

· 临床检验研究论著 ·

荧光定量 PCR 法和基因芯片分型法检测人乳头瘤病毒的敏感度比较研究

姚雪滢, 刘新海, 陈美才

(深圳市大鹏新区妇幼保健院检验科, 广东深圳 518120)

摘要:目的 比较荧光定量聚合酶链反应法(简称荧光定量法)与基因芯片分型法(简称基因芯片法)在检测人乳头瘤病毒(HPV)中的敏感度。方法 选取 2010 年 2 月至 2013 年 2 月来该院妇科门诊就诊的患者 305 例,收集其宫颈脱落细胞,分别用荧光定量法和基因芯片法检测 HPV,对结果不一致的病例采用测序法进行确证。305 例病例均进行液基细胞学检测。结果 荧光定量法检测 HPV 敏感度为 33.8%,基因芯片法检测 HPV 敏感度为 37.6%,两种方法具有较高的一致性,HPV 感染率随宫颈脱落细胞异型性增加而增加。结论 荧光定量法和基因芯片法检测 HPV 具有较高的一致性,其中基因芯片法敏感度较高。宫颈细胞学改变的严重程度与 HPV 感染情况呈正相关。

关键词:聚合酶链反应; 乳头状瘤病毒科; 细胞学技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)05-0536-02

Comparative research on fluorescent quantitation PCR method and gene chips typing method in testing sensitivity of human papilloma virus

Yao Xuegan, Liu Xinhai, Chen Meicai

(Department of Clinical Laboratory, Dapeng District Maternal and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518120, China)

Abstract: **Objective** To compare the sensitivity of the fluorescent quantitation PCR method (fluorescence quantitative method for short) and the gene chips typing method (gene chips method for short) in testing human papilloma virus (HPV). **Methods** 305 outpatients in the gynecological clinic of the hospital from February 2010 to February 2013 were selected as the research subject. Then the cervical exfoliated cells were collected and detected HPV by the fluorescence quantitative method and the gene chips method respectively. Those cases with inconsistent results were confirmed by the PCR sequencing method. 305 cases were performed the liquid based cytology test. **Results** The sensitivity of the fluorescence quantitative method in detecting HPV was 33.8% and which of the gene chips method was 37.6%. The two methods had a higher conformance. The HPV infection rate was increased with the increase of cervical exfoliated cell atypia. **Conclusion** The fluorescence quantitative method and the gene chips method have a higher conformance. The sensitivity of the gene chips method is higher. The severity degree of cervical cytological change is positively correlated with the HPV infection.

Key words: polymerase chain reaction; papillomaviridae; cytological techniques

人类乳头瘤病毒(HPV)感染在宫颈癌等妇科疾病中扮演着重要的角色,据报道 90% 以上的宫颈癌患者合并有 HPV 持续感染^[1],因此早期准确地检测 HPV 对防治各种宫颈病变具有重要的意义。荧光定量聚合酶链反应法(简称实时荧光法)以其简单、易操作等优点称为目前临床筛查 HPV 感染最常用的手法^[2]。近些年来,随着分子生物学技术的发展,基因芯片筛查 HPV 的方法逐渐被人们接受,本文旨在比较实时荧光法与基因芯片分型法(简称基因芯片法)的敏感度,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 2 月至 2013 年 2 月本院妇科门诊就诊的女性患者 305 例,年龄平均(35.76±9.21)岁,其中 22~<40 岁 164 例,40~<50 岁 102 例,50 岁以上 39 例。患者的临床诊断中宫颈癌 110 例,宫颈糜烂 118 例,尖锐湿疣 77 例。

1.2 标本采集 采集每位患者的宫颈脱落细胞,采集前要求:(1)24 h 内无性行为;(2)阴道不得进行醋酸或碘液涂抹;(3)患者不在经期;(4)3 d 内未使用阴道内药物或阴道洗液。采集时先用棉签擦净宫颈口分泌物,再将宫颈刷放置于宫颈口,顺时

针旋转 3~5 圈,取出宫颈刷,置于样品管中并于管口处折断刷柄,旋紧管盖。样品置于 4℃ 保存,于 2 周内进行检测。

1.3 仪器与试剂 13 种高危 HPV 核酸扩增荧光定量检测试剂盒(中西远大科技有限公司),HPV 基因分型检测试剂盒(亚能生物技术有限公司),医用核酸分子快速杂交仪(凯普生物科技有限公司),聚合酶链反应扩增仪(德国 Eppendorf 公司),DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)。

1.4 分子生物学技术 宫颈脱落细胞 DNA 提取及实时荧光法、基因芯片法检测 HPV 均按试剂盒说明书进行。液基细胞学检测由本院检验科进行。基因测序工作由生工生物工程股份有限公司进行。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,两种方法敏感度比较采用 χ^2 检验,两种方法一致性评价采用 kappa 值评价,不同液基细胞学所对应感染率的比较采用行列表卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法检测结果比较 见表 1。实时荧光法敏感度为 33.8%,基因芯片法敏感度为 37.6%。两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。根据表 1 得出 $\kappa=0.839>0.800$,实时荧

光法与基因芯片法具有较好的一致性。对不一致的病例确证结果为其不一致者共 23 例。实时荧光法阳性、基因芯片法阴性者 3 例,采用测序法表明其中 2 例 HPV 阳性,1 例 HPV 阴性;实时荧光法阴性、基因芯片法阳性者 20 例,采用测序法表明其中 14 例 HPV 阳性,6 例 HPV 阴性。

表 1 两种方法检测结果比较(n)

基因芯片法	实时荧光法		合计
	+	-	
+	102	20	122
-	3	183	186
合计	105	203	308

2.2 液基细胞学分析 见表 2。

表 2 液基细胞学检测结果[n(%)]

