

• 调查报告 •

多重实时 PCR 用于高危型人乳头瘤病毒感染检测的价值

陈海雁¹, 刘红军², 罗锦彬¹, 徐伟帆¹

(1. 广东省惠州市惠阳区人民医院检验科, 广东惠州 516211;

2. 广州达安临床检验中心有限公司, 广东广州 510000)

摘要:目的 探讨多重实时 PCR 技术的应用对高危型人乳头瘤病毒感染检测的临床意义。方法 选择疑似 HPV 感染和宫颈病变的病例 178 例, 分别应用多重实时 PCR 检测法与 HC2 检测法检测高危型 HPV 及其亚型的感染情况。结果 多重实时 PCR 检测法与 HC2 检测法用于高危型 HPV 的检测, 差异无统计学意义($P>0.05$), 表明两种检测方法在检测效能上相近; 两种检测方法中, 低度鳞状上皮内病变(LSIL)、高度鳞状上皮内病变(HSIL)与鳞状细胞癌的阳性率均高于宫颈炎与湿疣, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 多重实时 PCR 法适用于大规模筛查和高危型 HPV 持续感染的监测。

关键词: 多重实时 PCR; HC2 法; 高危型人乳头瘤病毒; 宫颈癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)11-1395-02

Value of multiplex real-time PCR in detection of high-risk human papillomavirus infection

Chen Haiyan¹, Liu Hongjun², Luo Jinbin¹, Xu Weifan¹

(1. Department of Laboratory, People's Hospital of Huiyang District, Huizhou, Guangdong 516211, China;

2. Daan Centre for Clinical Laboratory Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: **Objective** To explore the clinical significance of multiplex real-time PCR in detection of high-risk human papillomavirus (HPV) infection. **Methods** 178 suspected cases of HPV infection and cervical lesions were collected, and multiplex real-time PCR and HC2 method were respectively employed to detect the high-risk HPV and their subtypes. **Results** Compared with multiplex real-time PCR and HC2 methods used in high-risk HPV detection, there was no statistical difference ($P>0.05$), indicating that the two methods had similar detection performance. According to the two methods, positive rates of patients with LSIL, HSIL and squamous cell carcinoma were higher than those of cervicitis and condyloma, with statistical significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Multiplex real-time PCR is suitable for large-scale screening and monitoring high-risk HPV persistent infection.

Key words: multiple real-time PCR; HC2 method; high-risk human papillomavirus type; cervical cancer

人乳头瘤病毒(HPV)与人类宫颈上皮样瘤变(CIN)与宫颈癌的发生有密切关系^[1-2]。HPV 根据其致癌性的不同分为高危型 HPV 和低危型 HPV。其中 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型属于高危型 HPV, 有引起恶性肿瘤的可能性。HPV6、11、42、43、44 型均属于低危型 HPV, 能够引起良性肿瘤的发生^[3]。本研究针对本院门诊及体检中心就诊的疑似 HPV 感染和宫颈病变的患者资料数据进行研究, 具体研究结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 1 月至 2010 年 1 月本院宫颈门诊及体检中心就诊的疑似 HPV 感染和宫颈病变的病例 178 例。年龄 18~65 岁, 平均(33.8±8.21)岁。检查前 3 d 不进行阴道冲洗, 不使用阴道内药物。24 h 内禁止性行为, 且均在非经期检查。

1.2 方法

1.2.1 HC2 法检测 HPV DNA 采用美国 Digene 公司的 HC2 法检测系统检测 13 种高危型 HPV DNA(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 型)。HPV 阳性判断标准: 检测样本的相对光单位(RLU)与标准阳性对照的 RLU 比值(样本 RLU/阳标 RLU)大于 1.0。

1.2.2 多重实时 PCR 检测 HPV DNA 采用 ABI7300 荧光定量基因扩增仪(德国), 13 种高危 HPV 荧光定量多重 PCR 检测试剂由上海蓝基生物有限公司提供。检测上述 13 种高危

