

· 综 述 ·

人乳头瘤病毒检测研究进展

赖年钰, 喻 焱, 牟江涛 综述, 吴立翔[△] 审校
(重庆市肿瘤研究所临检中心 400030)

关键词: 人乳头瘤病毒 16; 宫颈肿瘤; 血清学

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2011. 30. 038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)30-3105-03

子宫颈癌是一种严重危害妇女健康的恶性肿瘤, 其发病率位居世界女性恶性肿瘤的第 2 位, 而在一些发展中国家和地区仍居第 1 位^[1]。子宫颈癌的发生是一个连续的过程, 即由细胞分化失调到不典型增生, 到原位癌, 最后发展成子宫颈癌。很多研究发现, 人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 的持续感染与宫颈病变的演进有着密切的关系, HPV 可促使子宫内上皮样瘤变及子宫颈癌的发生。2009 年 5 月召开的第 25 届国际乳头瘤病毒会议, 阐明了全球 HPV 的感染率呈上升趋势且出现了新的基因型^[2]。

HPV 作为一种双链环状 DNA 病毒, 根据其生物学特征、致癌潜能分为高危型和低危型两类。低危型主要引起生殖道肛周皮肤和阴道下部的非典型增生、扁平湿疣类病变和宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 诱发宫颈癌概率小于 5%; 高危型引起 CIN II、CIN III 及宫颈癌的概率大于 90%^[3]。HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 属于高危型, 通常在重度非典型增生和宫颈癌中检测到。其结构中由 E6 和 E7 编码形成的两个蛋白, 能促进细胞从正常到恶性变的转化^[4], E6、E7 基因编码的原癌蛋白是导致宫颈癌的重要原因^[5]。多数 HPV 感染是一过性的, 只有持续的 HPV 感染才会导致宫颈癌的发生^[6]。在女性宫颈病变中常存在多种型别 HPV 的单重感染或多重感染^[7]。HPV 检测对于常规宫颈癌筛查中排除 CIN 有价值, 而且在随访中能够区分高风险的女性。如果合理运用以上筛查方法, 可查出 98% 以上的早期患者^[8]。由此可见, HPV 的检测对于宫颈癌的诊断及预防有重要意义, 目前在临床和实验室已开展多种实验项目对 HPV 进行检测和筛选, 现将 HPV 的检测方法进展综述如下。

1 形态学方法

由于 HPV 在体外不能增殖, 20 世纪 40 年代起源的形态学方法是一种传统方法, 主要包括巴氏涂片细胞病理学检测、电镜技术 (直接观察病毒颗粒) 等。

1.1 巴氏涂片细胞病理学检测 凹空细胞是 HPV 感染的主要形态学改变, 在宫颈移行区取材, 巴氏染色可见由 HPV 引起的凹空细胞, 即可诊断。影响巴氏涂片的因素很多, 假阴性率高, 其应用受到了限制。近年来, 随着标本采集及制片、阅片技术的进步, 已由传统的巴氏涂片发展成液基薄层细胞技术 (Thinprep cytologic test, TCT) 和涂片自动检测系统^[9], TCT 由于影响相对较小, 操作标准化, 其检测准确度高于常规的巴氏涂片, 在临床上用于大规模普查和筛查^[10]。由于其他病毒感染以及人为因素均有可能造成细胞内出现空泡或凹空样变, 加之取材、染色及主观判断等因素的影响, 因此在形态学上检测 HPV 仍存在灵敏度低、特异性差、假阴性率和假阳性率高的缺点, 另外不能对 HPV 进行分型。

1.2 电镜技术 电镜技术阴道镜种类包括: 传统光学阴道镜、光电一体阴道镜及电子阴道镜。HPV 是最早在电镜下观察到的病毒之一, 将活检标本负染, 若能在电镜下见到特征性的病毒颗粒, 即可作出诊断。电镜检查法虽然准确率很高, 但费时, 仪器设备昂贵, 且检出阳性率很低。电镜技术检测 HPV 特异性和灵敏度均不高, 且不利于对 HPV 进行分型, 因而目前应用较少^[9]。

