

## PCR 在慢性宫颈炎 HSV 感染研究中的应用

蔡红 姚堃 季晓辉 周瑶玺

(南京医科大学微生物学教研室, 南京 210029)

关键词 多聚酶链反应, 单纯疱疹病毒, 宫颈炎

聚合酶链反应;

R373.9

单纯疱疹病毒(HSV)被认为与宫颈癌有关。目前生殖道 HSV 感染日渐升高, 日益引起人们的重视。由于药物治疗 HSV 感染有效, 因而迫切需要一种简便、快速、有效的检测方法。以此为目的, 我们用细胞裂解法结合 PCR 技术, 检测了 102 份临床宫颈拭子中 HSV-DNA, 并与病毒分离、McAb-ELISA 夹心法进行了比较, 获得了满意结果, 现报告如下。

## 材料和方法

- 1 检测标本 宫颈拭子。南京地区妇产门诊的 72 例慢性宫颈炎(临床诊断 I~III 度病损)和 30 例正常宫颈(宫颈口光滑、外观正常), 取样后即置于 1ml 病毒移送液(含青、链霉素的 Hanks 液)中。
- 2 细胞和病毒株 HSV-1 为 SM44 株, HSV-2 为 Sav 株。传代及分离细胞均为原代乳兔肾细胞(PRK), 按常规培养方法。
- 3 PCR 引物 选自 DNA 多聚酶编码区(pol 基因), 引物 1 为 5' AAG-GAG-GCG-CCC-AAG-CG-3'; 引物 2 为 5' GGT-ACA-GGC-TGG-CAA-AGT-3', 由南京军区军事医学研究所唐家琪副研究员设计并惠赠。其特异性已经过杂交试验验证, 并证实与人体其它疱疹病毒或细胞 DNA 无交叉反应。
- 4 样本处理及细胞裂解 将样品离心, 上清作病毒分离和可溶性抗原 ELISA 检测; 沉淀用 PBS 洗三次, 细胞裂解液(含 NP40、Tween-20、蛋白酶 K、Tris-HCl)重悬, 50~60℃ 1h、95℃ 10min 处理, 以上清为 PCR DNA 模板。
- 5 PCR 扩增及产物分析 本实验采用上海复华公司的 PCR 试剂盒, 操作按说明书。总体积为 50μl, 92℃ 10min, 55℃ 5min 预处理后, 按 93℃ 1min-55℃ 1min-72℃ 1.5min 进行 PCR 循环, 共 30 次。取 10μl 扩增产物加等量溴酚蓝上样液, 于 8% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 120V 2h 后, 溴化乙锭染色, 5' 紫外灯下观察结果, 参照标准分子量 Marker(上海华美公司)。阳性对照为 HSV 的标准毒株, 阴性对照为 PCR 试剂和原代兔肾细胞的裂解上清。质控的上述阴阳性对照, 本技术重复十次以上均获得同样结果。
- 6 病毒分离 标本采集后 24h 内接种于 PRK 单层细胞, 逐日观察细胞病变(CPE)。接种后 7~9 天仍无 CPE 时继续传代, 盲传三代仍无 CPE 者判为阴性。阳性者于细胞培养 48h 或 CPE 十~++ 时取细胞涂片, 以间接荧光抗体法鉴定。一抗为本室自备的兔抗 HSV, 二抗为上海生物制品研究所的荧光羊抗兔 IgG。
- 7 HSV 的 McAb-ELISA 双抗体夹心法检测 采用第四军医大学金伯泉教授提供的相应药盒, 操作按说明。

## 结果和讨论

- 1 HSV-PCR 结果 取 HSV-1(SM44)、HSV-2(Sav)株病毒感染的 PRK 细胞裂解上清, 经 PCR

扩增和聚丙烯酰胺电泳后,可见一明显DNA带,与参比Marker对比,扩增片段长度(229/241 bp)与预期相符;同时检测了相应的阴性对照和部分临床标本(见图)。

