

인간 면역결핍 바이러스 양성환자의 항문부 침규 콘딜로마에서 관찰되는 인유두종 바이러스의 아형에 관한 연구

서울대학교 의과대학 외과학교실

문석배 · 문상희 · 박규주

Detection and Typing of Human Papillomavirus in Anal Condyloma Acuminatum of HIV-positive Patients

Suk-Bae Moon, M.D., Ph.D., Sang-Hee Moon, M.D., Kyu-Joo Park, M.D., Ph.D.

Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Anal condyloma is an epithelial proliferative lesion caused by human papillomavirus (HPV) infection. The present study analyzed the HPV types detected in HIV (+) Korean anal condyloma using PCR-based DNA microarray.

Methods: DNA was extracted from the condyloma tissue of 17 patients including 9 HIV (+) patients (M : F=15 : 2, mean age 35 years, 22~59 years). The 1st PCR was performed with a general primer on L1 region, and nested PCR on the products of the 1st PCR. PCR products were hybridized with a DNA chip.

Results: Fourteen patients (9 HIV (+), 5 HIV (-)) showed positive HPV DNA. Overall, type 6 was the most common (N=11), and type 11 (N=6), type 53 (N=3) in order. Among HIV (+) patients, type 6 was also the most common (N=7), then type 11 (N=5) and type 53 (N=3). In contrast to the HIV (-) patients, 5 patients (55.6%) proved to have multiple infections in HIV (+) patients (2 double, 2 triple, 1 quadruple infection). Four of 9 HIV (+) patients (44.5%) showed co-infection with high-risk HPV.

Conclusion: Multiple infection and co-infection with high-risk types are more prevalent in HIV (+) condyloma patients compared to HIV (-) patients. HPV types on HIV (+) male anal condyloma are similar to those detected in the Korean female uterine cervix. (J Korean Surg Soc 2010;78:111-115)

Key Words: Anal condyloma acuminatum, Human papillomavirus, Human immunodeficiency virus, Polymerase chain reaction, DNA microarray

중심 단어: 항문부 침규 콘딜로마, 인유두종 바이러스, 인간면역결핍 바이러스, 중합효소 연쇄반응, DNA 미세배열법

서 론

침규 콘딜로마는 인유두종 바이러스(human papilloma-

virus, HPV)의 감염에 의해 발생하는 항문 주변 상피 세포의 증식성 질환으로, 성접촉에 의해 전파되는 흔한 질환 중의 하나이다. HPV는 현재까지 약 90여종의 아형이 알려져 있으며, 이 중 약 1/3이 사람에서 성접촉을 통해 전파되어 항문-성기 부위에 무 증상성 감염에서부터 양성 침규 콘딜로마, 상피세포 이형성증, 또는 침윤성 악성 종양까지 유발한다고 알려져 있다.(1) HPV 아형은 type 6, 11로 대표되는 저 위험군과 type 16, 18로 대표되는 고 위험군으로 크게 나눌

책임저자: 박규주, 서울시 종로구 연건동 28
☎ 110-744, 서울대학교병원 외과
Tel: 02-2072-2901, Fax: 02-745-2883
E-mail: kjparkmd@plaza.snu.ac.kr

접수일 : 2009년 10월 20일, 게재승인일 : 2009년 11월 18일

수 있으며, 첨규 콘딜로마에서는 type 6 HPV의 단일 감염이 가장 흔하게 발견된다고 알려져 있다.(2,3) 그러나 인간 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)에 감염된 환자의 콘딜로마에서는 고 위험군 HPV를 포함한 다수의 HPV 아형의 감염이 발견된다는 보고가 있다.(1) 현재 우리나라에서 HIV 음성 환자를 대상으로 항문부 첨규 콘딜로마에서 보이는 HPV 아형에 대한 연구는 있지만,(4) HIV 양성 환자의 콘딜로마에서 보이는 HPV 아형에 대한 연구는 없다. 본 연구는 HIV 양성 환자의 항문 콘딜로마에서 발견되는 HPV 아형을 분석하고자 시행되었다.

방 법

1998년 1월부터 2006년 3월까지 서울대학교병원 외과에서 항문부 첨규 콘딜로마 진단 하에 수술적 절제 후 병리학 적 검사를 통해 첨규 콘딜로마로 확진된 환자를 대상으로 하였다.

