

• 临床检验研究论著 •

196 例肛门及肛管尖锐湿疣病变中 HPV 感染的研究

唐永发¹, 耿建祥^{2△}, 张金浩³, 刘飞³, 赵雪², 吴崑崑³, 叶辉³, 吴金萍³

(1. 江苏省南京市六合区中医院病理科 210001; 南京中医药大学第三附属医院:

2. 病理科; 3. 全国肛肠医疗中心, 南京 210001)

摘要:目的 探讨南京地区肛门及肛管尖锐湿疣病变中人乳头瘤病毒(HPV)不同基因型别的感染情况及其临床意义。方法 从 196 例肛门及肛管尖锐湿疣(CA)石蜡组织标本中提取 23 种 HPV DNA, 采用基因扩增芯片杂交技术对其进行 HPV 基因型别的检测, 并对患者进行临床病理资料分析。结果 196 例肛门及肛管 CA 病变组织标本中检出 HPV 总阳性率为 67.86% (133/196), 其中单一型别的阳性率为 55.61% (109/196); 单一型别的感染中 HPV6 型阳性率为 28.06% (55/196), 是最主要的感染型别, 其次为 HPV11 型, 阳性率为 27.04% (53/196); 混合型 HPV 感染阳性率为 12.25% (24/196), 其中 HPV6 型与 11 型混合感染占 50.00% (12/24), 是混合型感染的主要型别, 此外还有 5 例 4 种型别的混合感染, 占混合感染的 20.83% (5/24)。结论 基因扩增芯片检测技术是一种比较适合临床进行 HPV 分型检测的、敏感性高、特异性好的诊断方法, 尤其适合开展某种病变中 HPV 感染的分子流行病学的研究。

关键词:尖锐湿疣; 人乳头瘤病毒; 肛门; 肛管; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)11-1303-02

Study of human papillomavirus infection in 196 cases of anus and anal canal condyloma acuminatum

Tang Yongfa¹, Geng Jianxiang^{2△}, Zhang Jinhao³, Liu Fei³, Zhao Xue², Wu Kunlan³, Ye Hui³, Wu Jinping³

(1. Department of Pathology, Chinese Medical Hospital of Liuhe District of Nanjing, Nanjing, Jiangsu 210001, China;

Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University; 2. Department of Pathology; 3. Department of National Anal and Colorectal Treatment Center, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To study the genotypes of human papillomavirus(HPV) and its clinical characteristics in condyloma acuminatum(CA) of anus and anal canal in Nanjing city. Methods 23 types of HPV genotype were detected in 196 patients with CA of anus and anal canal by polymerase chain reaction(PCR) and gene-chips technique, and the related clinical pathology data of patients were analyzed. Results In 196 patients with CA of anus and anal canal, the total HPV infection rate was 67.86% (133/196), with single type infection rate of 55.61% (109/196). The predominant type of single infection with HPV was HPV6 (28.06%, 55/196), followed by HPV11 (27.04%, 53/196). The mixed infection rate was 12.25% (24/196), and the predominant type of mixed infection was HPV6+11 (50.00%, 12/24), followed by HPV6+11+X+X (20.83%, 5/24). Conclusion Gene-chips method could be a high sensitive and specific method in detection and typing of HPV, especially fit for study on molecular epidemiology of HPV infection.

Key words: condylomata acuminata; human papillomavirus; anus; anal canal; genotyping

中国与世界各地交往日益广泛, 人员往来愈加频繁, 为性传播性疾病传入中国提供了可乘之机。其中, 尖锐湿疣(CA)已跻身为中国三大性病之一。世界卫生组织新近提出人乳头瘤病毒(HPV)感染性疾病的诊断不仅要有临床和病理学诊断, 还应具有基因水平的诊断才能确诊。随着分子生物学技术的快速发展, 基因诊断技术在病毒感染性疾病的诊断、研究和临床应用已日趋成熟, 此类技术的临床应用可以解决 HPV 感染的定性、定位、分型及定量诊断问题, 也可以解决其他病毒感染与 HPV 感染性疾病的鉴别诊断问题, 这将为临床进一步治疗提供客观、准确、科学的依据^[1-3]。本研究应用基因扩增分型技术对 196 例肛门及肛管 CA 组织进行了 HPV 型别的基因检测, 为肛门及肛管 CA 的预防、治疗、HPV 诊断试剂和疫苗的研发以及分子流行病学调查提供理论依据, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 收集 1985 年 1 月至 2011 年 4 月南京中医药大学第三附属医院经全国肛肠医疗中心手术切除的 196 例南京地区肛门及肛管 CA 病变的常规石蜡组织标本, 其中男 108 例, 女 88 例, 男女之比为 1.23 : 1; 年龄 12~71 岁, 平均年龄 38.33

