· 论 著 ·

PCR-荧光法与 PCR-膜杂交法在检测 HPV-DNA 中的比较分析

赵一琳, 崔映红, 黄少芝

(常熟市医学检验所, 江苏常熟 215500)

摘要:目的 比较并分析 PCR-荧光法与 PCR-膜杂交法在临床感染人乳头瘤病毒(HPV)中的检测结果,探讨其不同的应用价值。方法 收集 204 例标本,分别采用 PCR-荧光法与 PCR-膜杂交法检测 HPV-DNA,以细胞组织学诊断为标准分为未见上皮内病变或恶性病变(NILM)组(152 例)、意义不明的非典型鳞状上皮细胞增生(ASC-H)组(27 例)、鳞状上皮细胞低度病变(LSIL)组(21 例)、鳞状上皮细胞高度病变(HSIL)组(2 例)和宫颈鳞癌(SCC)组(2 例)。比较各组患者 HPV-DNA 阳性率,通过统计学方法比较 2 种方法的差异性。结果 204 例标本中 PCR-荧光法检测阳性 67 例,阴性 137 例,阳性率为 32.8%。PCR-膜杂交法检测阳性 94 例,阴性 110 例,阳性率为 46.1%。细胞学诊断有异常细胞 52 例(25.5%)。NILM 组患者 2 种方法检测 HPV 阳性率分别为 12.5%、28.3%,差异有统计学意义($\chi^2=11.670, P=0.001$);细胞异常组患者 2 种方法检测 HPV 阳性率分别为 92.3%、98.1%,差异无统计学意义($\chi^2=1.891, P=0.363$);细胞异常组患者 2 种方法检测 HPV 阳性率与 NILM 组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 PCR 核酸扩增检测 HPV-DNA 具有很高的特异性和灵敏度。在临床筛查诊疗中 PCR-荧光法具有更高的应用价值,而在非高危性 HPV 检测领域和科研领域 PCR-膜杂交法更具优势。HPV-DNA 检测结合细胞组织病理学检查可提高 HPV 感染诊断的准确性与临床指导意义。

关键词:乳头状瘤病毒科; 聚合酶链反应; 荧光; 膜杂交法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.02.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)02-0205-03

The comparative analysis on the detection of HPV-DNA by PCR- fluorescence and PCR-membrane hybridization

Zhao Yilin, Cui Yinghong, Huang Shaozhi

(Changshu Medical Testing Center, Changshu, Jiangsu 215500, China)

Abstract: Objective To explore different application of PCR- fluorescence method and PCR- hybridization method in the diagnosis of human papilloma virus (HPV) infection. **Methods** Clinical samples were collected and detected by PCR- fluorescence method and PCR- hybridization method respectively. The cell histological diagnosis was used to compare the positive rate of HPV-DNA detection between the two methods, and the difference was analyzed by statistical method. The specimens were divided into no intraepithelial lesion or malignancy(NILM) group(152 cases), atypical squamous cell hyperplasia of unknown significance(ASC-H) group (27 cases), low-grade squamous intraepithelial lesion(LSIL) group(21 cases), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) group (2 cases) and squamous cell cervical carcinoma(SCC) group (2 cases). **Results** Among 204 cases of specimens, the results of PCR- fluorescence showed 67 cases were positive, 137 cases were negative, the positive rate was 32.8%. The detection results of PCR- membrane hybridization showed 94 cases were positive, 110 cases were negative, the positive rate was 46.1%. 52 cases with abnormal cells were found by using cytological examination, the proportion is 25.5%. Within NILM group PCR- fluorescence method and PCR- membrane hybridization HPV positive rates were 12.5% and 28.3% respectively, the difference was statistically significant($P<0.05$). Meanwhile the positive rate in the group of abnormal cells were 92.3% and 98.1%, the difference was not statistically significant($P>0.05$). At the same time, the difference was statistically significant between the positive rate of abnormal HPV cell group and the NILM group($P<0.05$). **Conclusion** HPV-DNA detected by PCR are specific and sensitive. During clinical diagnosis and treatment, PCR- fluorescence method has higher application value, while in the detection and research of low-risk HPV, PCR membrane hybridization has more advantages. The detection of HPV-DNA combined with cell histological diagnosis can improve the diagnostic accuracy of HPV viral infection.

