

血红蛋白和宫颈黏液对人乳头状瘤病毒分型的影响

伍金华¹, 吴艳梅², 牛映红¹ (1. 广东省江门市中心医院检验科 529000; 2. 广东省恩平市人民医院检验科 529400)

【摘要】 目的 探讨血红蛋白和宫颈黏液对导流杂交基因芯片 (HybriMax) 技术检测人乳头状瘤病毒 (HPV) 分型结果的影响。**方法** 应用碱裂解法分别提取不同类型的宫颈脱落细胞样本的 HPV DNA, 经扩增后采用 HybriMax 技术对 HPV DNA 进行分型检测。**结果** (1) 非溶血样本经不同浓度 (0.75~24.0 g/L) 血红蛋白处理后, HPV 分型结果不受影响, 符合率为 100%。(2) 无宫颈黏液标本和宫颈黏液标本 HPV DNA 的阳性率分别为 25.11% 和 20.92%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.364, P<0.05$)。(3) 宫颈黏液标本和无宫颈黏液标本的复查率分别为 6.91% 和 2.49%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=24.049, P<0.01$)。**结论** 溶血的宫颈脱落细胞标本, 可采用碱裂解法提取 HPV DNA 进行 HybriMax 技术分型检测。标本中的宫颈黏液可影响本法对 HPV DNA 分型的检测。

【关键词】 人乳头状瘤病毒; 血红蛋白; 宫颈黏液; 导流杂交基因芯片技术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.10.014 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)10-1180-03

Impact of hemoglobin and cervical mucus on the detecting genotypes of human papillomavirus WU Jin-hua¹, WU Yan-mei², NIU Ying-hong¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Jiangmen, Guangdong 529000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Enping, Guangdong 529400, China)

【Abstract】 Objective To investigate the impact of hemoglobin and cervical mucus on the detecting genotypes of human papillomavirus by flow through hybridization and gene chip technology. **Methods** Nucleic acid of HPV were extracted by using the alkaline lysis methods, and after gene amplification, HPV subtype were detected by HybriMax from cervical epithelium samples containing different concentrations of hemoglobin or cervical mucus samples. **Results** (1) If the concentration of hemoglobin is less than 24.0 g/L in cervical epithelium samples, genotypes of HPV were not affected in the process of HybriMax. (2) The positive rate for samples with cervical mucus and without mucus were 25.11% and 20.92% respectively, and this discrepancy of positive rate was considered to have statistically significance ($\chi^2=5.364, P<0.05$). (3) The rate of re-examination for the samples with and without cervical mucus was 6.91% and 2.49% respectively, and this difference was considered as statistically significant ($\chi^2=24.049, P<0.01$). **Conclusion** For cervical epithelium samples with hemoglobin, the results suggested that using the alkaline lysis methods and HybriMax is suitable for detection the genotypes of HPV DNA. The detection of HPV DNA is interfered by cervical mucus.

【Key words】 human papillomavirus; hemoglobin; cervical mucus; flow-through hybridization and gene chip

随着分子生物学和分子流行病学的迅速发展, 病毒感染与肿瘤的关系受到广泛重视。人类乳头状瘤病毒 (HPV) 感染已被公认为是引起宫颈癌及癌前病变的主要原因^[1]。研究证明, 99% 的女性子宫颈癌伴有 HPV 感染^[2]。根据 HPV 基因序列不同, 目前已分离出 120 多种亚型^[3]。HPV DNA 分型检测作为临床预测患病风险、选择治疗方案和 HPV 疫苗开发研究的重要指标日益受到重视。目前, 作为一种新的 HPV 分型检测技术, 导流杂交基因芯片技术具有灵敏高效、快速检测 21 种 HPV 亚型的特点而广泛被实验室所采用。通常医生在采样时必须注意以下 2 点: (1) 采样时间避开妇女的月经期; (2) 先用干净棉签擦净宫颈口黏液再取样。然而, 在某些病理状态下, 如宫颈癌、宫颈炎、宫颈糜烂等情况下, 即使严格按照采样规范进行收集样本, 采集到的标本依然不可避免地出现混有血液或者脓性宫颈黏液等现象。血液和宫颈黏液是否会干扰 HPV 分型的检测, 本研究采用碱裂解法对含不同浓度血红蛋白或宫颈黏液的宫颈脱落细胞标本进行 HPV DNA 抽提, 经 DNA 扩增后采用核酸分子快速导流杂交技术对 HPV DNA 进行分型检测, 并分析溶血和黏液标本对 HPV 分型结果的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 6 月至 2011 年 6 月本院妇科和妇科门诊女性患者 HPV 标本作为研究对象, 年龄 19~62 岁, 平均 (35±11) 岁。

