

• 短篇论著 •

延安市妇女 HPV 基因分型与高危 HPV DNA 检测的临床研究*

杜伟平, 王丽, 米思蓉, 张宁梅, 李芳芹[△]

(延安大学附属医院, 陕西延安 716000)

摘要:目的 对比分析延安市妇女人乳头瘤病毒(HPV)感染的基因型分布情况和高危型人乳头瘤病毒 DNA(HPV-HR DNA)检测结果,探讨 HPV 检测的合理模式,为宫颈癌防治提供理论数据依据。方法 采用反向杂交法对 HPV 进行基因分型,用荧光定量 PCR 法对 HPV-HR DNA 进行检测,并对其结果进行对比分析。结果 2 006 例样本共检出阳性样本 332 例,阳性率 16.55%;HPV 分型中高危型以 HPV-16、52、53 居于前三位,HPV 低危型以 HPV-81、6、44 为主;单纯高危型感染 219 例,单纯低危型感染 74 例,混合感染 39 例,构成比分别为 65.96%、22.29%、11.75%。结论 HPV 基因分型检出率相比 HPV-HR DNA 检出率略高,在体检人群中可以采用 HPV-HR DNA 进行筛查,对于医院妇科就诊有临床症状的可以进行 HPV 基因分型检测。

关键词: HPV 基因分型; HPV DNA; 筛查**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.08.027**文章编号:**1673-4130(2018)08-0989-03**中图法分类号:**R446.5**文献标识码:**B

临床观察发现中国宫颈癌的发生有明显上升和年轻化趋势,发病率呈增长趋势,宫颈病变是育龄女性常见的疾病,广泛存在于有育龄期妇女当中,广义的宫颈病变有炎症、损伤、畸形、癌前病变及肿瘤等,其中宫颈癌危害最大,已成为仅次于乳腺癌的恶性肿瘤。宫颈癌的发生是经历了一个漫长的过程,经过慢性炎症、不典型细胞增生、细胞内瘤变等多个阶段发展而成。临床病因学研究证实人乳头瘤病毒(HPV)在侵犯人体皮肤与黏膜后引起增殖性乳头状瘤状病变。大量研究已经证实高危型 HPV 感染是引起宫颈上皮内瘤变(CIN)及宫颈癌的必要条件^[1],选择合理高效的筛查方法对早期诊断,有效降低宫颈癌的发病率具有重要的价值。目前临床进行 HPV 检测的方法包括质谱、基因分型、PCR 定量等^[1],由于方法学的差异和检出效率存在差别,目前临床多采用基因分型和 PCR 定量检测。不同人群感染情况差异较大,为了给临床提供更多的数据支持,本研究探讨针对不同人群的筛查手段。本研究选择导流杂交法和 HPV DNA PCR 定量检测对 2 006 例延安地区女性 HPV 进行检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 6 月至 2017 年 6 月在延安大学附属医院体检科、妇科门诊及住院部就诊的健康体检者及患者共 2 006 例,年龄 18~69 岁,平均年龄 37 岁。

1.2 仪器与试剂 试剂盒:HPV 基因分型试剂盒由

潮州凯普生物公司提供。高危人乳头瘤病毒 DNA(HPV-HR DNA)检测试剂盒、标准品、质控由中山大学达安基因有限责任公司提供。主要仪器:荧光定量 PCR 扩增仪 ABI-7500 由 ABI 提供,普通 PCR 扩增仪由博日提供,生物安全柜由鑫贝西提供,高速离心机由湘仪离心机有限公司提供,干式恒温器由杭州奥森仪器厂提供,振荡器由其林贝尔仪器厂提供。

1.3 方法

1.3.1 采样 采用专用宫颈脱落细胞采集器进行采样。用生理盐水冲洗宫颈口,用专用宫颈刷置于宫颈口,单方向旋转 4~5 周以获取足量的上皮细胞样本,然后将宫颈刷头部放入洗脱管中,沿刷柄折痕处折断,管盖后进行标识。

