

多聚酶链反应检测宫颈 HPV 感染及分型的研究

蔡红 姚堃 陈伟丽 周瑶玺

(南京医科大学微生物学教研室, 南京 210029)

杨志坚 ✓

(江苏省肿瘤防治研究所病毒室, 南京)

R711.320.4

R737.330.4

A 提要 本文应用 PCR 技术检测 212 例临床宫颈标本的 HPV-6、11、16、18 型特异性核酸序列。结果发现 HPV-DNA 的阳性率: 宫颈癌组为 62.5% (25/40), 慢性宫颈炎为 57% (81/142), 正常宫颈对照组为 20% (6/30), $P < 0.001$, 提示 HPV 的感染与宫颈炎、宫颈癌有关。同时分型结果显示, HPV-6、16、18 型与宫颈炎相关, 16 型与宫颈癌密切相关, 且 HPV 不同型别的混合感染在宫颈中普遍存在 (31.3%)。成年女性各年龄组间 HPV 的感染率并无明显差异 ($P > 0.05$)。

关键词 多聚酶链反应, 人乳头瘤病毒, 宫颈炎, 宫颈癌

乳头状瘤病毒

聚合酶链反应, 宫颈炎, 宫颈

人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 目前已发现 60 余型, 通常某些型别与一组临床或病理疾病有关^[1], 如 HPV-6、11 型主要出现于良性病变尖锐湿疣和低度宫颈上皮内瘤 (low-grade cervical intraepithelia neoplasm, CIN I) 等, 而 16、18 型则与高度宫颈上皮内瘤 (high-grade CIN, CIN II/III) 和宫颈癌等恶性病变有关。由于 HPV 体外培养系统至今尚未建立, 以往多采用免疫组化法或 DNA 杂交技术检测 HPV。本文应用型特异性 HPV-PCR 检测慢性宫颈炎、宫颈癌中 HPV 型将异感染, 获得满意结果。

材料和方法

- 1 标本采集 宫颈拭子标本为 142 例慢性宫颈炎 (临床诊断 I~III 度损害) 和 30 例正常对照 (宫颈口光滑, 外观正常), 取自南京市妇产医院和江苏省人民医院妇产科门诊的就诊者, 年龄 21~74 岁, 取样后即置 1ml pH 7.0 PBS 中; 活检组织块 40 例, 为江苏省肿瘤防治研究所就诊的宫颈癌患者标本, 经病理证实均为鳞癌。
- 2 对照组 阳性 HPV6、11、16、18 型 cDNA 质粒由德国海得堡肿瘤研究中心 Zur Hausen 教授惠赠; 阴性对照为不含 HPV-DNA 的人细胞株 K562 (10^8 /ml) 的 DNA 提取物。
- 3 PCR 模板 DNA 的制备 宫颈拭子及阴性对照细胞用 PBS 洗三次, 细胞裂解液 (含 NP₄₀、Tween-20、蛋白酶 K) 重悬, 50~60°C 1h, 95°C 10min 处理; 组织块用常规 DNA 法抽提, 定量。-20°C 保存备检。
- 4 PCR 引物的设计与合成 参阅了 He 和 Pao 等工作, HPV-6、11 型引物选位于 E₆ORF, 而 16、18 型则位于上游调节区 (URR)^[2,3], 详见表 1。引物由中科院上海生物工程研究所合成。
- 5 PCR 扩增 按 PCR 试剂盒说明 (上海复华股份有限公司) 在反应管中分别加入缓冲液, 4 种核苷酸, 配对引物及标本模板 (拭子模板 10 μ l 或组织模板 1 μ g), 用无菌双蒸水补足 50 μ l, 每次均设 PCR 试剂的阴性对照。95°C 10min, 55°C 5min 预处理后加入 DNA 多聚酶, 在内骊公司 XL-100A 型 PCR 自动扩增仪上进行, 反应条件为: 变性 55°C 1min, 延伸 72°C 90sec, 变性 92°C 1min, 共 30 个循环。