2 血清学检查

20 世纪 50 年代, 随着免疫学的发展, 在血清中也可检测到一些抗体, 作为宫颈癌诊断与治疗的标志物。应用重组技术表达抗原检测患者血清中相应的抗体, 或抗原免疫动物制备免疫血清或单克隆抗体检测组织或局部黏液中 HPV 抗原。临床常用于免疫吸附法检测 HPV 中 L1 类病毒颗粒的 IgM 和 IgG 抗体以及 HPV 的 E6、E7 特异性抗体蛋白等; 放射免疫法测定 CIN 和宫颈癌患者血清中 HPV16 抗体水平。另外也应用免疫组织化学法检测 HPV16、18 早期蛋白 E6 单抗能有效证明感染组织中存在的 E6 蛋白^[11], 本方法原理明确, 操作相对简单, 但由于血清学检测的对象是抗原和抗体, 人体对 HPV 产生免疫应答有一定的迟滞性, 同时 HPV 病毒不能在体外培养增殖, 所以血清学检测对无免疫应答者和 HPV 潜伏期感染者会产生漏检。另外, 多数人感染过 HPV 后均有可能在血清中出现抗体, 抗体在体内持续时间较长, 有的达数年, 并非宫颈癌所特有, 所以 HPV 的血清学抗体检测用于宫颈癌的诊断不具有特异性, 其临床应用受到限制。

3 分子生物学方法

3.1 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 检测 HPV-DNA。 评价 HPV 检测方法最关键的因素是检测灵敏度, 以基因扩增为基础检测 HPV DNA, 是目前最灵敏的检测方法。PCR 不仅可以应用于检测病毒负荷定量、DNA 测序和突变分析, 还可以进行多重扩增, 同时分析多个 DNA 序列, 且 PCR 具有操作相对简单、省时、标本来源不受限制等特点, 因此 PCR 检测是目前进行 HPV-DNA 检测及分型的最好方法^[12]。其缺陷在于它的高灵敏性, 很容易因为样品的交叉污染而导致检测的假阳性, PCR 进行分型时操作比较繁琐, 一次检测的样本量有限, 限制了其在大规模筛查中的应用。PCR 法大致分为通用引物介导的 PCR、型特异性 PCR、实时荧光定量 PCR。通用引物介导的 PCR 法是依据不同 HPV 亚型有共同保守序列的特点来合成通用引物, 利用通用引物实现广谱 HPV 的扩增, 从而做到 HPV 的基因分型。型特异性 PCR 法是通过具有型特异性的引物, 对病变组织提取的 HPV-DNA 进行特异性扩增, 而后用凝胶电泳进行检测, 通过检验阳性条带的扩增结果与扩增效率, 对 HPV 感染进行判断。实时荧光定量 PCR 具有型特异 PCR 的功能, 也可用普通 PCR 的功能

[△] 通讯作者, E-mail: WLX124610@yahoo.com.

对 HPV 分型和定量检测,实时荧光定量 PCR 还能由于基因扩增过程中污染造成的假阳性及技术成本高,目前不宜作为临床实验室 HPV 感染的常规检测。

3.2 核酸分子杂交技术 根据不同标本采用点杂交或原位杂交检测 HPV-DNA,具有很好的特异性和敏感性。核酸杂交检测方法主要包括原位杂交法(In situ hybridization, ISH)、核酸印迹法(Southern blot)、杂交捕获法(hybrid capture test, HC)等。ISH 利用 HPV 探针与组织中的 HPV-DNA 杂交,首先将探针和组织中的双链 HPV-DNA 变性为单链,然后使探针与组织杂交。其优点利于病理学分析,但杂交链的稳定性不高,在杂交过程中可能有部分探针单链复性,使杂交率降低,影响 HPV-DNA 的检出率。Southern blot 适用于 HPV 分型和 HPV-DNA 相对分子质量鉴定,曾用于 HPV 的早期研究,但必需为新鲜组织标本且操作复杂。HC 为 21 世纪的新方法,其基本原理是应用高效的液相 RNA-DNA 杂交方法捕获样品中的 HPV-DNA。采用碱性磷酸酶标记抗 RNA-DNA 抗体-化学发光信号显示系统。HC-I 能检测 9 种高危型 HPV 但其检测灵敏度低于 PCR 及其他基因扩增技术,临床应用受到限制。目前广泛用于 HC-II 检测病毒 DNA,对宫颈病变和宫颈癌有很高的阴性预测值,该方法已经得到世界范围的认可,广泛用于宫颈癌的筛查和复查^[13]。