型 HPV DNA。取 HC2 样本, 调 pH 值至 7.4 将 2 μ L 待测 HC2 样本加入 PCR 反应液中, 混匀, 置荧光定量 PCR 仪扩增。结果判断: 循环阈值(Ct)<37 的样本为高危型 HPV DNA 阳性。

1.2.3 观察指标 实时多重荧光 PCR 检测高危型 HPV 的结果; 实时多重荧光 PCR 检测高危型 HPV 各亚型感染率的结果; HC2 法检测高危型 HPV 的检测结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行统计处理, 两组间计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多重实时 PCR 与 HC2 法检测高危型 HPV 结果的比较

178 例患者中, PCR 组与 HC2 组在不同病理分型中的检测结果阳性率方面相比, 差异无统计学意义($P>0.05$), 其中 PCR 组中高危型 HPV 阳性率为 85.96%(153/178)。低度鳞状上皮内病变(LSIL)、高度鳞状上皮内病变(HSIL)、鳞状细胞癌中高危型 HPV 检出率明显高于宫颈炎和湿疣, 差异有统计学意义($P<0.05$)。HC2 组中高危型 HPV 阳性率为 87.08%(155/178), LSIL、HSIL、鳞状细胞癌中高危型 HPV 检出率明显高于宫颈炎和湿疣, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 1。

2.2 实时多重荧光 PCR 检测高危型 HPV 各亚型感染率结果 153 例 HPV 检测阳性的患者中, 16 型 39 例(21.91%)、18 型 24 例(13.48%)、31 型 14 例(7.87%)、33 型 17 例(9.55%)、45 型 18 例(10.11%)、52 型 7 例(3.93%)、56 型 8

例(4.49%)、58 型 26 例(14.61%)。在高危型 HPV 几个亚型当中,16 型、18 型和 58 型感染率分别为 21.91%、13.48%、14.61%,明显高于其他型别。

表 1 多重实时 PCR 与 HC2 法检测高危型人乳头瘤病毒结果的比较[n(%)]

组别	宫颈炎 (n=78)	湿疣 (n=25)	LSIL (n=29)	HSIL (n=33)	鳞状细胞癌 (n=5)
PCR 组	67(85.89)	22(88.00)	27(93.10)	32(96.97)	5(100.00)
HC2 组	69(88.46)	21(84.00)	28(96.55)	32(96.97)	5(100.00)
χ^2 值	61.468	19.94	16.095	18.497	0.000
P 值	0.750	0.978	0.738	0.799	>0.05

3 讨 论

HPV 根据生物学特性、致癌潜能可分为高危型和低危型。高危型 HPV 是指可引起恶性肿瘤(如宫颈癌)的 HPV,其中 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型均属于高危型^[4]。高危型 HPV 的 E6、E7 基因是病毒癌基因。E6 可结合多种蛋白,其中最重要的应是结合基因卫士 p53 蛋白,并通过与之结合的 E6AP 蛋白而活化泛素蛋白酶体途径降解 p53 蛋白^[5],使 DNA 受损的细胞即不能修复 DNA 损伤,又不能发生凋亡,只能进行分裂繁殖。低危型 HPV 是指引起良性肿瘤的 HPV,其中 HPV6、11、42、43、44 型属于低危型,病毒基因不整合于细胞基因组中,主要引起疣的发生(如宫颈湿疣等)。HPV DNA 的基因分型,对高危型 HPV 感染的流行病学调查具有重要的作用,而且对确定不同型 HPV 感染的自然历程以及其持续感染在子宫颈癌发展过程中的作用有十分重要的意义^[6-9]。

HC2 法是一种非放射性的分子杂交化学发光信号放大系统,样品中的 DNA 裂解为可杂交的单链与被标记的 RNA 探针杂交后,产生化学发光信号。HC2 法适用于其基因分型和 HPV-DNA 分子质量分析,但灵敏度较低、操作复杂,需用新鲜的组织标本,用甲醛等固定剂固定的组织中,DNA 可发生交联或降解,从而影响杂交结果。有时探针之间存在交叉反应,并且敏感度低于 PCR 方法。HC2 法可用于临床 HPV 的筛查,可区分 HPV 的高危型和低危型,但不能确定具体型别。

