4 结　语

尽管 AD 的病因和发病机制目前尚不十分明确，但可以肯定 AD 是一个多因素参与的疾病。硒、锌、铁作为人体必需的微量元素，由于具有独特的化学反应活性，在维持细胞和机体的正常代谢过程中起着至关重要的作用，目前也有较多的实验证明了硒、锌、铁在体内的代谢紊乱与 AD 的发生有着密切的关系，它们在诱发 Aβ 的产生与聚集、tau 蛋白过度磷酸化的过程中起着重要作用。随着对 AD 研究的不断深入，人们将进一步明确硒、锌、铁等金属离子参与 AD 发生的分子生物学机制，这对未来 AD 的防治具有重要的意义。

参考文献

[1] Henryk K, Marek L, Maurizio R. Zinc and iron in neurodegenerative diseases[J]. Coordination Chem Rev, 2012, 256: 2129-2141.

[2] Schrag M, Mueller C, Oyoyo U, et al. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: A quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientiflc opinion[J]. Pro Neurobiol, 2011, 94(3): 296-306.

[3] Margaret P R. Selenium and human health[J]. Lancet, 2012, 379 (9822): 1256-1268.

[4] 刘琼，姜亮，田静，等. 硒蛋白的分子生物学及与疾病的关系[J]. 化学进展，2009，21(5)：819-830.

[5] Ishrat T, Parveen K, Moshahid KM, et al. Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type[J]. Brain Research, 2009, 1281: 117-127.

[6] Hardy JA. Alzheimer 's disease: the amyloid cas-cade hypothesis [J]. Science, 1992, 256(5054): 184-185.

[7] 蒋术一，毛凤菊，李兴强. Aβ 的神经毒性及治疗[J]. 中国当代医药，2011，18(12)：21-22.

[8] Gwona AR, Parka JS, Parka JH, et al. Selenium attenuates A production and A -induced neuronal death[J]. Neuroscience Letters 2010, 469(3): 391-395.

[9] 许妍姬. 硒、锌对老年性痴呆模型小鼠记忆障碍及丙二醛和一氧化氮含量的影响[J]. 营养学报，2011，33(2)：118-122.

[10] 朱志杰，刘琼，陈平，等. 硒化聚甘露糖醛酸的合成及抗阿尔茨海默症细胞氧化与凋亡[J]. 高等学校化学学报，2013，34(1)：115-122.

[11] 金银龙，梁超轲，吉荣娣. 硒水平与中国农村老年人群认知能力研究[J]. 医学研究杂志，2008，37(9)：19-22

[12] 靳慧，张英东，杨霞，等. tau 蛋白相关阿尔茨海默病治疗进展[J]. 中国老年学杂志，2012，32(6)：1308-1310.

[13] Kevin JB, Ashley IB. Metals in Alzheimer's and Parkinson's Diseases[J]. Review Current Opinion in Chemical Biology, 2008, 12 (2): 222-228.

[14] 郑玮，王占友. 脑锌代谢与阿尔兹海默病[J]. 生命科学，2012，24 (8)：834-843.

[15] 张勇，竹俊苗，刘长林. 金属离子 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 诱导 β-淀粉样蛋白的聚集[J]. 药学学报，2012，47(3)：399-404.

[16] Dong J, Atwood CS, Anderson VE, et al. Metal binding and oxidation of amyloid- beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence[J]. Biochemistry, 2003, 42(10): 2768-2773.

[17] Mo ZY, Zhu YZ, Zhu HL, et al. Low micromolar zinc accelerates the fibrillization of human tau via bridging of Cys-291 and Cys-322[J]. J Biol Chem, 2009, 284(50): 34648-34657.

[18] 李艳伟，赵晋英，郭兴. 阿尔茨海默病与脑组织铁代谢的研究进展[J]. 中国老年学杂志，2009，29(17)：2276-2278

[19] 黄河浪，吴磊，吴一峰，等. 社区阿尔茨海默病患者血中相关元素神经递质的含量与分布特点[J]. 中华疾病控制杂志，2012，16 (5)：382-387.

