

核酸扩增和反向点杂交技术检测人乳头瘤病毒的临床应用

周 丹, 李 瑞, 黄 涛, 何进才(广州中医药大学深圳附属医院深圳市中医院检验科 518033)

【摘要】 目的 了解门诊患者人乳头瘤病毒(HPV)感染及其型别(低危型: HPV6、11、42、43、44, 高危型: HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4)分布情况, 为 HPV 感染诊断和相关疾病防治提供依据。**方法** 采用核酸扩增和反向点杂交技术检测 714 例临床怀疑 HPV 感染样本中 23 种 HPV 型别, 对检测结果进行统计分析。**结果** HPV 阳性检出率为 24.51%, 其中低危型别感染率为 8.40%, 高危型别感染率为 22.97%, 单一型别感染率为 19.05%, 两种型别混合感染率为 4.06%, 3 种或以上型别混合感染率为 1.40%。各种 HPV 型别检出率超过 5% 者有 6 种: HPV 16 型 18.75%、HPV11 型 14.29%、HPV33 型 11.16%、HPV58 型 9.82%、HPV6 和 18 型均为 8.48%。其余型别为 29.02%。**结论** 本组病例中 HPV 感染率高达 25%, 本法设计的 23 种常见 HPV 型别中除 HPV44、83、MM4 外其余型别均被检出, 其中高危型别感染率高达 22.97%。因此, HPV 及其分型检测作为妇女常规筛查项目对 HPV 感染诊断和宫颈癌等疾病的防治是十分必要的。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 核酸扩增; 分子杂交

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.21.028 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)21-2614-03

人乳头瘤病毒(HPV)是一种微小的环状双链 DNA 病毒, 通过性接触、直接或间接接触污染物品等途径在人群中广为传播, 特异性地感染人体皮肤和黏膜的鳞状上皮细胞, 引起多种良性或恶性病变。根据 HPV 基因的序列变异可将其分为多种类型, 目前确定的 HPV 型别有 100 余种, 其中约 40 种可以感染人的生殖器官, 约 20 种与肿瘤相关。根据其感染后致癌与否又分为高危型和低危型, 低危型 HPV 如 HPV6、11、42、43、44 等, 常引起外生殖器湿疣等良性病变; 高危型 HPV 如 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4 等, 与宫颈癌及宫颈上皮内高度病变的发生高度相关。随着对 HPV 研究的深入, 分子生物学方法已成为目前临床实验室检测 HPV 感染的主要手段。本文应用近年建立的可以同时检测 23 种 HPV 型别的核酸扩增和反向点杂交技术^[1]对 714 例门诊患者样本进行了检测和分析, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 714 例患者标本取自本院妇产科门诊疑似 HPV 感染的女性患者, 年龄 19~63 岁, 平均 35 岁。用专用宫颈脱落细胞采集器采集子宫颈脱落细胞、病变部位分泌物或脱落细胞, -20℃ 以下保存, 10 d 内检测。

1.2 仪器与试剂 亚能生物技术(深圳)有限公司提供的 HPV 基因分型检测试剂盒及 HPV 基因芯片阅读仪, 美国 MJ research 公司 PTC-200 型核酸扩增仪, 韩国 FINEPCR 公司 Combi-H12 分子杂交箱, 上海跃进医疗器械厂 THZ-92A 台式恒温振荡器。

1.3 检测方法

1.3.1 DNA 提取 充分洗脱宫颈刷并将 1 mL 洗脱液转移到 1.5 mL EP 管中, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 保留管底细胞沉淀, 加入 50 μ L 裂解液, 振荡混匀, 100℃ 干浴 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 保留上清液待检。

1.3.2 核酸扩增 将装有聚合酶链反应(PCR)混合液 20 μ L 的反应管低速离心数秒钟后, 分别加入已提取的模板 DNA 样品、阴阳性对照各 5 μ L, 反应体系总体积 25 μ L, 轻轻混匀, 稍做离心, 上机扩增。扩增条件为 50℃ 15 min, 95℃ 10 min,

