

目视LAMP技术对人乳头瘤病毒18亚型检测的应用价值研究

唐宏霞¹ 熊学峰¹ 秦志强² 周晓农²

1. 湖南省益阳市赫山区妇幼保健院, 湖南益阳 413002; 2. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025

[摘要] 目的 探讨环介导等温扩增技术用于检测临床标本乳头瘤病毒 HPV18 亚型的应用价值。方法 设计针对 HPV18-L1 基因序列中 6 个区段的 4 条特异引物, 在等温条件下(65℃)进行核酸扩增反应 1h, 在扩增前加入钙黄绿素作为反应指示剂; 利用建立的环介导等温扩增方法进行敏感型检测以及检测正常体检妇女和患者子宫颈分泌物的 HPV18 亚型。结果 LAMP 检测 HPV18 L1 基因的灵敏度为 1000 拷贝/微升; 阴道炎患者 HPV18 阳性检出率为 5.26% (1/19); 慢性宫颈炎组 HPV18 亚型检出率为 10% (2/20); 宫颈上皮内瘤变(CIN I~II 级)阳性检出率 33.3% (3/9); 子宫颈癌 I 级阳性检出率为 64% (16/25)。结论 基于目视的环介导等温扩增方法是一种具有经济、快速筛查临床标本中 HPV18 亚型的诊断工具, 可具有在基层医院推广应用的潜能。

[关键词] 人乳头瘤病毒; 核酸; 环介导等温扩增试验

[中图分类号] R737.33 [文献标识码] A [文章编号] 2095-0616 (2013)18-09-03

Application value study of visual loop-mediated isothermal amplification in human papillomavirus type 18 diagnosis

TANG Hongxia¹ XIONG Xuefeng¹ QIN Zhiqiang² ZHOU Xiaonong²

1. Heshan District Maternal and Child Health Hospital of Yiyang City in Hunan Province, Yiyang 413002, China; 2. National Institute of Parasitic Diseases, China CDC, Shanghai 200025, China

[Abstract] Objective To investigate the application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in detecting Human papillomavirus type 18 (HPV18) from clinical specimens. **Methods** It is characterized by employing a set of four specially designed primers spanning six distinct sequences of a target gene HPV18-L1. The reaction was performed at 65℃ for 1 hour with the addition of calcein dye prior to amplification. LAMP was used for sensitivity assay and detecting HPV18 mono infected in cervical secretions from women of physical examination and patients. **Results** The sensitivity of LAMP for detection of HPV18 L1 is 10-3 per microliter; the positive rate of HPV18 in patients with vaginitis is 5.26%(1/19); the positive rate of HPV18 in patients with chronic cervicitis is 10%(2/20); and the positive rate of HPV18 in patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN I- II) and cervical cancer-I is 33.3%(3/9), 64% (16/25), respectively. **Conclusion** LAMP assay is a high efficiency, low cost diagnostic tool, useful for rapid, accurate, direct detection of HPV for clinical diagnosis and might be popular at the primary hospital in future.

[Key words] Human papillomavirus; Nucleotide acids; Loop-mediated isothermal amplification

在妇科恶性肿瘤中,子宫颈癌是仅次于乳腺癌的威胁妇女健康的第二杀手。全球每年大约有 47 万妇女罹患宫颈癌^[1]。HPV 病毒几乎在所有子宫颈癌病例中都存在,是引发子宫颈癌的元凶^[2]。临床上用于检测 HPV 的方法包括免疫组化、原位杂交、斑点杂交、核酸印迹和 PCR 等,PCR 检测以基因扩增为基础,灵敏度高,是目前进行 HPV 基因检测及分型的最好方法^[3],但该技术对实验条件和操作技术要求较高,需要专门的 PCR 仪器和实验场地,因此不利于在基层医院推广。环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是由 Notomi 等于 2000 年研发的一种新颖的恒温核酸扩增方法^[4]。这种方法应用针对 6-8 个靶序列的 4-6 条特异性引物,利用一种具有链置换活性的 DNA

聚合酶(Bst)在等温条件下(60-65℃左右)保温 1-2h,即可实现核酸的大量扩增,从而保证 LAMP 技术的特异性,通过肉眼观察扩增产物颜色的变化即可判断样本中是否存在特异性 DNA 扩增片段。因其敏感、快速、不需特殊仪器设备的优点,LAMP 方法已经广泛用于病原体的核酸检测^[5-7]。据报道 HPV18 相关宫颈癌早期诊断率低,感染 HPV18 相关的宫颈癌癌前病变进程更快,HPV18 也是宫颈癌再发的独立危险因素^[8]。HPV16 或 HPV18 的女性,其病程发展至宫颈癌前病变的风险远高于未感染者^[9],HPV 晚期基因 L1 编码的病毒主要衣壳蛋白 L1 是病毒的重要抗原,故本研究拟以 HPV18 的 L1 基因为靶基因,建立环介导等温扩增方法,旨在探索可在基层医院操作的核酸筛查方法,从而可以帮助基层医院临床医师更好地找到 HPV 感染者,判断她们患癌的近期和远期风险,及时发现早期病变,尽早治疗,预防宫颈癌的发生。

