

• 临床研究 •

不同保存时间对人乳头瘤病毒 DNA 检测结果的影响*

宋艳红¹, 陈玲^{2△}, 孙飞², 姚仁南²

(1. 江苏省无锡市解放军第 101 医院检验科, 江苏无锡 214044;
2. 中国人民解放军第 97 医院输血科, 江苏徐州 221004)

摘要:目的 研究不同保存时间对人乳头瘤病毒(HPV)DNA 检测结果的影响。方法 收集 HPV 高危型标本,按病毒水平分为高水平组、中水平组和低水平组,每组各 5 例,每例分装成 3 份,其中 1 份立即提取 DNA 并进行检测(原始水平),检测后将其置于 4℃冰箱保存(已提取 DNA 标本),其余 2 份标本直接置于 4℃冰箱保存(未处理标本)。分别于第 2、4 周对已提取 DNA 标本和未处理标本进行 HPV DNA 检测分析。结果 未处理标本和已提取 DNA 标本的 3 个水平组 HPV DNA 检测结果一致。高、中、低水平组第 2 周 HPV DNA 水平与对应的原始水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。高、中水平组第 4 周 HPV DNA 水平与对应的原始水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);而低浓度组第 4 周 HPV DNA 水平降低甚至消失,无法进行检测。结论 适宜的保存温度和保存时间可保证 HPV DNA 水平的稳定,有利于指导标本的保存和复查工作。

关键词:人乳头瘤病毒; DNA 提取; 保存时间; PCR 反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)21-3011-02

人乳头瘤病毒(HPV)是一类环状双链 DNA 病毒,以感染人体皮肤及黏膜复层鳞状上皮细胞为主。研究表明,高危型 HPV 持续感染是导致宫颈癌和癌前病变的主要病因,尤其是 HPV16 型的持续感染^[1],而且 99.7% 的宫颈癌患者可以检测到 HPV DNA^[2]。HPV 亚型可分为高危型和低危型,高危型与宫颈癌的发生密切相关^[3]。聚合酶链反应(PCR)可对高危型 HPV 基因分型进行定量检测,已被广泛用于宫颈癌的筛查及治疗监测^[4]。本文主要探讨不同保存时间对提取前后 HPV DNA 水平检测结果的影响。

1 资料与方法

1.1 标本采集 选取解放军第 101 医院 HPV DNA 阳性标本作为研究对象,其中高水平组 5 例(10^7 病毒拷贝数/ 10^4 细胞数),中水平组 5 例(10^5 病毒拷贝数/ 10^4 细胞数),低水平组 5 例(10^3 病毒拷贝数/ 10^4 细胞数)。各组每例标本分装成 3 份,其中 1 份立即提取 DNA 并检测 HPV DNA 水平(原始水平),检测后将其置于 4℃冰箱保存,为已提取 DNA 标本,其余 2 份标本直接置于 4℃冰箱保存,为未处理标本。

1.2 仪器与试剂 高危型 HPV 分型荧光 PCR 检测试剂盒和细胞保存液均购自上海三江生物科技股份有限公司,荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司,高速低温离心机购自德国 Sigma 公司,干式恒温器购自杭州蓝焰科技有限公司,低温冰箱购自日本 SANYO 公司。

1.3 方法

1.3.1 HPV DNA 的提取 取 1 mL 细胞保存液标本移至离心管,13 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 1 mL 生理盐水混匀,13 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,再加入 100 μ L 裂解液,100℃孵育 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

1.3.2 试剂制备 从试剂盒中取出 PCR 反应液和 DNA 聚合酶,室温下避光解冻,上下颠倒混匀后,8 000 r/min 离心 10 s。每一人份扩增试剂含 36 μ L 的反应液和 0.4 μ L 的 DNA 聚合

酶。将配制好的扩增试剂充分混匀,8 000 r/min 离心 10 s,待用。

1.3.3 HPV DNA 的检测 每孔反应管加 36 μ L 的扩增试剂和 4 μ L 的 DNA 提取液,盖上反应管盖上机检测。循环参数为 94℃ 2 min,按 93℃ 10 s、62℃ 31 s 循环 40 次。单点荧光检测温度为 62℃,荧光通道检测选择 FAM、VIC 通道。