[20] Bartzokis G, Sultzer D, Mintz J, et al. In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer' s disease and normal subjects using MRI [J]. Biol Psychiatry, 1994, 35(7): 480-487.

[21] Antharam V, Collingwood FJ, Bullivant JP, et al. High field magnetic resonance microscopy of the human hippocampus in Alzheimer's disease: Quantitative imaging and correlation with iron [J]. NeuroImage, 2012, 59(2): 1249-1260.

[22] Wan L, Nie GJ, Zhang J, et al. β-Amyloid peptide increases levels of iron content and oxidative stress in human cell and Caenorhabditis elegans models of Alzheimer disease[J]. Free Rad Biol Med, 2011, 50(1): 122-129.

[23] 王东，胡学梅，方鑫，等. 铁在阿尔茨海默病 APPswe/ PS1 E9 双转基因小鼠模型脑组织内的沉积[J]. 中国康复，2008，23 (5)：302-304.

[24] Barney E, Leo R, Zacharski, DJ, et al. Getting the iron out: Phlebotomy for Alzheimer's disease [J]. Medical Hypotheses, 2009, 72 (5): 504-509.

[25] Lei P, Ayton S, Finkelstein DI. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export[J]. Nature Medicine, 2012, 18(2): 291-295.

(收稿日期：2013-03-20)

·综　述·

人乳头瘤病毒感染的实验室诊断研究进展

毛　源，郑　伟 综述，张厚智 审校

(南京金域医学检验所，江苏南京 210042)

关键词：人乳头瘤病毒；　实验室诊断；　综述

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.038　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1673-4130(2013)19-2579-03

人乳头瘤病毒(HPV)感染是一种非常广泛的性传播疾病[1]。在世界范围内宫颈癌都是女性第二大常见的肿瘤，也是导致发病和死亡的重要原因，高危型 HPV 是其致病的重要原因[2]。此外，很多研究表明 HPV 还与肛门癌、头颈部鳞状上

作者简介：毛源，男，主管检验师，主要从事分子生物学研究。

皮癌、皮肤基底细胞癌、乳腺癌等有关[3-6]，因此 HPV 感染检测的临床应用也越来越广泛。同时由于当前分子生物技术的发展，可用于 HPV 检测的技术手段也很多。本文对 HPV 的实验室诊断研究进展综述如下。

1　HPV-DNA 检测

HPV-DNA 的检测包含多种亚型混合的 HPV-DNA 检测和各种单独的亚型 HPV-DNA 检测。多种亚型混合的 HPV-DNA 检测一般不能区别出具体的某一种亚型，检测结果的阳性只能确定为感染了 HPV 病毒，感染亚型为检测的多种 HPV 中包含的一种或多种；单独亚型 HPV-DNA 的检测可以确定具体的某一 HPV 亚型的感染。这二种 HPV-DNA 的检测都可以进行定性和定量检测。检测混合 HPV-DNA 最常见的方法是 HC2，HC2 可以检测 13 种高危型 HPV 病毒(16，18，31，33，35，39，45，51，52，56，58，59，68)，对于宫颈标本 HC2 的灵敏度和特异性分别可以到达 97.1％和 85.6％[7]，此外 care-HPV 也是 QIAGEN 公司的产品，用于混合 HPV-DNA 的检测，可检测 14 种高危型(16，18，31，33，35，39，45，51，52，56，58，59，66，68)，其宫颈标本检测的灵敏度和特异性分别为 90.0％(95％CI 83.0～97.0)和 84.2％(95％CI：82.7～85.7)，同时它比 HC2 检测耗时短且成本便宜，适合在发展中国家使用[7]。PANArrayTM HPV 芯片检测试剂盒可以用于 19 种高危型和 13 种低危型 HPV 的分型检测，其宫颈病变程度达到 ASCUS 以上的灵敏度为 100％，其特异性与测序比较可以到达99.7％[8]。荧光定量多重 PCR 方法可以同时检测多种 HPV 亚型并进行定量，William T Seaman 研究的荧光定量 PCR 方法可以同时检测 6，11，16，18 四种 HPV 病毒的定量结果，其检测范围为 2×10 到 2×10^6 拷贝/反应，灵敏度和特异性分别为 89.0％(95％CI：77.0～96.0)和 90.0％(95％CI：52.0～98.0)[9]。

