

• 论 著 •

荧光定量聚合酶链式反应和基因芯片分型法行 HPV 分型检测的比较研究*

龙秀荣¹, 兰建云², 耿建祥^{2△}, 阚延静², 范雪梅², 夏林², 王宏景², 梅静², 赵雪²
(1. 南京市六合区人民医院病理科, 江苏南京 211500; 2. 南京中医药大学第三附属医院
病理科/江苏省 HPV 协作组, 江苏南京 210001)

摘要:目的 比较荧光定量聚合酶链式反应(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)中的灵敏度, 分析两者的差异及临床意义。方法 以 246 例女性为研究对象, 其中 111 例行液基细胞学诊断、135 例行组织学诊断, 采用荧光定量法和基因芯片法检测所有受试者 15 种高危 HPV 基因型, 并进行比较分析。结果 荧光定量法检测 HPV 的灵敏度为 55.28%, 基因芯片法灵敏度为 55.69%, 二者比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 两种方法检测结果有较高的一致性($\kappa = 0.745$); HPV 阳性率随宫颈病变程度增加而上升。结论 荧光定量法和基因芯片法检测 HPV 具有较高的一致性, 两者检测灵敏度都较高, 宫颈病变的严重程度与 HPV 感染呈正相关。

关键词:人乳头瘤病毒; 荧光定量聚合酶链式反应; 基因芯片分型法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)23-3385-03

Comparative study on fluorescent quantitation polymerase chain reaction and gene-chips typing method in genotyping HPV*

Long Xiurong¹, Lan Jianyun², Geng Jianxiang^{2△}, Kan Yanjing², Fan Xuemei²,
Xia Lin², Wang Hongjing², Mei Jing², Zhao Xue²

(1. Department of Pathology, the People's Hospital of Liuhe District in Nanjing City, Nanjing, Jiangsu 211500, China;

2. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Nanjing Traditional Chinese Medical University/HPV Collaboration of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

Abstract: Objective To compare the sensitivity of fluorescent quantitation polymerase chain reaction (fluorescent quantitation method) and gene-chips typing method (gene-chips method) in the detection of human papillomavirus (HPV), and to analyse differences and clinical significance. **Methods** A total of 246 women were selected as subjects, among them, 111 cases of cervical exfoliated cells and 135 cases of cervical tissues were collected and detected, 15 kinds of high-risk HPV genotypes were detected in all subjects by using fluorescent quantitation method and gene-chips method respectively, and the detection results were compared. **Results** The sensitivity of the fluorescent quantitation method in detecting HPV was 55.28% and that of the gene-chips method was 55.69%, there was no statistically significant difference in sensitivity between the two methods ($P > 0.05$). The two methods had relative high conformance ($\kappa = 0.745$). The positive rate of HPV infection was increased with the progression of cervical disease. **Conclusion** The fluorescent quantitation method and the gene-chips method have a relative high conformance, and both with high sensitivity in detecting HPV. The severity degree of cervical cytological and histological changes may be positively correlated with HPV infection.

Key words: human papillomavirus; fluorescent quantitation polymerase chain reaction; gene-chips typing method

宫颈癌是一种严重威胁女性健康的恶性肿瘤, 据全世界范围内统计, 其发病率仅次于乳腺癌, 位居女性恶性肿瘤的第 2 位。目前, 全球每年约有 52.9 万女性患宫颈癌, 每年约有 27.5 万女性死于该病。83% 的宫颈癌患者分布于发展中国家, 宫颈癌现已成为发展中国家女性癌症病死率最高的恶性肿瘤。中国是世界上宫颈癌患病人数最多的国家, 每年约有 13 万的新发病例, 以及 2~3 万死亡病例。几乎所有的宫颈癌病例(约 99%) 都与生殖器官人乳头瘤病毒(HPV)感染有关, 如能尽早准确地行宫颈病变的 HPV 分型检测, 对宫颈癌的防治具有十分重要的意义^[1-4]。荧光定量聚合酶链式反应(以下简称荧光定量法)以其省时、简单、易操作等优点已成为目前临床筛查宫颈病变 HPV 感染最常用的方法。而基因芯片分型法(以下简称基因芯片法)具有高通量, 能够对多种 HPV 进行准确的分

型, 现已被广泛接受。本文旨在比较荧光定量法与基因芯片法检测 15 种高危型 HPV 的敏感性及其差异。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 1~8 月在南京市中医院、南京市六合区人民医院、江苏省扬中市人民医院、安徽省当涂县人民医院妇科门诊就诊的 111 例女性的细胞标本, 其中体检者 40 例、低度病变者 50 例、盆腔炎患者 11 例、宫颈尖锐湿疣患者 2 例、宫颈肥大患者 1 例、宫颈细胞病理学意义未明的不典型鳞状细胞(ASCUS)患者 6 例及肛门上皮内瘤变(AIN)Ⅲ级患者 1 例。收集 2008 年 1 月至 2014 年 8 月在上述各医院病理科病理组织学诊断为宫颈病变的 135 例女性患者的石蜡组织标本, 其中宫颈上皮内瘤变(CIN)Ⅰ级 53 例、CIN Ⅱ级 27