岁, 20~60 岁患者 180 例, 占患者总数的 91.84% (180/196)。肛管 CA 18 例, 肛门 CA 178 例。由 2 位经验丰富的病理医师结合临床, 依据肛门及肛管 CA 大体及显微镜下的组织形态学特征, 作出符合肛门及肛管 CA 的诊断, 同时复习其临床病理资料。

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。显色液须新鲜配制, 使用时按所需浓度加蒸馏水配制。

1.3 方法

1.3.1 HPV DNA 提取 先将石蜡组织切成 4 μm 厚的切片, 3~5 片, 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, 100 °C 金属浴加热 10 min, 立即 13 000 r/min 离心 10 min 后, 取中间层 DNA 溶液待用。

1.3.2 PCR 扩增 将 PCR 反应管依次编号, 分别加入 2 μL

△ 通讯作者, E-mail: sunjihuahuyan@sina.com.

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。

1.3.3 杂交、孵育和显色 取 15 mL 离心管, 放入标有标本编号的膜条, 加入 5~6 mL A 液(2 \times SSC, 0.1% SDS) 及所有 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(0.5 \times SSC, 0.1% SDS), 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(A 液: POD=2 000: 1.4 张膜可用 6 μ L POD 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 枸橼酸钠) 轻摇洗涤 2 min; 显色液(C 液 19 mL, TMB 1 mL, 30% H_2O_2 2 μ L) 中显色至少 30 min; 转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

1.3.4 结果判定标准 (1) 实验后每张膜条在 PC 位点必须出现蓝色显示信号; (2) 阴性质控品除 PC 位点出现蓝色显色信号外, 其余位点均不出现蓝色显色信号; (3) 阳性质控品除 PC 位点出现蓝色显色信号外, 必须在相应 HPV 基因型位点上出现蓝色显色信号; (4) 每张膜条上除 PC 位点外有 23 种 HPV 型别(6、11、42、43、44、16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4 型) 的杂交显色位点, 除 PC 位点显色外, 肉眼可观察 23 种 HPV 型别位点上呈现蓝色小圆点为阳性信号; (5) 出现 1 个阳性信号为单一型别的感染, 出现 2 个阳性信号为双型别的混合感染, 出现 2 个以上的阳性信号为多型别的混合感染。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结 果

196 例肛门及肛管 CA 患者中, 133 例检出感染 HPV, 总阳性率为 67.86%(133/196)。单一型别的 HPV 感染 109 例, 占 55.61%(109/196), 单一型别的感染中, HPV6 型感染 55 例, 阳性率为 28.06%(55/196), 是最主要的感染型别, 其次为 HPV11 型, 其阳性率为 27.04%(53/196)。混合型 HPV 感染 24 例, 占 12.25%(24/196), 其中 HPV6 型与 11 型混合感染 12 例, 占混合型感染的 50.00%(12/24), 是混合型感染的主要型别, 其次是 5 例 4 种型别的混合感染, 占混合型感染的 20.83%(5/24), 分别为 HPV 6 型、11 型、16 型、18 型混合感染 1 例, HPV 6 型、11 型、33 型、52 型混合感染 1 例, HPV 6 型、11 型、16 型、33 型混合感染 2 例, HPV 6 型、11 型、16 型、66 型混合感染 1 例。另外 8 例 HPV 感染分别是 HPV 6 型、18 型混合感染 1 例, HPV 6 型、52 型、73 型混合感染 1 例, HPV 11 型、33 型混合感染 1 例, HPV 11 型、58 型混合感染 2 例, HPV 11 型、59 型混合感染 1 例, HPV 11 型、66 型混合感染 1 例, HPV 58 型感染 1 例。

3 讨 论

HPV 属乳头瘤病毒科, 是一类特异感染人类上皮、黏膜的微小共价双链环状 DNA 病毒, 其以闭合超螺旋结构、开放的环状结构、线性分子结构 3 种形式存在。现已发现乳头瘤病毒及 HPV 有 200 多个型别、亚型及变异体, 至今已鉴定出一百多种^[1-5]。人类是 HPV 的唯一宿主。世界卫生组织(WHO)、国际癌症研究学会(IARC)根据 HPV 致癌危险性的高低将其分为低危型和高危型两大类。分子流行病学调查显示, 高危型

