

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.020

HPV DNA 实时荧光定量 PCR 检测与宫颈癌相关性研究

程跃建

(江苏省盐城市第一人民医院检验科 224001)

摘要:目的 评价实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)在研究人乳头瘤病毒(HPV) DNA 与宫颈癌相关性中的临床应用价值,探讨 HPV 与宫颈癌的相关性。**方法** 选取经组织活检确诊的宫颈癌、宫颈糜烂患者及宫颈组织正常者共 125 例,采集其宫颈组织并进行 HPV DNA 实时荧光定量 PCR 检测,观察 HPV DNA 的检测率和病毒水平,分析其与宫颈癌临床分期的相关性。**结果** 60 例宫颈癌组织中检出 HPV 16、18 型 DNA 检出 54 例,检出率为 90.00%,DNA 模板平均拷贝数为 4.83×10^5 copy/mL,其中 HPV 16、18 型 DNA 均阳性者 8 例,仅检出 HPV 18 型 DNA 阳性者 6 例,仅检出 HPV 16 型 DNA 阳性者 32 例。35 例宫颈糜烂组织中检出 5 例 HPV 16 型 DNA 阳性,检出率为 14.29%,DNA 模板平均拷贝数为 5.85×10^3 copy/mL,未检出 HPV 18 型 DNA 阳性者。30 例宫颈正常组织未检出 HPV 16 型及 HPV 18 型 DNA 阳性。对不同组别(宫颈癌组、宫颈糜烂组、宫颈正常组)的 HPV DNA 平均拷贝数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随组织病变情况加重,具有明显相关性($r = 0.88$)。**结论** HPV DNA 水平与宫颈癌的发生有相关性,且 HPV DNA 拷贝数随病情加重而增加,测定 HPV DNA 水平对宫颈癌的筛查有一定临床意义。

关键词:实时荧光定量聚合酶链反应; 人乳头瘤病毒 DNA; 宫颈癌

中图分类号:R737.33;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)24-3718-04

The evaluation of real-time fluorescence quantitative PCR in the correlation of the HPV DNA and cervical cancer

CHENG Yuejian

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yancheng, Yancheng, Jiangsu 224001, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) in studying the correlation between human papillomavirus (HPV) DNA and cervical cancer, and to explore the correlation between HPV level and cervical cancer. **Methods** A total of 125 cases of cervical cancer, cervical erosion and normal cervical tissues were selected. The cervical tissues were collected and detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The detection rate and viral level of HPV DNA were observed, and the correlation between HPV DNA and clinical stages of cervical cancer was analyzed. **Results** In 60 cases of cervical cancer, 54 cases of 16 and 18 subtypes HPV DNA were detected, the detection rate was 90.00%. The average copy number of DNA template was 4.83×10^5 copy/mL. Among them, 8 cases were detected for 16 and 18 subtype HPV DNA, only 6 cases were positive for 18 subtype HPV DNA, and only 32 cases were detected for HPV 16. 5 cases of HPV 16 DNA were detected in 35 cases of cervical erosion. The detection rate was 14.29%. The average copy number of DNA template was 5.85×10^3 copy/mL. No HPV 18 DNA was detected. HPV 16 and HPV 18 DNA in 30 cases of normal cervical tissue were not detected. The average copies of HPV DNA in different groups (cervical cancer group, cervical erosion group, normal tissue group) were compared, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and they were correlated with the aggravation of pathological changes ($r = 0.88$). **Conclusion** The expression rate and expression level of HPV DNA are increased with the development of cervical cancer. Moreover, its expression level is positively correlated with the development of cervical cancer.

Key words: real-time fluorescence quantitative PCR; human papillomavirus DNA; cervical cancer

宫颈癌一般可定义为发生在女性子宫的恶性肿瘤,是常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一,其中大多