* 基金项目: 南京市卫生局中医专项支助项目(2009-92)。 作者简介: 龙秀荣, 女, 副主任医师, 主要从事宫颈癌及癌前病变 HPV 感染基因分型研究。 △ 通讯作者, E-mail: dyc720@163.com。

例、CINⅢ级 28 例、宫颈癌 27 例。纳入的所有受试者年龄 20~76 岁,平均(43.75±5.10)岁。病理诊断均由 2 位高年资主治医师按照世界卫生组织妇科肿瘤的组织学分类标准进行复阅。

1.2 仪器与试剂 ABI 7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI 公司);2400 型基因扩增仪(美国 PE 公司);FYY-3 型分子杂交仪(兴化市分析仪器厂);Eppendorf 5810 R 型高速冷冻离心机(德国艾本德公司);BHC-1300Ⅱ A2 型生物安全柜(苏州市安泰空气技术有限公司)。15 种高危型 HPV 核酸扩增荧光定量分型检测试剂盒,由湖南圣湘生物科技有限公司提供;23 种高低危型 HPV 基因分型检测试剂盒,由亚能生物技术(深圳)有限公司提供。显色液须新鲜配制,使用时所需浓度加蒸馏水配制。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及保存 (1)细胞标本:采用窥阴器或阴道扩张器充分暴露宫颈,用棉拭子擦去宫颈口过多的分泌物,将采样宫颈刷置于宫颈口,顺时针旋转宫颈刷 4~5 圈,慢慢抽出,以获得足够的宫颈上皮细胞标本,然后沿柄折痕处折断刷头,将宫颈刷头部放入洗脱管中,旋紧洗脱管盖,做好标本标识,保持采集管直立,放入-20℃冰箱保存待测。(2)石蜡组织标本:先去除每份石蜡组织标本周边多余的石蜡,将其石蜡组织切成 4 μm 厚的切片,3~5 片即可。用专用镊子轻轻夹取,放入小离心管中,切第 2 份石蜡组织标本前,用次氯酸钠溶液擦刀片及镊子各 3 次。

1.3.2 DNA 的提取与检测 (1)细胞标本:将宫颈刷头充分漂洗后,把洗脱液全部转移至 1.5 mL 离心管中,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,保留管底的细胞,随后加入裂解液 50 μL,充分振荡混匀;(2)石蜡组织标本:将石蜡组织切片放入 1.5 mL 离心管中,加入裂解液 150 μL,充分振荡混匀,两者均在金属浴中 100℃加热 10 min,立即 13 000 r/min 离心 10 min,取中间层 DNA 溶液待用。PCR 扩增、杂交、孵育和显色按说明书进行规范操作。每份标本显色后根据有无杂交信号判断结果。

1.4 统计学处理 两种检测方法都以 15 种相同的高危型 HPV(HPV-16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68)阳性作为评判标准,1 种及 1 种以上型别阳性均计为 1 例,每份细胞和组织标本中 HPV 感染率及各 HPV 型别的百分比采用 HPV 分型统计软件(由南京倍宁医疗器械有限公司提供)进行分析,所得数据采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,计数资料以例数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,一致性评价采用 Kappa 值(κ),以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法检测结果的一致性 基因芯片法检出阳性 137 例,总阳性率为 55.69%(137/246),其中一型感染 105 例、二型感染 25 例、三型感染 4 例、四型感染 3 例;荧光定量法检出阳性 136 例,总阳性率为 55.28%(136/246),其中一型感染 104 例、二型感染 24 例、三型感染 6 例、四型感染 2 例。两种方法检测总阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.008, P>0.05$)。两种方法检测阳性符合率为 88.32%(121/137),阴性符合率为 86.24%(94/109),总符合率为 87.40%(215/246),有较高的一致性($\kappa=0.745$)。两种方法检测结果比较,见表 1。

表 1 两种方法检测结果比较

基因芯片法	荧光定量法		合计
	+	-	
+	121	16	137
-	15	94	109
合计	136	110	246

2.2 两种方法检测 HPV 基因型别的一致性 采用两种 HPV 分型法分别检测 15 种高危型 HPV,1 种及 2 种 HPV 型别完全一致者共 85 例,分型符合率为 70.25%(85/121);其中 1 种型别完全相同者 74 例,占 87.06%(74/85),16、58、52、18、33、51、31、35、53、56、39、66、68 型分别为 26、11、9、8、6、3、2、2、2、2、1、1、1 例;2 种型别完全相同者 11 例,占 12.94%(11/85),其中 16+31、16+35、16+51、16+58、31+33、31+52、31+53、31+58、51+58、53+58、59+68 型各 1 例。基因芯片法检出 137 份阳性标本中 15 种高危型 HPV 出现频数为 179 次,荧光定量法检出 136 例阳性标本中出现频数为 178 次。

