

• 论 著 •

肛门区鳞状细胞癌和鳞状上皮内瘤变组织中 HPV 感染型别的研究*

季月霞¹, 武晓雷², 耿建祥^{2△}, 仲玉英¹, 吴 冲², 吴昆岚², 张金浩², 梅 静², 赵 雪²
(1. 南京中医药大学常熟附属医院病理科, 江苏常熟 215500; 2. 南京中医药大学附属
南京中医院病理科, 江苏南京 210022)

摘要:目的 探讨肛门区鳞状细胞癌及肛门区上皮内瘤变(AIN)组织中人乳头瘤病毒(HPV)感染型别分布情况及临床意义。方法 采用基因扩增结合基因芯片技术对 28 例肛门区鳞状细胞癌、20 例低级别及 34 例高级别 AIN 组织标本进行 23 种 HPV 分型检测,并对受检者行相关资料分析。结果 28 例肛门区鳞状细胞癌总的 HPV 检出率为 82.14%(23/28),检出的均为高危型 HPV(HRHPV),占检出 HPV 的 100.00%(23/23);20 例低级别 AIN 中,HPV 检出率为 55.00%(11/20),HRHPV 占检出 HPV 的 45.46%(5/11),34 例高级别 AIN 中,HPV 检出率为 79.41%(27/34),HRHPV 占检出 HPV 的 85.19%(23/27)。结论 肛门区鳞状细胞癌和 AIN 的发生、发展与 HRHPV 感染密切相关,随着 AIN 程度的增加,HRHPV 所占比例也随之增加。临床医师应对高危人群开展肛门区 HPV 分型检测及细胞学检查。

关键词:肛门; 人乳头瘤病毒; 鳞状细胞癌; 上皮内瘤变; 基因分型
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.06.004 **中图法分类号:**R711.74
文章编号:1673-4130(2020)06-0652-04 **文献标识码:**A

The Study of HPV infection types in tissues of squamous cell carcinoma
and intraepithelial neoplasia of anus area*

Ji Yuexia¹, Wu Xiaolei², GENG Jianxiang^{2△}, ZHONG Yuying¹, Wu Chong²,
WU Kunlan², ZHANG Jinhao², MEI Jing², ZHAO Xue²

(1. Department of Pathology, the Traditional Chinese Medical Hospital of Changshu City, Changshu, Jiangsu 215500, China; 2. Department of Pathology, the Affiliated Nanjing Traditional Chinese Medical Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University, Nanjing, Jiangsu 210022, China)

Abstract: **Objective** The anus squamous cell carcinoma (ASCCA) and anus intraepithelial neoplasm (AIN) are closely interrelated with human papillomavirus (HPV) infection. This is aimed to investigate the clinical value of the distribution of human papillomavirus (HPV) genotyping and its clinical significance in tissues of ASCCA and anus intraepithelial neoplasm (AIN). **Methods** PCR and gene-chips technology were utilized for the detection of 23 kinds of HPV genotypes in tissue specimens from 28 cases of ASCCA and 20 cases of low-grad and 34 cases of high-grade AIN. And related materials of all subjects were analyzed. **Results** In the 28 cases of ASCCA, the HPV detection rate was 82.14%(23/28) and high-risk human papillomavirus (HRHPV) counted for 100.00%(23/23). In the 20 cases of low-grade AIN, the HPV detection rate was 55.00%(11/20) and HRHPV counted for 45.46%(5/11). In the 34 cases of high-grade AIN, the HPV detection rate was 79.41%(27/34) and HRHPV counted for 85.19%(23/27). **Conclusion** The occurrence of ASCCA and AIN are related to HRHPV infection, the HRHPVs gradually increase with aggravation of anal squamous epithelial lesions. Clinical doctors should conduct anal HPV type tests and cytological examination on high-risk affected population.

