

• 论 著 •

女性肛门及肛管尖锐湿疣组织 HPV 感染基因型谱的分析*

张金浩¹, 蔡为民², 耿建祥^{2△}, 夏 林², 王宏景², 吴崑崙², 邵 馨², 梅 静², 赵 雪²

(1. 南京中医药大学第三附属医院全国肛肠医疗中心, 江苏南京 210001;

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 探讨女性肛门及肛管尖锐湿疣组织中人乳头瘤病毒(HPV)感染的基因型别及其临床意义。方法 从 140 例女性肛门及肛管尖锐湿疣(CA)石蜡组织标本中提取 23 种 HPV-DNA, 采用基因扩增结合基因芯片技术对其组织进行 23 种 HPV 基因型别的检测, 并对其患者进行临床病理资料分析。结果 140 例女性肛门及肛管 CA 组织标本中检出 HPV 阳性者 103 例, 总的 HPV 感染率 73.57%(103/140)。其中一型 HPV 感染 68 例, 阳性检出率为 48.57%(68/140), 多型 HPV 感染 35 例, 阳性检出率为 25.00%(35/140)。一型 HPV 感染中 HPV11 型为 34 例, 阳性检出率为 24.29%(34/140), HPV11 型是最主要的感染型别; 其次是 HPV6 型, 共有 27 例, 其阳性检出率为 19.29%(27/140)。多型 HPV 感染中, HPV6+11 型 13 例, 占多型感染的 37.14%(13/35), 是多型感染的主要型别; 其次是 HPV11+18 型和 HPV6+11+16 型各 3 例, 各占多型感染的 8.57%(3/35)。结论 HPV6 型、11 型、6+11 型、11+18 型和 6+11+16 型感染是女性肛门及肛管 CA 的主要致病类型。基因扩增结合基因芯片技术是一种比较适合临床开展 HPV 分型检测的诊断方法, 其敏感性高, 特异性好。尤其适合 HPV 感染的分子流行病学的研究。

关键词: 肛门及肛管; 尖锐湿疣; 人乳头瘤病毒; 基因型别; 基因芯片技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)01-0030-03

Analysis of genotype spectrum in condyloma acuminata tissues HPV infection of female anus and anal canal

Zhang Jinhao¹, Cai Weimin², Geng Jianxiang², Xia Lin², Wang Hongjing², Wu Kunlan², Shao Xin¹, Mei Jing², Zhao Xue²

(1. National Anal and Colorectal Medical Center of Chinese Medicine, Third Affiliated Hospital of Nanjing

Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210001, China; 2. Department of Pathology,

Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University/ Jiangsu Provincial

HPV Collaboration Group, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: **Objective** To study the genotypes of human papillomavirus (HPV) infection in female anus and anal canal condyloma acuminata(CA) tissues and their clinical significance. **Methods** 23 kinds of HPV-DNA were extracted from the paraffin-embedded anus and anal canal tissue samples in 140 cases of female CA and detected by using PCR combined with the gene-chips technique. Furthermore the related clinical pathological data of the patients were analyzed. **Results** Among 140 female anus and anal canal CA tissue samples, 103 cases were HPV positive and the total HPV infection rate was 73.57%(103/140). Among them, 68 cases were single type HPV infection, the positive detection rate was 48.57%(68/140) and 35 cases were multiple types HPV infection, the positive detection rate was 25.00%(35/140). In single type HPV infection, 34 cases were HPV11 and the positive detection rate was 24.29%(34/140), HPV11 was the main infection type, followed by HPV 6 in 27 cases, its positive detection rate was 19.29%(27/140). In the multiple types HPV infection, 13 cases were HPV 6+11, accounting for 37.14%(13/35) of multiple types infection, followed by HPV11+18 in 3 cases and HPV 6+11+16 in 3 cases, each accounting for 8.57%(3/35) of the multiple types infection. **Conclusion** HPV 11, 6, 6+11, 11+18 and 6+11+16 are the main infection genotypes in female anus and anal canal CA. PCR combined with the gene-chips technique is a diagnostic method more suitable for clinical development of HPV genotyping detection, which has high sensitivity and good specificity and is especially suitable for the molecular epidemiology study of HPV infection.