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2012ZX10004-220)

通讯作者

1 资料与方法

1.1 一般资料

将2008年5月~2013年5月我院就诊及手术的患者,标本为专用宫颈刷收集的宫颈分泌物,所有病例均经病理证实。实验观察组73例,其中阴道炎患者组19例,慢性宫颈炎组20例,宫颈上皮内瘤样病变(cIN)I~II级9例,宫颈癌25例,患者年龄28~72岁,平均47.8岁。对照组60例,年龄25~70岁,平均41.5岁。

1.2 HPV18检测方法

1.2.1 环介导等温扩增实验 取待检妇女的宫颈涂片,一部分用作经典HPV细菌学检查,另一部分采用QIAamp DNA Kit提取刮片组织DNA,进行核酸扩增实验。分别将HPV病毒DNA、待测样本DNA、去离子水加入到0.2mL无菌微量离心管,按照设计分别依次加入既定浓度的BstDNA聚合酶(8U)、DNTPS(1.4mmol/L)、Betaine(1.0mol/L)、MgSO₄(6.0mmol/L)、引物对(FIP和BIP各1.6μmol/L,F3和B3各0.2μmol/L)以及钙黄绿素显色剂(1μL),混匀反应体系后将反应管置于65℃水浴孵育60min,肉眼观察各反应管颜色变化,显色后管内溶液颜色变为绿色为阳性,棕色为阴性。

1.2.2 HPV18 -L1 基因的 LAMP 扩增 引物 F3: C C T A A G A A A C G T A A A C G T G T T ; B3: C A G G A A C C C T A A A A T A T G G A T T ; FIP: A G G A G T G G A A G A T A C G G T A T T C C C T A T T T T T T G C A G A T G G C ; BIP: G G C A A G A G T T G T A A T A C C G A T G A C C A C A G T T A A T A A T C T A G A C T。

2 结果

2.1 环介导等温扩增技术检测HPV18的敏感性

纯化和定量后的含HPV18 L1基因的质粒进行系列稀释为10⁶、10⁵、10⁴、10³、500和100拷贝/μL,LAMP检测HPV18 L1基因的敏感度为1000拷贝每微升,见图1。

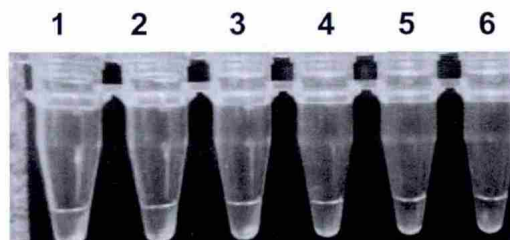


图1 LAMP检测HPV18型的灵敏度显色图

1~6: 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 100, 0

2.2 环介导等温扩增技术检测临床标本的效果

本研究采用环介导等温扩增技术检测60例正常体检妇女和患者人群宫颈刮片中HPV18感染情况,正常对照组60例,HPV18阳性为0;实验组中,阴道炎患者19例,HPV18阳性1例,阳性率为5.26%;慢性宫颈炎组20例,HPV18阳性2例,阳性率为10%;CIN I级5例中感染1例,CIN II级4例中感染2例,宫颈上皮内瘤变阳性检出率33.3%;阳性率子宫颈癌I级25例感染16例,阳性检出率为64%,随着病情加重,HPV18感染率增高,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$),图2A、2B、2C反应了LAMP检测各组样本的显色图,反应管内棕黄色表示阴性,绿色表示阳性。