각 환자의 파라핀 블록에서 조직을 채취하여 DNA를 추출하였다. 블록에서 5 μ m 절편을 얻은 후 10% Chelex 100 resin (Bio-Rad, USA)이 들어있는 DNA extraction buffer (50 mM Tris HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% Tween 20)에서 95°C로 탈 파라핀 과정을 거쳤다. 이후 식힌 다음 56°C에서 200 μ m/ml proteinase K로 30분간 처리 후 다시 100°C에서 10분간 처리하였다. 그리고 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 이용하였다.

HPV의 아형 분석을 위해 PCR-based DNA microarray system; HPV DNA chip kit (MyGene. Co, Seoul, Korea)를 이용하였다. HPV DNA chip에는 24개의 아형-특이적인 oligonucleotide probe가 내장되어 있으며, 이는 16개의 고 위험 아형(type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68)과 8개의 저 위험 아형(type 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 70)으로 이루어져 있다. HPV DNA의 증폭은 1차, 2차 PCR을 통해 이루어졌다. PCR은 Thermal Cycler Dice (Takara, Japan)를 이용하였다. 1차 PCR에서는 general primer MY09/11을 이용하여 consensus L1 region을 증폭시킨 후 이 산물을 가지고 2차 PCR을 시행하였다. 2차 PCR에서는 general primer GPd5+/GPd6+를 이용하였다. HPV DNA chip kit 내의 PCR premix ① 7 μ l와 추출한 DNA 5 μ l, Taq polymerase 0.3 μ l, distilled water (DW) 12.7 μ l를 혼합한 후 1차 PCR을 시행하였다. 1차 PCR cycle은 초기 denaturation (95°C에서 15

분), 35 cycle (95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초), 최종 합성(72°C에서 3분)으로 이루어졌다. 1차 PCR의 결과물 2 μ l에 PCR premix ② 6.5 μ l, Taq polymerase 0.3 μ l, DW 16.2 μ l를 혼합한 후 2차 PCR을 시행하였다. 2차 PCR cycle은 초기 denaturation (95°C에서 5분), 20 cycle (95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초), 최종 합성(72°C에서 3분)으로 이루어졌다. 양성 대조군으로는 kit 내의 HPV type 15 DNA sample이 이용되었다. 위 음성을 배제하기 위해 모든 환자의 검체에 대해서 1차 PCR과 동일한 조건에서 PCR premix ③을 이용하여 β -globin 유전자를 증폭시켰다. 각 검체의 PCR 결과물을 2.5% agarose gel에서 전기 영동을 통해 확인하였다. 2차 PCR 결과물의 10 μ l를 취해 95°C에서 5분간 denaturation시킨 후 hybridization buffer (MyGene. Co, Seoul, Korea) 30 μ l와 혼합한 후 DNA chip과 43°C에서 90분간 교잡반응을 시켰다. 교잡 반응이 끝난 DNA chip을 3X saline-sodium phosphate-EDTA (SSPE)로 5분, 1X SSPE로 5분 세척 후 실온에서 건조시켰다. 이후 DNA chip scanner (Genepix 4000B, Axon instrument, USA)를 이용해 교잡 반응이 일어난 HPV DNA와 그 아형을 확인하였다. 각 검체 내의 증폭된 HPV DNA는 각각 해당하는 아형-특이 oligonucleotide probe와 교잡 반응을 일으켜 DNA chip상에서 double spot으로 보이게 된다.

결 과

총 17명의 환자가 본 연구기간 동안 항문부 첨규 콘딜로마로 진단되었다. 남자 15명, 여자 2명이었으며, 평균 연령은 남자가 32.9세(22~43세), 여자가 50세(41~59세)였다. 남자 환자 중 12명(80%)이 HIV 양성이었으며, 여자 환자는 모두 HIV 음성이었다. 17명의 환자 중 14명의 환자에서 HPV DNA가 확인되었으며, 이 중 9명이 HIV 양성 환자였다. 17명 중 3명에서 HPV DNA가 검출되지 않았으며, 이들은 모두 HIV 양성 환자들이었다. 한 환자에서(patient No. 2, HIV 양성) HPV DNA는 검출되었으나 DNA chip scan 결과는 음성으로 판독되어서 DNA chip상에 정의되지 않은 HPV other type으로 분류하였다. HPV DNA의 1차 PCR 결과물의 크기는 450 base pair (bp)였으며, 2차 PCR 결과물의 크기는 150 bp였다(Fig. 1). 또한 대표적인 DNA chip 판독 결과는 Fig. 2와 같다. HPV DNA 양성을 보인 환자들에 대한 각각의 HPV typing 결과 및 HIV 감염 여부를 Table 1에 나타내었다.