1.2 仪器与试剂 MyCycler 聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪来自美国 Biorad 公司; 医用核酸分子快速杂交仪来自潮州凯普生物化学有限公司; 核酸的抽提、扩增和杂交分型检测试剂盒均购自潮州凯普生物化学有限公司。

1.3 模拟溶血试验对 HPV 分型检测结果的影响

1.3.1 标本收集和分组 所有标本采集均经就诊者本人同意。严格按照操作说明书执行, 医生用阴道内窥器暴露宫颈, 用干棉签擦干净宫颈口分泌物, 用凯普公司专用的毛刷紧贴宫颈口黏膜并旋转 5 周, 收集宫颈口及颈管脱落上皮细胞, 并将刷头放入装有保存液的小瓶内, 30 min 内送检, 4℃ 保存, 3 d 内测定, 测定前先离心取上清液测定血红蛋白的浓度。标本要求不带血液和黏液, 血红蛋白浓度为 0.00 g/L。每份标本均按照操作说明取 450 μL 进行测定。收集 HPV 单一和混合感染标本 150 例, 随机分入 6 种不同浓度的模拟溶血组

(25 份/组)。

1.3.2 模拟溶血组标本的制备 取一份妇科体检健康的女性志愿者乙二胺四乙酸二钾抗凝全血样本,离心去血浆后,用无菌生理盐水将红细胞洗涤数遍,加入灭菌蒸馏水溶解红细胞,测定血红蛋白溶液浓度,然后用灭菌蒸馏水对倍稀释成一系列梯度浓度的血红蛋白溶液。将模拟溶血组样本(450 微升/份)与其作 1∶1 混合,得到 HPV DNA 含量相同而血红蛋白终浓度不同的模拟溶血样本。

1.3.3 HPV 基因分型检测步骤 主要检测步骤包括 HPV-DNA 提取、PCR 扩增、导流杂交,每一步均严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 结果判断 肉眼观察按芯片上 HPV 亚型分布相应着色点位判断结果,阳性点呈蓝紫色圆点,有 1 个圆点阳性属单一感染;有 2 个及 2 个以上圆点阳性属混合感染,每张芯片设有反应质控点和杂交显色质控点各一个。每次检测必须具备反应质控(IC)点、杂交显色质控点、阳性对照点和阴性对照点同时在控。如 IC 点及 HPV 分型阳性点不显色,按说明书要求将 DNA 模板稀释 10 倍重复 PCR 过程,然后再杂交分析。

1.4 宫颈黏液对 HPV DNA 检测的影响

1.4.1 标本采集 所有标本采集均经就诊者本人同意。标本采集同 1.3.1,样本要求不带血液,血红蛋白浓度为 0.00 g/L。

1.4.2 样本分组 按样本采集情况分为无黏液组和有黏液组。

1.4.3 HPV 基因分型检测步骤和结果判断 检测步骤和结果判断同 1.3.3 和 1.3.4。

1.5 统计学方法 采用 SPSS Statistics 17.0 软件包进行统计学分析。采用符合率检测血红蛋白对 HPV 分型的影响;采用卡方检验比较无黏液组和有黏液组标本 HPV 的检出率和复查率。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度血红蛋白对 HPV 分型结果的影响 见表 1。由表 1 可见,各模拟溶血实验组 HPV 分型结果分别与相应原始标本进行对比,当血红蛋白终浓度在 0.75~24.00 g/L 范围内,HPV 分型的结果完全一致,符合率为 100%。由此可见,无论是血性样本中血红蛋白浓度低至 0.75 g/L 的轻微溶血,还是血红蛋白浓度高达 24.00 g/L 的严重溶血,HPV 分型结果均未受到影响。

表 1 不同浓度血红蛋白对 HPV 分型结果的影响		
组别	血红蛋白终浓度(g/L)	HPV 分型符合率(%)
实验组 1	0.75	100
实验组 2	1.50	100
实验组 3	3.00	100
实验组 4	6.00	100
实验组 5	12.00	100
实验组 6	24.00	100

2.2 宫颈黏液对 HPV DNA 检测的影响 见表 2。经统计有黏液样本和无黏液样本 HPV 检出率差异有统计学意义($\chi^2=5.364, P<0.05$),由此认为标本中的宫颈黏液可能对 HPV 检测的阳性率存在影响。同时,有黏液样本与无黏液样本由于杂交过程中 IC 点及 HPV 分型阳性点均不显色而需要复查,由此提示 DNA 抽提过程中出现 PCR 抑制物。

