维普资讯 http://www.cqvip.com

304-3.8

第6卷第4期
1991年12月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.6 No.4
Dec. 1991

外阴皮肤营养不良组织中人乳头瘤病毒DNA的检测

张利宁[1] 周利华[1] 盖其伟[2]
刘晓明[1] 高天祥[2]

（1.山东医科大学电镜室，济南 250012
2.首都医学院电镜室，北京100054）

R737.2
R373

提　要

采用Southern Blot分子杂交方法检测了9例外阴皮肤营养不良组织中人乳头瘤病毒DNA的存在情况。结果显示8例增生型营养不良组织中，2例HPV-16阳性，1例HPV33阳性，在3例组织中探测到HPV16相关序列，在1例混合型中也检测到HPV16相关序例，HPV DNA的总检出率为77%。结果提示外阴皮肤营养不良的发生可能与HPV感染有关。

关键词：核酸分子杂交　人乳头瘤病毒　外阴皮肤营养不良症　病变组织

外阴皮肤营养不良症是妇科比较常见的疾病之一，它是一种皮肤、粘膜生长和营养障碍性疾病，关于本病的病因众说不一，其确切原因还不清楚，少数病人皮损可发展为不典型增生，进而癌变。近几年来，国内外研究发现人乳头瘤病毒(Human papillomavirus，HPV)与妇女生殖道肿瘤的发生密切相关，HPV16、HPV18在宫颈和外阴的癌前病变和癌组织中具有较高的检出率[1-4]，而HPV6、HPV11主要与尖锐湿疣等良性疾病有关[5]。鉴于外阴皮肤营养不良症病因不清，而且部分病人的病变可发展至癌，所以我们用同位素标记的HPV16、HPV18探针，检测了部分营养不良的病变组织，以探索外阴皮肤营养不良病变与HPV的关系，并为临床治疗提供依据。

材料和方法

一、标本：标本来自临床诊断为慢性外阴皮肤营养不良病人的外阴皮损组织。取活检组织，每个标本分两份，一份10%福尔马林固定，常规组织学切片，进行病理诊断；另一份置－20℃用于抽提DNA进行Southern Blot杂交，3例宫颈癌手术标本作为对照。

二、组织DNA的抽提：将外阴皮损及宫颈组织分别放研钵中，加入消毒的海沙研成匀浆，用TE缓冲液制成20%的悬液，加入蛋白酶K及Sarcosyl，37℃水浴消化1.5小时，再用酚-氯仿抽提

本文于1990年10月18日收到，1991年3月15日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2次，乙醇沉淀，沉淀物溶解在少量TE缓冲液中备用。

三、Southern Blot杂交： 10μg组织DNA用限制性核酸内切酶PstI消化后，在0.7%琼脂糖凝胶上电泳16小时，然后用Southern Blot方法将电泳后的DNA片段转移到硝酸纤维素膜上，42℃预杂交17小时，在含有HPV16的杂交液中，42℃水浴中杂交2天，放入温度为Tm-38℃的2×SSC/0.1%SDS中洗三遍，－70℃放射自显形5天，含样品的硝酸纤维素膜再放入温度为Tm-38℃的2×SSC/0.1%SDS中继续洗三遍，－70℃自显影5天，然后再将膜与HPV18探针杂交，方法同HPV16探针杂交。

四、HPV DNA探针的标记： HPV16、HPV18重组质粒来自美国哥伦比亚大学微生物系，HPV16、HPV18重组质粒分别在大肠杆菌(*E.coli*)HB101中转染，扩增[6]，然后按Birnobiom的方法提取质粒DNA，BamHI消化后在0.7%的低熔点琼脂糖凝胶中电泳，回收DAN带、酚抽提、冷乙醇沉淀纯化探针DNA。每种用于探针的DNA在体外通过缺口翻译用α-^{32}P dCTP进行标记[7]，测定探针的总放射活性HPV16为4.4×10^{7}cpm/μg，HPV18为7.2×10^{6}cpm/μg。