液基细胞学分级	n	荧光定量法阳性率	基因芯片法阳性率
正常细胞	141	17(12.1)	22(15.6)
非典型鳞状上皮细胞	78	22(28.2)	27(34.6)
鳞状上皮内低度病变	40	24(60.0)	29(72.5)
鳞状上皮内高度病变	35	29(82.9)	30(85.7)
鳞状细胞癌细胞	14	13(92.9)	14(100.0)
合计	308	105(34.1)	122(39.6)

3 讨论

HPV 属乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒 A 属,为球形 DNA 病毒,其主要侵犯人体皮肤黏膜的鳞状上皮,引起寻常疣,生殖器疣等症状。1977 年 Laverty 等^[3]通过电镜观察到宫颈癌组织中存在 HPV 颗粒,随后 Bouvard 等^[4]提出宫颈癌的发病与 HPV 感染有关的假说。随着研究的深入人们把 HPV 分为两型:高危型包括 11、16、18、31、35、39、45、51、52、55、56、68、69、70、73、82、83 型,此类 HPV 有致宫颈癌的危险,其中又以 16、18 型在宫颈癌患者病变组织中最多见^[5-7];低危型包括 6、11、16、18、31、35、42、43、44 型,常引起尖锐湿疣等良性病变,影响生活质量。早期明确 HPV 的感染对防止宫颈疾病有着极为重要的意义。荧光定量法采用荧光探针技术,探针特异性的参入 DNA 双螺旋间形成三螺旋结构,当 Taq 酶接近时期核酸外切酶的作用会切断探针,使荧光集团游离从而产生荧光,该方法具有敏感度高,可进行定量分析的优点。基因芯片法先将不同亚型 HPV 的探针有序的固定于支持物上,再用样品 DNA 与芯片探针进行 southern 杂交,从而达到检测 HPV 明确分型的目的^[8-9]。两种技术均为检测 HPV 敏感而快捷的方法。

本研究表明两种方法检测 HPV 结果具有高度的一致性且基因芯片法的敏感度略高于实时荧光法,这与席雅娟等^[10]所得结果一致,产生这种差异可能的原因为基因芯片的通量大,可同时检测数十种 HPV 亚型,而荧光定量法由于操作上的繁琐,有些亚型检验不出,最终导致敏感度不如基因芯片法。液基细胞学的分析表明宫颈细胞学改变越严重,HPV 感染率越高,这与张志珊等^[11]所得结果一致,也从侧面反映出 HPV 为高危致癌因素。

基因芯片通量大,敏感度高且能对 HPV 分型,临床上对预测宫颈良恶性疾病更有意义^[12],另外与荧光定量法相比基因芯片法可节约成本和患者费用,为宫颈疾病筛查的好方法。荧光定量法能对 HPV 的 DNA 水平进行定量分析,可作为疗效评估的指标,另外该方法无需洗脱等繁琐步骤,比基因芯片法省时。以上两种方法均为检测 HPV 的一线方法,但各有优缺点。有学者建议基因芯片法可用于宫颈疾病筛查,荧光定量法可用于宫颈疾病疗效判断和预后判断^[13-17]。

参考文献

- [1] Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection; biology, epidemiology, and prevention[J]. Int J Gynecol Cancer, 2005, 5(5): 727-746.
- [2] 胡丽杰. 三种方法检测人乳头瘤病毒的对照研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(7): 534-535.
- [3] Laverty CR, Russell P, Black J, et al. Adenovirus infection of the cervix[J]. Acta Cytol, 1977, 21(1): 114-117.
- [4] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4): 321-322.
- [5] 朱小霞,程浩,张行,等. 荧光定量 PCR 检测尖锐湿疣皮损 Toll 样受体的表达水平[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(6): 560-563.
- [6] Schudel BR, Tanyeri M, Mukherjee A, et al. Multiplexed detection of nucleic acids in a combinatorial screening chip[J]. Lab Chip, 2011, 11(11): 1916-1923.
- [7] 童永清,刘蓓,李艳,等. 荧光定量 PCR 检测在宫颈癌筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 125-126.
- [8] 陈斌,周小棉,刘大渔,等. 多重聚合酶链反应联合芯片电泳在人乳头瘤病毒基因分型检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(4): 352-355.
- [9] 向华国,曾锦婷,何婉意,等. PCR-反向点杂交基因分型与实时荧光定量 PCR 检测人乳头瘤病毒的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(5): 367-368.
- [10] 席雅娟,肖海燕,李靖. 荧光定量 PCR 法和基因芯片分型法检测人乳头瘤病毒应用对照研究[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(5): 696-698.
- [11] 张志珊,庄建良,李爱禄,等. 实时荧光 PCR 与基因芯片分型法筛查宫颈标本 HPV DNA 的比较[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(2): 89-90.
- [12] 陈忠领,魏新燕,范美珍,等. 女性感染人乳头瘤病毒基因分型结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 944-945.
- [13] 曾华,刘晓强,庄豪,等. 实时荧光定量 PCR 法与基因芯片法检测 HPV 的比较[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(3): 165-169.
- [14] 张友忠. HPV 的检测方法及利弊[J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(5): 339-341.
- [15] 王勋松,邹学森,袁水斌. HPV 与宫颈癌的关系及检测方法的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(2): 166-168.
- [16] 井明霞,陈继明,郭晓青,等. 人类乳头瘤病毒(HPV)的检测方法[J]. 现代预防医学, 2007, 34(22): 4270-4271.
- [17] 彭敏,宋春林,王夷黎,等. 基因芯片技术检测宫颈病变中 HPV 感染的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 583-584.