维普资讯 http://www.cqvip.com

33-34,32

(11)

文章编号：0253-3626（2000）01-0033-02

以HPV基因通用引物行PCR检测阴茎肿瘤组织中HPV.DNA

R737.270.2

王德林[1] 何士元[2] 乔天恩[2]

（1 重庆医科大学临床学院泌尿科 400016 2 重庆医科大学第二临床学院泌尿科 400010）

摘 要 为了探讨人乳头瘤病毒感染与阴茎肿瘤的关系。用人乳头瘤病毒基因通用引物行聚合酶链反应，检测52例阴茎鳞癌。HPV阳性率为67%，31例为HPV-16，3例为HPV16/18，1例为HPV11/18。4例阴茎癌淋巴结转移灶标本,3例检出与原发癌一致的HPV.DNA。6例阴茎乳头状瘤标本，4例检出HPV-6或11。20例正常阴茎包皮均阴性。提示HPV在阴茎肿瘤的发生发展中有一定的作用,但与肿瘤的病理分级无关。

关键词 聚合酶链反应；人乳头瘤病毒；阴茎肿瘤 HPV DNA

中国图书分类法分类号：R737.27 **文献标识码**：A **收稿日期**：1999-03-22

Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in penile neoplasm by general primer mediated polymerase chain reaction

WANG De-lin, et al

Department of Urology,College of Clinical Medicine

Abstract: The Purpose of this study was to investigate the relationship bewteen HPV infection and penile neoplasm. Using general primer mediated polymerase chain reaction(PCR) assay, The HPV. DNA was detected in 52 penile squamous cell carcinomas. The HPV.DNA positive rate was 67%.HPV-16 was identified in 31 cases, HPV16/18 in 3 and HPV11/18 in 1. HPV.DNA was also detected in 3 of 4 cases of lymph node metastasis of penile carcionoma, and they beloned to the same type of HPV as the primary carcinoma. HPV-6 or 11 was found in 4 of 6 penile papillomas. As controls, HPV had not been detected in any of 20 nonneoplastic foreskins. These data indicate that HPV is strongly associated with penile neoplasm and may play an etiologic role in the development of these neoplasms.

Key Words: Polymerase chain reation ; Human papillomavirus; penile neoplasms.

人乳头瘤病毒(HPV)可引起多种皮肤粘膜病变。为进一步探讨HPV感染与阴茎肿瘤的关系，我们选择L_1通用引物[1]，以聚合酶链反应(PCR)检测52例阴茎鳞癌，4例淋巴结转移灶和6例阴茎乳头状瘤标本中HPV.DNA及型别，并以20例正常阴茎包皮作对照。

1 材料与方法

1.1 组织标本

阴茎鳞癌石蜡包埋组织52例，其淋巴结转移灶4例，阴茎乳头状瘤6例。从环切术取得的正常阴茎包皮20例作对照。新鲜组织取50～100mg置液氮中保存，石蜡包埋组织取3～5块8μm组织切片。

1.2 主要试剂

DNA扩增试剂盒和PCR扩增仪(TC-480型)为PE公司产品，[r^{32}P]ATP为北京亚辉公司产品，DNA分子量标尺(pBR^{322}-HaeIII)为华美公司产品。

1.3 引物和探针[1]

MY11和MY09为HPV基因组中L_1区通用引物，MY12、MY13、MY14、WD74分别为HPV-6、11、16、18的型特异寡核苷酸探针。序列如下：MY09
5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3'，MY11
5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3'，MY12
5'CATCCGTAACTACATCTTCCA3'，MY13
5'TCTGTGTCTAAATCTGCTACA3'，MY14
5'CATACACCTCCAGCACCTAA3'，WD74
5'GGATGCTGCACCGGCTGA 3'，

作者介绍：王德林（1968-09出生），男，讲师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

以上寡核苷酸片段由中科院上海细胞生物学研究所合成。β球蛋白基因引物(PE公司惠赠)用做内阳性对照，序列如下：PC045'CAACTTCATCCACGTTCACC3'，
GH20 5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'。