HPV 导致宫颈癌的概率约为 1.00%, 而低危型 HPV 导致宫颈癌的概率仅为 0.10%^[2]。目前发现有 30 多种高危型及 10 多种低危型 HPV 致癌致瘤, 其中 18 种高危型和 4 种低危型比较常见^[4]。本研究选择了 23 种最常见致癌致瘤的 HPV 型别作为研究的感染源, 此 23 种 HPV 型别大约占致癌致瘤型别的 95% 左右。由于目前人们都把目光主要集中在女性生殖道疾病的 HPV 研究上, 而直肠、肛管及肛门区 HPV 感染的专题研究尚无人触及, 全世界尚无确切可靠的直肠、肛管及肛门区 23 种 HPV 感染的流行病学的研究资料。当前 HPV 基因检测是捕获 HPV 感染最好的方法。临床上对 HPV 感染的诊断都是通过检测病毒 DNA, 现常用的 HC-II、荧光定量 PCR 法和原位杂交法均不能对 HPV 进行高通量的分型检测, 不适合用于 HPV 感染相关疾病的流行病学和病因学的深入研究。本文采用的高通量的分型检测技术对 196 例肛门及肛管 CA 的石蜡组织标本进行了 23 种 HPV 基因分型的回顾性研究, 并对其基因型别所占的比率作了比较和分析。

CA 是一种性传播疾病, 主要通过性接触传播, 男女均可发病。引起本病的主要类型为 HPV 的 6、11、16、18、31、33、35 型。85% 是由性传播而感染的。CA 是欧美国家最常见的性病之一, 其发病率逐年上升。CA 在中国也是最主要的性传播疾病之一, 在中国南方比北方多见, 以 20~34 岁者发病率最高。男性常发生于冠状沟、包皮、龟头、系带及尿道口, 有时可见于阴茎体及周围皮肤, 但很少长于阴囊, 男性同性恋者可发生于肛门及直肠。女性多见于大小阴唇、阴蒂、阴道、子宫颈及肛周。偶尔可出现在口腔、腋窝、脐窝、趾间和乳房下部、腹股沟。至少有 20% 的女性 CA 患者可波及肛周^[4-8]。本研究从 133 例肛门及肛管 CA 石蜡组织切片中检出 10 种 HPV 型别, 分别是 6、11、16、18、33、52、58、59、66、73 型, 未发现 31 和 35 型。发病年龄在 20~40 岁的患者 105 例, 占总人数的 53.57%(105/196)。196 例肛门及肛管 CA 患者中, 男性发病可能多数与同性恋行为有关, 女性多数是外阴 CA 波及肛门及肛管处。

随着 HPV 基因检测手段的改进, 一些亚临床阶段的 HPV 感染已经被发现, 这些亚临床 HPV 感染可以单独存在, 也可与 CA 并存, 主要表现为: (1) 微小的无蒂疣, 可单发或多发; (2) 微小的乳头状隆起, 多发, 呈绒毛状隆起, 有时众多小突起融合形成颗粒状外观; (3) 外观正常的斑状病损, 肉眼观察似为正常, 但用醋酸涂布后出现白色, 用放大镜才可见有斑状改变。近年来文献上逐渐将尖锐(acuminatum)一词略去, 统称生殖器湿疣(condyloma), 生殖器湿疣包含了从起初微小病损到巨大 CA 的所有病变, 从病理组织学上可分为: 微小湿疣; 典型 CA; 巨大 CA 三种形态^[4-6]。本文报道的 196 例 CA 组织形态学属比较典型的 CA。

从本研究结果来看, 196 例肛门及肛管 CA 患者中 HPV 感染率达 67.86%, 表明肛门及肛管是又一个 HPV 易感染部位。所有 133 例 HPV 阳性的肛门及肛管 CA 患者除 1 例外都伴有 6 型或 11 型 HPV 感染, 混合型感染除了 12 例 HPV 6 型、11 型混合感染外, 其余 12 例 HPV 混合感染及 1 例单一型感染都伴有高危型别的 HPV 感染, 而高危型别的 HPV 往往是 CA 癌变的重要诱发因素, 也是诱发肛门及肛管上皮癌变的重要诱因。因此, 对所有伴有高危型别 HPV 感染的 CA 患者进行 HPV 感染型别的追踪检测显得非常必要, 如果他们成为持续性的感染者, 就可成为 HPV 的重要传染源, 而且发生肛门及肛管癌的风险将大大增加, 应引起高度(下转第 1307 页)