2.3 不同受试者两种方法检测阳性率 见表 2。

表 2 不同受试者两种方法检测阳性率

临床诊断	n	荧光定量法		基因芯片法	
		阳性例数 (n)	阳性率 (%)	阳性例数 (n)	阳性率 (%)
体检	40	7	17.50	7	17.50
ASCUS	6	2	33.33	2	33.33
低度病变	50	20	40.00	23	46.00
其他病变	15	6	40.00	4	26.67
CINⅠ级	53	20	37.74	22	41.51
CINⅡ级	27	27	100.00	26	96.30
CINⅢ级	28	28	100.00	27	96.43
宫颈癌	27	26	96.30	26	96.43

3 讨 论

HPV 属乳头瘤病毒科,是一类特异感染人类上皮和黏膜的微小共价双链环状 DNA 病毒。HPV 感染主要通过性传播方式,感染者通常没有症状,由于其某些型别可导致宫颈肿瘤的发生,因此已受到广泛的关注。大量流行病学研究已明确显示,HPV 持续性感染是宫颈癌发病的首要条件。HPV 阴性者几乎不会发生宫颈鳞癌,大部分 HPV 感染者仅为一次性感染,只有小部分 HPV 持续性感染者才可能发展为宫颈癌前病变和宫颈癌。宫颈癌早期症状并不明显,其发展过程中又存在着较长的、可逆转的癌前病变期^[1,5-7]。此外,HPV 型别众多,各型别致病力也存在较大的差异,依据 HPV 致癌风险性的高低,将其分为两大类:(1)低危型,包括 HPV-6、11、40、42、43、44、54、57、61、62、67、72、81 型等;(2)高危型,包括 HPV-16、18、26、31、33、35、45、51、52、53、55、56、58、59、66、68、82、83 型等^[1,8-9]。因此,对宫颈细胞和组织进行 HPV 分型检测,将有助于有效识别宫颈癌的高危人群,对宫颈癌的防控和疫苗的研发意义也很大。本文就荧光定量法与基因芯片法对 15 种高危型 HPV 分型检测的结果进行对比研究。

本研究结果显示,基因芯片法检测总阳性率为 55.69%,

荧光定量法为 55.28%，差异无统计学意义($P>0.05$)，提示两种 HPV 检测方法的敏感性无明显差异。比较两种 HPV 分型法检测结果，1 种及 2 种 HPV 分型结果完全一致者 85 例，其中 1 种型别完全相同者 74 例(87.06%)，以 HPV-16 型为主；2 种型别完全相同者 11 例(12.94%)，其中 HPV-31、16、58、51、53、33、35、52、59、68 型的出现频数依次为 5、4、4、2、2、1、1、1、1 次；暂未发现 3 种型别完全相同的感染者。提示宫颈细胞的 HPV 感染，是以 1 种型别感染为主，多种型别感染为辅的感染模式。同时也进一步说明 HPV 感染宫颈细胞时，一般以 1 种型别感染 1 个细胞，当患者只感染了 1 种型别的 HPV 时，若取到被感染细胞即可检出 HPV，若所取细胞为未感染细胞则无法检出 HPV，这也可以从某种程度上理解两种检测方法分型完全一致者所占百分比最高。而对于 2 种型别及以上的 HPV 感染，取到同时感染 2 种及以上 HPV 型别的细胞的概率却大大降低，其中包括了宫颈细胞取样及试验操作细胞取样两个环节。这使得 2 种 HPV 型别完全相同的感染者百分率较低，而未检出 3 种 HPV 型别完全相同的感染者，进一步说明多型别完全相同的感染者非常罕见，即使用同一种分型检测法对同一患者进行多次多种型别 HPV 检测，也往往会不同的结果。

