

荧光探针 PCR 与膜芯片技术 在女性生殖道 HPV 分型的对比研究*

刘小君¹, 向华国², 曾锦婷², 李红春³ (1. 深圳市光明新区人民医院, 广东深圳 518106;
2. 深圳市宝安区福永人民医院, 广东深圳 518103; 3. 达州市中心医院, 四川达州 635000)

摘要:目的 探讨荧光探针 PCR 与膜芯片分型技术在检测女性生殖道人乳头状瘤病毒中的应用情况, 并进行临床应用评价。方法 门诊 230 例妇女同时利用荧光探针 PCR 与膜芯片分型技术检测其宫颈脱落细胞 HPV-DNA, 其中 70 例进行阴道镜宫颈组织病理活检。荧光探针 PCR 定性检测 14 种高危型 HPV 病毒(包括 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 和 66), 同时对其中的 HPV16 和 HPV18 型进行分型检测。膜芯片分型技术检测 23 种 HPV 型, 包括上述 14 种 HPV, 另外还有 HPV53, 73, 82 和 83 高危型和 5 种低危型 HPV 病毒(HPV6, 11, 42, 43 和 81)。结果 荧光探针 PCR 定性检测 HPV 的阳性率为 11.30%(26/230), 膜芯片分型技术检测 HPV 的总阳性率为 19.57%(45/230), 高于荧光探针 PCR 定性($P < 0.05$)。二者检测 14 种高危型 HPV 病毒总的符合率为 94.35%。在 70 例病理活检中荧光探针 PCR 定性和膜芯片分型技术检测为 HPV-DNA 阳性的妇女中, 宫颈上皮内瘤变 2 级以上, 分别为 26.92%(7/26)及 22.22%(10/45), 分别高于其 HPV-DNA 阴性对照组的 4.55%(2/44)及 4.00%(1/25)($P < 0.05$)。结论 荧光探针 PCR 与膜芯片分型技术比较, 在检测常见 14 种高危型 HPV 方面结果具有较好的一致性, 更适合大规模健康体检中的应用。然而两种方法又有其不同的优势, 应结合具体情况进行应用。

关键词:人乳头状瘤病毒; 荧光探针 PCR; 基因分型

中图分类号: R373; Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)06-092-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.027

Study on Comparing with the Fluorescence Probe PCR and Film Chip Technology for Genotyping Human Papilloma Virus in the Female Reproductive Tract

LIU Xiao-jun¹, XIANG Hua-guo², ZENG Jin-ting², LI Hong-chun³

(1. Guangming New District People's Hospital of Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518106, China;

2. Baoan District Fuyong People's Hospital of Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518103, China;

3. Dazhou Central Hospital, Sichuan Dazhou 635000, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical application of the fluorescence probe PCR and film chip genotyping technology for detecting human papilloma virus in the female reproductive tract. **Methods** A total of 230 outpatient women were checked for 14 high-risk HPV genotypes (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 and 66). At the same time, typing detection of the HPV16 and HPV18 were taken by the fluorescence probe PCR, and were detected to 23 HPV genotypes (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66, 53, 73, 82, 83 and 5 low-risk types of HPV virus) by film chip genotyping technology. **Results** The positive rate of the fluorescence probe PCR was 11.30% (26/230), and the total positive rate of film chip genotyping technology was 19.57% (45/230), and film chip genotyping technology had more positive rate than the fluorescence probe PCR in detecting HPV ($P < 0.05$). The total coincidence rate of two methods was 94.35%. In 70 patients with pathological biopsy, the rate above cervical intraepithelial neoplasia II was 26.92% (7/26) and 22.22% (10/45) in the fluorescence probe PCR and film chip genotyping technology test positive samples, which was higher than 4.55% (2/44) and 4.00% (1/25) in the fluorescence probe PCR and film chip genotyping technology test negative samples respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** It had good consistency for detection of the 14 high-risk HPV genotypes by the fluorescence probe PCR and film chip genotyping technology, and had the important significance for HPV infection, early cervical cancer discovery, prevention and treatment.

Keywords: human papilloma virus; fluorescence probe PCR; genotypes

人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV), 特别是高危型 HPV 与宫颈癌密切相关, 是重要的致癌因子, 同时也是引发宫颈癌的必要条件

之一。全世界每年新发宫颈癌病例 49.5 万, 我国每年新增宫颈癌患者约 13.15 万, 占全世界的 28.8%^[1], 是女性最常见的恶性肿瘤之一^[2~4]。最

* 基金项目: 深圳市宝安区科技计划项目(2013120)。

作者简介: 刘小君(1981-), 女, 本科, 学士, 主管技师, 主要从事临床医学检验工作, Tel: 13425161537, E-mail: xhuaguo@163.com。