数发生在发展中国家。近年来,我国宫颈癌的发病率有所增长,现阶段在我国农村地区增长更明显。为了

降低宫颈癌的发病率,目前对于发生原因及机制的研究越来越多,2008 年,德国科学家 Harald zur Hausen 因研究人乳头瘤病毒(HPV)与宫颈癌的关系而获得诺贝尔奖。随着研究深入,宫颈癌的病因越发趋于明确,这些研究成果为早期发现、诊断宫颈癌及早日研究宫颈癌的治疗策略提供了大量研究资料及理论依据^[1-2]。某些性传播因素,如性病病毒与宫颈癌发生的关系越来越受到国内外专家学者的重视。这些病毒中,研究最多的是 HPV。根据导致疾病的危险性不同,可将 HPV 分为高危型和低危型。低危型 HPV 对于疾病的产生危险性较低,高危型 HPV 对于疾病的产生危险性较高。低危型 HPV 往往引起性疾病,癌变的可能性很小;高危型 HPV 导致癌变的可能性较大,其中某些类型可能和宫颈癌的发生有关。有研究显示,高危型 HPV 能编码癌蛋白,癌蛋白可能会导致子宫颈上皮瘤样病变及子宫Ⅱ、Ⅲ级病变,甚至导致宫颈癌的发生^[3-4]。流行病学调查及实验室研究结果显示,HPV 16 和 18 型与生殖系统恶性肿瘤(如宫颈癌)有明显相关性^[5-6]。目前 HPV DNA 实验室检测方法很多,常规聚合酶链反应(PCR)具有简洁、迅速、敏感度高等优点,但有无法定量、容易污染,从而导致检测结果假阳性等缺点。因此,为了提高检测结果的灵敏度、灵活性和准确性,需要较为准确、灵敏和简便的监测方法^[7-8],因此,实时荧光定量 PCR 应运而生。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013—2016 年本院妇产科住院的宫颈癌、宫颈糜烂患者及宫颈组织正常者共 125 例,所有标本均经组织活检确诊,并采集宫颈组织。其中宫颈癌患者(宫颈癌组)60 例,年龄 18~64 岁,平均 43.40 岁;宫颈糜烂患者(宫颈糜烂组)35 例,年龄 21~59 岁,平均 41.30 岁;宫颈组织正常者(宫颈正常组)30 例,年龄 18~58 岁,平均 39.75 岁。根据 FIGO(1995 年)临床分期标准,将宫颈癌进行分期,本研究宫颈癌标本中Ⅰ期 26 例,Ⅱ期 18 例,Ⅲ期 16 例;本研究宫颈糜烂标本中 CIN Ⅱ级 19 例, CIN Ⅲ级 16 例^[9]。标本处理后保存在-70℃环境中备用。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 (1)美国 BIO-RAD 公司生产的 BIO-RAD iCycle 实时荧光定量 PCR 检测仪;(2)中山柏克电力有限公司生产的 UPS 不间断电源;(3)广州灵洁空气净化设备制造有限公司生产的超净工作台;(4)湖南湘立科学仪器有限公司生产的 CTH1850R 台式高速冷冻离心机;(5)北京时代北利离心机有限公司生产的 GT10-1 型高速台式离心机;(6)天津市顺诺仪器科技有限公司生产的电热恒温水浴箱;(7)德国普兰德公司生产的八通道可调移液器;(8)长沙市天天齿科器材有限公司生产的精细组织剪;(9)安徽普若迈德商用电器股份有限公司生产的-130℃深低

温冰箱。

1.2.2 主要试剂 (1)上海之江生物科技股份有限公司生产的 HPV 16、18 型核酸测定试剂盒(荧光 PCR);(2)美国贝克曼库尔特公司生产的 Agencourt AMPure XP-核酸纯化试剂盒;(3)上海紫一试剂厂生产的四甲基乙二胺;(4)国产分析纯常规试剂。

1.3 试验基本要求 为了防止试验过程中发生污染,进而防止产生假阳性及假阴性结果,所有试剂的放置、加入、监测等都要在专门试验区域;吸头、试管塞、瓶塞等需要专用并定期严格消毒;试管应为一次性使用,且不可混用;每次标本处理完成后均使用次氯酸钠擦拭台面,每次操作结束后均进行无核酸化处理,并进行紫外线消毒^[10]。

1.4 方法

1.4.1 组织标本的采集制作 宫颈癌患者的组织标本来自术中活检留取的可疑病变部位和癌旁组织;宫颈糜烂及宫颈组织正常者的组织标本来自活检中留取的部分组织。所有标本放置在 10%甲醛中固定,迅速送病理科制作 HE 染色的常规石蜡切片。