结　　果

15例外阴皮肤营养不良标本中，9例DNA进行Southern Blot杂交，其实验结果如下：

一、组织病理学的观察结果

9例标本中，病理诊断8例为外阴角化病，1例为硬萎性苔癣。根据分型标准，我们将病例进行了重新分型，增生型8例均为外阴角化病，无不典型增生；混合型1例。增生型的主要改变为上皮过度角化，棘细胞层增生，上皮脚增生肥大，向深部延伸。混合型的主要改变为表皮过度角化，有的部位棘细胞层明显萎缩，上皮脚消失变平，有些区域棘细胞层增生，上皮脚增大，无不典型增生。8例增生型中有6例发现有凹空样变（图1），凹空细胞的细胞核深染，有的核增大，核周有空晕，主要存在于棘细胞层，颗粒层少见。

二、Southern Blot杂交结果

在非严格条件下，样品与HPV16探针杂交，见图2。9例病变中有7例检测到HPV16相关序列，阳性率为77%，其中6例为增生型，1例为混合型，有1例病变皮肤（6号）及其病变周围正常皮肤（3号）均检测到HPV16相关序列；3例宫颈癌HPV相关序列全部呈阳性。在严格条件下与HPV16探针杂交（见图3），9例外阴病变中2例为HPV16型，1例为HPV33型（10号），余下4例未定型。3例宫颈癌中2例为HPV16型，1例未定型。在非严格和严格条件下，样品与HPV18探针杂交，外阴病变组织和宫颈癌组织DNA中均未见HPV18同源序列（见表1）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图1 增生型外阴皮肤营养不良的组织学改变。上皮过度角化，棘细胞层增生；在棘细胞层和颗粒层中可见许多凹空细胞，凹空细胞的细胞核肿大、深染、核周有空晕（×20）

Fig 1. Histological change of hyperplastic vulvar dytrophy, showing epithlial hyperkeratosis and hyperplasia of stratum spinosum. The koilocytes can be observed in the stratum spinosum and granulosum. The nuclei of koilocytes were enlarged and surrounded by a zone of cytoplasmic clearing. (×20)

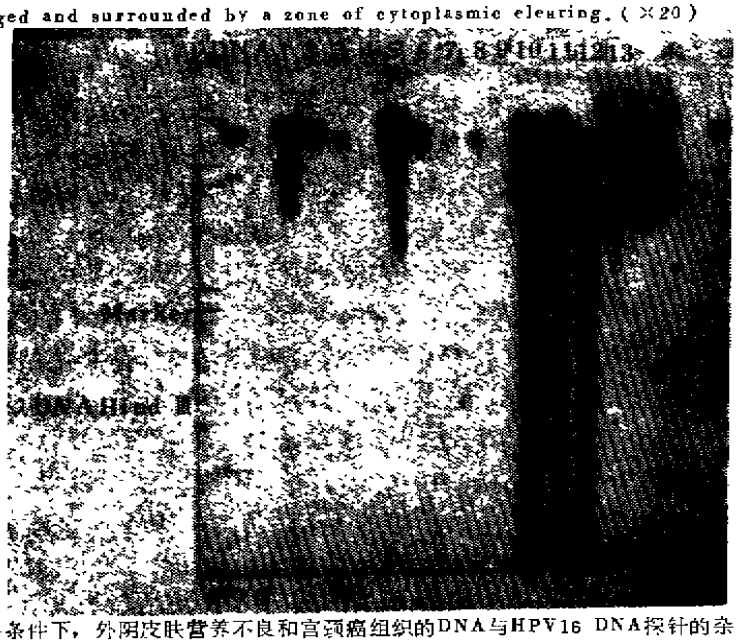

图2 在非严格条件下，外阴皮肤营养不良和宫颈癌组织的DNA与HPV16 DNA探针的杂交结果。1—2、4—10号为外阴皮肤营养不良病变组织DNA，3号为6号病变周围的正常皮肤DNA，11—13号为宫颈癌组织DNA。1—3、4—8、10—13均显示HPV DNA阳性带。

Fig. 2. Under the low-strigency conditions, results of hybridization of tissue DNA of vulvar dystrophies and cervical cancer, with HPV—16 DNA probe.
Lanes 1—2, 4—10 were tissues of vulvar dystrophies. Lane 3 was the normal epithelia around the lane 6 lesson. Lanes 11—13 were cervical cancer. Lanes 1—3, 5—8, 10—13 were positive for HPV.