够重视。KPC 酶是近年出现的一种新的碳青霉烯水解酶,该酶能水解碳青霉烯类、哌拉西林、头孢菌素和氨基曲南,酶抑制剂能抑制其活性,KPC 酶最先从肺炎克雷伯菌中分离出来,在欧美国家较为流行^[8],本研究中基因型及表型均没有检测出 KPC 酶。

全国医院感染监测系统报告显示 1998~2002 年对亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌增加了 15%,有研究报道减少亚胺培南的使用并降低其暴露率能使健康人对亚胺培南的敏感性从 83% 提高到 95%,使患者对亚胺培南的敏感性从 65% 提高到 83%^[9],这表明限制并减少碳青霉烯类抗生素的使用将是改善其耐药性问题的有效方法。

参考文献

[1] Maniati M, Ikonomidis A, Mantzana P, et al. A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel blaVIM-4/blaP1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(1): 132-135.

[2] Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 β -Lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(4): 1660-1664.

[3] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.

[4] Urban C, Mariano N, Rahal JJ, et al. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin a-

gainst multidrug-resistant *acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2732-2734.

[5] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1791-1796.

[6] Pagani L, Colinson C, Migliavacca R. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- β -lactamase[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3824-3828.

[7] Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(4): 315-321.

[8] Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, et al. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(2): 243-248.

[9] Pakyz AL, Oinonen M, Polk RE. Relationship of carbapenem restriction in 22 university teaching hospitals to carbapenem use and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(5): 1983-1986.

(收稿日期: 2012-01-09)

(上接第 1304 页)

重视。本研究 196 例 CA 患者中, 20 岁以下者 4 例, 70 岁以上者 2 例(包括 1 例 70 岁的患者), 60 岁以上者 12 例, 20~60 岁者 180 例, 占患者总数的 91.84%(180/196); 提示肛门及肛管 CA 主要发生于性活跃的群体; 肛门及肛管 CA 往往容易复发, 这与 CA 治疗后, 其周围皮肤中仍然存在 HPV 有关^[9]。本研究 196 例肛门及肛管 CA 患者只有 133 例检出 HPV 阳性, 有 63 例为 HPV 阴性, 这说明 63 例 HPV 阴性的 CA 患者中存在着两种情况, 一是 HPV 阴性的 CA 中可能存在着 HPV 6、11、42、43、44 型以外的型别, 提示试剂厂家应开发出符合中国 CA 感染谱的低危型别的 HPV 检测试剂, 二是 HPV 阴性的 CA 在组织形态学上非常像 CA, 但实际上又不是 HPV 引起的病变, 也就是说很可能是一种假性湿疣。本研究的 196 例肛门及肛管 CA 患者中没有检测到 42、43、44 型 HPV, 提示 42、43、44 型 HPV 不是引起南京地区肛门及肛管 CA 病变的型别。本研究采用的高通量 HPV 分型检测技术不但能对细胞, 也能对组织标本进行检测, 不但能对新鲜标本进行实时研究, 而且还可对石蜡组织进行回顾性研究, 是 HPV 分型检测的一种快捷、实用、高通量的检测方法, 值得推广。

总之, 对直肠、肛门及肛管的 HPV 感染的研究才刚刚开始, 还有许多的问题需要研究者去探索 and 发现。由于 HPV 是人类良、恶性肿瘤的重要诱因, 值得研究者对其进行多中心大样本量的基因研究, 为肛门直肠恶性肿瘤的防治提供科学的依据^[8, 10-12]。

参考文献

[1] Rasai J. 阿克曼外科病理学(上卷)[M]. 回允中, 译. 9 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 856-871.

[2] 范文生, 李亚里, 杨怡卓, 等. 基因芯片技术检测宫颈病变中 HPV 感染的临床研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(7): 745-747.

[3] 毕蕙, 赵健, 陈锐, 等. 宫颈上皮内瘤变患者人乳头状瘤病毒感染亚型的分布差异[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(6): 367-370.

[4] 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.

[5] 王建英, 范明明, 吴效科, 等. 人乳头状瘤病毒感染及端粒酶 hTERT 表达与宫颈癌关系的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(12): 1321-1324.

[6] 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): 391-393.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 赵敏, 张万宏, 董汉生, 等. 尖锐湿疣复发危险因素分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(4): 337-339.

[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] 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.

[12] 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.

(收稿日期: 2011-08-08)