

用与之匹配的毛细管电泳分析系统筛查 α 、 β -地中海贫血。

参考文献

- [1] Kumar R, Sagar C, Sharma D, et al. β -globin genes: mutation hot-spots in the global thalassemia belt[J]. Hemoglobin, 2015, 39(1):1-8.
- [2] Zhang J, He J, Zeng XH, et al. Genetic heterogeneity of the β -globin gene in various geographic populations of Yunnan in southwestern China[J]. PLoS One, 2015, 10(4):e0122956.
- [3] Zeng YT, Huang SZ. Disorders of haemoglobin in China[J]. Med Genet, 1987, 24(10):578-583.
- [4] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(2):139-148.
- [5] 范丽梅, 邹团标, 忽丽莎, 等. 西双版纳地区傣族、布朗族、基诺族 7 岁以下儿童地中海贫血调查分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(9):113-117.
- [6] Mantikou E, Arkesteijn SG, Van JMB, et al. A brief review on newborn screening methods for hemoglobinopa-
- [7] 甘冰, 毛锦江. 新生儿脐血血红蛋白电泳 HbA 在筛查 β 地中海贫血中的意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014(1):73-75.
- [8] 罗秋月, 秦丹卿, 尹爱华, 等. 毛细管电泳在新生儿 β -地中海贫血筛查中的应用[J]. 广东医学, 2014, 35(10):1502-1505.
- [9] Mantikou E, Hartevelde CL, Giordano PC. Newborn screening for hemoglobinopathies using capillary electrophoresis technology: testing the capillary neonat fast Hb device[J]. Clin Biochem, 2010, 43(16-17):1345-1350.
- [10] 李友琼. 毛细管电泳法筛查新生儿血红蛋白 E[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(23):3474-3475.
- [11] 万志丹, 陈敬林, 黄湘, 等. 滤纸干血片毛细管电泳技术在新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(6):731-734.

(收稿日期:2017-04-26 修回日期:2017-07-28)

• 临床研究 •

多通道荧光 PCR 技术检测 HPV 在宫颈癌筛查中的临床价值*

罗文沈, 黄 华, 叶远青, 梁红梅, 陈 群, 鲍红霞

(深圳市龙岗区第二人民医院检验科, 广东深圳 518000)

摘要:目的 探讨多通道荧光聚合酶链反应(PCR)技术检测 HPV 在宫颈癌筛查中的临床应用价值。方法 应用多通道荧光 PCR 技术对临床 1 039 例宫颈细胞标本进行 18 种高危 HPV DNA 分型及定量检测, 并与 PCR-反向斑点杂交法(PCR-RDB)的检测结果进行比较, 两种方法检测结果不一致的标本采用序列分析方法进行验证。结果 在 1 039 例标本中, 多通道实时荧光 PCR 法阳性检出率为 14.24%(148/1 039), PCR-RDB 法阳性检出率为 18.94%(196/1 039), 两种方法检测结果一致率为 99.4%($Kappa$ 值为 0.976)。结论 多通道荧光 PCR 技术检测 HPV 可作为宫颈癌的初筛方法, 值得临床推广使用。

关键词:多通道荧光 PCR; 人乳头瘤病毒; 高危型; 宫颈癌筛查

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)21-3019-03

人乳头瘤病毒(HPV)是一种可引起人类皮肤、黏膜组织良性及恶性肿瘤的双链 DNA 病毒。有研究显示, HPV 感染是女性宫颈上皮内瘤和宫颈癌病变的主要病因^[1-2]。目前报道的 HPV 型别已经有 200 多种, 其中 40 多种型别与人类生殖道疾病有关^[3], 根据致病力或致癌危险性大小可将感染生殖道和肛门的 HPV 分为低危型和高危型两大类。HPV 基因分型检测对于早期预防宫颈癌具有重要意义, 聚合酶链反应一反向点杂交技术(PCR-RDB)作为 HPV 基因分型常规检测方法具有特异性强及高通量等特点^[4]。本研究应用多通道荧光聚合酶链反应(PCR)分型分型技术对宫颈癌筛查标本进行高危型 HPV 分型检测, 并采用 PCR-RDB 法进行验证, 旨在为临床应用提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 10 月至 2016 年 10 月本院宫颈