1.3.2 HPV 分型检测 (1)样本 DNA 提取:将溶液 I 预先在 45 °C 金属浴溶解沉淀。然后将金属浴调至 100 °C。震荡混匀临床样本(宫颈脱落细胞),取 800 μL 混匀的临床样本,加入 1.5 mL 离心管,13 000 r/min 离心 2 min,去上清。加入 400 μL 溶液 I,重悬细胞,100 °C 放置 15 min,瞬间离心。加入 400 μL 溶液 II,混匀,放置 2 min,13 000 r/min 离心 5 min,去上清。13 000 r/min 离心 1 min,去上清,务必去干净。室温放置晾干,或至于金属浴 60 °C 加热晾干。加入 60 μL 溶液 III 重新悬浮沉淀,充分溶解。加样前 13 000 r/min 离心 1 min,上清即 DNA。(2)PCR 扩增:配置 PCR 反应体系,PCRmix 提前解冻;Taq 酶使用时拿出冰箱。在洁净的离心管中按比例混合

* 基金项目:科技惠民计划(2014HM-08)。

[△] 通信作者,E-mail:724411083@qq.com。

PCRmix、Taq 酶,混匀,短暂离心。分装 PCR 反应体系,每管 24 μ L(PCRmix 23.25 μ L+Taq 酶 0.75 μ L)分装到 PCR 管。将临床样本 DNA(1 μ L)按相应顺序加入到各 PCR 管,标记各管,混匀,短暂离心,各管放入 PCR 仪,按程序扩增 I(PCR 程序:95 $^{\circ}$ C 9 min,95 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min。(3)杂交:水浴锅 45 $^{\circ}$ C,杂交液、溶液 B 预热;制备冰水。开杂交仪,蒸馏水充满反应室,安放金属多孔板,设置 45 $^{\circ}$ C。PCR 仪 95 $^{\circ}$ C 变性 \geq 5 min,迅速放入冰水中 \geq 2 min。杂交仪开泵,排出多孔板上的水,关泵,安放分隔膜-杂交膜-分隔室-压扣盖,加入 1 000 μ L 杂交液 \geq 2 min。开泵-排干杂交液-关泵,加杂交液 0.5 mL。将 PCR 产物(\geq 20 μ L)加入各反应槽杂交液中,枪头吸吹 2~3 次混匀,枪头勿戳破杂交膜,盖盖板,45 $^{\circ}$ C 杂交 10 min。导流杂交,45 $^{\circ}$ C 杂交液 0.8 mL 清洗 3 次,液体排尽后,再清洗下 1 次,第 2 次清洗设温度 25 $^{\circ}$ C,加封阻液 0.5 mL,排液尽,关泵。加封阻液 0.5 mL,封阻 5 min。加酶标液 0.5 mL,酶标 3.5~5.0 min。溶液 A 0.8 mL 清洗 4 次,第 2 次清洗设温度 36 $^{\circ}$ C,排液尽关泵。加显色液 0.5 mL,盖好杂交仪盖板;显色 3~5 min。开泵-加溶液 B 0.8 mL 清洗 3 次-加蒸馏水清洗 1 次关泵。打开压扣盖,拿走分割室,用镊子取出杂交膜并放在吸水纸上,对照标准进行结果判读。

1.3.3 HPV-HR DNA 检测 采用荧光定量法进行检测,步骤包括 HPV DNA 的提取和 PCR 扩增。PCR 扩增按以下条件进行:93 $^{\circ}$ C 2 min 预变性,93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,设置 10 个循环,再按 93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,设置 30 个循环。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件。计数资料采用率表示(%),采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPV 基因分型结果与 HPV-HR DNA 检测结果的比较 HPV 基因分型中的高危型阳性检出率为 258/2 006(12.86%),HPV-HR DNA 阳性检出率为 192/2 006(9.57%),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 基因分型检测结果 HPV 高危型中 HPV-16、52、53 居于前三位;HPV 低危型以 HPV-81、6、44 为主。总检出阳性 332 例,阳性率为 16.55%。具体结果见表 1。

表 1 HPV 基因分型结果[n(%)]

