

• 检验技术与方法 •

应用支链 DNA 技术检测宫颈高危人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA

张凤芹, 张清泉, 侯素平, 邱 雷, 冀雪霞

(哈励逊国际和平医院病理科, 河北衡水 053000)

摘要:目的 评价高危人乳头瘤病毒(HPV)E6/E7 mRNA 检测宫颈病变的临床应用价值。方法 用支链 DNA(b-DNA)技术检测宫颈上皮细胞或组织高危 HPV E6/E7 mRNA 转录情况,以液基细胞结果和组织病理学结果为标准评价高危 HPV E6/E7 mRNA 临床价值标准。结果 细胞学异常组的阳性率显著高于细胞学正常组($P < 0.05$);宫颈癌前病变和宫颈癌之间阳性率无统计学差异。结论 宫颈上皮的异常与高危 HPV E6/E7 mRNA 的转录有关,在宫颈癌筛查中检测高危 HPV E6/E7 mRNA 的转录具有临床应用价值。

关键词:人乳头瘤病毒; 宫颈疾病; 支链 DNA 技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.06.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)06-0705-02

宫颈癌发生是多因素综合作用的结果,高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染是一个重要因素,遗传和环境因素也同样起作用,激素类避孕药、免疫抑制、某些饮食缺陷及单纯疱疹病毒 II 型感染是可能的协助因子^[1]。HPV 早期基因编码 E1、E2、E4、E5、E6、E7 蛋白,其中高危 HPV 编码的 E6、E7 蛋白有致癌性^[2]。为研究高危 HPV E6/E7 mRNA 和宫颈上皮异常的关系,本研究用支链 DNA(b-DNA)技术检测宫颈高危 HPV E6/E7 mRNA,标本来自于 2011 年 7 月至 2012 年 9 月本科室宫颈液基细胞学标本及宫颈石蜡标本,结合细胞学及病理学结果进行分析,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2011 年 7 月至 2012 年 9 月在本院因宫颈炎、阴道异常出血及积液、阴道分泌物增多而就诊及常规妇科体检的妇女为研究对象(均已有性生活),年龄 19~65 岁。非宫颈癌术后患者以细胞学分为正常 17 例和异常 13 例,宫颈癌术后患者以细胞学正常 7 例和异常分 1 例,组织学非癌标本 11 例,宫颈鳞状细胞癌标本 6 例。

1.2 仪器与试剂 科蒂亚生物有限公司电热恒温鼓风干燥箱、冷光仪、宫颈高危 HPV E6/E7 mRNA 检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集与保存方法 (1)细胞标本:用细胞采样器的中央刷毛部分轻轻的深插入子宫颈管内,按同一个时针方向转动采样器 5~8 周后,将收集的细胞放入细胞保存液中。(2)宫颈组织:用蜡块包埋的组织,切片,脱蜡至水,用刀片刮下。

1.3.2 标本处理 (1)细胞标本:将标本移入离心管,3 000 r/min 离心 5 min 后倒掉上清液,用 2 mL 去离子水洗后再次离心,去上清液,达到标本同质化的目的。将离心后沉淀细胞团。(2)石蜡块包埋的组织,切片,脱蜡至水,用刀片刮下,置入离心管。

1.3.3 转入物的释放 (1)将已处理的有细胞的离心管中加入裂解混合液(200 μ L 裂解液和 400 mL ddH₂O,混合比例为 1:2),用移液枪吹打细胞团,使细胞分散悬浮,再加入 5 μ L 蛋白酶 K。放入 65 $^{\circ}$ C 恒温箱中放置 1 h 后取出,取上清液用于检测。(2)将已处理的有组织的离心管中加入裂解混合液 300 μ L(比例见上述)。用移液枪吹打细胞团,使细胞分散悬浮。再加入 2 μ L 蛋白酶 K。放入 65 $^{\circ}$ C 恒温箱中放置 0.5 h 后取出,取上清液用于检测。按照说明书配置缓冲液。

1.3.4 使用高危 HPV E6/E7 mRNA 检测试剂盒进行检测 操作严格按说明书进行。

1.4 统计学处理 用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 60 例未确诊宫颈癌人群的检测结果分析 该人群分为细胞学结果正常组和细胞学结果异常组,两组之间 E6/E7 mRNA(HPV)阳性率进行比较。34 例细胞学结果健康群 E6/E7 mRNA 阳性率为 53%(18/34),26 例细胞学结果异常人群 E6/E7 mRNA(HPV)阳性率为 85%(22/26),细胞学异常组的阳性率高于细胞学正常组($P < 0.05$)。