1.4 PCR实验

1.4.1 新鲜组织DNA提取参照Baginski方法[2]，在液氮中击碎组织，移入TEN(10mM Tris:pH8，1mM EDTA，10mM NaCl、0.5%SDS，200μg/ml蛋白酶K)缓冲液中裂解消化，酚/氯仿抽提，乙醇沉淀DNA，干燥后以超纯水溶解备用。

1.4.2 石蜡包埋组织则根据Manos法进行处理[3]。二甲苯脱蜡，乙醇洗涤，干燥后加入TET(50mM Tris:pH8.5，1mM EDTA，0.5%Tween20，40μg/ml蛋白酶K)裂解缓冲液中消化，灭活蛋白酶K，取上清液做模板。

1.4.3 PCR反应参照Saiki法进行[4]。反应总体积为50μl，其中含模板、4xdNTPs、引物、TaqDNA聚合酶，Taq酶缓冲液等，并以等量灭菌石蜡油覆盖。新鲜组织DNA每一循环条件为95℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 1min，共30周期。石蜡包埋组织DNA则为94℃ 1min，45℃ 1min，72℃ 2min共35周期。设阳性和阴性对照，加酶扩增前，95℃变性10min，最后72℃额外延伸5～10min。取10μl PCR产物，以分子量标尺对照，在1.5%琼脂糖凝胶上电泳，经溴化乙锭染色后，在紫外光灯下观察结果。HPV.DNA阳性者在特定区域(约450bp)显示荧光条带。

1.5 斑点杂交

PCR产物纯化后，加入等体积2xDNA变性液变性。硝酸纤维膜置10xSSC浸泡数分钟，负压吸引点样，并设阳性和阴性对照。将点样膜烘干后，置预杂交液(5xDenhardt's，0.1% SDS，6xSSC，100μg/ml鲑精DNA)内，50℃预杂交2h，更换新的预杂交液，同时分别加入[$r^{32}P$]末端标记的寡核苷酸探针($4.5x10^6$cpm/ml)，55℃杂交3h后，用2xSSC，0.1%SDS于室温洗膜2次。MY12、MY13于56℃，MY14、WD74于58℃再漂洗2次，凉干，压X光片，进行放射自显影。

1.6 统计处理

根据不同资料，选择x^2或等级秩和检验

2 结　果

阴茎鳞癌石蜡包埋标本共65例，其中HPV阴性者30例，再以PC04/GH20扩增其β球蛋白基因，有13例未见扩增带，考虑可能为DNA质量不佳或有酶抑制物存在所致的假阴性，予以排除，故可供分析的例数为52例。其HPV.DNA阳性率为67%，31例HPV-16，3例HPV16/18，1例HPV11/18。淋巴结转移灶中3例HPV.DNA阳性，2例HPV16/18，1例HPV－18。HPV-16在各级阴茎鳞癌中分别为GⅠ26/41，GⅡ8/10，GⅢ0/1，差别无统计学意义(u=0.33，P>0.05)。阴茎乳头状瘤中4例HPV.DNA阳性，1例HPV-6，3例HPV-11，对照组均阴性。

3 讨　论

HPV是一种无包膜双链DNA病毒，迄今已证实的型别达66种之多。近年来，HPV与肿瘤的关系引起人们广泛重视。许多资料证实HPV-16、18和较少见的31、33等型与宫颈癌有关。关于阴茎癌与HPV的关系，日本Iwasawa[5]报告111例阴茎癌中，70例检出HPV.DNA，68例为HPV-16，2例为HPV-18。美国Varma[6]报告亚特兰大市阴茎癌患者的30例标本中HPV-16、18阳性率分别为65%和13%。巴西McCance[7]应用Southern杂交法，研究发现53例阴茎癌中的HPV-16、18阳性率分别为49%和9%。国内赵进英[8]以HPV-6、11、16、18混合探针杂交法，检测24例阴茎癌中HPV阳性率为54%，但未进一步分型。李西启[9]应用地高辛标记的HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18探针分别对46例阴茎鳞癌组织进行原位杂交分析，HPV-16、HPV-18阳性率为43.38%和8.7%。HPV16/18阳性率4.35%，HPV.DNA位于细胞核中。本组阴茎癌标本中，HPV-16、18阳性率分别为65%和8%，明显高于对照组(P<0.01)，与上述各组报告相符，提示HPV-16、18在阴茎癌变病因中有一定的作用。