组别	n	HPV 型别	构成比	HPV 型别	构成比
HPV 高危型	258	16	57(14.11)	68	21(5.20)
		52	55(13.61)	33	20(4.95)
		53	46(11.39)	66	18(4.46)
		58	36(8.91)	31	15(3.71)
		51	36(8.91)	59	6(1.49)

续表 1 HPV 基因分型结果[n(%)]

组别	n	HPV 型别	构成比	HPV 型别	构成比
HPV 低危型	192	39	33(8.17)	45	5(1.11)
		56	28(6.93)	35	2(0.50)
		18	26(6.44)		
		81	37(57.81)	11	5(7.81)
		6	11(17.19)	42	3(4.69)
		44	6(9.38)	43	2(3.13)

2.3 基因分型检测 共检出阳性标本 332 例,阳性率为 16.55%;单纯高危型感染 219 例,单纯低危型感染 74 例,混合感染 39 例,构成比分别为 65.96%、22.29%、11.75%。具体结果见表 2。

表 2 HPV 不同感染类型构成比

类型	n	阳性(n)	构成比(%)
单纯高危型	332	219	65.96
单纯低危型	332	74	22.29
混合感染型	332	39	11.75

3 讨 论

宫颈癌是目前少有的明确病因的肿瘤^[2]。在宫颈癌患者中 HPV DNA 的检出率很高,目前临床进行 HPV 检测的方法多样,包括质谱、基因分型、PCR 定量等,由于方法学的差异和检出效率存在差别,给临床带来一些困惑,如何选择筛选方式对于不同人群及不同医院都有差异。在健康妇女中,HPV 的感染率较低,而在存在宫颈病变的患者当中感染率较高,不同地区报道的结果存在差异。高危型 HPV 的持续性感染是宫颈癌患病的关键病因,如能早期对 HPV 进行检测对宫颈癌的早期防治有非常重要的意义。

本研究显示,延安地区妇女 HPV 总感染率为 16.55%,高危亚型感染率为 12.86%,HPV-HR DNA 检测阳性率为 9.57%,感染率存在差异。HPV-HR DNA 所涵盖的基因型检出率同基因分型相同,HPV 基因分型涵盖高危型 15 个,HPV-HR DNA 涵盖 8 个型,因此检出率存在差异。对于健康人员体检 HPV-HR DNA 检测可以满足要求,而对于临床存在宫颈病变的人群基因分型检出率更高,更能反映实际的情况。基因分型检测结果显示:HPV 高危型中 HPV-16、52、53 居于前三位,这与文献报道存在差异^[3],由于不同地区存在经济、文化等多因素导致不同地区感染情况存在差异,感染率及基因型别也就存在差异。在 HPV 低危型中以 HPV-81、6、44 为主。所有样本总检出阳性 332 例,其中单纯高危型感染 219 例,单纯低危型感染 74 例,混合感染 39 例,构成比分别为 65.96%、22.29%、11.75%。其中危害最大的 HPV-16 型构成比为 14.11%,数量也是所有检出的高危型中最多的。与临床研究数据类似,研究显示

多重主要为二重感染,以高危型和混合型多见^[3]。随着年龄的增长高危 HPV 的感染持续增加,到达一定年龄后又开始下降^[4]。对健康体检的人群及存在宫颈病变的人群进行 HPV 感染的筛查可以选择不同的方式,在发达国家 HPV DNA 检测已经被列入宫颈癌筛查必做项目^[5-6],结合国内实际对于健康人群可以进行 HPV-HR DNA 的检测,筛查出阳性者再做分型检测,明确基因型,采取不同的治疗措施,进而获得满意的治疗效果。对于存在临床症状的人群直接进行 HPV 基因分型更有现实的意义。

宫颈癌患者从感染 HPV 到宫颈癌的潜伏期时间很长。所以实现 HPV 早期筛查对筛查宫颈癌有重要意义,对早期进行诊断、规范治疗以及预测病变进展等具有重要价值。充分掌握 HPV 感染的情况及亚型分布,对发现 HPV 感染的高危人群,进行 HPV 感染的控制和有效治疗有重要意义,进而对降低宫颈癌的发生率产生积极的影响^[7-8]。

参考文献

[1] 温旺荣,李莉. HPV 基因检测技术新进展[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(8):514-516.