2.2 宫颈瘤术后人群众检测结果分析 7 例细胞学结果正常者 E6/E7 mRNA(HPV)阳性者 5 例,阳性率为 71%,1 例细胞学结果异常人群 E6/E7 mRNA(HPV)为阳性者,例数太少无法进行统计学分析。阳性拷贝值范围 121.750~31 545,应注意密切随访。

2.3 组织学标本的检测 共 34 例,分两组:宫颈癌患者组和癌前病变组。22 例癌前病变人群 E6/E7 mRNA(HPV),阳性率为 91%(20/22),宫颈癌人群 E6/E7 mRNA(HPV),阳性率为 100%(12/12),两组间阳性率差异没有统计学意义($P > 0.05$)。宫颈癌前病变组阳性拷贝值范围 32.870~11 274.460,宫颈鳞状细胞癌阳性拷贝值范围 15 516.400~246 410.890。宫颈鳞状细胞癌阳性拷贝值均值高于癌前病变组。

3 讨论

癌前病变具有进展性和可逆性,决定于病变的范围及程度。一般说,级别越高发展为浸润癌的机会越多,级别越低,自然消退的机会也越多。发展为原位癌的百分率:轻度不典型增生为 6.2%,中度不典型增生为 12.9%,轻度不典型增生为 29.1%^[1]。高危型 HPV 可导致高度宫颈上皮内瘤病变与宫颈癌的发生。HPV 是一类小双股 DNA 病毒,E6、E7 蛋白作用于细胞增殖抑制系统,E6 蛋白能结合 P53 蛋白,与泛素连接酶形成三聚体复合物,使 P53 蛋白失去抑癌作用。E7 蛋白能调控许多蛋白,如 Rb 家族及细胞周期调控蛋白,从而使细胞无限增殖^[2]。

E6、E7 致癌蛋白是细胞恶性转化的主要原因,一旦 HPV 整合入人基因组,E6/E7 mRNA 的表达不受限制,将增加到一个引起恶性转化的水平,检测这种癌基因的转录不必重复进行即能确诊高危反复感染者^[3]。

本研究表明,高危 HPV E6/E7 mRNA 的阳性率随细胞的异常而上升;宫颈上皮的 CIN I 及 CIN II~III 者高危人乳头状瘤病毒(HPV)E6/E7 mRNA 阳性表达高达 91%;宫颈癌术后仍有 75% 的患者 E6/E7 mRNA 为阳性。其中阳性拷贝值高达 31 545.920 的部分患者提示宫颈仍有 HPV 病毒感染,且为高表达,应密切随访以防复发。宫颈鳞状细胞癌患者高危 HPV E6/E7 mRNA 阳性表达高达 100%且宫颈鳞状细胞癌阳

性拷贝值范围 15 516. 400~246 410. 890, 远高于无鳞状上皮细胞内病变者高危人乳头状瘤病毒(HPV)E6/E7 mRNA 阳性拷贝值范围 40. 530~2 069. 020。宫颈上皮感染 HPV 病毒后不一定都引起上皮细胞的异常, 高危 HPV E6/E7 mRNA 的阳性一定要引起足够的注意。宫颈癌术后高危 HPV E6/E7 mRNA 的阳性也要重视, 以防其复发。

总之高危 HPV E6/E7 mRNA 在预防宫颈癌发生方面作为检测指标具有临床意义。

参考文献

[1] 刘复生, 刘彤华. 肿瘤病理学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和

• 检验技术与方法 •

其他微生物及酸碱前处理对诺卡菌分离培养的影响

李术惠¹, 王晓燕¹, 曲本祥², 李晓军¹, 胡志红²

(1. 威海市传染病医院检验科, 山东威海 264200; 2. 威海市中医院, 山东威海 264200)

摘要:目的 研究快速生长的其他微生物以及酸碱前处理方法对诺卡菌分离培养的影响情况。方法 将大肠埃希菌标准菌株 ATCC25922、金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 与大致等量的星形诺卡菌经研磨、振荡混匀后分别制成混合菌液; 先直接接种血平板, 然后分别经 3% 的 HCl、4% 的 NaOH 以及用 N-乙酰-L-半胱氨酸-NaOH 消化液(NALC-NaOH)前处理后再接种培养, 观察记录结果。结果 混合菌液在血平板上培养 24 h 后, 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌均大量生长, 菌落可达 0.5 mm; 但培养 48 h 后, 才可见到少量几个针尖样的诺卡菌菌落。混合菌液经 3% 的 HCl 或 4% 的 NaOH 前处理后, 培养 7 d 仍无菌生长; 经 NALC-NaOH 法前处理再培养后, 仅有诺卡菌生长。结论 标本中混有其他快速生长的微生物时, 诺卡菌的培养会受到抑制、掩盖, 不易检出。3% 的 HCl、4% 的 NaOH 均可杀灭诺卡菌; 而用 NALC-NaOH 消化液前处理杂菌污染的标本时, 则有助于诺卡菌的选择检出。