2　HPV-RNA 检测

HPV-RNA 的检测主要是 HPV E6/E7 mRNA 的检测。HPV E6/E7 mRNA 检测是通过冰冻组织提取病毒 RNA 后进行 PCR 反应来扩增病毒 RNA，与其他 HPV 检测指标相比无论是从其敏感性和特异性上都是目前公认的最标准的检测指标[10]。最常用的检测 HPV E6/E7mRNA 的方法是 PreTect Proofer 和 APTIMA HPV Assay[11]。PreTect Proofer 方法检测 HPV E6/E7mRNA 包括 5 种(16，18，31，33，45)高危型的 HPV 亚型[12]；APTIMA HPV Assay 方法检测 HPV E6/E7mRNA 包括 14 种高危型(16，18，31，33，35，39，45，51，52，56，58，59，66，68)HPV 病毒，它比 PreTect Proofer 方法拥有更高的敏感性[13]。Möckel 等[14]研究 HPV E6/E7mRNA 的阳性率在宫颈上皮内瘤变 1～2 级(CINⅠ/Ⅱ)、宫颈上皮内瘤变 3 级(CINⅢ)、宫颈癌的患者中分别占到 8％、41％、64％ 和 94％，比 HPV-DNA 体现出更高的诊断预测功能。Broccolo 等[15]研究也认为 HPV-DNA 的敏感性和阴性预测值分别为 95.0％和 96.0％要高于 HPV-RNA 的 77.0％和 88.0％；但是 HPV-RNA 的特异性和阳性预测值分别为 81.7％和 66.9％高于 HPV-DNA 的 58.6％和 52.5％。这也进一步说明了 HPV-RNA 阳性有着比 HPV-DNA 更高的诊断预测功能。

3　HPV 抗体检测

在 HPV 感染的患者中 HPV-L1、HPV-L2、HPV-E7 抗体呈现阳性的比例较高，而 HPV-E4、HPV-E6 抗体呈现阳性的比例较低[16]。HPV-16/18E7 抗体可以在 53％的宫颈癌患者中检测出来，有 40％的癌前病变的患者包括宫颈低度鳞状上皮内病变到高度鳞状上皮内病变(L-SIL～H-SIL)的患者中可以检测到，而且 HPV-E7 抗体的水平与疾病在临床上的发生发展成平行关系[17]。同时 HPV-L 抗体和 HPV-E 抗体的表达与年龄没有关系，但与患者是否吸烟和是否感染其他疾病(比如 HIV)有着密切的关系，吸烟的患者的 HPV-L 抗体的表达明显低于不吸烟的患者。同时在不同的区域的人群中表达的 HPV 抗体的亚型是有明显差异的，这可能与不同地区 HPV 感染的主要亚型存在差异有关。HPV 抗体的检测除了可以用单纯的 HPV 抗原之外，还可以使用 HPV 病毒样的颗粒(VLPs)制作各种需要的抗原。比如可以用 HPV-16 L1 蛋白融合 E6、E7 血清反应表位制作出 HPV-16(L1、E6、E7)混合型病毒样颗粒用于 HPV 抗体的检测。HPV 抗体的检测既可以进行定性检测，也可以进行定量分析。常用的有 ELISA 方法，也可以用磁珠微球法。