94℃ 30 s, 42℃ 90 s, 72℃ 30 s(40 个循环), 72℃ 5 min。

1.3.3 反向点杂交、显色及结果判读 在杂交管中加入 5~8 mL A 液(2×SSC, 0.1% SDS, pH 7.4), 放入已固定 23 种 HPV 分型探针的膜条, 加入 20 μ L PCR 扩增产物, 混匀后置沸水浴 10 min; 于 51℃ 杂交箱内杂交 1.5 h; 将膜条转移至已预热到 51℃ 的 40 mL B 液(0.5×SSC, 0.1% SDS, pH 7.4)离心管中, 51℃ 轻摇洗涤 15 min; 将膜条转移至 1:2 000 过氧化物酶溶液中室温孵育 30 min; 用 A 液轻摇洗涤 2 次, 5 分/次, 再用 C 液(0.1 mol/L 柠檬酸钠, pH 5.0)轻摇洗涤膜条 2 min; 显色液(19 mL 0.1 mol/L 柠檬酸钠, 1 mL TMB, 2 μ L 30% 过氧化氢)中避光显色 30 min 至 1 h; 用 HPV 基因芯片阅读仪进行结果判读。

2 结 果

2.1 阳性病例基因芯片扫描图谱 图 1 为单一型别 HPV 感染病例(HPV52)的基因芯片检测图谱; 图 2 为两种高危型(HPV33、66)混合感染病例。

2.2 HPV 感染率 714 例门诊患者中检出 HPV 感染者 175 例, 感染率为 24.51%, 其中低危型 HPV 感染率为 8.40%, 高危型 HPV 感染率为 22.97%。从感染的 HPV 型别看, 单一型别感染者 136 例(19.05%), 两种型别混合感染者 29 例(4.06%), 3 种或以上型别混合感染者 10 例(1.40%)。

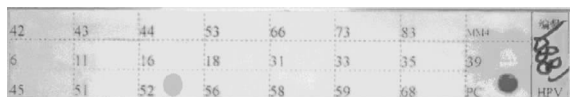


图 1 HPV 52 感染的基因芯片扫描图谱(PC 为阳性质控)

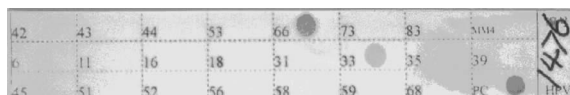


图 2 HPV33、66 混合感染的基因芯片扫描图谱

2.3 HPV 型别分布 见表 1。由表 1 可见, HPV 感染的各种

型别分布中检出率超过 5% 者有 6 种: HPV16 为 18.75%、HPV11 为 14.29%、HPV33 为 11.16%、HPV58 为 9.82%、HPV6 和 18 均为 8.48%。其余 HPV 型别为 29.02%。本组病例中低危型 HPV44、高危型 HPV83 和 MM4 未被检出。

表 1 23 种 HPV DNA 型别检出情况及构成比[n(%)]

HPV 型别	构成比 1	构成比 2	HPV 型别	构成比 1	构成比 2
HPV6	19(8.48)	—	HPV51	3(1.34)	3(1.83)
HPV11	32(14.29)	—	HPV52	6(2.68)	6(3.66)
HPV42	2(0.90)	—	HPV53	1(0.45)	1(0.61)
HPV43	7(3.13)	—	HPV56	8(3.57)	8(4.88)
HPV44	0(0.00)	—	HPV58	22(9.82)	22(13.41)
HPV16	42(18.75)	42(25.61)	HPV59	5(2.23)	5(3.05)
HPV18	19(8.48)	19(11.59)	HPV66	8(3.57)	8(4.88)
HPV31	8(3.57)	8(4.88)	HPV68	4(1.79)	4(2.44)
HPV33	25(11.16)	25(15.24)	HPV73	1(0.45)	1(0.45)
HPV35	5(2.23)	5(3.05)	HPV83	0(0.00)	0(0.00)
HPV39	1(0.45)	1(0.61)	HPVMM4	0(0.00)	0(0.00)
HPV45	6(2.68)	6(3.66)	—	—	—