Key words: anus; human papillomavirus; squamous cell carcinomas; intraepithelial neoplasm; genotyping

肛门区鳞状细胞癌的发病率在一般人群中为 1/10 万,是一种比较少见的恶性肿瘤,过去 20~30

* 基金项目:江苏省南京市卫生局中医专项(2009-92);江苏省常熟市中医院青年科研基金项目(cszyy201902)。
作者简介:季月霞,女,主治医师,主要从事 HPV 感染疾病研究和病理诊断的相关研究。△ 通信作者, E-mail:maox999@163.com。
本文引用格式:季月霞,武晓雷,耿建祥,等. 肛门区鳞状细胞癌和鳞状上皮内瘤变组织中 HPV 感染型别的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(6): 652-655.

年,美国男性和女性肛门区鳞状细胞癌的发病率分别增加 96%和 39%。男性同性恋者(MSM)肛门区鳞状细胞癌的发病率据估计为 35/10 万。人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的 MSM 发生肛门区鳞状细胞癌的风险可能是非 HIV 感染 MSM 的 2 倍。有肛门性交的男性人群发病率比一般人群高,性行为的方式是导致肛门区鳞状细胞癌发病率上升的重要因素之一。有研究发现,90%左右的肛门区鳞状细胞癌与高危型人乳头瘤病毒(HRHPV)感染密切相关,宫颈部位和肛门部位在人乳头瘤病毒(HPV)感染的型别上高度一致,这意味着肛门部位与宫颈部位具有共同的感染来源^[1-4]。国内文献中少见关于肛门区鳞状细胞癌及肛门区上皮内瘤变(AIN)组织感染 HPV 的研究报道。为了进一步了解我国肛门区鳞状细胞癌及 AIN 组织中的 HPV 感染及型别分布情况,笔者对 28 例肛门区鳞状细胞癌及 20 例低级别和 34 例高级别 AIN 患者的发病年龄及 HPV 感染型别的分布进行了分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年于南京中医药大学附属南京中医院全国肛肠医疗中心治疗的 5 例外痔及 5 例混合痔患者,女 5 例,男 5 例;患者年龄 25~68 岁,平均 50.12 岁,收集上述人群肛门周围正常的鳞状上皮石蜡组织标本。选取 1995 年 1 月至 2018 年 12 月于南京中医药大学附属南京中医院以及南京中医药大学常熟附属医院就诊的肛门区鳞状细胞癌及 AIN 患者,其中肛门区鳞状细胞癌 28 例,女 13 例、男 15 例,病变发生于肛管的 15 例、肛缘的 13 例,患者年龄 40~86 岁、平均 61.96 岁;低级别 AIN 20 例,女 6 例、男 14 例,发生于肛管的 7 例、肛缘的 13 例,患者年龄 24~68 岁、平均 43.85 岁;高级别 AIN 患者 34 例,女 19 例、男 15 例,发生于肛管的 9 例、肛缘的 25 例,患者年龄 23~86 岁、平均 48.27 岁。收集上述人群的石蜡组织标本,由 2 位年资较高的主治医师级别以上的病理科医师按照 WHO(2014 年)组织学消化道肿瘤的分类标准进行组织切片病理结果复核。

1.2 仪器与试剂 基因扩增仪为 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 Eppendorf 公司生产的 5810 R 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-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,使用时所需水平通过加蒸馏水配制。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集 先去除每例石蜡组织周边多余

的石蜡,将石蜡组织切成 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。

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 μL,充分振荡混匀,两者均在金属浴中加热 100℃ 10 min,立即 13 000 r/min 离心 10 min 后,取中间层 DNA 溶液待用。PCR 扩增、杂交、孵育和显色按说明书进行规范操作。每份标本显色后根据杂交信号的有无来判断结果。

1.4 统计学处理 正常的肛门区周围的鳞状上皮组织、肛门区鳞状细胞癌及 AIN 组织 HPV 检出率及各 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提供)进行分析,对分析出来的相关数据,应用统计软件包 SPSS13.0 对相关数据进行统计学处理,计数资料以百分率表示,百分率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

10 例肛门周围正常的鳞状上皮组织中 HPV 阳性者 1 例,总检出率为 10.00%(1/10),其中 1 例为单型感染者(HPV11 型)。20 例低级别 AIN,34 例高级别 AIN 及 28 例肛门区鳞状细胞癌组织中 HPV 阴性者、阳性者、总检出率,单型、多型、低危型、高低危型、高危型感染者例数及百分比见表 1。肛门区鳞状细胞癌中总的 HPV 检出率为 82.14%(23/28),其中 HRHPV 检出占 100.00%(23/23);20 例低级别 AIN 总的 HPV 检出率为 55.00%(11/20),其中 HRHPV 占 45.46%(5/11);34 例高级别 AIN 总的 HPV 检出率为 79.41%(27/34),其中 HRHPV 占 85.19%(23/27)。HPV 各型别感染分布情况见表 2。