4　HPV 蛋白检测

目前已经明确的 HPV 蛋白包括 8 个 HPV 基因开放阅读框编码出来的 E1、E2、E4、E5、E5、E6、E7 六个早期蛋白和 L1、L2 二个衣壳蛋白，E6 、E7 蛋白具有转化属性，在肿瘤生成过程中的病毒的复制发挥重要作用，E2 蛋白通过调节 E6 、E7 蛋白的转录从而间接的影响细胞的增殖[18]。有学者研究一些药物的联合使用可以下调 E6 蛋白而增强凋亡效应来达到提高宫颈癌的治疗效果的作用[19]。有学者研究发现 HPV E2 蛋白 338 位点氨基酸由丙氨酸变为结氨酸后会增强其 DNA 结合能力和病毒早期启动子逆转录调节活性。HPV L1 蛋白占据了 HPV 病毒表面 90％的位置，它可以在轻度到中度增生的病变组织中检测出来，但是在重度增生的组织中极少见到。Sarmadi 等[20]研究发现在宫颈低度鳞状上皮内病变(LSIL)中 HPV L1 蛋白的阳性率为 65.1％，而高度鳞状上皮内病变(HSIL)的 HPV L1 蛋白的阳性率为 0％，HPV L1 蛋白阳性的 LSIL 患者中 24 个月后 60.7％的患者病情好转，HPV L1 蛋白阴性的 LSIL 患者中 33.3％的患者病情好转，HPV L1 蛋白阴性的 HSIL 患者中 13.6％的患者病情好转，HPV L1 蛋白是可以对疾病的预后起到预测作用的一个指标。

5　P16-INK4A 蛋白检测

P16-INK4A 蛋白是一种细胞周期激酶抑制剂，它通过 RB1 基因产物负调控来表达，通常在正常细胞中 P16 蛋白的表达浓度非常低，在宫颈癌细胞中当 HPVE7 癌蛋白导致 RB1 基因功能失活而导致 P16 蛋白过度表达[21]。可以通过免疫组化和 ELISA 方法来检测。在 HPV 阳性达到 CINⅡ级的患者中 P16 的灵敏度和特异性分别为 88.0％(95％CI：80.0～94.0)和 61.0％(95％CI：57.0～64.0)[22]。此外，P16 也是头颈部鳞状上皮肿瘤中替代 HPV 检测的一个非常敏感的重要标记物[23]，在皮肤基底细胞癌中 P16 也会过度表达，其原因也是因为 βHPV 种属的存在[24]。Shah 等[25]研究发现在内翻性乳头状瘤(Schneiderian Papillomas)与 HPV 关联紧密，但是 P16 却不是一个有价值的可用于 HPV 感染检测的替代标记物。

6　结　　语

人乳头瘤病毒感染的实验室检测指标主要有 5 类：HPV-

DNA、HPV-RNA、HPV 蛋白、HPV 抗体、HPV 感染相关蛋白。每一种实验室检测指标都有它独特的价值，每一种实验室检测指标都有其优势和不足。研究者在进行 HPV 感染相关疾病检验的时候，根据疾病的情况和采集标本的类型选择最适合的检测指标或者能尽量全面的检测多个指标能对疾病的诊治起到最大的帮助作用。

参考文献

[1] Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, et al. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) [J]. MMWR Recomm Rep, 2007, 56(2): 1-24.

[2] Sheng J, Zhang WY. Identification of biomarkers for cervical cancer in peripheral blood lymphocytes using oligonucleotide microarrays[J]. Chin Med J, 2010, 123(8): 1000-1005.

[3] Margaret A Stanley, David M Winder, Jane C Sterling, et al. HPV infection, anal intra-epithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues [J]. BMC Cancer, 2012, 12(9): 398.

[4] Westra WH. The Morphologic Profile of HPV-Related Head and Neck Squamous Carcinoma: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Clinical Management [J]. Head Neck Pathol, 2012, 6 (Suppl1): S48-54.