多重实时 PCR 技术是基因时代基于核酸杂交,一项用于检测 mRNA 的常用技术^[10]。该技术的特点是可以减少 PCR 后操作,在比较不同浓度的 mRNA 方面具有非常宽的动力学范围。实时荧光定量 PCR 技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团(如染料或探针),利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程荧光染料能特异性掺入 DNA 双链,发出荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物增加完全同步,荧光探针是在探针的 5'端标记一个荧光报告基团(R),3'端标记一个淬灭基团(Q),两者可构成能量传递结构,即 5'端荧光基团所发出的荧光可被淬灭基团吸收或抑制,当两者距离较远时,抑制作用消失,报告基团荧光信号增强,荧光监测系统可收到荧光信号。通过检测到的荧光信号的强弱,就可高效的检测出 HPV 扩增后的基因产物。

多重实时 PCR 技术的优点:(1)对于核酸的定量有非常宽的动力学范围;(2)极高的敏感度,可对小于 5 拷贝的靶基因序

列进行定量分析;(3)可以分析极微小的基因表达差异;(4)可以相对快速高通量地自动分析;(5)在密闭的反应器中进行反应,交叉污染的可能性小。

多重实时 PCR 技术的缺点:(1)PCR 反应体系易被存在于特定样本中的物质所抑制;(2)RNA 样本容易被降解;(3)结果易受人为因素的干扰。因此引物必须进行严谨的设计及验证,以确保结果的特异性和准确性。若用于检测病原,假阳性/假阴性必须考虑,扩增和熔解曲线必须进行双检验以保证结果的准确性。尽量提高操作者的技术水平和理论知识以及软件操作和数据分析的准确性等,从而保证结果的真是可靠性。

尽管多重实时 PCR 技术有以上缺点,但是这项技术也有很多优越性,使得实时荧光定量 PCR 技术,在相当长的时间内仍然是基因表达分析的主要研究工具之一。

综上所述,多重实时 PCR 技术有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化等突出优点,能够准确、高效地检测出扩增后的 DNA 产物,已经成为一种在临床检测和基础研究中被广泛使用的技术,适用于大规模筛查和高危型 HPV 持续感染的检测。

参考文献

[1] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. Pathol, 2009, 189(1): 12-19.

[2] Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst J, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study[J]. Lancet, 2007, 354(9172): 20-25.

[3] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. New Engl J Med, 2010, 348(6): 518-527.

[4] 杨忠明, 丁显平, 庞博, 等. 人乳头瘤病毒 DNA 联合液基薄层细胞学检测在宫颈癌筛查诊断中的研究[J]. 成都医学院学报, 2011, 6(4): 320-323.

[5] Burkhardt A, Willingham M, Gay C, et al. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma[J]. Virology, 2009, 170(1): 334-339.

[6] Ho GY, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection factor for persistent cervi dysplasia[J]. Nail Cancer Inst, 2008, 87(18): 1365-1371.

[7] 陈观娣, 钱德英, 李志刚, 等. 高危型人乳头瘤病毒 DNA 检测在宫颈鳞状上皮内高度病变筛查中的价值[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(9): 1427-1429.

[8] 方红辉, 唐曙明, 薄宁, 等. 两种方法用于高危型 HPV 检测的结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(11): 1552-1553.

[9] 邹倩, 濮德敏, 周利千. 液基超薄细胞技术及 TBS 系统检测 2635 例宫颈涂片的临床分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2008, 22(4): 268-270.

[10] 郑莹, 彭芝兰, 楼江燕, 等. 多重实时 PCR 对宫颈癌及癌前病变 HPV16 病毒整合状态的检测[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(8): 573-577.

(收稿日期: 2013-01-16)

热烈祝贺本刊影响因子创国内检验医学类期刊之最: 1. 国际检验医学杂志; 2. 中华检验医学杂志; 3. 临床检验杂志。