表 1 3 种肛门病变组织的 HPV 感染情况[n(%)]

HPV	低级别 AIN (n=20)	高级别 AIN (n=34)	肛门区鳞状细胞癌 (n=28)
阴性	9(45.00)	7(20.59)	5(17.86)
阳性(总检出率)	11(55.00)	27(79.41)	23(82.14)
单型感染	7(35.00)	16(47.06)	19(67.86)
多型感染	4(20.00)	11(32.35)	4(14.29)
二型感染	1(5.00)	7(20.59)	3(10.71)
三型感染	3(15.00)	3(8.82)	1(3.57)
五型感染	0(0.00)	1(2.94)	0(0.00)
低危型感染	6(30.00)	4(11.77)	0(0.00)
高低危型感染	3(15.00)	7(20.59)	0(0.00)
高危型感染	2(10.00)	16(47.06)	23(82.14)

肛门区正常的鳞状上皮组织中 HPV 总检出率与

低级别及高级别 AIN 组织和肛门区鳞状细胞癌组织中 HPV 总检出率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 低级别与高级别 AIN 组织中 HPV 总检出率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 低级别 AIN 与肛门区鳞状细胞癌组织的 HPV 总检出率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高级别 AIN 组织和肛门区鳞状细胞癌组织的 HPV 总检出率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 3 种肛门病变组织的 HPV 感染型别分布(n)			
HPV 感染型别	低级别 AIN (n=20)	高级别 AIN (n=34)	肛门区鳞状细胞癌 (n=28)
6 型	7	7	/
11 型	5	5	/
16 型	2	12	11
18 型	/	2	3
31 型	1	1	4
33 型	1	4	2
35 型	/	/	1
43 型	/	3	/
45 型	/	1	/
51 型	/	2	/
52 型	2	5	3
58 型	/	1	3
59 型	/	1	1
总次数	18	44	28

注: 对于多重感染者, 各型别的阳性重复计算; / 表示无该型别的感染。

3 讨 论

肛门区鳞状细胞癌是发生于中年人的一种少见但发病率正在不断上升的上皮性恶性肿瘤。每年肛门区癌发病率在异性恋人群中约为 1/10 万, 在行肛门性交的男性群体中其发病率明显增高。根据肛门区癌发生的部位可分为肛管癌与肛缘癌两类, 大约占下消化道恶性肿瘤的 4%。肛门区癌最常见的组织学类型是鳞状细胞癌, 其他少见的组织学类型包括腺癌、移行细胞癌、基底细胞样癌或黏液表皮样癌^[1]。本文报道的 82 例患者是常见的肛门区病变, 即 28 例鳞状细胞癌及 54 例 AIN。HPV 有许多不同的型别。目前, 根据 HPV 致病性的差异性将 HPV 分为两大类。一类为低危型 HPV: 主要引起肛门区及外生殖器皮肤的疣类病变或宫颈和肛门区低级别 AIN, 其型别主要有 6、11、30、42、43、44 型等。另一类为 HRHPV: 可诱发生殖器癌、宫颈癌、肛门区鳞状细胞癌及宫颈和肛门区高级别 AIN, 主要型别有 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、73 型等, 其中 16 和 18 两型感染率最高^[1,5-8]。随着肛门区 HPV 感染

率的增加, 肛门区鳞状细胞癌及癌前病变发生率也随之上升, 应引起人们的关注。

本研究显示, 从肛门区正常的鳞状上皮到低级别和高级别 AIN, 再到肛门区鳞状细胞癌, HPV 的总检出率逐步增加, 说明 HPV 感染与肛门区鳞状细胞癌和 AIN 的发生、发展有着密切的关系。

