

71-75

第8卷第1期
1993年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.8 No.1
Mar. 1993快速检测尖锐湿疣组织中人乳头瘤病
毒6型和11型DNA的研究*

李明发 麻晓迁 谢 维 单祥年 蒋 清 茅一萍

(南京铁道医学院生物学教研室 南京 210009)

刘季和 常宝珠 孙建方

(中国医学科学院皮肤病研究所 南京)

杨志坚

(江苏省肿瘤防治研究所病毒室 南京)

提 要

本文应用聚合酶链反应技术对30例人生殖器尖锐湿疣组织中HPV6, 11 DNA的存在进行了检测研究。结果发现HPV6, HPV11 DNA的阳性率分别为60%, 90% HPV6, HPV11 DNA双重检出率为53.3%, 总阳性率达96.7%。本文结果证实HPV6, 11的感染和尖锐湿疣的发生密切相关。本文检测方法具有快速, 灵敏、特异性强的优点, 为HPV DNA的检测及其分型研究提供了有效的手段。作者还对两例女阴假性湿疣进行PCR扩增, 结果似乎不支持女阴假性湿疣的HPV感染的病因学。

关键词: 生殖器尖锐湿疣 女阴假性湿疣 人乳头瘤病毒 聚合酶链反应

快速检测

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)是一种DNA病毒, 属乳多空病毒, 已发现HPV达57型^[1]。不同型别的HPV可使人体许多部位感染形成不同类型的病变。人生殖器尖锐湿疣系HPV感染所引起的一种性接触传播疾病, 近年来, 发病率呈急剧上升趋势。多数资料报道: HPV6和11的存在和尖锐湿疣密切相关^[2,3]。目前国内对尖锐湿疣组织中HPV DNA的检测均采用核酸分子杂交法或免疫组化法, 上述方法费时, 昂贵且灵敏度不够。本文采用聚合酶链反应技术对人生殖器尖锐湿疣组织中HPV6和11DNA进行了检测研究, 旨在建立一种对HPV DNA快速, 灵敏, 特异性强的检测及其分型方法。

本文于1992年6月29日收到, 7月23日修回。

* 江苏省卫生厅资助课题。

材 料 与 方 法

1. **活检组织标本的收集及处理** 活检组织标本取自中国医学科学院皮肤病研究所及南京铁道医学院附属医院妇产科门诊患者,共32例,其中30例诊断为尖锐湿疣,2例为女阴假性湿疣。30例尖锐湿疣中男性占12例,女性占18例。年龄最大为62岁,最小为22岁,病程一般为一个月到一年不等。所有标本一份送病理学检查,另一份置-20℃备用。

2. **组织的DNA提取** 本文采用略去蛋白酶k处理的快速DNA抽提法^[4]。经-20℃冻存的活检组织剪碎后,用0.5%的SDS消化,然后用酚,氯仿,异戊醇抽提,最后用异丙醇沉淀,TE溶解组织DNA。DU70紫外分光光度计测定DNA的浓度。

3. **阳性HPV6, 11 DNA的制备** 阳性HPV6, 11 DNA克隆由德国海得堡肿瘤研究中心Zur Hausen教授惠赠。HPV6, 11阳性克隆经细菌转化,扩增,提取及纯化后备用。

4. **寡聚核苷酸引物的设计及合成** 用于扩增HPV6和HPV11的两对引物的设计参照Pao等的工作^[5]。两对引物均为型别特异性寡聚核苷酸引物。引物的核苷酸序列及扩增区域见附表。引物的合成由中科院上海细胞生物学研究所完成。

5. **PCR扩增** PCR反应体系包括1μg组织DNA, 200μmol/L四种三磷酸核苷(dATP dGTP dCTP dTTP), 50pmol/L分子的两对引物, Taq耐热DNA聚合酶2~3U(美国Premega公司), 1xPCR反应缓冲液<50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.01%明胶, 0.1% Triton X-100), 反应总体积为50μl。PCR循环前模板DNA经95℃, 10'预变性。PCR循环参数如下: 93℃, 30"; 55℃, 45"; 72℃, 2'; 共35次循环。末次循环延伸反应在72℃维持10', PCR反应在DNA热循环仪上进行(美国PE-Cetus公司)。阴性对照组DNA模板为灭菌双蒸水所代替。阳性HPV DNA作为模板扩增时,用量仅为1ng。