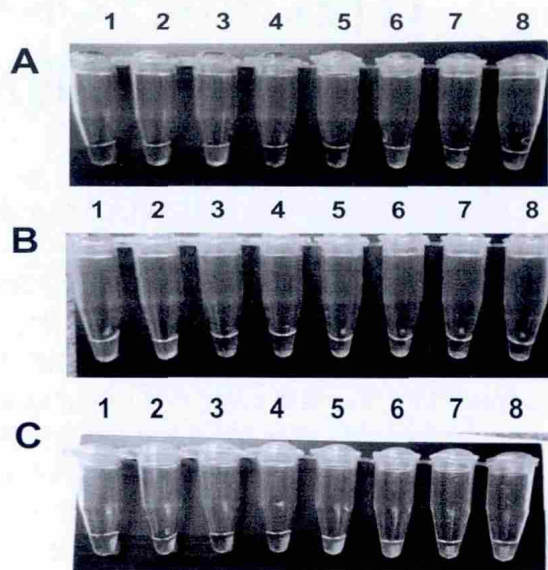


图2 LAMP检测临床标本HPV18亚型的显色图

A: 阴道炎患者和宫颈炎患者样本。1~4: 部分宫颈炎患者样本,2、3阳性显色,1、4阴性反应;5~8: 部分阴道炎患者样本,6阳性显色,5、7、8阴性反应;B: 部分宫颈上皮内瘤变患者样本。1、2阳性显色,3~8,阴性反应;C: 阳性率子宫颈癌患者样本。1、2、5阳性显色,3、4、8阴性反应,6、阳性对照,8、阴性对照

3 讨论

流行病学调查发现,与高级别宫颈癌相比,早期宫颈癌和宫颈上皮内瘤变预后相对较好。因此,在病原学因素方面找到可以早期快速诊断、有效治疗宫颈癌的方法至关重要并且切实可行。目前通过宫颈细胞涂片来筛查宫颈癌的方法有一定局限性,容易漏诊和误诊,灵敏性及特异性均不高。LAMP方法是近年来兴起的一种快速检测核酸的分子生物学方法,其反应特异性显著高于常规PCR。芦春斌等^[10]建立了基于颜色判定的环介导等温扩增方法检测HPV6和HPV16,提示利用该技术可以早期检测HPV DNA。我们利用该技术对60例健康体检妇女和73例不同妇科疾病人群进行HPV18检测,结果显示正常对照组中未检出HPV18感染;而在阴道炎、宫颈炎等妇科炎症中检出了HPV18感染,随着病情加重,宫颈上皮内瘤变和子宫颈癌变标本中HPV18检出阳性率增高。由此可见,对HPV18 DNA早期检测为更好地判断病变性质、发展趋势以及进一步的治疗和预防提供了重要依据。

目前妇女HPV感染及其混合感染率增高亚临床和潜伏型HPV感染,因缺乏形态学变化临床上迫切需要使用高敏感的DNA检测方法。我们在国内外相关研究基础上发展了LAMP法对临床标本HPV18的DNA检测,LAMP法在试验条件下能检测出1000拷贝的HPV18 DNA,且对于宫颈病变的临床标本能较为敏感的检测出HPV18,LAMP法在反应体系加入了显色剂,结果可以通过目视即可以鉴定(绿色可判定为阳性,阴性呈棕黄色反应),检测时间60min,与常规的PCR方法相比,因此LAMP更为简便迅速、易于操作。我们将进一步利用建立的目视LAMP法检测更多临床样本,为完善基于目视LAMP法用于HPV病毒的检测在基层医院的推广应用鉴定坚实的实验依据。

(下转第41页)

表1 妇科止血合剂对大鼠血浆复钙时间和毛细血管通透性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	出血时间 (min)	凝血时间 (min)	血浆复钙时间 (s)	光密度值 (%)
正常组	10	19.20 ± 0.63	5.10 ± 0.81	68.70 ± 8.30	0.368 ± 0.039
对照组	10	15.85 ± 0.47	5.30 ± 0.42	61.00 ± 9.89	0.306 ± 0.063
妇科止血合剂组	10	13.35 ± 0.97	2.55 ± 0.37	52.30 ± 5.48	0.249 ± 0.051

注:与妇科止血合剂组比较, $P < 0.01$, $P < 0.05$

2 结果

妇科止血合剂组出、凝血时间和血浆复钙时间均较另二组明显缩短,毛细血管通透性亦降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表1。

3 讨论

无全身疾病或任何器质性病变而引起的不正常的子宫出血为功能性子宫出血^[5],属妇科常见病。祖国医学认为,其病机关键在冲任损伤,经血不得制约而妄行,问脏之责当首归于肾虚,亦或又成于脾虚及肝损,若责气血之过,则当首属气虚与血热^[6],再虑崩漏日久,阴血屡屡耗伤,则致血虚而气陷,经血固摄无权,漏下淋漓而不止^[7],病程逐步发展,阴血亏虚,内热必然滋生,故阴虚血热当属本病最常见的证型,西医认为,子宫出血,宫口微张,上行感染途径打开,日久则必有炎症。大量现代药理研究都证实,在止血、抗炎,包括改善微循环病变及增强免疫力等诸多方面,中药均可起到有效作用^[8],方中五味子收敛固涩、化瘀止血以塞其流而治标^[9];黄芪益气生血、滋阴养血以澄源复旧^[10];旱莲草补肝肾之阴以固本^[11],诸药合用,使新血得生,阳生阴长,冲任得固,离经之血得归^[12]。经由长期辨证论治,结合丰富的临床经验,进行合理的组方后,本制剂可加速凝血过程、对炎症有一定的抑制作用,同时利于病损的修复以及组织功能的逐渐恢复,还可以促进机体免疫功能的提高,标本兼治,疗效可喜。