本研究低级别 AIN 中 HRHPV 检出率为 45.46%、高级别 AIN 中 HRHPV 检出率为 85.19%, 肛门区鳞状细胞癌中 HRHPV 检出率为 100.00%。这与 WONG 等^[9]报道的 AIN 低级别病变中 HRHPV 检出率为 56.00%, 高级别病变中 HRHPV 检出率为 88.00%, 肛门鳞状细胞癌中 HRHPV 检出率为 89.00% 比较, 虽然 HRHPV 检出率都随着病变程度的增加而增加, 但 HRHPV 检出率略有差异, 这可能与 HPV DNA 的提取方法、检测的方法、检测试剂型别的覆盖面, 检测的最低拷贝数以及组织蜡块保存的条件和时间不同有着一定的关系。低级别 AIN 中 HPV 检出率以低危型 HPV 为主, 其次是高低危型 HPV, 最后为 HRHPV, 高级别 AIN 中 HPV 检出率以 HRHPV 为主, 其次是高低危型 HPV, 最后为低危型 HPV, 肛门区鳞状细胞癌中 HPV 均为 HRHPV, 提示 HRHPV 感染是肛门区鳞状细胞癌及大多数高级别 AIN 的诱发因子。

28 例肛门区鳞状细胞癌 HPV 型别检出频次前 5 位的为 16、31、18、52、58 型。20 例低级别 AIN 中 HPV 型别检出频次前 5 位为 6、11、16、52、31、33 型; 34 例高级别 AIN 中 HPV 型别检出频次前 5 位为 16、6、11、52、33 型。28 例肛门区鳞状细胞癌组织中未出现低危型 HPV, 全部都是 HRHPV, 而低级别和高级别 AIN 中前 5 位检出频次的 HPV 型别中除 HRHPV 外, 有两种低危型 HPV, 说明 HRHPV 是致肛门区鳞状细胞癌最主要的型别。16 型在正常肛门区鳞状上皮中未检测出, 低级别 AIN 中 16 型排名第 3 位, 高级别 AIN 及肛门区鳞状细胞癌 16 型排名均上升到第 1 位, 在肛门区鳞状细胞癌中 16 型检出率 39.29% (11/28), 在高级别 AIN 中 16 型检出率 35.29% (12/34), 均是两者所有高危型检出率最高的型别。因此, 高危 16 型是肛门鳞状细胞癌和高级别 AIN 中最主要的致癌、致瘤型别, 因此, 临床肛肠科和皮肤科医师对感染了高危 16 型的低级别 AIN 患者应给予密切观察, 对感染了高危 16 型的高级别 AIN 及肛门区鳞状细胞癌除切除病灶外, 应定期复查 HRHPV 并密切随访, 以防病变复发。

从发病年龄来看, 肛门区鳞状细胞癌患者中位发病年龄为 61.96 岁, 而低级别 AIN 患者中位发病年龄为 43.85 岁, 高级别 AIN 患者中位发病年龄为 48.27 岁, 低级别和高级别 AIN 是肛门区鳞状细胞癌的前

期病变,与肛门区鳞状细胞癌患者中位发病年龄比较相差 13~18 岁。男、女 40 岁以上均逐步进入肛门区鳞状细胞癌发病的高峰阶段,这与宫颈癌患者发病呈现出年轻化的趋势有所不同^[10-11]。可以考虑将 40 岁以后的高危人群作为肛门区鳞状细胞癌的筛查人群,对他们开展 HRHPV 检测,如果 HRHPV 阳性,建议行细胞学及 P16/Ki-67 双染检查。如细胞学及 P16/Ki-67 双染检查有一项阳性,建议行肛门镜检查,必要时活检,根据活检报告,确定下一步治疗方案。如细胞学及 P16/Ki-67 双染检查都阴性,而高危 16 型 HPV 检测阳性感染者,也应对其进行跟踪随访观察。