新研究证实宫颈癌存在较长的可逆转的癌前病变期,早发现及时治疗,宫颈癌患者五年治愈率达90%,进行宫颈癌的筛查和预防对降低宫颈癌发病率有着极其重要的意义。本研究同时采用深圳康美生物科技股份有限公司生产的荧光探针 PCR 试剂盒和深圳亚能生物技术有限公司开发的膜芯片分型试剂盒检测女性下生殖道 HPV 感染情况,结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象 2014年11月1日~12月31日就诊于深圳市光明新区人民医院门诊的女性患者230例,以窥阴器或阴道张开器暴露宫颈,用棉拭子将宫颈口过多的分泌物擦去,取出宫颈刷置于宫颈口,单方向旋转5圈,然后将宫颈刷头部放入洗脱管中,沿刷柄折痕处将宫颈刷柄折断,旋紧洗脱管盖,尽快送检,于-20℃保存,1周内测定。

1.2 试剂与仪器 HPV 荧光探针 PCR 试剂盒,由深圳康美生物科技股份有限公司生产;人乳头状瘤病毒膜芯片分型检测试剂盒,由亚能生物技术(深圳)有限公司生产。SLAN-96P 实时荧光 PCR 仪,由上海宏石医疗科技有限公司生产;FYY-3 分子杂交仪,由江苏兴化分析仪器厂生产。

1.3 方法

1.3.1 荧光探针 PCR 检测 14 种高危 HPV 及 16/18 分型:设置能收集 FAM, VIC 及 ROX 荧光信号的荧光检测通道,可同时检测 14 种高危型 HPV DNA 型,HPV16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,66,同时对其中的 HPV16 和 HPV18 型进行分型检测。检测步骤按厂家说明书操作。

1.3.2 膜芯片分型检测 HPV:检测方法按说明书进行,包括 DNA 提取、PCR 扩增、杂交、洗膜、显色。可同时检测 23 种 HPV 基因型,包括 HPV16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73,82,83 等 18 种高危型和 HPV6,11,42,43,81 等 5 种低危型。

1.4 统计学分析 利用 SPSS10.0 软件包进行统计学处理,率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法 HPV 阳性检出率比较 同时用荧光探针 PCR 和膜芯片分型检测 230 例患者标本的 HPV DNA,其中荧光探针 PCR 定性检测 14 种高危型 HPV 病毒,同时对其中的 HPV16 和 HPV18 型进行分型检测,荧光探针 PCR 的阳性率为 11.30%(26/230);膜芯片分型技术可检测 23 种 HPV 型,其阳性率为 19.57%(45/230),明显高于

荧光探针 PCR,差异有统计学意义($\chi^2 = 12.1, P < 0.05$)。

2.2 两种检测方法检测 14 种高危型 HPV 的符合率 将荧光探针 PCR 与膜芯片分型技术检测 14 种 HPV 高危型(包括 HPV16,18,31,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66)的检测结果进行比较,总符合率为 94.35%(217/230),其阳性符合率为 92.31%(24/26),阴性符合率为 98.97%(193/195)。

2.3 荧光探针 PCR 与膜芯片分型技术检测与宫颈病理活检诊断结果 在对其中 70 例妇女病理活检中,荧光探针 PCR 定性检测为 HPV-DNA 阳性组中,宫颈上皮内瘤变 2 级以上 26.92%(7/26),明显高于 HPV-DNA 阴性对照组的 4.55%(2/44)($\chi^2 = 29.2, P < 0.05$);而膜芯片分型技术检测为 HPV-DNA 阳性组中,宫颈上皮内瘤变 2 级以上为 22.22%(10/45),明显高于 HPV-DNA 阴性对照组的 4.00%(1/25)($\chi^2 = 26.3, P < 0.05$)。两种方法分别检测为 HPV-DNA 阳性的两组之间宫颈上皮内瘤变 2 级以上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论 目前已经发现的 HPV 亚型多达 100 多种,常见的有 40 多种 HPV 可感染女性生殖道,其中高危 HPV 持续感染可致宫颈癌,宫颈癌在全球的发病率仅次于乳腺癌,居妇女恶性肿瘤的第 2 位^[5],其发病率呈逐年上升之势^[6,7]。研究发现 HPV 感染是引起宫颈癌的必要条件,99% 的宫颈癌都是由 HR-HPV 引起^[8],因此,HPV 的检测已逐渐成为预防和控制宫颈癌的重要手段^[9]。