1.4.2 HPV DNA 的获取 本研究使用 Michael PCR 改良法获取 HPV DNA(16、18 型)。具体步骤:(1)取约 2 g 新鲜组织活检标本,将标本用精细组织剪进行处理后,加入 pH8.0 的三羟甲基氨基甲烷(Tris)和乙二胺四乙酸(EDTA)配制而成的 TE 缓冲液[成分为盐酸(10 mmol/L)-EDTA(0.1 mol/L),0.5%十二烷基硫酸钠(SDS),20 μg/mL 核糖核酸酶]中,并用仪器研磨直到肉眼下看不到块状组织为止。(2)将处理后的标本连同 100 μL TE 缓冲液一起转移到容量为 1.5 mL 的离心管内。(3)在离心管中加入 20% SDS 直至其浓度为 1%为止。将以上组织及溶液充分混合均匀,然后在离心管内加入蛋白酶 K 直至其浓度为 100~200 μg/mL 为止。以上物质充分混合均匀后,放在 37℃水浴 20 h,中间振荡离心管几次。(4)以上混合物中加入 500 μL 的 Tris-平衡酚:氯仿:异戊醇(混合比为 25:24:1),将其混合均匀后离心 10 min,取上清液用氯仿:异戊醇(比例为 24:1)进行抽提,离心 10 min,取上清液加入 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠和-20℃预冷处理的 2 倍体积的乙醇,离心 5 min 后弃上清液,用 75%乙醇进行洗涤,自然风干,用 50 μL TE 进行溶解,作为标本检测 PCR 反应模板,置-70℃保存待用。

1.4.3 PCR 扩增 从试剂盒中选取 HPV DNA(16、18 型)反应液及相关反应酶,室温环境下融化并与获取的 HPV DNA 混合物均匀混合,用离心机以 2 000 r/min 离心 10 s。将混合物移入每个 PCR 反应管内,加入 2 μL 混合物,同时加入宫颈组织正常者混合物上清液、宫颈糜烂者混合物上清液及不同水平的标准物各 2 μL,塞紧试管塞。将这些待测反应管转移到监测试验

区,并按顺序放置,做好记录,放在荧光定量 PCR 检测仪上进行监测(循环)。循环程序设置为:37 °C 5 min; 94 °C 1 min;95 °C 5 s;60 °C 30 s。共 42 个循环^[9]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学处理。计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验和秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPV 16、18 型 DNA 在宫颈组织标本检测情况 60 例宫颈癌组织中检出 HPV 16、18 型 DNA 54 例,检出率为 90.00%,DNA 模板平均拷贝数为 4.83×10^5 copy/mL,其中 HPV 16、18 型 DNA 均检出者 8 例,仅检出 HPV 18 型 DNA 阳性者 6 例,仅检出 HPV 16 型者 32 例。35 例宫颈糜烂组织中检测出 5 例 HPV 16 型 DNA,检出率为 14.29%,DNA 模板平均拷贝数为 5.85×10^3 copy/mL,未检出 HPV 18 型 DNA。30 例宫颈正常组中 HPV 16 型 DNA 及 HPV 18 型 DNA 均未检出,见表 1。宫颈癌组、宫颈糜烂组、宫颈正常组 HPV DNA 平均拷贝数比较差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着组织病变情况加重,具有明显相关性($r = 0.88$),见表 2。

表 1 各类宫颈病变组织 HPV 16、18 型阳性分布[n(%)]

组别	n	阳性		阴性	
		16 型	18 型	16 型	18 型
宫颈癌组	60	40(66.67)	14(23.33)	20(33.33)	46(76.67)
宫颈糜烂组	35	5(14.29)	0(0.00)	30(85.71)	35(100.00)
宫颈正常组	30	0(0.00)	0(0.00)	30(100.00)	30(100.00)

表 2 各类宫颈病变组织 HPV 16、18 型 DNA 水平

组别	n	HPV 16 型		HPV 18 型	
		阳性	平均水平	阳性	平均水平
		(n)	(copy/mL)	(n)	(copy/mL)
宫颈癌组	60	40	$(5.64 \pm 1.63) \times 10^5$	14	$(4.67 \pm 1.32) \times 10^5$
宫颈糜烂组	35	5	$(3.72 \pm 0.91) \times 10^3$	0	0
宫颈正常组	30	0	0	0	0