癌筛查患者 1 039 例作为研究对象, 年龄 17~78 岁。先用无菌棉签将宫颈分泌物擦净, 再用安必平专用宫颈刷在宫颈鳞柱交界处旋转 5 周, 收集宫颈口及颈管的脱落上皮细胞, 将毛刷放入盛有细胞保存液的小瓶内, 于 4℃下保存。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 将漂洗过宫颈刷拭子的生理盐水全部转移到 1.5 mL 离心管中, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀加入 50 μ L 的 DNA 裂解液, 混匀后 100℃干浴 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 上清液备用。

1.2.2 HPV 通用 PCR 引物设计 扩增各 HPV 亚型的通用引物核苷酸由上海生工生物工程技术有限公司合成, MY09 引物序列为 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3', MY11 引物序列为 5'-GCM CAA GGG WCA TAA YAA TGG-3', 其中 M=A/C, W=A/T, Y=C/T, R=A/G。

* 基金项目:深圳市龙岗区科技创新局资助项目(YLWSF20150512140632763)。

1.2.3 多通道荧光 PCR 检测方法 采用广州安必平自动化检测设备有限公司的 HPV 分型检测试剂盒,检测 18 种高危型 HPV,其中 14 种 HPV 能被分出具体型别(包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68),4 种 HPV 不能被分出具体型别(包括 HPV26、53、73、82)。每例标本采用 4 个反应管进行检测,参照说明书配制具体试剂量。在 PCR 反应管中加入已提取的待测 DNA 标本 5 μ L,采用美国 ABI Prism7300PCR 仪,按试剂盒的说明书设置反应条件、4 个通道及对应的荧光基团,然后进行 PCR 扩增。结果判读:通道存在明显对数扩增曲线且 Ct \leq 26 时,标记该型别为阳性;无对数扩增曲线或 Ct $>$ 26 时,标记该型别为阴性;每个标本均通过检测反应管 4-通道 4 中的 β 球蛋白基因(内参基因)来确认试验是否有效。

1.2.4 PCR-RDB 检测方法 采用广州安必平自动化检测设备有限公司的 RDB 试剂盒进行 HPV 分型检测,包括 18 种高危型别(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、82、26、53、66),10 种低危型别(HPV6、11、40、42、43、44、54、61、81、83)。采用达安基因 DA7600PCR 仪、广州安必平 DA8000 全自动核酸杂交检测仪进行检测,操作方法按照试剂盒说明书进行。结果判读:膜条在 PC 位点处有蓝色斑点出现视为试验有效;根据膜条上蓝色斑点的有无和出现的位置判断是否有 HPV 感染及其型别。

1.2.5 HPV 序列分析 多通道荧光 PCR 法及 PCR-RDB 法分型检测筛选出的阳性标本经 DNA 测序确诊型别,由广州安必平自动化检测设备有限公司完成。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学处理;计数资料以百分比或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;多通道荧光 PCR 法与 PCR-RDB 法检测结果一致性评估采用 Kappa 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法检测结果比较 多通道荧光 PCR 法的阳性检出率为 14.24% (148/1 039),PCR-RDB 法阳性检出率为 18.94% (196/1 039),两种方法均未出现无效结果,其中 PCR-RDB 法检测的 28 种 HPV 基因分型包含了多通道荧光 PCR 法检测的 18 种高危型 HPV。1 039 例标本中,两种方法检测结果全为阳性的有 144 例,两种方法检测结果全为阴性的有 889 例,两种方法检测结果一致率为 99.4% (Kappa 值为 0.976)。见表 1。

表 1 多通道荧光 PCR 法和 PCR-RDB 法检测结果比较(n)

多通道荧光 PCR 法	PCR-RDB 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	144	4	148
阴性	2	889	891
合计	146	893	1039

2.2 不一致结果比较 两种方法检测结果不一致的 6 例标本中,多通道荧光 PCR 法检出 1 例假阳性和 2 例假阴性,PCR-RDB 法检出假阴性 3 例,因此 1 039 例标本中共有 149 例高危型阳性标本。在多通道荧光 PCR 法检测的 891 例阴性标本中,除上述的 2 例假阴性标本,未发现 18 种高危型别内的 HPV 阳性标本,但发现低危型 HPV 阳性标本 43 例。

2.3 病毒载量检测结果比较 采用多通道荧光 PCR 法对 HPV 进行定量检测,148 例阳性标本的病毒载量值为 $1.25 \times 10^3 \sim 3.84 \times 10^7$,近似于正态分布。见图 1。