总之,随着自然人群中 HPV 感染率的增加,肛门区鳞状细胞癌的发病率呈现出逐年增加的趋势,目前,肛门区鳞状细胞癌的发生率还相对较低,但近年来,该病在两性群体中的发生率正以每年约 2% 的速度逐年递增。男男同性恋及 HIV 检测阳性者,患 AIN 及肛门区鳞状细胞癌的风险较高。因肛门区癌与宫颈癌具有相同发病因素,女性如为宫颈癌或宫颈上皮内瘤变(CIN)Ⅲ级病变者发生肛门区癌的风险性明显增加,进一步提示这两种癌具有共同的致病因素,即高危型持续性 HPV 感染所致^[10-12]。年龄在 40 岁以上的 HPV16 型感染者发生肛门区鳞状细胞癌的可能性最高,而宫颈高危型 HPV 阳性的女性,肛门部位感染高危型 HPV 的风险高出一般女性 3 倍以上。在高危人群中检测 HPV DNA,特别是检查 HRHPV、细胞学和 P16/Ki-67 双染,对发现高级别 AIN 非常有用,值得在临床上推广^[13]。对高危人群——男男同性恋及 HIV 检测阳性者、年龄在 40 岁以上的 HPV16 型感染者及宫颈高级别 CIN 有 HRHPV 阳性的女性,开展以高危型 HPV、细胞学及 P16/Ki-67 双染检查是非常必要的,这样肛肠科和皮肤科医师就可有的放矢地对高风险患者实行重点检测和随访,以便尽早地发现 AIN 患者,把疾病阻止在癌前病变阶段,造福于广大肛门区鳞状细胞癌的患者^[2-4,14-16]。

4 结 论

HRHPV 感染与高级别 AIN 及鳞状细胞癌的发生、发展密切相关,对高危人群开展肛门区 HRHPV 检测、细胞学和 P16/Ki-67 双染检查,有利于肛门区癌前病变患者实现早诊、早治。

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] 张金浩,耿建祥,路斌,等.326 例尖锐湿疣患者肛门及肛

管组织 HPV 基因型检测及性别对比研究[J].医学研究生学报,2017,30(12):1246-1249.
[3] 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.
[4] 张金浩,耿建祥,樊志敏,等.257 例肛门及肛管尖锐湿疣组织中 HPV 感染的基因分析[J].临床与实验病理学杂志,2013,29(5):520-523.
[5] 耿建祥,黄华艺,刘建华,等. HPV 感染疾病相关问题专家共识(2017)[J].医学研究生学报,2017,30(12):1238-1241.
[6] 吴昆岚,张金浩,耿建祥,等.肛门直肠常见病变中 HPV 感染基因型比较[J].国际检验医学杂志,2013,34(19):2516-2518.
[7] 梁晓东,张莉莉,耿建祥,等.肛门、直肠常见病变中 HPV 感染的研究[J].国际检验医学杂志,2014,35(9):1107-1109.
[8] 刘建华,王萍.高危型 HPV 感染导致宫颈癌发生的风险评估[J].医学研究生学报,2017,30(12):1233-1237.
[9] WONG A K, CHAN R C, AGGARWAL N, et al. Human papillomavirus genotypes in anal intraepithelial neoplasia and anal carcinoma as detected in tissue biopsies[J]. Mod Pathol, 2010, 23(2):144-150.
[10] 王宏景,夏林,耿建祥.宫颈腺癌组织中乳头瘤病毒感染型别分布的研究[J].医学研究生学报,2016,29(12):1291-1294.
[11] 石彩歌,顾芸,耿建祥,等.宫颈鳞癌及腺癌组织 HPV 感染型别分布的对比研究[J].医学研究生学报,2018,31(8):840-843.
[12] 王宏景,刘忠伦,耿建祥,等.苏州两医院女性宫颈 HPV 感染基因型别的对比研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(4):404-406.
[13] ETIENNEY I, VUONG S, PHARM D A S M, 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.
[14] 蔡为民,王宏景,耿建祥,等.宫颈正常细胞和宫颈鳞癌、腺癌组织中 HPV 感染基因型的分布[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(8):854-857.
[15] 顾听,龙秀荣,耿建祥,等.宫颈鳞状细胞癌组织人乳头瘤病毒分型研究的意义[J].中国妇幼保健,2016,31(23):5140-5143.
[16] 梅静,徐海燕,耿建祥,等.宫颈上皮内瘤变组织中乳头瘤病毒感染基因型的分析[J].中国妇幼保健,2015,30(15):2333-2336.