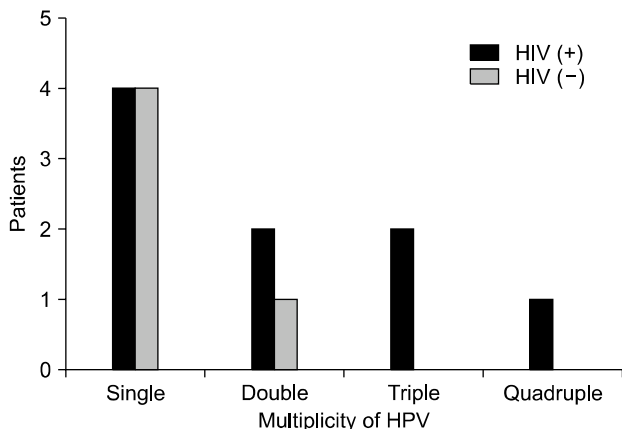


Fig. 4. Multiplicity of the HPV infection according to the HIV status.

로 확인되었다. 이는 HIV 양성 환자 1인당 평균 2개 아형의 HPV 중복 감염이 있는 것으로 나타났다. HIV 음성 환자 군에서는 1명(20%; type 6, 16)에서만 중복 감염이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

HIV 양성 환자 군에서는 4명(44.5%; type 66 1명, type 53 2명, type 16, 53 중복감염 1명)에서 고 위험군 HPV의 동반 감염이 있었으며, HIV 음성 환자 군에서는 1명(20%; type 16)에서 고 위험군 아형의 동반 감염이 있었다(Table 1).

고 찰

본 연구는 우리나라 HIV 양성 환자의 항문부 콘딜로마에서 발견되는 HPV 아형의 특징을 알아보고자 시행되었다. Brown 등(1)은 41명의 대조군과 16명의 면역억제군(HIV 양성 환자 16명 및 8명의 장기 이식 환자)의 첨규 콘딜로마에서 보이는 HPV 아형을 분석한 결과, 면역 억제군에서 환자 1명당 발견되는 HPV 아형의 수가 유의하게 많았으며 또한 고 위험 아형의 비율이 유의하게 높았음을 보여주었다. Critchlow 등(5)은 287명의 HIV 음성 환자와 322명의 HIV 양성 환자를 대상으로 한 연구에서 HIV 양성 환자에서 고 위험 HPV 아형이 감염된 비율이 높았음을 보고하였다. 또한 Anderson 등(6)은 악성 변화를 보인 콘딜로마 환자 5명 중 4명이 HIV 양성이었다는 점에서 HIV 양성 환자에서 고 위험 HPV가 동반될 가능성이 높음을 보고하였다. 이번 연구 결과에서도 HIV 음성 환자에 비해 HIV 양성 환자에서 여러 아형에 다중 감염된 환자의 비율이 높았으며 또한 고 위험 아형이 동반된 비율도 높은 것으로 나타났다.

HIV 양성 환자의 콘딜로마를 추적 관찰하였을 때 양성 병변에서 악성 병변으로 변화가 관찰되었다는 보고가 있다.(7,8) 그러나 이번 연구에 포함되었던 HIV 양성 환자 12명 중에서 DNA 검출에 성공한 9명 환자의 병리학적 진단이 이형성을 동반하지 않은 첨규 콘딜로마로 HIV 음성 환자와 모두 동일하였으며, DNA 추출에 실패한 1명(HIV 양성)에서만 심한 이형성증이 동반되어 있었던 것으로 나타났다. 따라서 이번 연구 결과 만으로 HIV 감염 여부와 콘딜로마의 악성 변화에 대한 관계를 파악하기에는 한계가 있다고 생각되며, 차후 동일 환자에서 콘딜로마가 재발할 경우의 절제 표본과 연속적인 비교 평가를 통해 악성 변화 여부를 관찰해야 할 것이다.