本文于 1993 年 6 月 24 日收到, 8 月 19 日修回

表1 HPV-PCR 引物设计及扩增

Table 1 Primers for DNA amplification of HPV by Polymerase Chain Reaction

引物 Primers	扩增区 Region of amplification	序列(5' to 3') Sequence	扩增长度 Length
HPV6	E6	GCA-CGT-CTA-AGA-TGT-CIT-GTT-TAG AGA-CCA-GTT-GTG-CAA-GAC-GTT-TAA	263bp
HPV11	E6	AAG-GGA-AAG-TTG-TCT-OGC-CAC-ACA AGA-CCA-GTT-GTG-CAA-GAC-GTT-TAA	144bp
HPV16	URR	GCT-GTT-AGG-CAC-ATA-TTT-T ATG-AAC-TAG-GGT-GAC-ATT-T	100bp
HPV18	URR	GCT-GTT-AGG-CAC-ATA-TTT-T ATG-TAT-GCA-CAG-CTT-AGT-T	130bp

6 产物的分析与鉴定 扩增产物经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴化乙锭染色后直接在紫外检测仪下观察。分型结果参照阳性对照和标准分子量 Marker,扩增带 263、144、100、130bp 分别代表 HPV-6、11、16、18 型。

7 PCR 质控 每次 PCR 均设置阴、阳性对照,以阴性对照无基因扩增,阳性对照出现特异性扩增为标准。该方法经 10 次以上重复,结果一致。

结 果

1 PCR 的特异性和敏感性 用各型引物对四型单一或混合的 HPV 质粒($1\text{ng}/\mu\text{l}$)进行 PCR 扩增。结果未见型间交叉反应(图 1)。同时将 HPV-16DNA 的质粒浓度作 10 倍梯度稀释,观察 100bp 的扩增带位置。结果在 $1-10\text{fg}/\mu\text{l}$ 模板量水平仍可见有微弱扩增带。



图1 用 HPV 质粒模板进行 PCR 特异性试验。263、144、130、100bp 的扩增带分别代表 HPV-6、11、18、16 型(高分子区的一些非特异扩增带为质粒本身及杂蛋白的产物,不影响结果判定)。M: 标准分子量 Marker; 1: 无模板的阴性对照; 2~5: 分别为 HPV-6、11、16、18 型; 6: HPV6+11; 7: HPV16+18

Fig. 1 Specific PCR amplification of plasmid-containing HPV-DNA. Amplified bands of 263, 144, 130, 100bp indicate HPV type 6, 11, 18, 16, respectively. M, standard size marker; Lane 1, amplification without DNA; Lane 2~5, HPV-6, 11, 16, 18, respectively; Lane 6, HPV 6+11; Lane 7, HPV 16+18.

2 各组临床标本 HPV-DNA 的检测 (图 2,表 2)



图 2 部分临床标本的 PCR 分型结果。M:标准分子量 Marker,1;HPV-16;2;HPV-11,4;HPV11+16;3和 5:阴性;6:无模板的 PCR 试剂对照。

Fig 2 PCR amplification for some clinical samples. M:standard size marker; Lane 1;HPV-16; Lane 2;HPV-11; Lane 4;HPV-11+16; Lane 3 and Lane 5:negative; Lane 6:negative control of amplification without DNA.

正常宫颈组 HPV-DNA 的检出率显著低于慢性宫颈炎组和宫颈癌组($P < 0.001$),但慢性宫颈炎组与宫颈癌组间的检出率无显著差异($P > 0.5$)。

表 2 宫颈 HPV-DNA 的检测结果

Tab 2 Results of HPV-DNA detection in cervix

临床分组 Group	例数 Cases	检测结果 HPV-DNA		阳性百分率(%) Positivity rate
		+	-	
慢性宫颈炎 Chronic cervicitis	142	81	61	57
宫颈癌 Cervical cancer	40	25	15	62.5
正常宫颈 Healthy control	30	6	24	20