注:构成比 1 表示所有阳性病例 HPV 型别检出总次数(n=224)中不同型别所占比例;构成比 2 表示所有高危 HPV 阳性型别检出总次数(n=164)中不同高危型别所占比例。—表示无数据。

3 讨 论

HPV 高危型感染是宫颈癌发生的必要条件和首要因素, HPV 导致宫颈癌是目前人类所有癌症病变中明确的致病因子,宫颈癌也成为人类历史上少数几个找到明确病因的肿瘤之一^[2],几乎所有宫颈癌患者的病理标本中均能找到 HPV 高危型病毒^[3],而 HPV 感染的诊断完全依赖于临床标本中 HPV DNA 的检测。对 HPV DNA 进行检测和基因分型对于宫颈癌的早期防治具有非常重要的意义。本文采用核酸扩增和反向点杂交技术对本院妇产科门诊疑似 HPV 感染的女性患者样本进行 HPV DNA 及分型检测,以了解 HPV 感染及其基因型别分布情况,为 HPV 感染诊断及宫颈癌等相关疾病防治提供依据。

本研究结果显示,本组病例中 HPV 的感染率为 24.51%,与宫颈癌密切相关的 18 种高危型 HPV 阳性率为 22.97%,占 HPV 检出型别总数的 73.21%,而 5 种低危型 HPV 阳性率为 8.40%,占 HPV 检出型别总数的 26.79%。其中阳性率与感染率不一致是因为其中存在了两种型别混合感染或者是两种型别以上的混合感染者。除此之外,本组病例中低危型 HPV44、高危型 HPV83 和 HPV MM4 未被检出,是由于 HPV 型别分布具有地域性,与该方法学无关。

1995 年一项来自世界范围的宫颈癌组织标本研究发现^[4],HPV16 和 HPV18 感染率最高,在检出的所有型别中 HPV16 占 50%,HPV18 占 14%,HPV45 占 8%,HPV31 占 5%,其他型别 HPV 占 23%。HPV16、18 感染没有明显地区差异,但有些型别的感染有地区差异,如 HPV45 在非洲西部很常见,而 HPV39、59 仅在美洲的中部和南部出现,HPV52、58 则在中国妇女中检出率最高。本组病例中高危型 HPV 感染率分布中 HPV16 检出率最高,占高危型 HPV 感染人数的

25.61%,其次是 HPV33,占高危型 HPV 感染人数的 15.24%,再次为 HPV58,占高危型感染人数的 13.41%。本研究中 HPV 各型别分布与其他相关研究结果存在一定差别,但 HPV16 检出率仍为最高,且值得一提的是,HPV58 检出率高达 9.82%,而 HPV52 仅检测出 6 例(2.68%)。同时该研究结果也低于文献^[5-6]报道的深圳地区女性 HPV 感染率,产生这种差异的原因可能与受检对象不同有关,Munoz 等^[7]报道也支持此观点。除此之外,本研究结果也支持 HPV 型别分布具有一定地域性的观点。

本研究采用的反向点杂交方法,是以基因芯片作为基础技术,敏感性高,特异性强,检测结果准确可靠,操作简单,通过一次杂交检测不仅可以判断待测样品中是否存在 HPV 感染,而且还可以鉴定出是哪种型别的 HPV 感染;且针对性强,对样品中的 HPV DNA 直接进行检测,可以检测出 HPV 潜伏期感染;同时可检测多种 HPV 型别,对多重 HPV 感染的判断一目了然,克服了其他 HPV 检测方法难以判断混合感染或操作繁琐的缺点,从而简化检测步骤,缩短检测时间和降低患者临床费用等优势。