Key words: papillomaviridae; polymerase chain reaction; fluorescence; membrane hybridization

人乳头瘤病毒(HPV)是妇女生殖道感染的常见病原体,是宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌的主要病因。有研究表明,99%宫颈癌患者存在 HPV 感染,在美国至少有 80% 妇女到 50 岁时有过一次以上 HPV 感染史^[1]。由于 HPV 感染与宫颈癌的高度相关性,而 HPV 阴性者几乎很少发生宫颈癌;且 HPV 感染与宫颈癌的发生具有时序关系,不同亚型 HPV 在致病性

方面均存在差异^[2],所以在临床对宫颈癌的筛查中进行 HPV 及其分型检测是一项极其重要的检查手段。HPV 分型检测对临床 CIN 和宫颈癌筛查和评估、治疗后的随访、病程进展监测及人群流行病学状态和病毒疫苗的研制均具有重要意义。目前国内临床进行 HPV DNA 检测的主要方法为实时荧光 PCR 与杂交捕获法^[3]。本研究采用 PCR-荧光法与 PCR-膜杂交法

同时检测临床标本中的 HPV 并以细胞学诊断作为依据对检测结果进行分析和评估,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 1 月至 2014 年 12 月江苏省常熟市第二人民医院妇科门诊患者 204 例作为研究对象,年龄 20~60 岁,平均(36.5±7.0)岁,均存在性生活史并自愿接受细胞学和 HPV 病毒学检测。所有检测标本均为从受检者宫颈口鳞、柱状上皮交界处采集,使用一次性棉拭子。采样前拭去宫颈口过多分泌物,将宫颈刷伸入宫颈外口,轻压旋转取得脱落细胞。迅速将宫颈刷浸入盛有 1 mL 无菌生理盐水的样本管中,充分漂洗,贴壁挤干后即刻送检。细胞学检查标本采用专用脱落细胞采集器采集,即时送检。

1.2 方法

1.2.1 PCR-荧光法 13 000 r/min 离心 5 min,取沉淀,采用港龙生物技术有限公司提供的试剂盒提取标本 DNA,取 2 μL 待测 DNA 加入试剂盒提供的反应管。管内含有根据 13 种高危型 HPV 的 L1 基因靶序列设计一组高度特异的引物和探针,在同一 PCR 反应中检测宫颈脱落细胞中的 13 种高危型 HPV(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68) DNA。反应参数为 50 °C 2 min,95 °C 10 min,40 个循环(95 °C 15 s,52 °C 30 s,62 °C 1 min)。PCR-荧光法是在 PCR 过程中使用荧光 PCR 检测仪同时记录荧光标记探针在分子杂交时每次 PCR 循环释放出的荧光能量变化,直接反映出 PCR 扩增产物量的变化。采用美国 ABI 7500 自动记录荧光值变化并转换成 DNA 模板量,用以判断检测结果。设立 HPV 阴性对照、临界阳性对照和强阳性对照,以保证质量受到控制。

1.2.2 PCR-膜杂交法 该法采用基因扩增技术及导流杂交原理,通过反向点杂交检测扩增产物与包被有型特异性探针膜杂交结果,再用碱性磷酸酶系统定性检测,从而对 21 种 HPV 基因型(6、11、16、18、31、33、35、39、42、43、44、45、51、52、53、56、58、59、66、68 和 CP8304)进行分型检测分析。标本采集与 DNA 提取与 PCR-荧光法相同,采用凯普生物化学有限公司提供的分型检测试剂盒,将 PCR Mix、Taq 酶和 DNA 模板按比例混匀。扩增参数:95 °C 9 min,40 个循环(95 °C 20 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s);72 °C 5 min。所有产物用于杂交过程,详细步骤参照说明书操作。在显色过后检测结果阳性为清晰可见的蓝紫色圆点。根据膜条 HPV 分型分布图,判断阳性点为何种 HPV 类型。全程设立阴、阳性对照。

1.3 细胞组织学检查 根据 2001 年贝塞斯达分类系统(TBS)将宫颈鳞状上皮细胞学检查结果分为未见上皮内病变或恶性病变(NILM)、意义不明的非典型鳞状上皮细胞增生(ASC-H)、鳞状上皮细胞低度病变(LSIL)、鳞状上皮细胞高度病变(HSIL)和宫颈鳞癌(SCC)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率或构成比表示,采用 χ^2 检验和相关性分析比较两种方法的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞组织学检查结果 204 例受检者中 NILM 152 例(74.5%),提示存在细胞异常 52 例(25.5%),其中 ASC-H 27 例,LSIL 21 例,HSIL 2 例,SCC 2 例。

