

# 检测结直肠组织中人乳头瘤病毒 DNA 的研究

徐 芸 王孝华<sup>1)</sup> 陈禹保<sup>2)</sup> 赵 明<sup>3)</sup> 林玉兵<sup>2)</sup>

(河南医科大学一附院消化科 郑州 450052)

**摘 要** 用人乳头瘤病毒(HPV)高度保守的通用引物和 16、18 型特异引物对 123 例结直肠组织作聚合酶链反应(PCR)检测 HPV DNA, 总检出率为 14.6%。正常粘膜、结肠炎和炎性息肉组为 3.3%(2 / 71), 乳头状腺瘤为 17.6%(3 / 17), 原位癌和浸润癌为 37.1%(13 / 35)。在正常组织、癌旁组织和癌组织 HPV DNA 阳性率分别为 2.9%、5.7% 和 37.1%。在结直肠腺瘤中 HPV 感染以 18 型多见, 18 型与 16 型之比为 3:1, HPV 在左半结肠以下比右半结肠感染率高。

**关键词** 人乳头瘤病毒 DNA, 结直肠组织, 聚合酶链反应

迄今大量文献报道了某些型的人乳头瘤病毒(HPV)的感染与生殖器肿瘤发生有关<sup>[1,2]</sup>, 此外, HPV 也可以感染其他器官的鳞状上皮<sup>[3,4]</sup>但对腺上皮的感染和其与腺癌发生关系的研究, 结论不甚相同<sup>[5,6]</sup>, 我们采用人乳头瘤病毒的高度保守的通用引物和 E6、E7 区的 16、18 型特异引物, 对 123 例结肠镜下结直肠活检标本作聚合酶链反应(PGR), 检测 HPV DNA, 目的在于了解与生殖器肿瘤发生有关的 16、18 型 HPV 是否与结直肠腺癌的发生也有关。

## 1 材料与方 法

### 1.1 取材

标本取自我市几家医院内镜室结肠镜下结直肠活检组织标本共 123 例, 每例于病变部位取 4 块, 其中 35 例结直肠癌病例分别在癌组织、癌旁组织(病变周围 5cm 以内)和正常组织(病变周围 5cm 以外的正常处), 各取 4 块, 2 块用福尔马林固定, 待作病理检查, 2 块放入盛有 TE(0.5mol / L Tris pH 9.0, 0.02mol / L EDTA 0.01mol / L NaCl)缓冲液中, 15mg 组织 / ml, 于-20℃保存。

### 1.2 方法

提取模板按 Rogers BB 方法加以改良, 将保存组织块的溶液融化后, 加蛋白酶 K 至终浓度 250μg / ml, 在 48℃水浴 3h, 再加蛋白酶 K 至终浓度 500μg / ml 水浴过夜。用酚-氯仿-异戊醇(50:

49:1)抽提, 乙醇沉淀, 溶于 20μl 双蒸水中, 待作 PCR。PCR 试剂由北京科海生物工程公司提供。100μl 反应液中, 含 10mmol / L Tris-HCL(pH 8.3), 50mmol / L KCL, 1.5mmol / L MgCl<sub>2</sub>, 0.02% 明胶, 40μmol / L 4 × dNTP, 0.4μmol / L 每对引物(序列见表 1), 2μl Taq DNA 聚合酶, 及 5μl 模板, 94℃预变性 300s 后, 94℃45s, 58℃30s, 72℃60s, 35 个循环, 扩增产物在 2% 的用 EB 染色的琼脂糖凝胶上电泳 30min, 紫外灯下观察。通用引物和 16、18 型特异引物的扩增带分别是 450、253 和 201bp。

### 1.3 病理诊断

标本用福尔马林固定后, 常规石蜡包埋、HE 染色, 由两位有经验的病理医生诊断, 35 例结直肠癌组织全为腺癌。

表1 通用引物和16、18型特异引物序列

引物	序 列	产物
通用PL1	5'-CGTCCAAGAGGAAACTGATC-3'	450
通用PL2	5'-GCACAGGGACATAATAATGG-3'	
16型特异1	5'-CCCAGCTGTAATCATGCATGGAGA-'	253
16型特异2	5'-GTGTGCCCATTAACAGGTCCTCCA	
18型特异1	5'-CGACAGGAACGACTCCAACGA-3'	201
18型特异2	5'-GCTGGTAAATGTTGATGATTTAACT-3'	