HC-II 采用化学荧光法来定量检测病毒 DNA,对高危 HPV 检测敏感度较高,有较宽的 HPV 检测谱,可同时检测 13 种高危 HPV,重复性好,但不能进行基因分型鉴定^[14]。因为使用的探针是混合探针,具有较好的敏感性、特异性和阴性预测值,是目前国际上惟一获美国 FDA 认证的 HPV 检测方法^[15]。目前 HC II 与细胞学检查联合应用,是筛查宫颈癌的最佳方案^[16-17]。HC-II 检测方法的缺点是不能分型,对实验条件和操作技术要求较高,容易引起交叉反应导致假阳性结果,从而降低特异性^[18]。

HC-III 是近年来的新一代捕获杂交法,将 HC-II 中 RNA 探针的一段特异性抗体替代为带有生物素的寡核苷酸,减少非特异性杂交造成的假阳性结果^[19]。但不能对 HPV 进行分型。

3.3 基因芯片技术 基因芯片技术是 20 世纪末才发展起来的一项新技术,其原理是采用原位合成或直接点样的方法将大量的 DNA 片段或寡糖核苷酸片段排列于支持物表面上,产生二维 DNA 探针阵列,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号的强度而获取样品分子的数量和序列信息,从而对基因序列及功能进行研究。基因芯片法具有微型化、集约化和标准化、高通量等优点。基因芯片的灵敏度和特异性相对其他方法较高^[20],不仅可用于分型,而且可以对多个型别的混合感染情况同时进行检测。但由于检测费用高,很难投入临床应用,但随此项技术的发展,如果成本下降,无疑它是未来最有潜力的检测分析手段^[21]。

4 胶体金技术

胶体金技术是近年来发展起来的一种新技术,是一种将胶体金标记免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术。免疫胶体金快速诊断技术具有操作方便,易于判定,快捷迅速等优点,在检测样品时只需要 5~10 min 即可判断结果,因此可达到快速诊断的目的。胶体金比目前运用广泛的 HC-II 便宜、快捷、易于操作,可以作为宫颈癌的筛查,无疑是以后检测 HPV 发展的方向,但目前该技术还不成熟,正在发展之中。

近几年也有厂家生产了检测 HPV 的胶体金产品,但产品尚未获得产品注册证号,仅供研究,不用于临床诊断。该试剂

试验仅用于检测人类乳头瘤病毒抗体,而非直接检测人类乳头瘤病毒抗原,因而阳性结果并不能确诊是人类乳头瘤病毒感染。抗体含量低的血清样品中,HPV 有可能不能被检测出来。重庆理工大学化学与生物工程学院的研究完成了高危型人乳头瘤病毒 16E6 的免疫胶体金试纸条的研制,检测 HPV16E6 蛋白时可以显色,但灵敏度只达 7.5 ng,不是很高,需要进一步优化实验条件。该研究的试纸条只是形成了 HPV16 诊断试纸的基本生产工艺,需要加强质量和临床实践的研究等,才能完成商品化的开发,仍有大量的后续工作^[22]。