6. **PCR产物的鉴定** PCR产物经2%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后直接在紫外检测仪下观察扩增结果。

结 果

1. **HPV6和11 DNA扩增的特异性** 本文用从德国Zur Hausen实验室所获得的阳性HPV6, 11 DNA克隆作为DNA模板,采用型别特异性的两对引物进行PCR扩增反应后发现,型别特异性的引物只能扩增相对应型别的阳性HPV DNA引物和不同型别的HPV DNA模板之间在本实验扩增条件下未见交叉扩增反应。

2. **假性湿疣组织的HPV6, 11 DNA扩增结果** 在本文PCR反应条件下,两对型别特异性引物所介导的PCR反应在2例女阴假性湿疣组织中均未检测到DNA扩增带的存在。

3. **尖锐湿疣组织的HPV6, 11 DNA扩增结果**。尖锐湿疣组织DNA经两对引物扩增后,结果呈现不同的格局(见附图)。在所检测的30例活检标本中,有18例仅出现263bp的扩增带,表明HPV6 DNA的检出率达60%, 27例出现144bp扩增带,表明HPV 11 DNA检出率达90%, 16例同时出现上述两条扩增带,表明HPV6, 11 DNA双重检出率达53.3%。本文病例HPV6, 11 DNA检出的总阳性率达96.7%(29/30)。所有阴性对照组未见PCR扩增带的出现(见附表)。

附表 尖锐湿疣组织中 HPV6, 11 DNA 的检测
Tab. Detection of HPV6, HPV11 DNA in Condyloma Acuminatum

| 引物 | 核苷酸序列 (5'→3') | 扩增片段长度 | 阳性检出率 |
|-------|-----------------------------|--------|-------|
| HPV6 | F-AGACCAAGTTGTGCAAGACGTTTAA | 263bp | 60% |
| | R-GCACGTCTAAGATGTCTTGTTTAG | | |
| HPV11 | F-AGACCAAGTTGTGCAAGACGTTTAA | 144bp | 90% |
| | R-AAGCGAAAGTTGTCTCGCCACACA | | |



附图: 部份尖锐湿疣组织中 HPV6, 11 DNA PCR 扩增结果, MW: ϕ x174/HaeII 分子量标准, 363bp 示 HPV6 DNA 扩增片段, 144bp 示 HPV11 DNA PCR 扩增片段, 第12号为阴性对照样本。

Fig. PCR amplification of HPV6, 11 DNA in some cases of Condyloma Acuminatum, MW: ϕ x174/HaeII, 363bp, HPV6 DNA fragment, 144bp, HPV11 DNA fragment, No.12, negative control.

讨 论

迄今, 病毒性疾病的诊断主要依赖于免疫学方法, 病毒培养和核酸分子杂交等。由于缺乏体外培养 HPV 的组织培养系统, 因此, 血清学检测和病毒培养均无法实施⁽⁴⁾。免疫组化法灵敏度差。目前, 国内普遍采用的核酸分子杂交法存在下列问题: 如用同位素标记核酸探针, 不仅操作繁琐, 而且有放射性污染, 如用非同位素, 则灵敏度较差。同时, 某些不同型别 HPV DNA 之间核苷酸同源性较大, 如 HPV6 和 11 型, 16 和 33 型之间, 用核酸分子杂交法若不严格控制杂交条件, 往往难以区分各型 HPV^(5,7)。本文从基因组选择合成了 HPV6 和 11 DNA 型别特异性引物, 在同一份 PCR 反应体系中同时加入两对引物, 扩增后经电泳、染色后直接观察扩增结果, 可根据扩增带大小直接对 HPV6 和 11 DNA 进行分型检测。本文所用的型别特异性引物序列取自于 HPV 基因组 E6 区域, 该区域已被证实 HPV 基因组整合到宿主细胞基因组过程中不会丢失⁽⁸⁾, 同时, E6 区