1)湖南省临床检验中心, 长沙, 410045, 2)北京科海医疗生物工程公司, 3)河南省肿瘤医院综合病房

### 1.4 统计学处理

用卡方检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同病变类型结直肠病变中 HPV DNA 的检出

将 123 例结直肠癌组织活检标本用 HPV 通用引物扩增出 18 例 HPV DNA 阳性的标本, 阳性率为 14.6%, 再分别用 16、18 型特异引物扩增, 结果见表 2: 表中显示正常粘膜、结肠炎和炎性息肉三组共 71 例, HPV DNA 阳性 2 例, 阳性率为 3.3%, 结直肠乳头状腺瘤 17 例, 阳性 4 例, 阳性率为 17.6%, 结直肠癌 35 例, 阳性 13 例, 阳性率为 37.1%。将这三组比较,  $X^2=22.14$ ,  $P < 0.005$ , 说明差异显著。结直肠癌 HPV DNA 感染率明显高于其他组。我们发现除在乳头状腺瘤组有 3 例 16、18 型 HPV DNA 检出外其他良性病变中均未发现有 HPV16、18 型的感染。

表2 不同类型的结直肠病变中 HPV DNA 的检出情况

病变类型	病例数	HPV+	%	HPV分型	
				16型	18
正常粘膜	30	1		0	0
结肠炎	30	1	3.3	0	0
炎性息肉	11	0		0	0
乳头状腺瘤	17	3	17.6	0	3
原位癌	9	3		1	2
浸润癌	26	10	37.1	2	7
合计	123	18	14.6	3	12

### 2.2 HPV DNA 的检出率

将 35 例结直肠癌病例的癌组织、癌旁组织和正常组织进行 HPV DNA 检测, 发现正常组织、癌旁组织和癌组织 HPV DNA 检出率依次升高。类似于 Togawa 报道的在食管鳞状细胞癌中 HPV 检出率为 14%, 而在癌旁正常组织无一例发现<sup>[7]</sup>。一般认为 16 型与鳞癌发生关系较密切, 而 18 型多与腺癌有关, 从表 3 可见, 在结直肠癌中 HPV 感染也以 18 型占多数, 16 型与 18 型之比为 1 / 3。Koulos<sup>[9]</sup>在其试验

中得出 8 例 HPV DNA 阳性的肛门癌病人, 2 例鳞癌均为 HPV16 阳性, 6 例腺癌均为 HPV18 阳性。但是, 他检测的 3 例腺瘤样息肉和 7 例结直肠腺癌均未发现有 HPV DNA 存在。该结果也许是病例较少所致, 与此相反, 许多学者<sup>[10, 11, 12]</sup>无论是在各型结肠腺瘤或腺癌及结肠癌细胞系中都用免疫组织化学的方法证明了 HPV 抗原的存在, 并用探针杂交、PCR 扩增的方法证实了 HPV DNA 的存在。这些结论的差异还有待进一步研究。关于 16、18 型 HPV 在肿瘤发生中的作用, Lewensohn<sup>[3]</sup>和 Chang<sup>[10]</sup>都认为这是由于 16、18 型 HPV 可通过使 P53 基因突变而使之异常表达, 或 HPV 的 E6 蛋白与 P53 蛋白的相互作用而影响抑癌基因的作用正常发挥所致。

表3 23例结直肠癌不同部位 HPV DNA 检测情况

病变部位	例数	HPV+	%	HPV型别	
				16型	18型
癌组织	35	13	37.1	3	9
癌旁组织	35	2	5.7	1	1
正常组织	35	1	2.9	0	1

