染率、一重感染率和多重感染率分别为 32.14%(117/364)、23.35%(85/364)及 8.79%(32/364), 与女性[分别为 34.16%(69/202)、24.75%(50/202)及 9.41%(19/202)]比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), HPV 18、16、33、31 型是肛门、直肠常见病变中的主要型别。结论 肛门、直肠组织 HPV 基因分型检测对肛门、直肠 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; 基因型; 直肠疾病; 肛门疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)09-1107-03

Study of HPV infection in common anus and rectal disease*

Liang Xiaodong¹, Zhang Lili², Geng Jianxiang^{2△}, Wu Kunlan², Zhang Jinhao²,

Zhang Jianqiang², Xue Yahong², Wang Hongjing², Zhao Xue²

(1. Department of Pathology, the Third People's Hospital of Yancheng, Yancheng, Jiangsu 224001, China;

2. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine/HPV Collaborative Group of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: **Objective** To study the human papilloma virus(HPV) infection in lesion tissues of patients with common anus and rectal disease. **Methods** Gene amplification combined with gene chip technology were employed to conduct genotyping test in lesion tissue of 566 patients with common anus and rectal disease. **Results** In lesion tissues of 566 patients with common anus and rectal disease, the overall HPV infection rate was 32.86%(186/566). In male patients, the overall HPV infection rate, monopole infection rate and multiple infection rate were 32.14%(117/364), 23.35%(85/364) and 8.79%(32/364), respectively, which showed no statistically significant difference with female[34.16%(69/202), 24.75%(50/202) and 9.41%(19/202), respectively] ($P>0.05$). HPV 18, 16, 33, 31 types were the main types of common anus and rectal disease. **Conclusion** HPV genotyping test of anus and rectum tissues is important for molecular epidemiological studies of HPV infection in anus and rectum.

Key words: Papillomavirus; genotype; anus diseases; rectal diseases

人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是一类古老的病毒, 现已发现其有 200 多个型别、亚型及变异体^[1-4]。由于人们把目光主要集中在女性生殖道疾病的 HPV 研究上, 目前, 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研究资料。现研究证实, 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^[1,5-9]。本文采用基因扩增结合基因芯片检测技术, 以 23 种常见的 HPV 作为感染源, 对 566 例肛门直肠常见病组织进行 HPV 基因分型检测, 并对两性中 HPV 感染基因谱的分布情况进行比对研究。

1 资料与方法

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 月至 2013 年 10 月的 566 例肛门、直肠常见病变的石蜡组织标本, 其中, 男 364 例, 女 202 例; 年龄 10~84 岁, 平均 42.40 岁; 10~<20 岁 21 例(男 18 例, 女 3 例),

20~<30 岁 110 例(男 63 例, 女 47 例), 30~<40 岁 109 例(男 81 例, 女 28 例), 40~<50 岁 152 例(男 94 例, 女 58 例), 50~<60 岁 92 例(男 54 例, 女 38 例), 60~<70 岁 65 例(男 41 例, 女 24 例), 70~<80 岁 17 例(男 13 例, 女 4 例)。病理诊断由 2 位经验丰富的病理主治医师阅片诊断, 并复习其临床及病理资料。

1.2 主要试剂与仪器 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; 主要仪器: Gene Amp 2400 型聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪(美国 ABI 公司)、FYY-3 型分子杂交仪(江苏省兴化市分析仪器厂)、Eppendorf 5810R 台式高速大容量冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)及苏净安泰 BHC-1300 II A2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.3 标本的采集 随机取 566 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

* 基金项目: 南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介: 梁晓东, 男, 主治医师, 主要从事消化道疾病 HPV 感染基因的研究工作。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

蜡,将其石蜡组织切成 4 μm 厚的切片 3~5 片。

1.4 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 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,取中间层 DNA 溶液待用。

1.5 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:50℃ 15 min,95℃ 10 min,94℃ 30 s,42℃ 90 s,72℃ 30 s,共 40 个循环;72℃ 5 min。

1.6 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×柠檬酸钠缓冲液、0.1%十二烷基硫酸钠)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,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×柠檬酸钠缓冲液、0.1%十二烷基硫酸钠),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;显色液中显色至少 30 min;转移至去离子水中浸泡,即可观察结果。

1.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,男女各组 HPV 感染率及各 HPV 型别的比例采用 HPV 分型统计软件(南京倍宁医疗器械有限公司)进行分析,计数资料用率表示,率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