刘群等^[10]研究表明荧光定量 PCR 在宫颈癌筛查中具有十分重要的作用,检测 8 种高危型 HPV 总的阳性率达到 27.5%,其中检测健康体检者 HPV 阳性率为 7.8%;本研究荧光探针 PCR 定性检测 HPV 的阳性率为 11.30%,要低于荧光定量 PCR 检测的阳性率。何桂蓉等^[11]利用反向杂交技术检测深圳地区女性感染 HPV 总的阳性率为 17.5%,与本研究膜芯片分型技术检测 HPV 的总阳性率为 19.57% 基本一致。本研究通过对荧光探针 PCR 和膜芯片分型技术两种方法进行比较,可以看出膜芯片分型技术检测 HPV 的总阳性率明显高于荧光探针 PCR 法。主要原因是 PCR-反向杂交法能检测 23 种 HPV DNA 亚型,其中与宫颈癌密切相关的高危亚型达 18 种,而荧光探针 PCR 定性只能检测 14 种高危型病毒,比膜芯片分型检测 HPV 少了 9 种 HPV 亚型,漏检常见的高危型是 HPV53 型,低危型则是 HPV6 和 HPV81 型。

两种方法在检测 14 种高危型 (下转 97 页)

(上接 93 页)HPV 病毒的阳性符合率为 92.31%, 阴性符合率为 98.97%, 总的符合率为 94.35%, 具有较好的符合率。在 70 例病理活检中荧光探针 PCR 定性和膜芯片分型技术检测为 HPV-DNA 阳性的妇女中, 宫颈上皮内瘤变 2 级以上分别为 26.92% 及 22.22%, 分别高于其 HPV-DNA 阴性对照组的 4.55% 及 4.00% ($P < 0.05$), 表明两种方法在女性宫颈瘤变筛查中具有十分重要的作用。

同时我们看到荧光探针 PCR 定性检测具有操作相对简单, 快速及成本相对较低的优势, 比较适合大规模人群体检初筛。但对于临床上感染 HPV 的高危人群及具有临床指征的一些女性患者可能利用膜芯片技术检测则更加全面, 特别是一些低危型 HPV 感染引起的尖锐湿疣检测。总之, 两种方法各有优缺点, 在临床应用中应结合具体情况进行选择。

参考文献:

- [1] 蓝春燕, 刘继红. 人乳头状瘤病毒感染及病毒载量与宫颈病变的相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(1): 5-8.
Lan CY, Liu JH. Study of the relationship between human papilloma virus infection and cervical diseases [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2007, 14(1): 5-8.
- [2] Valdespino VM, Valdespino VE. Cervical cancer screening: state of the art[J]. Curr Opin Obstet Genecol, 2006, 18(1): 35-40.
- [3] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papilloma virus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4): 244-265.
- [4] 冯阳春, 张园, 黄艳春. 高危型人类乳头状瘤病毒负荷量对宫颈上皮细胞 DNA 倍体的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(1): 5-7.
Feng YC, Zhang Y, Huang YC. The effect of high-risk human papilloma virus load on DNA ploidy of cervical epithelial cells[J]. Journal of Pathogen Biology, 2012, 7(1): 5-7.
- [5] 王琳, 屠蕊沁. 液基薄层细胞学检查联合人乳头状瘤病毒基因分型检测在宫颈病变筛查中的应用[J]. 中国临床医学, 2014, 21(2): 200-201, 205.
Wang L, Tu RQ. Application of ThinPrep cytologic test combined with human papilloma virus genotyping in cervical lesions screening[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2014, 21(2): 200-201, 205.
- [6] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [7] 周权, 黄民主, 黄霜, 等. 中国已婚妇女宫颈癌发病影响因素 Meta 分析[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(2): 125-129.
Zhou Q, Huang MZ, Huang S, et al. Meta analysis of the influential factors on cervical cancer among married women in China[J]. China Oncology, 2011, 21(2): 125-129.
- [8] 梁东霞, 张彦娜. 宫颈癌与 HPV 关系的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2010, 25(2): 202-205.
Liang DX, Zhang YN. Research progress of the relationship between HPV and cervical cancer[J]. Practical Journal of Cancer, 2010, 25(2): 202-205.
- [9] 凌云, 冯春颜, 胡纪文, 等. 人乳头瘤病毒快速检测分型方法的临床应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(7): 527-529.
Ling Y, Feng CH, Hu JW, et al. Clinical application to assure the type of human papilloma virus (HPV) by the rapid detection method[J]. Journal of Pathogen Biology, 2011, 6(7): 527-529.
- [10] 刘群, 张萌, 周亚军, 等. 荧光定量聚合酶链反应在宫颈癌筛查中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(5): 121-122, 125.
Liu Q, Zhang M, Zhou YJ, et al. Value of the fluorescence quantitative polymerase chain reaction in the screening of cervical cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(5): 121-122, 125.
- [11] 何桂蓉, 武学成. 深圳地区女性感染人乳头瘤病毒基因类型分析[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(2): 19-21.
He GR, Wu XC. Analysis of the genotyping human papilloma virus from Shenzhen women[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2007, 22(2): 19-21.

收稿日期: 2014-12-11

修回日期: 2015-03-31