### 2.3 结直肠不同部位 HPV 感染情况

在 123 例结直肠活检标本中, 有 35 例取自直肠, 50 例取自左半结肠, 38 例取自右半结肠, 其各部位 HPV 检测情况见表 4; HPV 检出率以左半结肠以下较高, 右半结肠仅 1 例。这可能由于 HPV 感染途径多来源于会阴部, 所以直肠和左半结肠的感染机会多于

表4 结直肠不同部位 HPV 感染情况

病变类型	直肠		左半结肠		右半结肠	
	病例数	HPV+ %	病例数	HPV+ %	病例数	HPV+ %
正常粘膜	10	1	10	0	10	0
结肠炎	10	0	10	1	10	0
炎性息肉	3	0	4	0	4	0
乳头状腺瘤	3	2	10	1	4	0
原位癌	1	1	3	2	5	0
浸润癌	8	6	13	3	5	1
合计	35	10 28.6	50	7 14	38	1 2.6

右半结肠,这可以对 Koulos<sup>[9]</sup>及 Shroyer<sup>[5]</sup>等作者在结直肠腺瘤和腺癌中未检出 HPV 作一解释,也许是其取材部位多位于右半结肠有关。

本文通过用 HPV 高度保守的通用引物对 123 例结直肠瘤组织用 PCR 检测 HPV DNA,阳性率为 14.6%,结直肠瘤组明显高于其他两组,有癌变可能性的结直肠乳头状腺瘤 HPV DNA 检出率也有 17.6%,并且瘤组织比瘤旁组织和正常组织 HPV DNA 检出率明显增高,说明结直肠癌的发生与 HPV,特别是其 18 型有一定的关系。同时发现,越是接近肛门 HPV 感染机会就越多。

## 参 考 文 献

- [1] Gissman L. *Cancer Surv*, 1984, 3: 161~168.
- [2] McCane D J. *Br J Obster, Gynaecol*, 1985, 92: 1101~1105.
- [3] Lewensohn F I. *Anticancer Res*, 1994, 14: 1281~1283.
- [4] Ogura H. *Jpn J Clin Oncol*, 1993, 23: 221~225.
- [5] Shroyer K R. *Arch Surg*, 1992, 127: 741~744.
- [6] Kirgan D. *Arch Surg*, 1990, 125: 862~865.
- [7] Roger B B. *Am J Pathol*, 1990, 136: 541~548.
- [8] Togawa K. *Gastroenterology*, 1994, 107: 128~136.
- [9] Koulos J. *Mod Pathol*, 1991, 4: 58~61.
- [10] Chang F. *Br J Cancer*, 1994, 70: 346~351.
- [11] Cheng Jhy Y. *Arch Sur*, 1995, 130: 73~76.
- [12] Cheng Jhy Y. *Gut*, 1993, 34: 1710~1713.

## DELECTION OF HUMAN PAPILOMAVIRUS DNA IN COLORECTAL CARCINOMA

Xu Yun<sup>1)</sup> Wang Xiaohua<sup>1)</sup> Chen Yubao<sup>2)</sup> Zhao Ming<sup>3)</sup> Lin Yubing<sup>2)</sup>

(Department of Gastrointesterology, The Eirst Affiliated Hospitol of Henan Medical University, Zhengzhou, 450052, 1) Hunan Clinic Laboratory Control Center, 2) Beijing Kehai Medical and Biological Engineering Company, 3) Department of Comprehensive, Oncology Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450003)

**Abstract** Piopsy spesmens specimens from colorectum of 123 patients were analysed for human papillomavirus (HPV) by polymerase chain reaction (PCR). We used general consensus primers and type-specific primers (16,18). HPV DNA was detected in 14.6% of piopies. There were two of 17 in normal (3.3%), coloproctitis and inflammatory polyps, three of 17 in papillate adenomas (17.6%) and thirteen of 35 in colorectal. Detection rate of HPV DNA in normal, adjacent carcinoma and carcinoma were 13 / 35 (37.1%), 2 / 35(5.7%) and 1 / 35(2.9%) respectively. HPV was predominatly type 18 in colorectal carcinoma. The inflammatory rate is higher in rectum and left colon than right colon.

**Key words** Human Papillomavirus DNA, colorectal carcinoma, PCR