在本次实验中,我们可以看见,妇科止血合剂组的出、凝血时间以及血浆复钙时间比另二组明显缩短($P < 0.05$),该组与宫血宁组均可抑制炎症状态下小鼠毛细血管通透性的增加,但比较疗效,以妇科止血合剂组为最佳。

妇科出血,病因病机复杂多变,恩师梅乾茵教授总结多年临床经验,结合现代药理学理论,精心立方,养阴清热、引血归经、凉血止血的功效,经过多年的临床观察,疗效显著,

未发现任何副作用。

由此可见,中医药治疗子宫出血有自己的病因病机理论,整体观念、辨证论治、标本兼顾为中医药治病优势所在,在妇科临床中广泛应用,疗效可喜。

[参考文献]

[1] 章轶立. 中医药治疗功能性子宫出血[J]. 长春中医药大学学报, 2012, 11(10): 841-843.

[2] 胡咏梅, 孟黎, 胡志红. 对体表面积新公式应用的研究[J]. 基础医学与临床, 2003, 23(4): 444-445.

[3] 张旭, 金城, 骆骄阳. 姜黄素类化合物体外抗凝血与抗血栓作用研究[J]. 中草药, 2011, 42(10): 2070-2074.

[4] 陈爱华, 赵维中. 芸香苷对急性胰腺炎大鼠胰腺毛细血管通透性的影响[J]. 军事进修学院学报, 2011, 31(4): 358-361.

[5] 郭咏琚, 卫俊涛. 功能失调性子宫出血的药物治疗进展[J]. 医学综述, 2011, 11(17): 1863-1865.

[6] 张帝开, 李秀云. 青春期子宫出血 54 例临床分析[J]. 中国妇科与产科杂志, 2006, 13(22): 677-678.

[7] 王红卫. 中医治疗青春期功能性子宫出血[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(8): 570-571.

[8] 潘晓云. 辨证治疗青春期功能失调性子宫出血 30 例[J]. 山西中医, 2006, 22(6): 21-22.

[9] 史琳, 王志成, 冯叙桥. 五味子化学成分及药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 208-213.

[10] 全欣. 黄芪主要活性成分的药理作用[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1246-1250.

[11] 袁继承, 蒋永和, 沈志滨. 旱莲草化学成分的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 5(1): 125-129.

[12] 马堃, 孙立华, 王清华. 调经止血冲剂治疗月经失调 405 例的临床研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 78.

(收稿日期: 2013-08-15)

(上接第 10 页)

[参考文献]

[1] zurHausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(9): 690-698.

[2] Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, et al. HPV screening for cervical cancer in Rural India[J]. N Engl J Med, 2009, 360(14): 1385-1394.

[3] Takacs T, Jeney C, Kovacs L, et al. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high risk and 5 low-risk HPV types[J]. J Virol Methods, 2008, 149(1): 153-162.

[4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(2): e63.

[5] Fan H, Long B, Wu X, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of Cronobacter sakazaki[J]. Virol J, 2012, 9(12): 321.

[6] Tsai MA, Wang PC, Yoshida T, et al. Development of a sensitive and specific LAMP PCR assay for detection of fish pathogen Lactococcus garvieae[J]. Dis Aquat Organ, 2013, 102(3): 225-235.

[7] Bühlmann A, Pothier JF, Rezzonico F, et al. Erwinia amylovora loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight[J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(3): 332-339.

[8] 郑曙民, 陈星籍, 海红, 等. 子宫颈癌患者人乳头瘤病毒 16、18 检测[J]. 肿瘤研究与临床, 2008, 20(1): 48-49.

[9] Parviz M, Mohammad R, Bahram K, et al. Detection of human papillomavirus type 16 and 18 in pathologic samples from patients with cervical cancer by PCR and RFLP methods[J]. DARU, 2006, 14(2): 78-81.

[10] 芦春斌, 罗乐, 杨梦婕, 等. 基于颜色判定的环介导等温扩增技术检测 HPV6 和 HPV16[J]. 病毒学报, 2011, 27(1): 64-69.

(收稿日期: 2013-08-03)