根据 Munozetal 的分类，19 种 HPV 型别被认为有致癌性，包括 HPV-16、18、26、31、33、34、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82。有研究表明，95% 的宫颈癌由 8 种高危型(HPV-16、18、31、33、45、52、58、35)所致^[10-11]。蔡为民等^[3]研究显示，15 种高危型 HPV 感染频率在宫颈鳞癌中为 98.91%，在宫颈腺癌中为 100.00%，15 种高危型 HPV 感染频率都很高。因此，检测 15 种高危型 HPV 基本满足了宫颈癌筛查及妇科宫颈疾病预防的需要。本研究结果显示，两种方法检测结果有较高的一致性($\kappa=0.745$)，其中阳性符合率为 88.32%，阴性符合率为 86.24%，总符合率为 87.40%。持续性 HPV 感染是女性宫颈肿瘤的患病信号，携带整合的 HPV 基因组的女性发展成高级别 CIN 和宫颈癌的概率明显高于已清除 HPV 感染的女性。因此，HPV 分型检测对于预测 CIN 病变的转归有着重要的作用。现 HPV 被认为是所有级别 CIN 病变的主要高危因素，而 CIN II、CIN III 级病变与 HPV 的关联度明显高于 CIN I 级病变。高危型 HPV-16、18 阳性者较低危型 HPV-6、11 阳性者 CIN 病变进展的概率大大增加^[3,12]。本研究从体检女性到 ASCUS 及低度病变女性，从 CIN I、CIN II、CIN III 级到宫颈癌患者，HPV 感染率随宫颈病变程度的增加而上升。尤其 HPV-16、18 型，是所有宫颈肿瘤中最为强势的型别，出现频率也最高。因此，临床妇科医生应该对宫颈病变的患者进行 HPV 分型检测，尤其对 35 岁以上伴有 HPV-16、18 型持续性感染者应给予更多的关注，建议行宫颈细胞的 DNA 倍体和液基细胞学检查，以便早期及时预警，把宫颈癌阻止在癌前病变阶段^[13-14]。

从临床角度来看，基因芯片法通量大，灵敏度高，采用的是高低危型 HPV 组合搭配检测模式，不但能够对人体各个部位的各种疣类病变进行 HPV 分型检测，也可以对人体宫颈及其他部位因 HPV 感染致癌或致瘤病变组织和细胞进行分型检测，既可以明确 HPV 感染相关疾病的病因，也可以了解其分子流行病学情况，对此类疾病的防控及 HPV 疫苗的研发具有

重大的指导意义。荧光定量法灵敏度高，由于其均为高危型 HPV 设计模式，只能检测 15 种高危型 HPV，并可对 15 种高危型 HPV 准确分型，一般主要用于宫颈肿瘤的筛查。此外，荧光定量法还可以对高危型 HPV DNA 进行定量分析，可作为宫颈肿瘤的疗效评估指标。并且，荧光定量法无需洗脱等繁琐步骤，比基因芯片法快捷。

综上所述，荧光定量法与基因芯片法均是目前临床 HPV 检测的主要方法，两种方法各有其优缺点。应根据 HPV 感染的不同疾病，正确合理地选用这两种检测方法，发挥各自优点，服务于临床。

参考文献

- [1] 耿建祥,王旭波.人乳头瘤病毒检测及其临床应用[M].北京:人民卫生出版社,2009:381-427.
- [2] 董云灿,耿建祥,张劲松,等.1722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒基因的分型[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):817-818.
- [3] 蔡为民,王宏景,耿建祥,等.宫颈正常细胞和宫颈鳞癌、腺癌组织中 HPV 感染基因型的分布[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(8):854-857.
- [4] 邹琳,兰建云,耿建祥,等.47 例宫颈腺癌中人乳头瘤病毒感染基因分型的研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(4):393-394.
- [5] 任晓惠,耿建祥,李海,等.某市 2109 例女性宫颈细胞中 HPV 基因型别的研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(13):1542-1544.
- [6] 魏谨,耿建祥,朴正爱,等.已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒感染的基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2012,22(23):5202-5205.
- [7] 冷秀兰,范雪梅,耿建祥,等.宫颈鳞癌及腺癌组织中 HPV 感染基因型分布的比较研究[J].中国妇幼保健,2014,29(10):1594-1596.
- [8] 兰建云,邵伟伟,袁苏娟,等.外耳道乳头状瘤中的人乳头瘤病毒检测及其临床意义[J].医学研究生学报,2010,23(4):391-393.
- [9] 张金浩,耿建祥,樊志敏,等.肛管及肛门区尖锐湿疣组织中乳头状瘤病毒基因类型的研究[J].医学研究生学报,2011,24(11):1129-1132.
- [10] Rodriguez AC,Schiffman M,Herrero R,et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3:critical role of duration of infection[J].J Natl Cancer Inst,2010,102(5):315-324.
- [11] Bruni L,Diaz M,Castellsague X,et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents:meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings[J].J Infect Dis,2010,202(12):1789-1799.
- [12] 龙秀荣,王志惠,耿建祥,等.健康妇女及宫颈上皮癌瘤患者 HPV 感染基因型分布特征研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(24):2958-2959.
- [13] 王宏景,刘忠伦,耿建祥,等.苏州两医院女性宫颈 HPV 感染基因型别的对比研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(4):404-406.
- [14] 许晓红,解正新,马嵘,等. HPV 高危型别检测联合细胞学检查对宫颈病变筛查的研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2011,25(4):298-300.