[2] WEN W R, LI L. Progresses in HPV gene detection technology[J]. Chin J Lab Med, 2015, 39(8): 514-516.
 [3] 任玲,石启明. 徐州地区 39 997 例女性生殖道人乳头瘤病毒检测结果分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(11): 1996-1998.
 [4] REN L, SHI Q M. Analysis of detection of human papilloma virus in 39997 cases in Xuzhou[J]. Modern Preventive Medicine, 2002, 32(11): 1996-1998.
 [5] 杨二姣,潘琪,江虹,等. 两种高危型 HPV 检测技术诊断宫颈病变的临床价值比较[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(4): 653-655.
 [6] YANG E J, PAN Q, JANG H, et al. Comparison of the Clinical Significances of two Kinds of High-risk Type HPV Detection Technology in the Diagnosis of Cervical Lesions, [J]. Progress in Modern Biomedicine. 2015, 45(4): 653-655.
 [7] 刘永良. 导流杂交基因芯片检测 HPV-DNA 亚型 1 760 例结果分析[J]. 诊断病理学杂志, 2015, 22(1): 59.
 [8] LIU Y L. Analysis results of 1 760 cases for microarray Diversion hybridization detect HPV DNA subtype [J]. Chinese J Diag Path, 2015, 34(1): 62.

(收稿日期:2017-09-28 修回日期:2017-12-14)

• 短篇论著 •

PCR 反向点杂交技术与 DNA 测序法检测 HPV 的对比研究*

许爱敏,张丽萍,周惠芳

(喀什地区第一人民医院,新疆喀什 844000)

摘要:目的 通过 PCR 反向点杂交技术检测人乳头瘤病毒(HPV),并采用 DNA 测序法对此方法进行验证,比较两种检测方法的一致性,为临床使用 PCR 反向点杂交技术进行 HPV DNA 检测提供准确依据。方法 采用 PCR 反向点杂交技术和 DNA 测序法对喀什地区第一人民医院妇科门诊收集的 27 例 HPV 感染患者进行检测,将两种检测方法得到的检测结果进行比对。结果 采用 PCR 反向点杂交技术和 DNA 测序法得到的检测结果一致,27 例样本中阳性检出率 100.0%,其中高危型检出率为 85.2%,低危型检出率为 14.8%,多重型别感染率为 25.9%。结论 两种 HPV 检测方法的结果符合率 100.0%,PCR-反向点杂交技术检测结果准确度高,可以为临床诊断提供准确可靠的依据。

关键词:PCR 反向点杂交法; DNA 测序; HPV

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.08.028

文章编号:1673-4130(2018)08-0991-03

中图法分类号:R446.5

文献标识码:B

近年来,随着宫颈癌发病率不断上升并呈年轻化趋势,国内对人乳头瘤病毒(HPV)的研究也不断深入。大量的流行病学资料表明,高危型 HPV 感染是宫颈癌及其癌前病变发病的必要条件^[1]。基于有力的临床研究数据,美国阴道镜和宫颈病理学会(ASCCP)和美国妇科肿瘤学会(SGO)在 2015 年发表了宫

颈癌筛查中期指南,推荐 HPV 检测作为宫颈癌筛查的重要手段^[2-3]。HPV DNA 检测是直接针对病原体的检查,从感染到癌变的全过程均可检出,更具时间提示性,能够将已经患宫颈癌或癌前病变的妇女以及存在潜在发病风险的妇女筛选出来^[4]。因而加强防治和监控 HPV 的感染状态已成为预防和诊治宫颈癌

* 基金项目:喀什地区自然科学基金项目(KS2015012)。

本文引用格式:许爱敏,张丽萍,周惠芳. PCR 反向点杂交技术与 DNA 测序法检测 HPV 的对比研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(8):