Key words: anus and anal canal; condyloma acuminata; human papillomavirus; genotype; gene-chips technique

尖锐湿疣(CA)是由人乳头瘤病毒(HPV)感染而引起的外生殖器、会阴、宫颈及肛门等部位鳞状上皮瘤样增生性病变。由于此类病变的常见性、易反复发作性、致癌性已引起人们的广泛关注^[1-3]。由于 HPV 有众多的型别, 为了解女性肛门及肛管 CA 患者组织中 HPV 感染的基因型, 以便给临床诊断和治疗提供正确可靠的基因背景资料, 现对女性患者临床病理诊

断为符合尖锐湿疣的组织进行 HPV 基因分型检测, 以探讨 23 种 HPV 在女性肛门及肛管 CA 中基因谱的分布情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 1985 年 1 月至 2014 年 5 月南京市中医院、徐州市中医院和常州市中医院肛肠科 30 年来手术切除的 140 例女性肛门及肛管 CA 病变的常规石蜡组织标本, 最大年

* 基金项目 江苏省南京市卫生局中医专项资助项目(2009-92)。 作者简介: 张金浩, 男, 副主任中医师, 主要从事 HPV 感染相关性疾病的
研究。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

龄 74 岁,最小年龄 17 岁,平均 37.17 岁,发生于肛管的 CA 15 例,发生于肛门的 CA 125 例。另取 10 例女性肛门外痔常规石蜡组织的痔旁正常鳞状上皮标本作为对照,其最大年龄 61 岁,最小年龄 18 岁,平均 42.10 岁。由 2 位经验丰富的主治病理医师结合临床和病理作出符合肛门及肛管 CA 的诊断。

1.2 仪器与试剂 AB Applied Biosystems 2720 型基因扩增仪购自新加坡 Perkin elmer 公司;Combi-H12 型分子杂交仪购自韩国 Finepcr 公司;Eppendorf 5810R 型高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;BSC2A2-1102 购自上海瑞仰净化装备公司;HPV 分型基因检测试剂盒购自亚能生物技术深圳公司。每次实验时需当时配制显色液,浓度用蒸馏水调配。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集 取 140 例女性肛门及肛管 CA 病变的常规石蜡组织标本及 10 例女性肛门外痔石蜡组织的痔旁正常鳞状上皮标本,对 CA 及痔旁正常鳞状上皮石蜡组织切片,切片厚度为 4 μm,切 5~8 片。切后的石蜡组织切片用小镊子夹取,一定要轻夹,将其夹入小离心管内,如再切后面组织时,要用含有次氯酸钠液的棉签来回擦刀片及小镊子各 2~4 次。

1.3.2 提取 DNA 将装有石蜡组织切片的待测小离心管(1.5 mL)取出,用移液器吸取 150 μL 的裂解液加入管内,放在振荡器上充分混匀,混匀后将小管放入 1 000 ℃的金属浴中约 10 min,随后 13 000 r/min 离心 10 min,离心后用移液器吸取中层 DNA 溶液待测。整个实验操作步骤按照说明书进行。

1.3.3 判定结果 (1) 观察膜条时每例膜条上都应该在 PC 点显出蓝圆点;(2) 除 PC 点外,阴性质控品不应该在其他点上出现蓝圆点;(3) 除 PC 点外,阳性质控品应该在某位置上出现蓝圆点;(4) 除 PC 点外,膜条上还有 23 个 HPV 型别位点。如杂交阳性时,用肉眼可观察到某位置上出现小蓝色圆点;(5) 除 PC 点外如观察到 1 个蓝色圆点为一型感染,看到 2 个蓝圆点为二型感染,同时显示 2 个以上的蓝圆点为多型感染。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件包进行统计学分析,组间比较采取 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

10 例女性肛门外痔常规石蜡组织的痔旁正常鳞状上皮标本,23 种 HPV 基因分型检测阳性者为 2 例,其中 HPV6 型 1 例,HPV18 型 1 例,阳性率为 20.00%(2/10);140 例女性肛门及肛管 CA 患者中,23 种 HPV 基因分型检测阳性者 103 例,阴性者 37 例,HPV 感染率 73.57%(103/140),一型 HPV 感染 68 例,占总 HPV 感染率的 48.57%(68/140);一型感染中 HPV11 型为 34 例,其阳性检出率为 24.29%(34/140),是最主要的型别;其次 HPV6 型为 27 例,其阳性检出率为 19.29%(27/140);多型 HPV 感染 35 例,其阳性检出率为 25.00%(35/140),其中 HPV6+11 型 13 例,占多型感染的 37.14%(13/35)是多型感染的主要型别,其次是 HPV11+18 型和 HPV6+11+16 型各 3 例,各占多型感染的 8.57%(3/35)。单一型感染依次为:11 型 34 例,6 型 27 例,16 型 4 例,18 型 2 例,53 型 1 例;二型感染依次为:6+11 型 13 例,6+16 型 1 例,6+18 型 1 例,11+16 型 2 例,11+18 型 3 例,11+33 型 1 例,11+43 型 1 例,11+58 型 1 例,11+59 型 2 例,16+18 型 1 例,16+31 型 1 例;三型感染依次为:6+11+16 型 3 例,6+52+73 型 1 例,6+55+68 型 1 例;四型感染依次为:6+11+16+33 型 1 例,6+11+16+66 型 1 例,11+18+51+81 型 1 例。