[5] Zakrzewska K, Regalbuto E, Pierucci F, et al. Pattern of HPV infection in basal cell carcinoma and in perilesional skin biopsies from immunocompetent patients[J]. Virology J, 2012, 9(12): 309.

[6] Wang T, Chang P, Wang L, et al. The role of human papillomavirus infection in breast cancer[J]. Med Oncol, 2012, 29(1): 48-55.

[7] Qiao YL, Sellors JW, Eder PS, et al. A new HPV-DNA test for cervical-cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China [J]. Lancet Oncol, 2008, 9 (10): 929-936.

[8] Song HJ, Lee JW, Kim BG, et al. Comparison of the performance of the PANArrayTM HPV test and DNA chip test for genotyping of human papillomavirus in cervical swabs [J]. Bio Chip J, 2010, 4 (3): 167-172.

[9] Seaman WT, Andrews E, Couch M, et al. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR [J]. Virology J, 2010, 7(8): 194-210.

[10] Westra WH. Detection of Human Papillomavirus in Clinical Samples[J]. Otolaryngol Clin N Am, 2012, 45(4): 765-777.

[11] Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(10): 2536-2545.

[12] Hwang SJ, Shroyer KR. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma [J]. J Oncol, 2012: 507286.

[13] Dockter J, Schroder A, Eaton B, et al. Analytical characterization of the APTIMA HPV Assay[J]. J Clin Virol, 2009, 45(Suppl1): 39-47.

[14] Möckel, Clad A, Endres AS, et al. HPV E6/E7 mRNA transcripts as predictors of high-grade epithelial cervix dysplasia[J]. Diagnostic Pathology, 2007, 2(Suppl1): S1.

[15] Broccolo F, Fusetti L, Rosini S, et al. Comparison of oncogenic HPV type-specific viral DNA load and E6/E7 mRNA detection in cervical samples: results from a multicenter study[J]. J Med Virol, 2013, 85(3): 472-482.

[16] Bonito PD, Grasso F, Mochi S, et al. Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins[J]. Infect Agent Cancer, 2006, 1: 6.

[17] Ravaggi A, Romani C, Pasinetti B, et al. Correlation between serological immune response analyzed by a new ELISA for HPV-16/18 E7 oncoprotein and clinical characteristics of cervical cancer patients[J]. Arch Virol, 2006, 151(10): 1899-1916.

[18] Abdul Hamid N, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(10): 1700-1717.

[19] Ye YT, Xu WQ, Zhong W, et al. Combination treatment with dihydrotanshinone I and irradiation enhances apoptotic effects in human cervical cancer by HPV E6 down-regulation and caspases activation[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1/2): 191-202.

[20] Sarmadi S, Izadi-mood N, Pourlashkari M, et al. HPV L1 capsid protein expression in squamous intraepithelial lesions of cervix uteri and its relevance to disease outcome[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 285(3): 779-784.

[21] Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation[J]. Br J Cancer, 1997, 75(10): 1410-1416.

[22] Carozzi F, Confortini M, Palma PD, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specifi city of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2008, 9(10): 937-945.

[23] Venuti A, Paolini F. HPV Detection Methods in Head and Neck Cancer[J]. Head and Neck Pathol, 2012, 6(1): S63-S74.

[24] Paolini F, Carbone A, Benevolo M, et al. Human Papillomaviruses, p16INK4a and Akt expression in basal cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30(11): 108-116.

[25] Shah AA, Evans MF, Adamson SC, et al. HPV DNA is Associated with a Subset of Schneiderian Papillomas but Does not Correlate with p16INK4a Immunoreactivity [J]. Head and Neck Pathol, 2010, 4(2): 106-112.

(收稿日期：2013-02-28)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数，通常是未知的，一般用希腊字母表示，如 μ、σ、π 等。描述样本特征的数值为统计量，是已知的或可计算获得的，用英文字母表述，如 S、P 等。从总体中随机抽样可获得样本，以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。