5 展 望

HPV 检测方法大至经历了形态学方法、血清学方法、分子生物学方法、胶体金技术的发展过程。目前 HPV 分型检测技术主要基于聚合酶链反应、核酸杂交与 PCR 结合法以及基因芯片技术。这些技术克服了传统细胞形态学只能定性不能分型以及敏感性低等缺陷,表现出高灵敏度、高特异性,可以进行多重感染检测等优点,但这些技术对实验条件要求高,检测费用也较高,不太适用于大量的临床检测和大规模的流行病学调查^[23]。进一步提高 HPV 检测技术的灵敏度和特异度,增强检测技术的分型能力,减少财力、人力和物力的消耗,将是 HPV 检测技术今后的改进方向^[24]。随着分子生物学技术的发展,PCR 技术、核酸分子杂交技术和基因芯片技术将有广阔的发展前景。胶体金技术快速、方便、成本低,适合大规模人群的普查,也是今后的一个发展方向。

参考文献:

- [1] Parkin DM, Bray F, Farley J, et al. Estimating the world cancer burden; Globocan 2000[J]. Int J Cancer, 2001, 94(2):153-156.
- [2] Alcín FN, Gerard JN, Joakim D. A summary of the 25th international papillomavirus conference 2009: vaccines, screening epidemiology and therapeutics[J]. J Clin Virol, 2010, 4(7):208-215.
- [3] 宋庆恩, 马红英. HPV-DNA 在宫颈疾病检测中的意义[J]. 中国基层医药, 2010, 17(14):1885-1886.
- [4] Rittman S, Coutlee F, Fontaine D, et al. Clinical performance of the pre test HPV-proofer E6/E7 mRNA assay in comparison with that of the hybrid capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(8):2779-2782.
- [5] 王勋松. HPV 与宫颈癌的关系及检测方法的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(2):166-168.
- [6] Dalstein V, Riethmullet D, Pretet JL, et al. Persistence and load of high-risk HPV predictors for development of high-grade cervical lesions; a longitudinal French cohort study[J]. Int J Cancer, 2003, 106(3):396-403.
- [7] Chan PK, Mark KH, Cheung JL, et al. Genotype spectrum of cervical human papillomavims infection am on sexually transmitted disease clinic patients in Hong Kong[J]. J Med Virol, 2002, 68:273-277.
- [8] Peltry KU. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in germ any: Results for 8466 patients[J]. Br J Cancer, 2003, 59:88-57.
- [9] 安妍, 孙秀明, 姚军. 人乳头瘤病毒检测技术研究新进展[J]. 中国实用医药, 2009, 21(4):256-257.

- [10] 李琴艳,杨庆忠,付雯. TCT 与巴氏细胞学在宫颈癌筛查中的对比研究[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(9): 1173-1174.
- [11] 李雯,陈金培,梁颜笑. 原位杂交与免疫组化技术在 HPV 检测中的应用[J]. 广州医学院学报, 2004, 32(1): 63-65
- [12] Mauricio U, Tatiana G. Two L1-peptides are excellent tools for serological detection of HPV associated cervical carcinoma lesions [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(1): 224-232.
- [13] Kitchener HC, Walker PG, Nelson L, et al. HPV testing as an adjunct to cytology in the follow up of women treated for cervical intraepithelial neoplasia [J]. BJOG, 2008, 115(8): 1001-1007.
- [14] Catani P, Gain FZ, Ricci C, et al. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 3896-3899.
- [15] Klug SJ, Molijn A, Schopp B, et al. Comparison of the performance of different HPV genotyping methods for detecting genital HPV types [J]. J Med Virol, 2008, 80(7): 1264-1274.
- [16] 余丽辉. 杂交捕获二代法检测在宫颈癌筛查中的应用价值[J]. 南华大学学报: 医学版, 2009, 37(4): 403-405.
- [17] 王建捷,冯凌,靳家玉. 杂交捕获二代法检测人乳头瘤病毒 DNA 在实验宫颈病变诊断中的价值[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006, 22(1): 51-52.
- [18] Castle PE, Schiffman M, Burk RD, et al. Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papilloma virus types [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002, 11(11): 1394-1399.
- [19] Xu Q, Wang YH, Tong WJ, et al. Interaction and relationship between angiogenesis converting enzyme gene and environmental factors predisposing to essential hypertension in Mongolian population of China [J]. Biomed Environ Sci, 2004, 17(2): 177-186.
- [20] An HJ, Cho NH, Lee SY, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method [J]. Cancer, 2003, 97(7): 1672-1680.
- [21] 陶萍萍,卞美璐,欧华,等. 导流杂交基因芯片技术在人乳头瘤病毒检测中的应用研究[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(1): 43-47.
- [22] 胡仁建,蔡家利,徐佳缘,等. HPV16 型免疫胶体金诊断试纸条的制备[J]. 重庆理工大学学报: 自然科学, 2010, 24(2): 34-39.
- [23] 方红辉,唐曙明,薄宁. 两种方法用于高危型 HPV 检测的结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2008, 12(5): 1552-1553.
- [24] Elbasha EH, Dasbach EJ, Insinga RP, et al. Age-Based Programs for Vaccination against HPV [J]. Value Health, 2009, 38(2): 128-135.