2.2 HPV-DNA 检测结果 细胞异常组 2 种方法的 HPV-DNA 检出率均很高,PCR 法检测 HPV-DNA 具有很高的灵敏度与特异性。PCR-荧光法检测阴性 137 例,阳性 67 例,阳性率为 32.8%;NILM 组检测阳性 19 例,阳性率为 12.5%,细胞异常组检测阳性 48 例,阳性率为 92.3%。PCR-膜杂交法检测阴性 110 例,阳性 94 例,阳性率为 46.1%;NILM 组检测阳性 43 例,阳性率为 28.3%;细胞异常组检测阳性 51 例,阳性率为 98.1%。细胞异常组患者 2 种方法检测 HPV 阳性率与 NILM 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2 种方法在细胞组织学分组中检测阳性情况比较[n(%)]

组别	n	PCR-荧光法	PCR-膜杂交法
NILM 组	152	19(12.5)	43(28.3)
细胞异常组	52	48(92.3)*	51(98.1)*
ASC-H 组	27	24(88.9)	26(96.3)
LSIL 组	21	20(95.2)	21(100.0)
HSIL 组	2	2(100.0)	2(100.0)
SCC 组	2	2(100.0)	2(100.0)

* :与 NILM 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 2 种方法检测结果比较 PCR-荧光法和 PCR-膜杂交法在 NILM 组检测阳性率分别为 12.5%、28.3%,差异有统计学意义($P < 0.05$);在细胞异常组检测阳性率分别为 92.3%、98.1%,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 2 种方法检测结果比较[n(%)]

组别	阴性	阳性	χ^2	P
NILM 组(n=152)				
PCR-荧光法	133(87.5)	19(12.5)	11.670	0.001
PCR-膜杂交法	109(71.7)	43(28.3)		
细胞异常组(n=52)				
PCR-荧光法	4(7.7)	48(92.3)	1.891	0.363
PCR-膜杂交法	1(1.9)	51(98.1)		

3 讨论

从方法学来看,PCR-膜杂交法也是建立在常规 PCR 基础上的,增加膜杂交显色过程,其检测结果只能进行定性分析,以检测位点出现信号与否进行判断,信号点的强弱不能提供定量方面的参考。除 PC 位点外膜条上各检测位点有信号,说明感染了相应的基因型,即使是混合型感染也能分辨^[4]。但该方法比 PCR-荧光法多一步杂交显色,操作步骤稍显繁琐,同时杂交显色过程中增加了实验室 PCR 产物污染的风险。PCR-荧光法是在常规 PCR 基础上加入荧光标记探针,从扩增到检测完均在封闭反应管内进行,从而避免了实验室产物交叉污染的可能。PCR-荧光法可以实时荧光监测扩增过程并且能提供准确的半定量分析,结果可靠,非常适用于针对高危 HPV 亚型流行病学的筛查^[5]。由于该法检测宫颈 HPV 感染具有快速、简便、准确的优点,且适用于多种样本类型,成本相对较低,在严格进行实验室质量控制的情况下,该法不失为临床 HPV 检测的一种理想方法^[6-8]。

本研究结果显示, HPV 感染在细胞组织学分类检测中呈现不同的阳性比例, NILM 组明显低于细胞异常组。从表 1 可见, PCR-荧光法与 PCR-膜杂交法检测结果均证明这一点, 建立在 PCR 基础上的 HPV-DNA 检测技术具备很高的灵敏度与特异性。2 种方法在细胞异常组检测阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$), 说明 HPV 感染与宫颈病变具有直接相关性。但在 NILM 组中 2 种方法检测阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$), 主要原因在于 PCR-荧光法检测目标群只局限于 13 种类型的高危 HPV, 而 PCR-膜杂交法可以检测 21 种类型的 HPV 亚型, 不仅包括 PCR-荧光法所含的 13 种高危型, 还能检测 5 种低危型(HPV6、11、42、43、44)及 2 种高危型(HPV66、CP8304)^[7]。