HPV type 53의 경우, 연구에 따라 고 위험 군으로 분류되기도 하고 저 위험 군으로 분류되기도 한다. 2003년 International agency for research on cancer (IARC)의 발표 결과에 따르면 type 53은 probably carcinogenic으로 분류되었다.(9) 이를 따라 본 연구에서는 type 53을 고 위험 군으로 분류하여 결과를 해석하였다.

우리나라 여성 14,264명을 대상으로 자궁 경부 HPV 선별 검사를 시행한 국내 다 기관 연구 결과에 따르면 발견되는 HPV 아형 중 저 위험 군에서는 type 6, 11이 가장 흔하였으며, 고 위험 군에서는 type 16, 18, 53이 가장 흔한 것으로 나타났다.(10) 이는 본 연구 결과인 HIV 양성 환자에서 보인 HPV 아형의 양상과 동일하여 여성의 자궁 경부에서 전파되는 HPV 양상과 남성 HIV 양성 환자의 항문 콘딜로마에서 전파되는 HPV 양상이 유사함을 시사한다.

이번 연구에서 HPV DNA 음성으로 나타난 3예는 internal control로 설정한 β -globin 증폭의 결과도 음성으로 나타났기 때문에 실험 초기에 DNA 추출에 실패했을 가능성 및 실험 도중 DNA의 변성의 가능성을 생각해 볼 수 있다.

환자 2의 경우 HPV DNA는 검출되었으나 DNA chip상에서는 아형이 확인되지 않아 HPV other type으로 처리하였다. Choi 등(11)은 본 실험에서 사용한 것과 동일한 kit를 사용하여 HPV other type으로 판정된 95예에 대해 HPV DNA direct sequencing을 시도하여 94예(98.9%)에서 chip상에는 내장되어 있지 않은 비교적 드문 HPV 아형임을 확인하였고, 단 1예(1.1%)만이 위 음성으로 나온 것을 보고하였다. 본 연구에서는 DNA sequencing을 시도하지 않았고, 따라서 사람에서 흔하지 않은 아형으로 처리하여 결과를 해석하였다.

결론

남성 HIV 양성 환자의 콘딜로마에서 보이는 HPV 아형의 양상이 우리나라 여성의 자궁 경부에서 관찰되는 HPV 아형의 양상과 매우 유사하였으며 HIV 양성 환자에서 보이는 HPV 아형의 분포 양상은 HIV 음성 대조군에 비해 다중 감염과 고 위험 아형의 동반 감염 비율이 높았다.

REFERENCES

- 1) Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol* 1999;37:3316-22.
- 2) Brown DR, Bryan JT, Cramer H, Fife KH. Analysis of human papillomavirus types in exophytic condylomata acuminata by hybrid capture and Southern blot techniques. *J Clin Microbiol* 1993;31:2667-73.
- 3) Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurch HG, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:560-3.
- 4) Kim TJ, Joo JH, Kim HR, Kim DY. Human papillomavirus infection in anal carcinoma, anal condylomata and rectal carcinoma. *J Korean Soc Coloproctol* 1997;13:7-14.
- 5) Critchlow CW, Hawes SE, Kuypers JM, Goldbaum GM, Holmes KK, Surawicz CM, et al. Effect of HIV infection on the natural history of anal human papillomavirus infection. *AIDS* 1998;12:1177-84.
- 6) Anderson CA, Boller AM, Richardson CJ, Balcos EG, Zera RT. Anal condyloma: a comparison between HIV positive and negative patients. *Am Surg* 2004;70:1014-8.
- 7) Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Jay N, Berry JM, Darragh TM. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *AIDS* 1998;12:495-503.
- 8) Palefsky JM, Holly EA, Hogeboom CJ, Ralston ML, DaCosta MM, Botts R, et al. Virologic, immunologic, and clinical parameters in the incidence and progression of anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;17:314-9.
- 9) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
- 10) Jung WW, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang HS, Lee DJ, et al. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol* 2004;42:255-66.
- 11) Choi YD, Jung WW, Nam JH, Choi HS, Park CS. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing. *Gynecol Oncol* 2005;98:369-75.