见表 1。

表 1 140 例女性肛门及肛管 CA 患者 HPV 感染情况(n)

HPV 感染类型	女性总人数	该型人数	非该型人数
单一型	140	68	72
混合二型	140	28	113
混合三型	140	5	135
混合四型	140	3	137

女性肛门及肛管 CA 组织中 HPV 总感染率与女性肛门外痔旁正常鳞状上皮中 HPV 总感染率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 HPV 单一型和二、三、四型混合型感染之间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。HPV 三和四型混合型感染之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

CA 是一种常见且由性传播引起的疾病,临床上把它称之为性病。随着人们对 HPV 感染相关疾病研究的不断深入,此类感染性疾病已逐渐引起民众的广泛关注和重视。绝大多数学者现已把基因诊断作为病毒感染性疾病诊断的金标准。目前,临床病理对 CA 的诊断主要是采用临床病史、组织形态学加病毒基因检测结合的诊断模式^[1,3]。

CA 主要通过性行为的方式经过损伤的皮肤和黏膜直接接触传播,间接接触是感染 HPV 诱发 CA,与前者相比,此传播途径为非主流传播途径。HPV 具有嗜上皮的特性,感染上皮后寄生在皮肤和黏膜上皮细胞中,且待机致病。至今 HPV 尚未在体外培养成功,临床上主要通过采集患者的细胞和组织来对该病毒进行基因诊断^[4-7]。人体的温暖、潮湿部位是 HPV 最爱寄生的地方,它们在此生存和繁殖,且诱发相关疾病。女性 CA 发生率依次为大小阴唇、阴道口、阴道、阴蒂、后联合、宫颈、会阴和肛周,偶见乳房、腋窝、脐窝和趾间等部位,如常行肛交和口交的女性可发生于肛门、肛管、直肠和口腔等部位^[8-10]。尽管 CA 是常见疾病,但在中国直到上世纪 80 年代后期才开始逐步报道,近年来发病患者数明显增多,发病率逐年升高,已成为我国第 2 位的性传播疾病^[1,3]。

本文 CA 组织中检测出了 17 种型别的 HPV,它们分别是 6、11、16、18、31、33、43、51、52、53、55、58、59、66、68、73、81 型。所检测出的 HPV 型别占 23 种 HPV 型别的 73.91%。本研究显示,女性肛门及肛管 CA 患者组织中 HPV 感染以低危型为主,低高危型和高危型为辅,采用单一型(低危型和高危型)一次计算,混合型重复计算的原则,低危型出现频率为 114 次,高危型出现频率为 35 次,低危型:高危型=3.26:1,符合既往报道的低危型 HPV 感染是引起生殖道及肛周皮肤的外生性湿疣类病变的主要病因^[10-12]。103 例 HPV 阳性的女性 CA 患者中,28 例有或伴有高危型 HPV 感染,而高危型别的 HPV 感染往往是导致人体恶性肿瘤的重要诱发因素,也是引发宫颈癌、肛门癌、外生殖器癌及女性 CA 癌变的主要诱因。在 HPV 传播上,男性起主动和关键的作用,因此,对 HPV 阳性的男性要给予行之有效的管理和治疗^[3,11-12]。本研究表明女性的肛门及肛管是 HPV 的又一个高感染区,也是 HPV 的又一个易感部位,肛门及肛管癌与 HPV 持续性感染密切相关,女性肛门癌的发病比男性更为常见,值得对女性肛门及肛管癌的深入研究。女性肛门及肛管 CA 治疗后易复发,与其发病部位与周