表 2 宫颈黏液对 HPV-DNA 分型结果的影响				
标本类型	阳性例数	阴性例数	合计	阳性率(%)
无黏液组	282	841	1 123	25.11
有黏液组	221	835	1 056	20.92
合计	503	1 676	2 179	23.08

2.3 有黏液组与无黏液组标本复查率结果 见表 3。由表 3 可见,有黏液样本的复查率高于无黏液样本,差异有统计学意义($\chi^2=6.929, P<0.01$)。

表 3 有黏液组与无黏液组标本复查率的比较				
标本类型	复查例数	不复查例数	合计	复查率(%)
无黏液组	28	1 095	1 123	2.49
有黏液组	73	983	1 056	6.91
合计	101	2 078	2 179	4.64

3 讨 论

子宫颈癌是目前所有癌症当中惟一病因明确、能有效预防、早期及时发现、并且能早期治疗的癌症。大量研究已证明,女性患宫颈癌是子宫颈被 HPV 感染所致,99.8%的宫颈癌患者中可以检测到不同型别的 HPV DNA,而 HPV 阴性者几乎不会发生宫颈癌。HPV DNA 检测结果的准确性往往影响临床对疾病的早期诊断。而 HPV 分型检测结果的准确性与核酸的提取技术及标本的性质密切相关。

本研究通过碱裂解法抽提 HPV DNA,经过 PCR 扩增后,采用 HybriMax 技术进行 HPV 分型研究。HybriMax 技术是 HPV 基因分型检测的新方法,采用基因扩增技术及导流杂交原理,通过反向点杂交检测扩增产物与包被有型特异性探针膜杂交结果,采用碱性磷酸酶系统定性检测,从而对 21 种 HPV 基因型进行分型检测,具有覆盖面广、灵敏度和特异性高、检测通量高等性能特点,有利于随访和流行病学调查^[4-5]。在标本收集过程中,尽管医生已严格按照操作规程,如避开妇女的月经期,但在某些情况下,如严重的宫颈炎、宫颈糜烂、宫颈癌等因素的影响下可以导致采样位置充血、水肿,触之易出血。有研究表明,标本血红蛋白中的血红素可通过其卟啉环与 Taq 酶的不可逆结合而抑制 Taq 酶的活性,导致 PCR 受到抑制而出现假阴性结果^[6]。因此,病毒核酸的提取方法能否有效去除血红蛋白显得尤为重要。本研究所采用的碱裂解法是先通过高速离心沉淀宫颈上皮细胞后,吸弃上清液,再加入碱性裂解液,经煮沸裂解使病毒核酸释放出来。虽然该方法并非对核酸进行纯化萃取,但吸弃上清液和多次用蒸馏水清洗离心沉淀物的步骤中已将绝大部分血红蛋白去除。同时,导流杂交技术设置了 IC 点,有利于监控 PCR 过程是否出现抑制现象,从而杜绝假阴性结果。本实验结果显示,随着样本中血红蛋白浓度的改变(0.75~24.00 g/L),杂交过程 IC 点均在控,HPV 的分型检测结果依然保持着高度的一致性。日常工作中因病理情况而引起的标本溶血多为轻微或中度溶血,此类标本如采用碱裂解法提取病毒核酸,对 HPV 分型结果无影响。

宫颈黏液是含有糖蛋白、血浆蛋白、氯化钠和水分的水凝胶。宫颈黏液含量的多少与妇女生理性周期性的变化有关,也与妇科病理变化有关,如内分泌不平衡、黏液脓性宫颈炎、生殖器官病变等。因此,医生采样过程并不能完全杜绝标本带有黏