566 例肛门、直肠常见病变组织中检出 HPV 感染 186 例,阴性 380 例,总 HPV 感染率为 32.86%(186/566);一重感染 135 例(男 85 例,女 50 例),多重感染 51 例(男 32 例,女 19 例);二重感染 27 例(男 15 例,女 12 例);三重感染 11 例(男 11 例,女 0 例);四重感染 7 例(男 4 例,女 3 例);五重感染 5 例(男 2 例,女 3 例);六重感染 1 例(男 0 例,女 1 例)。男性总 HPV 感染率、一重感染率和多重感染率[分别为 32.14%(117/364)、23.35%(85/364)及 8.79%(32/364)]与女性[分别为 34.16%(69/202)、24.75%(50/202)及 9.41%(19/202)]比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两性 7 种肛门、直肠常见病变中的 HPV 感染见表 1,肛门、直肠常见病变中 18 种 HPV 感染基因型别出现频率见表 2。

表 1 566 例男、女性肛门、直肠常见 7 种不同病变中 HPV 感染的比较				
病变种类	女性		男性	
	<i>n</i>	阳性[<i>n</i> (%)]	<i>n</i>	阳性[<i>n</i> (%)]
肛痿	23	7(3.47)	148	47(12.91)
内痔	13	5(2.48)	24	12(3.30)
肛乳头状瘤	24	6(2.97)	10	2(0.55)
外痔	60	18(8.91)	48	18(4.95)
肛裂	14	6(2.97)	16	4(1.10)
混合痔	56	23(11.39)	73	25(6.87)
肛周脓肿	12	4(1.98)	45	9(2.47)
总计	202	69(34.16)	364	117(32.14)

表 2 18 种 HPV 型别在男、女性肛门、直肠常见病变中的感染分布情况				
HPV 型别	女性		男性	
	阳性次数(<i>n</i>)*	百分比(%)	阳性次数(<i>n</i>)*	百分比(%)
18	41	38.32	70	40.23
16	18	16.82	32	18.39
33	13	12.15	24	13.79
31	11	10.28	22	12.64
43	5	4.67	3	1.72
11	4	3.74	4	2.30
58	3	2.80	2	1.15
81	2	1.87	3	1.72
6	1	0.94	3	1.72
35	2	1.87	2	1.15
52	1	0.94	2	1.15
53	1	0.94	2	1.15
51	0	0.00	2	1.15
56	2	1.87	0	0.00
59	0	0.00	2	1.15
73	2	1.87	0	0.00
42	1	0.94	0	0.00
68	0	0.00	1	0.58

*:对多重感染者,各型别的阳性次数重复计算。

3 讨 论

目前,HPV 已成为肿瘤病因学研究的热点,人类的许多良、恶性肿瘤与 HPV 感染有着密切的关系,现全世界有 5.5% 的癌症与 HPV 感染有关^[1,7,9]。随着人们对 HPV 研究的深入,其型别的不断发现,人们逐渐认识到某些特定 HPV 型别与某种疾病或人体某个特定部位的病变及病变性质有关,且不同疾病可由某一种或多种 HPV 型别引起,某一种 HPV 型别也可引起不同疾病。在 HPV 导致的良、恶性病变中,最常见的是宫颈、肛门、生殖器和皮肤的病变^[1,10,11]。因此,弄清肛门、直肠常见病变中 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 主要通过皮肤或黏膜接触传播,也可通过接触该病毒污染的物品间接传播,由于离体 HPV 很难长期存活,与性传播相比,间接传播途径只占少数,多数 HPV 感染来源于 HPV 感染者。HPV 传播通常是在性交或肛交时经过生殖器的接触而传播,有性生活的男女在数年里仍可以携带 HPV,现认为 HPV 感染相关病变为性传播疾病。由于 HPV 极易在性伴侣间传播,大多数感染者并没有意识到他们已经感染了 HPV 或他们正将 HPV 传染给性伴侣^[1,12-14]。因此,对有性生活的男女开展宫颈外的 HPV 基因检测,对了解其他部位的 HPV 感染情况及该部位癌瘤的防控意义重大。

从研究显示,566 例肛门、直肠常见病变组织中检出了 18 种 HPV 基因型别,提示:(1)两性肛门、直肠常见病变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;(2)肛门、直肠常见病变中虽然 HPV 多重感染呈现不断增加趋势,但一重感染仍是 HPV 感染的主流;(3)两性肛门、直肠常见病变中以高危型 HPV 感染为主,低危型 HPV 感染为辅,18 型是最优势型别,两性出现频率都排位第一;(4)两性肛门、直肠常见病变的 HPV 感染最主要的型别是 18、16、33、31、11、43(6、81)和宫颈癌瘤中 HPV 感染最主要的型别相似;(5)因 HPV 感染诱发人体鳞状细胞上皮内瘤变和癌变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,肛管和宫颈管一