分子杂交技术证明在低危型 HPV 引起的尖锐湿疣中,病毒多以游离形式存在,而在高危型 HPV16 引起的宫颈癌中,绝大部分病毒 DNA 已整合入宿主细胞 DNA 中,而在 HPV DNA 中常出现基因缺失和突变。采用膜杂交多重检测技术进行 HPV 分型检测使流行病学的研究更深入化,定期、及时地进行 HPV 基因分型诊断是预防宫颈癌的有效途径。

针对中国地域宽广,人口众多,而 HPV 型别分布复杂的实际情况,明确一个地区 HPV 流行的主要型别,可以帮助设计包括该地区常见感染型别的检测试剂盒,提高 HPV 检出率。通过 HPV 分型检测浓缩高风险人群,根据感染型别预测病变进展,评估预后,指导临床医生制定治疗方案。并且可研制有针对性的基因疫苗,最终根除 HPV 感染,实现宫颈癌的一级预防。目前这方面的研究多集中在经济发达地区和大城市,而且资料不多,随着研究的广泛和深入,HPV 基因型与宫颈病变的关系以及对临床工作的指导作用将被进一步阐明。

参考文献

[1] 何进才,周小梅,黄涛,等. 反向杂交法检测 23 种人乳头瘤病毒型别的研究[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(1): 44-47.

[2] Zur Hausen H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer[J]. J Natl Cancer Inst,2001,93(4):252-253.

[3] 李洁,刘宝印. 中国妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒感染及其地理分布的调查[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,1996,10(1):50-51.

[4] Bosch FX,Manos MM,Munoz N,et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical (IBSCC) study group[J]. J Natl Cancer Inst,1995,87(11): 796-802.

[5] 蔡虹. 深圳市城区育龄妇女 HPV 感染状况调查[J]. 中国妇幼保健杂志,2004,19(9):90-92.

- [6] 王洪军,郭永忠,史冰洋,等. 深圳地区妇科疾病高危型人乳头瘤病毒感染状况的调查[J]. 肿瘤研究与临床,2004,16(5):359-360.
- [7] Munoz N,Kato I,Bosch FX,et al. Risk factors for HPV DNA detection in middle-aged women[J]. Sex Transm Dis,1996,23(6):504-510.
- (收稿日期:2011-06-28)

• 临床研究 •

临产孕妇血浆 D-二聚体 纤维蛋白原及抗凝血酶Ⅲ检测的临床意义

杜建钢(南京医科大学附属苏州市立医院本部检验科,苏州 215002)

【摘要】 目的 探讨临产孕妇血浆 D-二聚体(D-D)、纤维蛋白原(Fib)及抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)的检测结果与产后出血的关系。**方法** 采用 Sysmex CA6000 全自动血凝分析仪检测 198 例产后出血的临产孕妇及 284 例正常生产的临产孕妇血浆 D-D、Fib 及 AT-Ⅲ的结果并进行比较。**结果** 198 例产后出血的临产孕妇与 284 例正常生产的临产孕妇比较发现,产后出血的临产孕妇血浆 D-D 的检测结果明显高于正常生产的临产孕妇,差异有统计学意义($P<0.05$);Fib 及 AT-Ⅲ的检测结果明显低于正常生产的临产孕妇,差异也有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 临产孕妇血浆 D-D、Fib 及 AT-Ⅲ的检测对产后出血及其并发血栓栓塞性疾病的预测、预防和及时治疗具有重要的临床意义。

【关键词】 产后出血; D-二聚体; 纤维蛋白原; 抗凝血酶Ⅲ
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.21.029 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)21-2616-02