(收稿日期: 2011-04-09 修回日期: 2011-05-12)

· 综 述 ·

造血干细胞归巢机制研究进展*

罗云¹综述,张勇²,王导新¹审校

(1. 重庆医科大学附属第二医院 400010; 2. 第三军医大学西南医院, 重庆 400038)

关键词:造血干细胞;受体,淋巴细胞;归巢;移植

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.30.039

文献标识码:A**文章编号:**1671-8348(2011)30-3107-03

造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)移植已经成为治疗难治性血液病、免疫缺陷性疾病、恶性肿瘤等的重要手段之一,外周血干细胞移植由于干细胞采集方便,移植后造血重建快等优点得到广泛应用,而影响外周血干细胞移植能否成功最重要因素取决于干细胞数量、干细胞能否顺利归巢、植入。造血干细胞归巢(homing)是指定向造血干细胞通过静脉移植经外周血循环进入受体后,经复杂的分子间相互作用而介导其在骨髓内识别与定位^[1]。目前研究表明, HSC 归巢包括一系列复杂的过程:(1)移植的干细胞滚动粘附于骨髓血管内皮;(2)稳定的黏附并穿行内皮;(3)到达血管外骨髓微环境开始增殖分化,重建造血^[2]。现就干细胞归巢的过程及其相关机制进展综述如下。

1 造血干细胞与造血微环境关系

有关 HSC 归巢的分子机制涉及到骨髓微环境中,30 多年前就已提出造血干细胞微环境的概念,用生态学中的 niche 一词表示,国内文献大多译为“龕”。正常有效的造血是定向造血

干细胞与骨髓造血微环境之间相互作用的结果。一般认为骨髓微环境包括基质干细胞、细胞外基质和各种造血调节因子,是定向造血干细胞宿居、增殖和分化的场所。基质干细胞也称为间充质干细胞,在一定条件下可向成骨细胞、造血基质细胞、脂肪细胞等分化;细胞外基质有纤维连接蛋白、层黏蛋白和胶原蛋白等,而细胞因子则包括多种黏附分子、趋化因子等,共同协调 HSC 的生命活动。骨髓微环境中骨内膜区域主要由成骨细胞组成,血管区域主要由血管内皮细胞组成,前者在维持 HSC 的稳定性发挥重要作用,而后者与 HSC 的动员及归巢密切相关。近年来对造血干细胞 niche 的研究表明,骨髓中的造血干细胞 niche 是由骨内膜 niche 和血管 niche 构成的复杂系统^[3]。最近 Lo Celso 等应用 3D 体内成像技术观测移植干细胞及造血前体细胞(HSPC)在受者小鼠骨髓中归巢、定位,发现在未接受照射处理的小鼠 HSPC 呈弥散分布,而接受照射处理的小鼠绝大部分 HSPC 分布在骨内膜区域^[4]。Xie 等^[5]研究者采用荧光素酶转染干细胞的显色法在小鼠移植中同样

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(30970868)。