1.3.4 HPV DNA 检测时间 已提取 DNA 标本和未处理标本分别在第 2、4 周进行 HPV DNA 荧光定量 PCR 检测。

1.4 质量控制 FAM 和 VIC 通道的 Ct $\leq$ 38,且扩增曲线呈典型的 S 型。每批次试验同时设置一个阳性质控品和一个阴性质控品,进行质量控制^[5]。HPV DNA 检测均在室内质控范围内。

1.5 统计学处理 将 HPV DNA 水平转换成常用对数,利用 SPSS16.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

不同保存时间 HPV DNA 水平比较结果见表 1、2。未处理标本和已提取 DNA 标本的 3 个水平组 HPV DNA 检测结果基本一致。高、中、低水平组第 2 周 HPV DNA 水平与对应的原始水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。高、中水平组第 4 周 HPV DNA 水平与对应的原始水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);而低浓度组第 4 周 HPV DNA 水平降低甚至消失,无法进行检测。

表 1 不同保存时间下未处理标本 HPV DNA 水平比较
[$\bar{x}\pm s$,lg(病毒拷贝数/细胞数)]

组别	原始水平	2 周	4 周
高水平组	7.56 $\pm$ 0.38	7.51 $\pm$ 0.33	7.50 $\pm$ 0.35
中水平组	5.21 $\pm$ 0.17	5.17 $\pm$ 0.21	5.16 $\pm$ 0.27
低水平组	3.26 $\pm$ 0.22	3.17 $\pm$ 0.19	—

注:“—”表示无法检测。

* 基金项目:南京军区医学科技创新重点课题(14ZD17)。

△ 通信作者,E-mail:chenlingjy97@163.com。

表 2 不同保存时间下已提取 DNA 标本 HPV DNA 水平比较[$\bar{x}\pm s$,lg(病毒拷贝数/细胞数)]

组别	原始水平	2 周	4 周
高水平组	7.56±0.38	7.54±0.30	7.50±0.24
中水平组	5.21±0.17	5.18±0.22	5.15±0.23
低水平组	3.26±0.22	3.15±0.18	—

注：“—”表示无法检测。

3 讨 论

大量流行病学调查显示,宫颈癌的发生逐年增加且呈低龄化。高危型 HPV DNA 链易丢失转录调节蛋白,使促进和维持整合状态功能的 E6、E7 蛋白表达活跃。E6 蛋白可使 P53 基因失活,从而阻碍细胞对 DNA 损伤的反应,进而产生恶变的基因型。E7 蛋白则会导致 pRb 功能失活,增长细胞的周期,加重细胞的恶变^[6]。因此 HPV 感染是宫颈癌病变的主要因素之一。

从 HPV 感染发展到宫颈癌需要 5~10 年^[7],早期宫颈癌的治愈率可达 90%以上,晚期宫颈癌的疗效则明显下降;因此早期检测发现 HPV 感染是宫颈癌预防和治疗的重要途径。以往多采用细胞学来检测 HPV DNA,但其灵敏度低、主观人为干扰因素多、重复性差。近年来,研究发现 HPV DNA 病毒载量的检测可作为一种动态监测手段来监测宫颈癌的病情,有效预防宫颈上皮内瘤样病变和宫颈癌的发生^[8]。而病毒载量检测主要采用荧光定量 PCR 技术^[9],其在遗传病、肿瘤的基因诊断等方面具有重要的应用价值,可以检测不同病变程度,有利于疾病的诊断和治疗(灵敏度高达 98%以上),可防止酸性磷酸酶检测中假阴性的漏诊,具有阴性预测值高、准确度高、客观性强、重复性高和操作简便的特点。目前,荧光定量 PCR 法已成为 HPV DNA 基因分型的主要检测手段^[10]。HPV DNA 基因分型检测操作环境要求较高、试剂成本和检测价格较昂贵,许多医院尚未开展 HPV DNA 检测,或因标本数量有限未能及时进行 HPV DNA 检测;因此如何保存宫颈细胞标本成为影响 HPV DNA 检测结果准确性的重要因素。近年来研究发现,抗凝血分离血浆中的病毒滴度在 25℃ 中的下降速度快于 4℃,全血中病毒含量在 4℃ 保存环境下较为稳定^[11]。且有研究报道,短时间内标本的病毒检测结果无显著性差异,但保存时间的延长会使标本中病毒含量降低^[12-13]。但上述研究主要针对外周血标本中病毒的保存,针对宫颈细胞中病毒标本的保存研究甚少。