关键词:星形诺卡菌; 培养; 前处理

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 06. 033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)06-0706-02

诺卡菌广泛存在于自然界中, 对人有致病的主要是星形诺卡菌和巴西诺卡菌^[1]。诺卡菌病是由诺卡菌引起的一种急性、亚急性感染性疾病; 其多发生于长期应用皮质类激素、免疫抑制剂及广谱抗菌药物的患者^[2-3]。近年来, 有关诺卡菌病的报道越来越多, 以肺诺卡菌病为多见^[4]; 该病临床表现及影像学检查无特异性, 易漏诊误诊; 病原学检查是诊断该病的重要依据。本研究旨在了解其他快速生长的微生物以及酸、碱等前处理方法对诺卡菌分离培养的影响, 并探讨从混合标本中分离诺卡菌的实用方法, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 试验菌株 2 株星形诺卡菌从临床肺结核疑似患者的痰液标本中分离获得; 另 1 株星形诺卡菌及大肠埃希菌标准菌株 ATCC25922、金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 均来为于山东省临床检验中心发放的全省室间质评用菌株。

1.2 培养基 改良中性罗氏培养基(L-J 培养基)由山东省胸科医院汉光国际感染性疾病研究中心按文献^[5]配制并提供; 血平板为济南百博生物公司产品。

1.3 方 法

1.3.1 标准菌株 ATCC25922、ATCC25923 对诺卡菌生长的影响 选取血平板上培养 4 d、直径约为 0.5 mm 大小的 3 个星形诺卡菌菌落; 再选取同等大小的 3 个 ATCC25922 菌落, 在盛有 2 mL 生理盐水的无菌试管内壁研磨后、漩涡式振荡混匀, 制成 ATCC25922 与诺卡菌的混悬液。用同样方法获得 ATCC25923 与诺卡菌的混悬液 2 mL。然后, 各取 20 μL 分别分区划线接种于血平板上, 35 ℃ 培养进行观察。

1.3.2 不同前处理液对诺卡菌的筛选效果及生长的影响 将用上述方法获得的 ATCC25922、ATCC25923 与星形诺卡菌的

医科大学联合出版社, 1997: 136-137.

[2] 王怡, 郭潮潭. 人乳头状瘤病毒与宫颈癌关系的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2010, 11(3): 862-864.

[3] 卢文波, 姜智南, 陈顺美, 等. 人乳头状瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测宫颈高度病变的临床评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(22): 155-157.

(收稿日期: 2012-12-01)

混合菌液, 分别用等量的前处理液如 4% NaOH 作用 20 min^[5]、3% HCl 作用 20 min^[6], 用 N-乙酰-L-半胱氨酸-NaOH 消化液(NALC-NaOH)前处理^[5]后; 再按文献^[5]的要求加入 PBS 缓冲液混匀离心 15 min, 倒掉上清液后各取 0.1 mL 残渣分别接种于血平板及 L-J 培养基上, 35 ℃ 培养进行观察。

2 结 果

2.1 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌对诺卡菌生长影响的观察 大肠埃希菌 ATCC29522 与诺卡菌混悬液接种于血平板上培养 24 h 后, 可见大量直径 0.5 mm 左右的大肠埃希菌单个菌落; 48 h 后才可见到少数几个针尖样的诺卡菌菌落散布于 ATCC25922 菌落间; 培养 72 h, 有的诺卡菌菌落直径才能达到 0.5 mm 左右。ATCC25923 与诺卡菌混悬液在血平板上的生长情况类似。

2.2 不同前处理液对诺卡菌的筛选效果及生长的影响 ATCC25922、ATCC25923 与星形诺卡菌的混悬液, 经 3% 的 HCl 及 4% 的 NaOH 前处理后, 在血平板、L-J 培养基上培养至 7 d, 均无菌落生长。经 NALC-NaOH 前处理后, 在血平板及 L-J 培养基上, 48 h 后即可见诺卡菌菌落生长, 72 h 后可达 0.5 mm 左右; 而 ATCC25922、ATCC25923 菌株均不生长。

3 讨 论

实验结果显示, 星形诺卡菌生长缓慢, 在血平板上培养 48 h 仅见针尖样小菌落; 若与其他快速生长的微生物如大肠埃希菌、葡萄球菌混合存在时, 诺卡菌的生长受到了明显的抑制和掩盖, 不易检出、不易被发现。故延长培养时间^[7], 使用选择性方法有助于该菌的发现。含 3% HCl 或 4% NaOH 消化液对星形诺卡菌有杀灭作用; 但经 NALC-NaOH 法前处理后, 诺卡菌在血平板及 L-J 培养基上均能生长良好, 表明其仅对