产后出血是分娩期严重的并发症,居我国目前孕产妇死亡原因的首位,其发生率占分娩总数的 2%~3%^[1]。产后出血极易导致血栓栓塞性疾病的发生,对产妇的生命安全构成严重威胁。据文献报道,我国孕产妇死亡中有 49.9% 孕妇死于产后出血,其中产后出血占产科出血死亡构成比的 87.8%^[2]。本文对临产孕妇血浆 D-二聚体(D-D)、纤维蛋白原(Fib)及抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)的检测结果进行分析,旨在为临床对临产孕妇产后出血及其并发血栓栓塞性疾病的预测、预防和及时治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)产后出血组:本院 2009 年 1 月至 2010 年 1 月经临床诊断为产后出血的临产孕妇共 198 例,年龄 20~45 岁。(2)正常生产组:随机选取本院 2009 年 1 月至 2010 年 1 月经临床诊断无产后并发症的临产孕妇共 284 例,年龄 20~46 岁。

1.2 仪器与试剂 采用日本 Sysmex CA6000 全自动血凝分析仪,所用试剂均为仪器配套 DADE BEHRING 试剂。每天室内质控均为在控。

1.3 方法 使用一次性 BD 血凝专用真空采血管,抽取临产孕妇产前肘静脉血 2.7 mL 与 BD 血凝管内 109 mmol/L 枸橼酸钠按 9:1 比例混合,3 000 r/min 离心 5 min 后检测血浆 D-D、Fib 及 AT-Ⅲ的结果,所有标本均在采血后 2 h 内检测完毕。

1.4 统计学方法 采用配对 t 检验及 t' 检验,运用四川大学华西公共卫生学院卫生统计学教研室设计的 PEMS3.1 统计软件包进行统计学处理。

2 结果

产后出血组 D-D 检测结果明显高于正常生产组,差异有统计学意义($P<0.05$);血浆 Fib 及 AT-Ⅲ的检测结果明显低于正常生产组,差异也有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组血浆 D-D、Fib 及 AT-Ⅲ检测结果

组别	D-D($\mu\text{g/L}$)	Fib(g/L)	AT-Ⅲ(%)
产后出血组	905.10 $\pm$ 418.41	3.36 $\pm$ 0.96	81.18 $\pm$ 20.96
正常生产组	526.19 $\pm$ 315.28	3.62 $\pm$ 0.73	89.81 $\pm$ 17.52
P	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

在正常生理状态下,凝血和抗凝血处于一种动态平衡状态,促进和抑制血液凝固的物质相互作用和制约,构成了凝血机制的自我控制和调节。妊娠是一种复杂的生理过程,其凝血因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ等可升高到原水平的 150%~500%^[3],致使抗凝功能相对减弱,凝血和抗凝血机制发生变化,导致生理性高凝状态,这种过度高凝状态是一种生理性保护机制,可防止产时过量出血,但同时也是容易形成血栓的原因之一。在该高凝状态下,由于产妇生产过程中一些诱发因素的作用,易导致组织损伤,组织凝血活酶类促凝物质进入血液,消耗大量的凝血因子,引起凝血功能障碍,致使产妇在生产过程中及产后出现异常出血。

D-D 是血浆中的 Fib 在凝血酶作用下形成纤维蛋白单体,经因子ⅩⅢa 交联后,由纤溶酶降解产生的特异性终末产物,为继发性纤溶的特有代谢物,D-D 能正确反映体内凝血酶和纤溶酶活性^[4]。其含量的升高可反映体内继发性纤溶活性增强。Fib 是一种糖蛋白,与凝血酶活性有关,是血栓开成的重要因素之一^[5-6],在凝血酶作用下水解形成肽 A 和肽 B,最后形成不溶性的纤维蛋白以止血。Fib 在血小板聚集过程起重要作用,与血小板膜表面糖蛋白Ⅱb/Ⅲa 结合介导血小板的聚集及黏附反应,形成血小板聚集体,最终形成血栓。AT-Ⅲ是由肝脏和血管内皮细胞合成的依赖肝素的丝氨酸蛋白酶抑制物,是人体内最重要的凝血酶抑制剂,占血浆凝血酶抑制活性的 75%^[7],可抑制凝血酶的生成,也能直接与凝血酶结合,致使凝