域开放阅读框架 (open reading frame) 有相当的保守性^[8], 因此, 根据已知的 HPV6 和11型基因组DNA区域核苷酸序列可设计出两型特异性引物。作者用阳性HPV6, 11DNA克隆做PCR模板时, 两型引物之间无交叉扩增反应, 从而肯定了型别特异性引物的真实性。

Young 等报道应用PCR法可直接测出10个拷贝的HPV DNA, 比Southern吸印法至少敏感10万倍^[9]。本文对30例生殖器尖锐湿疣组织中HPV6, 11DNA检出率明显高于国内应用核酸分子杂交技术所得到的阳性率^[10], 说明PCR法用于HPV DNA检测, 其灵敏度要显著高于核酸分子杂交法。本文结果还提示PCR法的应用有可能实现尖锐湿疣的亚临床HPV感染的分型检测, PCR扩增具有高度灵敏度的优点, 但在应用PCR检测病毒DNA时, 若实验操作不严格, 有假阳性的危险。为防止因PCR扩增反应中可能出现的续代污染 (carryover) 而影响实验结果的可信性, 作者除将活检标本DNA抽提, PCR扩增, 扩增后产物的分析鉴定等步骤分开操作外, 每次PCR扩增时均设置阴性对照, 结果阴性对照无扩增带。本实验结合运用简化的活检标本组织DNA提取法, 整个检测可在24小时内报告结果。

女阴假性湿疣在临床上有时难以和女性尖锐湿疣区分, 本实验对两例女阴假性湿疣活检组织的HPV检测出现阴性结果, 似乎支持女阴假性湿疣的非HPV感染的病因学, 为临床上两种疾病的鉴别诊断提供依据。当然排除女阴假性湿疣的HPV感染因素尚须扩大研究的病例数及检测更多型别的HPV DNA。

参 考 文 献

- [1] Zur Hausen, H., 1989, *Cancer Res.*, 49: 4677.
- [2] Nasseri, M, et al., 1987, *Virology* 159: 433.
- [3] Gissmann, L, et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80: 560.
- [4] Davis, L, et al., 1990, 基因工程技术在基础与临床医学中的应用 (中译本), 科学出版社。
- [5] Pao, C, C, et al., 1990, *J. Infect. Dis.*, 161: 113—115.
- [6] 蔡良琬, 1990, 分子生物学实验技术 (中译本), 科学出版社。
- [7] Dallas, P, B, et al., 1989, *J. Med. Virol.*, 27: 105—111.
- [8] 侯云德, 1990, 分子病毒学, 学苑出版社。
- [9] Young, L, S, et al., 1989, *Br. Med. J.*, 298: 14—18.
- [10] 赖晃文等, 1992, 中华皮肤科杂志, 25: 77—78.

A Rapid Detection of Human Papillomavirus 6, 11 DNA in Condyloma Acuminatum

Li Mingfa et al

(*Department of Biology, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009*)

Liu Jihe

(*Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Science, Nanjing*)

Yang Zhijian

(*Department of Virology, Institute of Cancer Research, Nanjing*)

The polymerase chain reaction (PCR) was applied to identify the human papillomavirus (HPV) 6 and 11 DNA in the specimens from 30 patients with condyloma acuminatum. The positive percentage of HPV6, HPV11 DNA was 60%, 90%, respectively. 53.3% samples showed the presence of both HPV6 and HPV11 DNA. The total positive percentage was 96.7%. Our result supported the data presented previously that the HPV6 and HPV11 are strongly associated with condyloma acuminatum. The PCR proved to be a rapid, sensitive, highly specific for detection and typing of HPV DNA. The negative amplification result of two cases of atypical condyloma could contribute to the explanation of its etiology.

Key words: Condyloma Acuminatum Atypical Condyloma Human Papillomavirus PCR