样都有一个连接腺上皮和鳞状上皮的移行区,该区温暖潮湿、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,这是该区容易感染 HPV 并发生癌变的主因^[1,11-13]; (6)566 例肛门、直肠常见病变中,HPV 感染者中有 186 例有高危型 HPV 型别,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器癌的重要诱因^[1,7,13]。因此,对肛门直肠开展 HPV 分型检测,尤其是对高危型别 HPV 行追踪检测就显得非常必要; (7)男女性 HPV 总感染率、一重感染率和多重感染率的差异无统计学意义,提示 HPV 感染在两性肛门、直肠常见病变人群中无性别上的差异性。

肛门鳞状细胞癌是一种少见的恶性肿瘤,但是在感染了 HIV 的男性中已是第四大常见的恶性肿瘤。女性肛门癌比男性更为常见。大多数情况下,肛门 HPV 感染是通过性传播实现的,肛门肿瘤中 HPV 的高检出率是导致肛门癌的必要因素。如何降低 HPV 在两性之间的传播,是逐渐减少 HPV 感染相关癌瘤发生的关键,同时应对肛门、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^[1,12-15]。

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.
- [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.人乳头状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瘤病毒基因的分型[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):817-818.
- [5] 任晓慧,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):1542-1544.
- [6] 李海,耿建祥,张劲松,等.宫颈 HPV 感染基因型分布比较研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(19):2319-2320.
- [7] 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的基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2012,22(23):5202-5205.
- [8] 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.
- [9] 张金浩,耿建祥,吴崑崙,等.结直肠肿瘤中人乳头瘤病毒感染的基因分析[J].医学研究生学报,2011,24(2):154-157.
- [10] 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.
- [11] 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(Suppl 10):S17-28.
- [12] 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.
- [13] 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: comparison with histology of a surgical sample[J]. Cancer, 2012, 118(24):6031-6038.
- [14] 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.
- [15] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2):195-208.

(收稿日期:2014-02-26)

(上接第 1106 页)

总之,NHL 检测在细菌感染的早期诊断、病程监测、用药指导等方面都发挥着重要的作用。细菌培养及微生物敏感性试验虽受检测条件的影响,其检出率较低,但二者仍是细菌感染诊治的重要依据。HNL 联合细菌培养对于细菌感染的早期确诊及治疗中抗菌药的合理选用具有积极作用。

参考文献

- [1] 王红梅,贾芙蓉,盛岩,等.人中性粒细胞脂蛋白快速定量 ELISA 检测方法的建立[J].中国生物制品学杂志,2010,23(4):434-436.
- [2] 杨泽平,聂国明,邹敏书.中性粒细胞脂钙素在儿童急性细菌感染中的临床意义[J].临床荟萃,2008,23(20):1491-1493.
- [3] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis[J]. N Engl J Med, 2001, 344(10):699-709.
- [4] Xu SY, Petersson CG, Carlson M, et al. The development of an assay for human neutrophil lipocalin (HNL)——to be used as a specific marker of neutrophil activity in vivo and vitro[J]. J Immunol Methods, 1994, 171(2):245-252.
- [5] Xu SY, Carlson M, Engström A, et al. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary

- granules of human neutrophils[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1994, 54(5):365-376.
- [6] Xu SY, Pauksen K, Venge P. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1995, 55(2):125-131.
- [7] Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1482(1/2):298-307.
- [8] 张红运.老年肺炎临床治疗观察[J].中国现代药物应用,2010,4(9):103-104.
- [9] 徐静,何春琳,李琦.降钙素原监测在呼吸重症疾病中的研究进展[J].四川医学,2011,32(3):430-432.
- [10] Fjaertoft G, Foucard T, Xu S. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a diagnostic tool in children with acute infections: a study of the kinetics[J]. Acta Paediatr, 2005, 94(6):661-666.
- [11] Björkqvist M, Källman J, Fjaertoft G, et al. Human neutrophil lipocalin: normal levels and use as a marker for invasive infection in the newborn[J]. Acta Paediatr, 2004, 93(4):534-539.
- [12] 李彦华,王士雯,杜文津.血清降钙素原及 C-反应蛋白在诊断老年脓毒症中的应用[J].中国综合临床,2004,20(1):1-2.

(收稿日期:2013-12-21)