Wiener[10]报告6例已有转移的阴茎癌中，3例在原发灶与转移灶均检出HPV-16。本组在4例阴茎癌淋巴结转移灶中，证实2例含有与原发灶一致的HPV16/18，另一例原发灶含HPV11/18，其转移灶为HPV-18。高危型HPV持续存在于阴茎癌转移灶中，提示HPV基因可能在癌发生前已整合到宿主细胞DNA中，支持HPV-16、18的致癌作用。

若按病理级别进行分析，则在各级阴茎鳞癌中，HPV-16阳性率无明显差别(P>0.05)，与Wiener和李西启报告一致[9,10]。

HPV感染与阴茎乳头状瘤的关系，本组6例中4例检出HPV.DNA，属HPV-6或11。提示阴茎乳头状瘤的发生与低危型HPV的感染有一定相关性。

(下转第32页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] Bolufer P, Luch A, Molina R, et al. Epidermal growth factor in human breast cancer, endometrial carcinoma and lung cancer [J] Clinica Chimica Acta, 1993;215:51～61

[2] 米建强. 表皮生长因子受体在胃癌及癌前病变中的表达[J]. 中华肿瘤杂志,1993;3:192

[3] Mayer A, et al. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer[J]. Cancer, 1993;71:2454

[4] Ishida T, Kaneko S, Akazawa K, et al. Proliferating cell nuclear organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients[J]. Cancer Res, 1993;53: 5000～5003

[5] Gorgoulis V, Aninos D, Mikou P, et al. Expression of EGF, TGF-α and EGFR in squamous cell lung carcinomas[J]. Anticancer Res, 1992;12:1183～1188

[6] Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T. et al. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung[J]. Cancer Res, 1990;50:7077～7080

[7]Veale D, Ashcroft T, Marsh C. et al. Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 1987;55: 513～516

[8]Jaskuisky D. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors[J]. J Biol Chem, 1988;263:1075

[9] Pavelic K, Banjac Z, Pavelic J, et al. Evidence for a role of EGFR in the progression of human lung carcinoma [J]. Anticancer Res, 1993;13:1133～1138

[10] 吕忠东、肺癌中PCNA表达临床意义的初步研究[J].中国肺癌临床与康复，1996;3:19～20

（上接第34页）

参 考 文 献

[1] Ting Y and Manos MM. Detection and typing of genital human papillomavirus[M].In: Innis MA, et al.PCR protocol : A guide to methods and applications. San Diego, Calif: Academic Press Inc:1990;356～367

[2] Baginski I, Ferrie A, Waston R, et al. Detection of hepatitis B virus[M]. In: Innis Ma, et al. PCR protocol: A guide to methods and applications. San Diego, Calif: Academic Press Inc:1990;348～354

[3] Wright DK and Manos MM. Sample preparation from paraffim - embedded tissues[M]. In: Innis MA, et al. PCR protocol: A guide to mothods and applications. San Diego, Calif: Academic Press Inc:1990;153～158

[4] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel C, et al. Primer directed enzymatic application fo DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. Science,1989,239:487～491

[5] Iwasawa A,Kumamoto Y and Fujinaga K. Detection of human Papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization [J]. J Urol.1993;149(1):59～63

[6] Varma VA, Sancher-LM M, Unger ER, et al. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and in situ hybridization[J] Hum Pathol, 1991;22:908～913

[7] McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 in carcinoma of the penis from Brazil[J]. Int J Cancer, 1986;37:55～59

[8] 赵进英，祝庆蕾，务孔俊，等. 乳头状瘤病毒感染与阴茎尖锐湿疣及阴茎癌之间关系的初步探讨[J].中华泌尿外科杂志,1993;14(3):207～209

[9] 李西启，姜元庆，邹积才，等. 阴茎癌组织中人乳头瘤病毒DNA的原位杂交研究[J].中华泌尿外科杂志,1996;17(10); 627～629

[10] Wiener JS, Effect PJ, Humphrey PA. et al. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous- cell carcinoma of the penis : a retrospective analysis of primary and metastatic lessions by differential polymerase chain reaction . [J]Int J Cancer, 1992;50:694～701