液甚至脓性黏液等情况的出现。陈凤等^[7]研究表明,第 2 代杂交捕获法检测 HPV DNA 结果不受标本带有分泌物的影响。但该法存在一定的交叉反应现象,无法进行 HPV 分型,进口试剂盒成本高,目前还不能达到全面普及^[8]。在本研究中有黏液组的 HPV 检出率(20.92%)与无黏液组的 HPV 检出率(25.11%)差异有统计学意义,因此表明样本中宫颈黏液的存在影响了 HPV 的检出率。探讨其原因有:(1)采样误差。HPV 主要宿主是宫颈上皮细胞,受到宫颈黏液特别是脓性黏液的影响,采样过程收集到的不是病变位置的上皮细胞,而仅仅是宫颈黏液。相比之下,无黏液标本中宫颈上皮细胞的含量明显比有黏液标本的要高,易于获得足够含量的 HPV DNA 模板量,有利于提高 HPV 的检出率。(2)方法学误差。含有 HPV 的宫颈上皮细胞被包裹在宫颈黏液中,使用碱裂解法在抽提 HPV DNA 过程中,可能未能充分溶解黏液释放出病毒 DNA,导致抽提效果不佳,无法获得足够的模板量进行 PCR,从而使黏液组一部分标本结果出现假阴性。同时,本研究数据显示,有宫颈黏液标本的复查率(6.91%)比无宫颈黏液的复查率(2.49%)高。这一现象国外有类似报道,Peavor 等^[9]通过内标(β -珠蛋白)监控发现,由于 DNA 抽提失败而需要复查的标本占 7%。本文探讨宫颈有黏液标本高复查率原因在于有黏液标本可能含有较多的黏蛋白、免疫球蛋白、蛋白酶和多糖等内源性 PCR 抑制物。抑制物可通过干扰核酸提取过程的细胞裂解或者通过抑制 DNA 聚合酶活性而干扰 PCR^[10],导致杂交 IC 点不显色。由此可见,宫颈黏液标本不仅影响了 HPV 的检出率,也在一定程度上干扰 PCR 和杂交过程。

综上所述,在严格遵循标本采集要求的前提下,如何有效清除黏液对 HPV DNA 抽提的干扰,提高 HybridMax 技术对 HPV 分型的阳性率,尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 518-527.
- [2] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87: 796-802.
- [3] Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection[J]. Vaccine, 2006, 24(Suppl 1): 1-15.
- [4] 陶萍萍, 卞美璐, 欧华, 等. 导流杂交基因芯片技术在人乳头状瘤病毒检测中应用的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(1): 43-47.
- [5] 吕晓萍, 李体远, 戴勇, 等. 人乳头状瘤病毒快速导流杂交与传统杂交法比较基因分型及临床应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15: 618-621.
- [6] Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich HA, eds. PCR technology: principles and applications for DNA amplification[M]. New York: Stockton Press, 1989: 31-38.
- [7] 陈凤, 沈艳红, 刘彬, 等. 第二代杂交捕获法检测子宫颈癌人乳头状瘤病毒影响因素的研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(2): 129-130.
- [8] Poljak M, Marin IJ, Seme K, et al. Hybrid Capture II HPV Test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail [J]. J Clin Virol, 2002, 25(suppl 3): 89-97.
- [9] Peavor R, Jones J, Fiander AN, et al. Development of optimal liquid based cytology sample processing methods for HPV testing: minimising the 'inadequate' test result[J]. J Virol Methods, 2011, 173(2): 374-377.
- [10] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 70-71.
- [1] Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 518-527.
- [2] Clarke R, Homocysteine B. Vitamins and the risk of cardiovascular disease[J]. Clin Chem, 2005, 57(8): 1201-1202.
- [3] Veeranna V, Zalawadiya SK, Niraj A, et al. Homocysteine and reclassification of cardiovascular disease risk[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(10): 1025-1033.
- [4] 全国脑血管病学术会议. 脑卒中患者临床功能缺损评分标准[J]. 中国实用内科杂志, 1997, 17(5): 3139.
- [5] 陈彦龙. 急性脑血管病与血浆同型半胱氨酸水平关系研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2009, 16(5): 385-386.
- [6] 胡晓芳, 罗军, 孟冬娅, 等. 同型半胱氨酸在急性脑血管病发病早期中的作用地位[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(3): 266-274.
- [7] 胡志雄, 汤智敏. 同型半胱氨酸与脑血管病研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2009, 17(9): 839-841.
- [8] 李福春, 卢宏. 血浆同型半胱氨酸水平与缺血性脑血管病的相关性研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 6(1): 29-31.
- [9] 高嵩, 危春英, 陈开森. 原发性高血压患者血清同型半胱氨酸和超敏 C 反应蛋白及叶酸的变化及意义[J]. 检验医学与临床, 2011, 18(6): 2243-2244.
- [10] 张高明, 李志沐, 许森林, 等. 高血压病及其血管病变患者血浆同型半胱氨酸检测的临床价值[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 10(1): 56-57.
- [11] 潘晓华, 高文伟. 高同型半胱氨酸血症与缺血性脑血管病相关性[J]. 中国热带医学, 2005, 5(8): 1679-1681.

(收稿日期: 2011-12-28)

(收稿日期: 2011-12-27)

(上接第 1179 页)