2.2 HPV 16 型 DNA 在标本中的年龄分布情况 HPV 16 型 DNA 在 18 ~ 40 岁标本中共检出 9 例,>40 ~ 50 岁标本中共检出 13 例,年龄超过 50 岁标本中共检出 23 例。通过两两比较,高危型 HPV 检出率在不同年龄组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

目前,随着宫颈癌发病率逐渐增加及宫颈癌发病年龄逐渐减小,其预防和治疗越来越重要。早发现和早预防对于宫颈癌的治疗和预后有着极为重要的作用。因此,在很多综合医院的妇产科已设立了高危型

HPV 检查。有研究表明,对妇女宫颈组织进行 HPV DNA 检测,可有效监控宫颈癌及癌前病变的发生和发展^[7]。但是,对于是否将 HPV DNA 作为宫颈癌筛查的手段,目前学术界支持和反对意见不一。反对的专家学者认为,全球不同国家地区的研究表明,细胞学检查手段可使宫颈癌发病率和病死率下降很多,因此,仅运用细胞学筛查宫颈癌已足够,不需要再使用另一种方法;支持的专家学者认为,细胞学检查虽然可以使宫颈癌的发病率和病死率下降,但是这种筛查方法成本太高。因为筛查方法的学习需要细胞学的基础和经验,而这些学习和历练是一件成本较高、耗时较长的事业,对于部分国家和地区,尤其是经济条件较差的地区,细胞学筛查更加难以普及。而 HPV DNA 检测可以采用荧光定量 PCR 检测手段进行,成本较低,简单易学,医务人员稍微经过学习或培训就可进行和普及。现在,有不少国家和地区同意将 HPV DNA 检测作为宫颈癌筛查的手段。如法国已将 HPV DNA 检测作为筛查宫颈癌的手段,因为 HPV DNA 采用 PCR 检测,其敏感度较细胞学检查高,原因可能和信号放大作用有关。

本研究中宫颈癌患者 HPV 18 型 DNA 检出率为 23.33%,与文献^[11]报道的广西壮族自治区宫颈癌高发区人群 HPV 18 型 DNA 总检出率为 10.15% 差别不大。宫颈癌患者 HPV 16、18 型 DNA 的检出率为 90.00%,与文献^[11]报道的流行区的高危 HPV 感染率相近。

本研究结果显示,在检出 HPV 16、18 型 DNA 的宫颈癌组中,DNA 平均拷贝数为 4.83×10^5 copy/mL,与其他组别比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。而且 HPV DNA 的拷贝数随病情加重而增加,二者有明显相关性($r = 0.88$)。HPV DNA(16、18 型)在宫颈正常组、宫颈糜烂组及宫颈癌组中的检出率随宫颈病变严重程度而增加,提示 HPV 感染可能会引起宫颈癌,宫颈癌的重要预防措施之一可能就是预防 HPV 感染。建议对宫颈糜烂患者行宫颈组织 HPV DNA(16、18 型)实时荧光定量 PCR 检测,从而尽早筛选出宫颈癌发生的高危人群,并定期随访,对于其中发病者宜及时治疗,尽量预防宫颈癌发生,尽量避免宫颈癌发展和扩散。

HPV DNA 可在宫颈糜烂的治疗、筛查及宫颈癌的早期筛查、分型、治疗中发挥重要作用。有研究表明,HPV DNA 在宫颈癌的病情预测中有十分重要的参考价值。HPV DNA 有多种实验室检测手段,常见的为 PCR,虽然常规 PCR 具有简单、快捷、敏感度高等优点,但是也有无法定量、容易污染而造成假阳性等不足。实时荧光定量 PCR 技术解决了常规 PCR 的缺点,因此成为近年来的研究热点。 (下转第 3725 页)

study[J]. Sex Transm Dis, 2018, 45(6): 382-386.

[2] BOUSHAB B M, MOHAMED LIMAME O C M, FATIM ZAHRA F M, et al. Estimation of seroprevalence of HIV, hepatitis B and C virus and syphilis among blood donors in the hospital of Aioun, Mauritania[J]. Pan Afr Med J, 2017, 28(6): 12465-12469.

[3] XU T, YI Z M, LUO J M, et al. Prevalence and trends of transfusion- transmittable infections among blood donors in Southwest China[J]. J Public Health, 2018, 17(10): 1093-1099.

[4] CERQUEIRA L R P, MONTEIRO D L M, Taquette S R, et al. The magnitude of syphilis: from prevalence to vertical transmission[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2017, 59(21): 78-82.