本研究结果显示:未处理标本和已提取 DNA 标本在 4℃ 下保存 2 周,其 HPV DNA 水平是相对稳定的,与文献报道结果相似^[14];但在第 4 周,高、中、低水平组 HPV DNA 水平出现差异,高、中水平组 HPV DNA 水平仍保持稳定,而低水平组 HPV DNA 水平降低甚至消失。这表明保存时间延长会导致宫颈细胞中 HPV DNA 水平降低,其原因可能是长时间低温保存使 DNA 受到核酸氧化影响,以及自我修复功能减退启动凋亡程序,从而导致病毒含量降低^[15]。本研究结果与有些报道结果存在差异,其原因可能是细胞保存液的成分不同。因此,本研究使用同一厂家、同一批次的细胞保存液在同一环境下保存标本,同时采用同一批次首次冻融试剂进行试验,避免反复冻融的试剂对结果产生影响^[16]。

综上所述,提取 DNA 标本和未处理标本在 4℃ 下保存 4 周时,其 HPV DNA 检测结果一致,而标本最佳保存时间为 2 周。在对 HPV DNA 标本进行复查时,可选用已提取 DNA 标本,从而节省操作时间和试剂成本。

参考文献

[1] 骆跃兴,邓秀美.某区 PCR 法检测 HPV 感染的临床意义及分析[J].中国医药指南,2015,13(34):89-90.

[2] 杨菊芬,黎曼依,程亚蝶,等.昆明地区女性 HPV 基因分型情况分析[J].云南医学,2016,37(3):304-305.

[3] 李红威,叶芳.人乳头瘤病毒检测的临床意义研究进展[J].中国医药导报,2016,13(18):58-61.

[4] 马海龙,沈萍,姬玉,等.以 PCR 为基础的 HPV 检测在宫颈癌筛查中的应用[J].临床合理用药杂志,2016,9(28):144-145.

[5] 徐闽,李静,张婷婷,等.人乳头瘤病毒分型联合 TCT 检测及宫颈活检对宫颈癌早期诊治的临床应用分析[J].河北医药,2014,43(6):841-844.

[6] 李剑,曲芃芃. HPV E6/E7 mRNA 与 HPV DNA 检测在宫颈癌早期筛查中的临床价值[J].天津医药,2016,44(4):466-469.

[7] 杨秋霞,宋冬冬,李茂珍.高危型 HPV 检测用于不同年龄患者宫颈病变筛查的价值探讨[J].齐齐哈尔医学院学报,2016,37(25):3203-3205.

[8] 马晓星,李亚里,胡凌云. HR-HPV 载量与宫颈病变的相关性分析[J].解放军医学杂志,2012,37(5):477-481.

[9] 陈玲,刘军权,周忠海,等.冷冻保存血清对 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测结果的影响[J].中华全科医学,2015,13(4):630-631.

[10] 袁媛,黄赫.实时荧光定量 PCR 检测人乳头瘤病毒 HPV23 分型的临床研究[J].海峡医学,2016,28(7):77-79.

[11] 李欣华,张晓梅,黄萃,等.荧光定量聚合酶链反应检测 HBV DNA 标本处理过程中的影响因素分析[J].检验医学,2006,21(2):158.

[12] 刘长利,任芙蓉,吕秋霜,等.不同处理和保存条件下体外 HCV RNA 稳定性研究[J].中国实验血液学杂志,2006,14(6):1238-1243.

[13] 李友琼,黄慧嫔,阳文辉,等.不同保存温度和时间对 EBV-DNA 载量检测结果的影响[J].国际检验医学杂志,2013,34(7):877-878.

[14] 廖焕兰,周妙姬,冯辉,等.不同保存时间和反复冻融对人乳头瘤病毒 DNA 检测结果的影响[J].检验医学与临床,2014,11(21):3024-3025.

[15] Fraser L, Strzeżek J, Kordan W. Effect of freezing on sperm nuclear DNA[J]. Reprod Domest Anim, 2011, 46 (Suppl 2):14-17.

[16] 朱旭阳.试剂反复冻融对二型肝炎病毒核酸检测结果的影响[J].中国慢性病预防与控制,2010,18(1):90-91.