3 各组临床标本中的 HPV-DNA 型别 检出结果见表 3,单型及混合感染情况见表 4。

在慢性宫颈炎中,四型的检出率均在 30%左右,无明显不同;在宫颈癌中,16 型占绝对优势,明显高于其它三型。与正常宫颈比较,宫颈炎标本的 6、16、18 型的感染率均较高($P < 0.05$),11 型与正常宫颈相近($P > 0.1$),宫颈癌则 16 型较高($P < 0.001$),其它三型与正常宫颈

相近;在与宫颈炎的比较中,宫颈癌 16 型感染高于宫颈炎($P < 0.001$),其它三型则相近。

表 3 各组临床标本中检出的 HPV-DNA 型别
Tab 3 Types of HPV-DNA detected in different clinical groups

HPV 型别 HPV types	慢性宫颈炎 Chronic cervicitis ($n_1=142$)		宫颈癌 Cervical cancer ($n_2=40$)		对照组 Healthy control $n_3=30$	
	例数 Cases	%	例数 Cases	%	例数 Cases	%
	6	42	29.6	8	20.0	3
11	41	28.9	5	12.5	5	16.7
16	41	28.9	21	52.5	1	3.3
18	49	34.5	1	2.5	1	3.3

表 4 HPV 单型及混合型感染
Tab 4 Infections with single and multiple HPV types

临床分组 Group	例数 Cases	单型感染 Single type		重复感染 Multiple types	
		例数 Cases	%	例数 Cases	%
		慢性宫颈炎 Chronic cervicitis	142	27	19.0
宫颈癌 Cervical cancer	50	17	42.5	8	20.0
对照组 Healthy control	30	2	6.7	4	13.3
合计 Total	212	36	17	66	31.3

因而提示,与宫颈癌密切相关的主要是 16 型,与宫颈炎相关的包括 6、16、18 型,而 11 型对宫颈炎、宫颈癌的意义似乎不大。

由表 4 看出,在总样本中,单一型别 HPV 感染所占比例较少(17.0%),而 2 型或 2 型以上的混合型别的感染较高(31.3%),提示宫颈 HPV 多型别感染的普遍存在。

4 慢性宫颈炎 HPV 感染与年龄分布的关系 结果见表 5,各年龄段的 HPV 感染率相当,仅在两端略高一些。

表5 慢性宫颈炎 HPV-DNA 与的年龄的关系
Tab 5 HPV-DNA positive in relation to age in chronic cervicitis

年龄分组	例数	阳性例数	阳性百分率(%)
Age group	Cases	Positive cases	Positive rate
21~30	35	24	68.6
31~40	67	34	50.7
41~50	25	12	70
51~74	15	11	73.3

讨 论

近年来,女性生殖道 HPV 的感染由于与宫颈癌密切相关而越来越受到人们的重视。过去在临床检测中主要采用细胞学和免疫酶技术。近年来则利用核酸杂交技术进行 HPV-DNA 的检测,虽然敏感性和特异性均较高(可检出 1pg HPV-DNA)^[4],但存在操作繁杂且标本需要量大等缺点。本实验采用了 HPV 型特异 PCR 技术,其样本需要量少,宫颈脱落细胞即可,同时采用简易的 DNA 裂解方法,简便快速,可在 5 小时内得出结果,适用于临床实验室的检测。由于扩增模板 DNA 未经抽提,有时可能会出现一些非特异性条带。但有阴、阳性及 Marker 的对照,并不影响实验结果的判断。

大多数研究指出宫颈癌很象是一种潜伏期很长的性传播性疾病(STD),而 HVP 是其重要的病因之一。目前已有文献表明宫颈鳞癌中主要存在 HPV-16 型的基因相关序列,在宫颈腺癌中则以 HPV-18 型为主^[6]。本实验结果显示:HPV-DNA 的检出率在慢性宫颈炎、宫颈癌中显著高于对照组,提示 HPV 感染与宫颈损害密切相关。这可能与 HPV 感染途径相关,即病毒通过损伤部位暴露的基底细胞,在一定条件下增殖,也可能因 HPV 是宫颈炎、宫颈癌的致病因素。