维普资讯 http://www.cqvip.com

图3　在严格条件下，标本与HPV16 DNA探针的杂交结果。1、5、11、12号显示HPV16阳性，10号为HPV33型，2、3、6、7、8、13号含有HPV16相关序列。

Fig 3. Under the high-strigency conditions, results of hybridization of specimens with HPV-16 DNA probe.
Lanes 1, 5, 11, 12 were positive for HPV-16, Lane 10 was positive for HPV-33. Lanes 2, 3, 6, 7, 8, 13 contained HPV-16 relative sequence.

表1　杂交结果

Table 1. Results of Hybridization

HPV型 HPV type	外阴皮肤营养不良 Chronic vulvar dystrophies		宫颈癌 cervical cancer
	增生型 hyperplastic type	混合型 Mixie type	
HPV16	2/8	0	2/3
HPV18	0	0	
HPV33	1/8	0	
HPV*	3/8	1	1/3
合计 total	7/9(77%)		3/3(100%)

讨　论

1988年 Mickey Karrau[8] 等人报道用 Southern Blot 杂交，在5例有不典型增生的外阴皮肤营养不良标本中检测到3例 HPV16 DNA，而其它5例无不典型增生的增生型、1例混合型营养不良及5例硬萎性苔癣标本中均未测到 HPV DNA。因而，他们认为硬萎性苔癣、无不典型增生的增生型或混合型营养不良病变可能与 HPV 感染无关，而具有明显不典型增生（上皮内肿瘤）的那一部分营养不良病变才与 HPV 感染有关。

维普资讯 http://www.cqvip.com

我们的结果与其不同，同样用 Southern Blot 杂交方法，结果在 9 例外阴皮肤营养不良症的标本中，7 例检测到 HPV DNA，7 例阳性标本中 6 例为增生型，1 例为混合型，所有病例均无不典型增生。我们的结果提示外阴皮肤营养不良与 HPV 的感染有关，但是HPV感染引起发病还是已经发病因抵抗力降低后引起HPV感染还不清楚。分析我们的实验结果与 Mickey Karran实验结果不同的原因，可能与以下因素有关：一是与不同国家地理环境、生活习惯有关；二是与取材部位可能有关；三是由于本研究和Mickey等用于研究的病例都较少，有一定的偶然性。虽然在外阴皮肤营养不良标本中探测到 HPV DNA，但由于现有研究资料较少，所以 HPV 与外阴营养不良的确切关系还有待于进一步研究。

参 考 文 献

〔1〕 Boshart M et al., 1984, *Cancer* 99 : 113—67.

〔2〕 Durst M et al., 1984, *Proc Natl Acad Sci* USA 80 : 3812—5.

〔3〕 Anna MB et al., 1988, *Inter J Gynecol. Pathol* 7 : 39—47.

〔4〕 Leo B et al., 1988, *Inter J Gynecol Pathol* 7 : 48—55.

〔5〕 Gissman L et al., 1984, *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 560—3.

〔6〕 Maniatis T et al., 1982, Molecular Clonig, pp250, Cold Spring Harbor Laboratory.

〔7〕 Righy P et al., 1977, *J Mol. Biol.* 113 : 237.

〔8〕 Mickey Karram et al., 1988, *Am J Obstet Gyncol* 159(1) : 22—23.

Detection of Human Papillomavirus DNA from Epithelial Lessions of Vulvar Dystrophies by Isotope-labelled DNA Probes

Zhang Li-ning et al

(*Laboratory of Electron Microscopy, Shandong Medical University, Jinan* 250012)

Vulvar biopsy specimens from nine patients with vulvar dystrophy were examined for the presence of human papillomavirus DNA by Southern blot hybridization. The results showed that two of eight hyperplastic dystrophies contained HPV 16 homologous sequence, one contained HPV 33 homologous sequence and three cases were positive for HPV relative sequence. HPV relative sequence was also detected in one case with mixed dystrophy. So total proportion of HPV in the nine vulvar specimens was seventy-seven percent. The result suggested that the genesis of vulvar dystrophy may be related to infection of HPV.

Key Words: Molecular Hybridization of Nucleic Acid Human Papillomavirus Vulvar dystrophy