PCR-膜杂交法可以对患者所感染的 HPV 进行高危和低危分型, 能通过一次实验检测获得相对较多的检验信息。PCR-膜杂交法可明确患者具体所感染的 HPV 类型, 对判断多重感染和疗效监测有着较大的应用价值。但也有研究表明, 只有高危型 HPV 基因组能整合进宿主细胞染色体内, 精确的分型检测具有的临床诊疗意义不大, 其在学术研究、病毒感染与组织病变的机制关系及疫苗研发方面等具有更大的应用价值^[9]。PCR-荧光法与 PCR-膜杂交法比较具有时间短、操作简单、交叉污染少、可以允许同一反应垫板更多具备临床意义的高危 HPV 类型, 可适用于大批量样本的筛查^[10]。同时 PCR-荧光法还提供了半定量分析, 检测临床标本中的病毒 DNA 承载量, 这对于预测宫颈病变的危险程度具有一定应用价值^[11]。

总之, HPV 的检测方法学选择应根据患者自身病情的实际需求, 选择更适合于临床诊疗需求的 HPV 检测方法。一方面能更快速、准确地进行检测分析; 另一方面能为临床医生提供更有价值的检验信息。

参考文献

- [1] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide

[J]. *J Pathol*, 1999, 189(1):12-19.

- [2] Lee JH, Lee NW, Hong SW, et al. Establishment of an efficient multiplex real-time PCR assay for human papillomavirus genotyping in cervical cytology specimens; comparison with hybrid capture II[J]. *Cytopathology*, 2010, 22(4):261-268.
- [3] 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.
- [4] Knoepp SM, Kuebler DL, Wilbur DC. Correlation between hybrid capture II high-risk human papillomavirus DNA test chemiluminescence intensity from cervical samples with follow-up histologic results; a cytologic/histologic review of 367 cases[J]. *Cancer Cytopathol*, 2010, 118(4):209-217.
- [5] 肖克林, 王辉林, 麦光兴, 等. 多重实时 PCR 检测高危型人乳头瘤病毒感染[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(6):534-537.
- [6] 孟芝兰, 程雪梅, 朱晨雁, 等. 全自动 DNA 定量分析系统在宫颈癌及癌前病变筛查中的应用价值[J]. *诊断病理学杂志*, 2012, 19(1):15-18.
- [7] 康爱琴, 陈爱霞, 顾建. 宫颈刮片细胞学与阴道镜联合应用在癌前病变及宫颈癌筛查中的临床价值[J]. *中国妇幼保健*, 2012, 27(34):5627-5629.
- [8] 田卫华, 何小英, 郭晓红, 等. 人乳头瘤病毒-DNA 检测与液基细胞学在宫颈病变筛查中的比较分析[J]. *实用医技杂志*, 2015, 22(5):461-462.
- [9] 李广太. HPV 检测在子宫颈癌筛查中的意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(4):241-245.
- [10] 马岩. 两种人乳头瘤病毒检测方法的比较[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(28):136-137.
- [11] 王慰敏, 安瑞芳, 朱克修. 多重聚合酶链反应一步法用于宫颈病变患者 HPV 分型检测的初步研究[J]. *现代诊断与治疗*, 2014, 25(12):2647-2649.

(收稿日期:2015-08-16)

(上接第 203 页)

度好和回收率高等特点, 能批量进行治疗药物的监测, 适用于药物分析实验和临床药代动力学研究。

参考文献

- [1] Allqvist A, Miura J, Bertilsson L, et al. Inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 catalyzed metabolism of alprazolam and quinine by ketoconazole as racemate and four different enantiomers[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2007, 63(2):173-179.
- [2] 杨广声, 钱东丽. 盐酸齐拉西酮片[J]. *中国新药杂志*, 2006, 15(23):2081-2082.
- [3] Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011[J]. *Pharmacopsychiatry*, 2011, 44(6):195-235.

- [4] 徐德峰, 宓为峰, 李玲芝, 等. 齐拉西酮临床研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 30(1):63-65.
- [5] 李华芳, 沈一峰, 葛庆华, 等. 盐酸齐拉西酮在中国健康志愿者中的药代动力学研究[J]. *上海精神医学*, 2006, 18(4):222-225.
- [6] 隋忠国, 毕晓林, 荆凡波. 新型非典型抗精神病药——齐拉西酮的临床应用进展[J]. *中国药房*, 2009, 20(5):385-387.
- [7] 陈清霞, 吕永丰, 黄伟侨, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中齐拉西酮浓度[J]. *海峡药学*, 2009, 21(2):69-71.
- [8] 刘伟忠, 陈清霞, 莫玉泉, 等. 反相高效液相色谱法同时测定人血浆齐拉西酮与阿立哌唑浓度[J]. *医药导报*, 2011, 30(8):1000-1003.

(收稿日期:2015-07-28)