一般认为 HPV-6、11 型是低危型别组,而 16、18 型则为高危组。我们的实验结果提示:与宫颈癌(鳞癌)密切相关的主要是 16 型,与宫颈炎相关的包括 6、16、18 型,而 11 型与宫颈炎、宫颈癌的意义似乎不大。本实验癌组织取样均为鳞癌,故未体现出 HPV-18 型的高危性。大量的资料表明宫颈癌的发生与 HPV-DNA 整合到宿主细胞中有关,其中主要是 E6、E7 ORF 区^[6]。而 HPV 16/18 型的高危性主要是其基因组中含有一个能编码拼接 E6 蛋白的 E6* mRNA,此片段未在 6、11 型中出现^[7]。另有文献报道^[9],在生殖道 HPV 感染中,两型或两型以上的混合感染者波动于 2~71%,最多见于 10~20%,略低于本实验的结果(31.3%),可能是因为所用的研究方法不同。前者主要采用细胞学或核酸杂交法,而我们所用的是高敏感性的 PCR 方法,使极低的拷贝数也可检出。我们的结果进一步证实了 HPV 重复感染在宫颈疾病中普遍存在。

参 考 文 献

- 1 De Villiers EM, Schneider A, Gruss G, *et al*. Analysis of benign and malignant urogenital tumors for human papillomavirus infection by labelling cellular DNA. *Mod Microbiol Immunol*. 1986; 174:281-286
- 2 He YK, Zhang JZ, Xu Q, *et al*. Detection of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissue by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 1989; 26: 17-26
- 3 Pao CC, Lin CY, Mau JS, *et al*. -Detection of human papillomavirus in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 1990; 161:113-115
- 4 Chow V, Thum KM, Michele YG, *et al*. M-115: molecular diagnosis of genital HPV DNA types by polymerase chain reaction and

- sensitivity-standardized filter in situ hybridization in randomly sampled cohorts of Singapore women. *Molecular and Cellular Probes*. 1990; 4; 121-131
- 5 Johnson TL, Kim W, Plieth DA, *et al.* Detection of HPV 16/18 DNA in cervical adenocarcinoma using polymerase chain reaction (PCR) methodology. *Mod Pathol*. 1992; 5(1); 35-40
 - 6 Czeglody J, Batar I, Evander M, *et al.* Analysis of transforming gene regions of human papillomavirus type 16 in normal cervical smears. *Arch Gynecol Obstet*. 1991; 249(4); 185-189
 - 7 Sherman L, Alloul N, Golan I, *et al.* Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in precancerous lesions and carcinomas of the cervix in human keratinocytes. *Int J Cancer*. 1992; 50(3); 356-364
 - 8 De Villiers EM, Wagner D, Schneider A, *et al.* Human Papillomavirus infections in woman with and without abnormal cervical cytology. *The Lancet*. 1987; Sept 26; 703-705
 - 9 Twigg LB, Okagaki T, Clark B, *et al.* A clinical, histopathologic and molecular biologic investigation of vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 1988; 7; 48-55
 - 10 Nuovo GJ, Darfler MM, Impraim CG, *et al.* Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. *Am J Pathol*. 1991; 138(1); 53-58

Polymerase Chain Reaction for Detection of Different Types of Human Papillomavirus in the Cervix

Cai Hong Yao Kun Cheng Weili Zhou Yaoxi

(Department of Microbiology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

Yang Zhijian

(Department of Virology, Jiangsu Cancer Research Institute & Hospital, Nanjing)

Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detect HPV 6, 11, 16, 18 type specific DNA sequences in 212 clinical cervical samples. The positivity of HPV-DNA was 62.5% (25/40) in patients with cervical cancer (squamous cell) and 57% (81/142) in chronic cervicitis, markedly higher than 20% (6/30) in healthy control ($P < 0.001$). HPV-16 was predominantly related to cervical cancer whereas HPV-6, 16, 18 frequently in chronic cervicitis. This study also indicated that multiple infection of different HPV types is common (31.3%) and the rate of HPV positivity showed no association with age-dependence ($P > 0.05$).

Key words Polymerase Chain Reaction, Human Papillomavirus, Cervicitis, Cervical cancer