围皮肤中是否存有 HPV 有关。现已发现 CA 患者尿道内 HPV 阳性率 60%, 阴囊阳性率 22%, 这些部位是 HPV 的潜在储存库, 也是外阴 HPV 的散布源。现认为 HPV 潜伏感染是 CA 复发的主要原因之一, 目前认为 CA 的复发主要与亚临床 HPV 感染的存在和再活动有关。由此可见, 要降低女性肛门及肛管 CA 治疗后的复发率, 除了切除 CA 病灶外, 如何彻底清除 CA 病灶周围皮肤中的 HPV 潜伏感染和亚临床 HPV 感染是预防 CA 复发的关键问题所在。从女性肛门及肛管 CA 组织 HPV 感染基因谱的流行趋势来看, 从 1985 年收治的第 1 例 HPV11 型感染, 到 1999 年发现第 1 例 HPV6+11+16+66 型感染, 其 HPV 基因流行谱的渐变过程提示女性肛门及肛管 CA 组织中 HPV 感染从一型到二型感染, 再逐渐发展到三型和四型感染。大量的流行病学资料表明, CA 与生殖器癌的发生密切相关, 特别是 HPV16、18 引起的 CA。有研究发现外阴部 CA 经 5~40 年后可能会转化为鳞状细胞癌、阴茎癌、女阴癌等^[13]。

总之, 自上个世纪 70 年代以来, 随着中国改革开放的进行, 社会发生了巨大的变化, 尤其是人们性行为方式的改变, 曾经在中国销声匿迹的性病死灰复燃。目前, 中国正面临着男男同性恋及男双性同性恋人群、暗娼人群、婚外情人群、艾滋病患者群中 HPV 感染比例高的压力。如果成人 HPV 感染不能得到有效的控制, 就不利于控制 HPV 的母婴传播, 也不利于 HPV 感染相关癌症的防控。专家建议, 在强调行为干预的基础上, 提倡固定性伴侣, 同时加强生物医学干预, 通过加强疾病筛查和治疗, 有效的阻断和减少或消灭传染源, 可进一步降低 HPV 感染率及 HPV 感染相关疾病和癌症的发病率, 这将造福于广大民众^[13-15]。

参考文献

- [1] 杨慧兰. 病毒性皮肤病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2008: 174-195.
- [2] 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.
- [3] 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: 144-230.

- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 张金浩, 耿建祥, 樊志敏, 等. 肛管及肛门区尖锐湿疣组织中人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] 赵敏, 张万宏, 董汉生, 等. 尖锐湿疣复发危险因素分析[J]. 中国皮肤性病杂志, 2010, 24(4): 337-339.
- [9] 张金浩, 耿建祥, 樊志敏, 等. 257 例肛门及肛管尖锐湿疣组织 HPV 感染的基因分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(5): 520-523.
- [10] Papaconstantinou HT, Lee AJ, Simmang CL, et al. Screening methods for high-grade dysplasia in patients with anal condyloma[J]. J Surg Res, 2005, 127(1): 8-13.
- [11] 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.
- [12] 赵敏, 董汉生, 陈雷, 等. 尖锐湿疣组织 HPV 基因芯片分型及亚型分析[J]. 中国皮肤性病杂志, 2006, 20(8): 490-491.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Etienney I, Vuong S, Si MA, et al. Value of cytologic papanicolaou smears and polymerase chain reaction screening for human papillomavirus DNA in detecting anal intraepithelial neoplasia[J]. Cancer, 2012, 115(12): 6031-6038.

(收稿日期: 2014-11-08)

(上接第 29 页)

- [2] Monecke S, Engelmann I, Archambault M, et al. Distribution of SCCmec-associated phenol-soluble modulin in staphylococci[J]. Mol Cell Probes, 2012, 26(2): 99-103.
- [3] Kaito C, Saito Y, Ikuo M, et al. Mobile genetic element SCCmec-encoded psm-mec RNA suppresses translation of agrA and attenuates MRSA virulence[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(4): 1003269.
- [4] Liakopoulos V, Petinaki E, Efthimiadi G, et al. Clonal relatedness of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the haemodialysis unit of a single university centre in Greece[J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23(8): 2599-2603.
- [5] Mombach AB, Reiter KC, Paiva RM, et al. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(10): 1328-1333.
- [6] Chatterjee SS, Chen L, Joo HS, et al. Distribution and regulation of the Mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulin PSM-mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. PLoS

One, 2011, 6(12): 28781.

- [7] Milheiri'o C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(9): 3374-3377.
- [8] Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(7): 2155-2161.
- [9] Bouchami O, Ben Hassen A, de Lencastre H, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus hominis (MR-SHo): low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements[J]. PLoS One, 2011, 6(7): 21940.
- [10] Mendoza-Olazarán S, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, et al. microbiological and molecular characterization of staphylococcus hominis isolates from blood[J]. PLoS One, 2013, 8(4): 61161.

(收稿日期: 2014-10-18)