[5] PILLAY A. CDC syphilis summit-diagnostics and laboratory issues[J]. Sex Transm Dis, 2018, 29(10): 1097-1099.

[6] STAMM L V. Syphilis: Re-emergence of an old foe[J]. Microbial cell, 2016, 3(9): 363-370.

[7] HU M, LIU N, CAI Y Y, et al. Accuracy analysis and comparison of different serological detection methods in syphilis[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2017, 97(36): 2844-

2847.

[8] 张晓红, 张倩, 周学红, 等. 化学发光法检测梅毒特异性抗体在临床筛查试验中的应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(10): 780-783.

[9] 熊继红, 张秀明, 卢建强, 等. 雅培 I2000sr CMIA 法筛查梅毒特异性抗体的测量阈值探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(6): 105-106.

[10] MARANGONI A, MORONI A, ACCARDO S, et al. Laboratory diagnosis of syphilis with automated immunoassays[J]. J Clin Lab Anal, 2009, 23(1): 1-6.

[11] WELLINGHAUSEN N, DIETENBERGER H. Evaluation of two automated chemiluminescence immunoassays, the LIAISON Treponema Screen and the ARCHITECT Syphilis TP, and the Treponema pallidum particle agglutination test for laboratory diagnosis of syphilis[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(8): 1375-1377.

[12] JANIER M, HEGYI V, DUPIN N, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(12): 1581-1593.

(收稿日期: 2018-06-20 修回日期: 2018-09-26)

(上接第 3720 页)

实时荧光定量 PCR 检测技术实现定量检测功能的机制是在常规 PCR 检测的基础上增加了荧光标记探针, 在 TaqMan 酶 5'-3' 端外切酶的催化下实现的。是在 PCR 检测过程中检测被检测物质的荧光信号变化, 在反应完成后, 计算出起始 DNA 拷贝数。有研究表明, 这项技术有许多优点, 不需要在扩增后再进行分析, 尤其在在进行大范围检测时, 避免了交叉污染, 定量准确^[9]。本研究结果提示, 采用实时荧光定量 PCR 来检测宫颈组织中 HPV 16、18 型 DNA 水平, 可以筛查宫颈癌, 判断癌前病变的转归, 观察治疗进展和效果, 监测病情进展。

参考文献

[1] RAMALINGAM P, ZOROQUIAIN P, VALBUENA J R, et al. Florid reactive lymphoid hyperplasia (lymphoma-like lesion) of the uterine cervix [J]. Ann Diagn Pathol, 2012, 16(1): 21-28.

[2] 许春伟, 张博. WHO(2014) 子宫颈肿瘤组织学分类[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(11): 1326.

[3] MCMURRAY H R, MCCANCE D J. Human papilloma-virus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression[J]. J Virol, 2003, 77(18): 9852-9861.

[4] MCMURRAY H R, NGUYEN D. Biology of human papillomaviruses[J]. Int J Exp Pathol, 2001, 82(1): 15-33.

[5] 陈锐, 赵健, 毕惠. 宫颈细胞学检查未见异常的人乳头瘤病毒 16、18、31、33 型感染妇女的管理[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2014, 30(2): 123-126.

[6] 柴凤霞, 樊玉兰, 窦心灵. 细胞角蛋白 19 联合人乳头状瘤病毒 DNA(16/18 型) 检测早期宫颈癌淋巴结微转移[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1394-1395.

[7] 周丹, 林蓓, 于冬冬, 等. 宫颈癌患者淋巴结中 HPV DNA 检测的临床意义[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(4): 542-544.

[8] 贺国丽, 符生苗. 三种方法检测人乳头瘤病毒的比较[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2009, 5(6): 577-579.

[9] 刘韵, 兰艳丽. 阴道镜与宫颈 HPV 检测对宫颈癌及癌前病变检出率的临床对比研究[J]. 实用癌症杂志, 2016, 31(5): 830-832.

[10] 李公祥. 荧光定量 PCR 检测 HPV DNA 与宫颈癌的相关研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2005.

[11] 王鹤, 于继云, 李力. 广西宫颈癌患者 HPV 感染情况的分子流行病学调查[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(24): 2070-2074.

(收稿日期: 2018-05-17 修回日期: 2018-08-22)