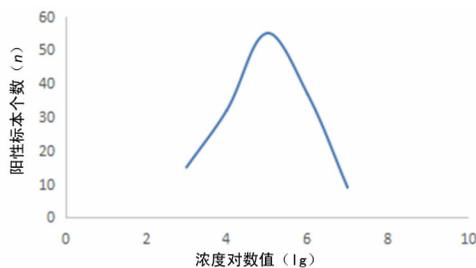


图 1 病毒载量曲线图

3 讨 论

宫颈癌是世界范围内女性最常见的第二大肿瘤,发病率和病死率仅次于乳腺癌。据流行病学调查,子宫颈癌发病率在发展中国家发病率远远超过发达国家,发病率呈上升趋势并趋向年轻化^[5]。2010 年全国恶性肿瘤登记数据分析显示,女性宫颈癌发病率为 9.84‰,病死率为 2.60‰^[6]。宫颈癌是唯一病因明确的癌症,大量研究证实 HPV 感染是宫颈癌的主要危险因素,高危型 HPV 持续感染是宫颈癌及其癌前病变发生的必要条件^[7-9],并且认为 HPV-DNA 是预测妇女宫颈病变的标志物^[10]。全球范围的研究结果显示,在 99.7% 的宫颈癌患者体内检测到高危型 HPV DNA 的存在。因此,检测妇女生殖道 HPV 感染状况及基因型对于预防宫颈癌具有十分重要的意义。基于大量的研究数据,2014 年美国 FDA 批准 HPV 检测作为子宫颈癌的一线筛查策略^[11],中国也已启动相关的研究和评估。

PCR-RDB 法采用固化了多种特异性探针的膜条与扩增靶序列杂交,通过 1 次杂交即可同时筛查被检 DNA 中的多种突变。该方法采用标准化试剂盒,通过显色肉眼直接判读结果,具有灵敏性强、特异性强的特点,是目前国内常用的 HPV 基因分型检测方法;但此法耗时较长,手工操作较多,扩增后需对产物进行开管操作,并容易造成实验室污染,而且试剂成本较高。本研究采用多通道荧光 PCR 法弥补了以上的缺点,并使用 β 球蛋白基因作为宫颈上皮细胞鉴别基因来排除假阴性。

本研究对多通道荧光 PCR 法和 PCR-RDB 法进行分型检测比较,并以序列分析方法进行验证,其结果显示两种方法检测 18 种高危型 HPV 的一致率为 99.4%,提示两种方法具有高度的一致性,能满足女性生殖道 HPV 高危分型检测的常规高通量筛查。有研究表明,病毒载量与宫颈上皮内瘤变及子宫颈癌的严重程度呈正相关,病毒载量随着宫颈病变严重程度的增加而逐渐升高^[12]。本研究结果显示所有标本病毒载量分布近似于正态分布,提示本检测试剂可适用于 HPV 各型别的定量分析,临床可通过观察病毒载量变化来指导定期随访。

综上所述,采用广州安必平自动化检测设备有限公司的 HPV 分型检测试剂盒可一次性检测 18 种高危型 HPV,并且能够分型及定量,适用于临床 HPV 感染的筛查及患者疗效观察。目前市场尚未发现同类试剂,本产品技术新颖、临床适用性强,如能进一步对试剂进行临床研究及注册批报,则可作为宫颈癌的初筛方法在临床大规模推广使用。

参考文献

- [1] 吉耀华, 陆春雪, 周伟强, 等. 人乳头瘤病毒感染与宫颈疾病关系的研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2008, 9(6): 462-463.
- [2] Sigstad E, Lie AK, Luostarinen T, et al. A prospective study of the relationship between prediagnostic human papillomavirus seropositivity and HPV DNA in subsequent cervical carcinomas[J]. Br J Cancer, 2002, 87(2): 175-180.
- [3] Bosch FX, Lorincz A, Mufloz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4): 244-265.
- [4] 肖克林, 严泽浩, 罗茗月, 等. 实时 PCR 和 PCR-RDB 法检测人乳头瘤病毒的比对研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(24): 3373-3376.
- [5] Kang TH, Kim KW, Bae HC, et al. Enhancement of DNA vaccine potency by antigen linkage to IFN-gamma-inducible protein-10[J]. Int J Cancer, 2011, 128(3): 702-714.
- [6] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病

与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1): 1-10.

- [7] 訾聃, 何丽萍, 杨英捷, 等. 贵州省黔南苗族、布依族妇女 HPV 感染状况[J]. 贵州医药, 2010, 34(3): 209-211.
- [8] 白华, 黄宁, 刘继秀. 南宁市妇女人乳头瘤病毒感染的流行病学调查[J]. 国际妇产科学杂志, 2013, 40(1): 81-83.
- [9] 刘卫红, 张秋玲. 妊娠期高危型人乳头状瘤病毒感染者新型护理模式[J]. 武警医学, 2013, 24(7): 611-613.
- [10] Nadarzynskit T, Waller J, Robb KA, et al. Perceived risk of cervical cancer among pre-screening age women (18-24 years): the impact of information about cervical cancer risk factors and the causal role of HPV[J]. Sex Transm Infect, 2012, 19(4): 652-675.
- [11] Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer[J]. BMJ, 2015, 350(6): h2372.
- [12] 赵颖, 林敏, 潘美晨, 等. HPV 分型及高危八型定量检测在宫颈病变中的意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(2): 102-106.

(收稿日期: 2017-04-10 修回日期: 2017-07-12)

• 临床研究 •

血管生成素样蛋白 2 与冠心病的相关性研究*

蒋玲, 杨收平, 秦继宝, 安仲武, 李海英[△]

(连云港市东方医院检验科, 江苏连云港 222042)

摘要:目的 探讨冠心病(CHD)患者血管生成素样蛋白 2(Angptl2)水平变化及其与 CHD 的相关性。方法 选取 115 例 CHD 患者和 40 例健康体检者分别作为 CHD 组和对照组, 并按临床类型将 CHD 组分为稳定性心绞痛组(SAP 组)、不稳定性心绞痛组(UAP 组)和急性心肌梗死组(AMI 组), 检测所有受试者 Angptl2、肿瘤坏死因子(TNF- α)、血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)和低密度脂蛋白(LDL-C)水平, 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), 并对检测结果进行统计分析。结果 CHD 组 Angptl2、TNF- α 水平高于健康对照组($P < 0.05$); AMI 组 Angptl2、TNF- α 水平高于 SAP 组和 UAP 组($P < 0.05$)。Angptl2 与收缩压、TC、LDL-C、HOMA-IR 和 TNF- α 呈正相关($P < 0.05$), 与 HDL-C 呈负相关($P < 0.05$)。结论 Angptl2 可作为 CHD 的预测指标, 具有临床价值。

关键词:冠心病; 血管生成素样蛋白 2; 肿瘤坏死因子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)21-3021-03

随着人们生活水平的提高, 冠心病(CHD)发病率越来越高, 严重威胁人类健康。CHD 的病理生理机制为长期血管壁炎症浸润、内皮细胞损伤导致的动脉粥样硬化。血管生成素样蛋白 2(Angptl2)由内脏脂肪细胞表达和分泌, 能促进血管生成^[1-2], 提高造血干细胞修补生存能力^[3], 与炎症反应、血小板活化、动脉粥样硬化及胰岛素抵抗密切相关^[4]。本文通过检测 115 例 CHD 患者 Angptl2 水平, 探讨其与 CHD 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2016 年 6 月本院 CHD 患者 115 例作为 CHD 组, 其中男 68 例, 女 47 例, 年龄 45~78 岁, 中位数年龄 62 岁。CHD 组按临床类型又分为稳定性心绞痛组(SAP 组)35 例, 不稳定性心绞痛组(UAP 组)39 例和急性

心肌梗死组(AMI 组)41 例。入选标准: 所有患者均符合相关诊断标准^[5-7]。排除标准: 其他类型心血管疾病患者, 如原发性心肌病、心肌炎、心功能不全等; 肝肾功能不全、恶性肿瘤、严重感染等患者。同时选取无肿瘤、糖尿病或遗传病家族史健康体检者 40 例为对照组, 其中男 26 例, 女 14 例, 年龄 42~75 岁, 中位数年龄 54 岁。两组性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法 受试者均空腹 8~10 h, 于次日清晨静脉采血, 置于黄色真空管内, 37℃放置 30 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清。采用德国西门子公司 RL Max 全自动生化分析仪及配套试剂测定空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)和低密度脂蛋白(LDL-C)水平。

* 基金项目: 连云港市卫生科技项目(局 1424)。

[△] 通信作者, E-mail: 15261379395@163.com。