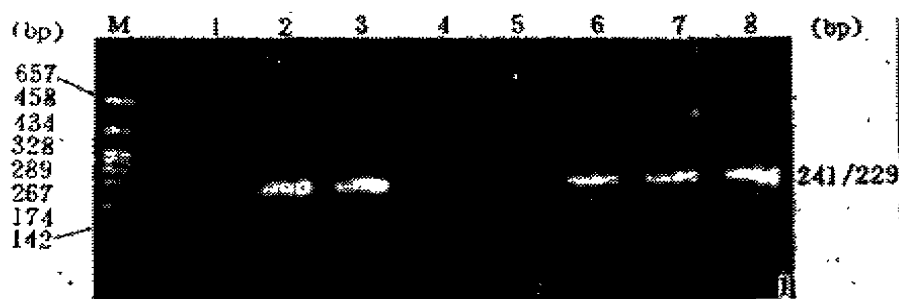


图 单纯疱疹病毒PCR扩增结果

M, Marker; 1, PCR试剂阴性对照; 2, HSV-1; 3, HSV-2; 4, PRK; 5~8, 临床标本。

Fig. Electrophoresis of DNA fragment amplified by PCR from Herpes Simplex Virus(SM44.Sav) in PRK cell culture and some samples. Lane M; marker; Lane 1; negative control with no DNA; Lane 2; HSV-1; Lane 3; HSV-2; Lane 4; PRK; Lane 5-8; clinical samples.

2 PCR、ELISA、VI三种方法检测宫颈HSV感染的结果比较(见表)。三种方法的检出率依次为28.4%、22.5%和20.6%。与此同时,也进行了两两方法间的比较,其总符合率:PCR-ELISA, PCR-VI, ELISA-VI分别为94.1%、90.2%、94.1%,均>90%,提示PCR在该检测中为一种特异、敏感和可靠的技术。进行统计学处理发现无论何种方法,慢性宫颈炎HSV感染均显著高于正常宫颈组。

表 三种方法的HSV检测结果

Table Results of HSV detection by the three methods

分组 Group	例数 Cases	HSV检测结果(%) HSV positivity		
		PCR	McAb-ELISA	VI
慢性宫颈炎 Chronic cervicitis	72	25(34.7)	21(29.2)	19(26.4)
正常对照 Healthy control	30	4(13.3)	2(6.7)	2(6.7)
合计 Total	102	29(28.4)	23(22.5)	21(20.6)
	$\chi^2$	5.04*	6.14*	5.14*

\*P<0.05

慢性宫颈炎是妇科常见病,多发病,其病因复杂,HSV是其重要的病因之一<sup>[1]</sup>。而在HSV的诊断上,尽管已建立了病毒分离<sup>[2]</sup>、ELISA等方法,但存在着费时、敏感性低等问题,尚不能满足科研和临床的需要。近年来发展起来的PCR技术已广泛用于病毒病的诊断,但对于生殖道疱疹的检测尚少报道<sup>[3,4]</sup>。本实验采用了细胞裂解法和PCR技术,进行宫颈疱疹病毒的研究,结果发现:(1)采用细胞裂解法获得DNA模板远比传统的酚/氯仿抽提法简便得多,可使整

个周期缩短在5个小时内。尽管可能会出现一些非特异性条带,但远比预期的特异性条带弱得多;(2)宫颈分泌物成份复杂、病毒含量少、PCR不仅能使极微量的HSV被检出,还能检出其中因某些原因失活的HSV;(3)病毒分离与ELISA法都只能检出复制态的病毒,即检出的是病毒基因产物,而PCR直接检测病毒基因,无论潜伏或复制态的病毒都可测出,在潜伏感染研究中意义重大<sup>[5]</sup>。因而该法可能成为宫颈疱疹病毒的简便、快速、敏感、可靠的检测方法,对保障妇女健康和防治宫颈癌有重要意义。

### 参 考 文 献

- 1 杜平,等主编.现代临床病毒学.第1版.北京,人民军医出版社,1991,434
- 2 Winter GF, Inglis JM, Cubie HA. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection in convention and shell vial cell cultures using monoclonal antibodies. *J Virol Methods*. 1987;329-330
- 3 Hardy DA, Arivin AM, Yasukawa LL, et al. Use of polymerase chain reaction for successful identification of asymptomatic genital infection with herpes simplex virus in pregnant women at delivery. *J Infect Dis*. 1990; 162:1031-1035
- 4 Rozenberg F, Lebon P. Amplification and Characterization of herpes virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with acute encephalitis. *J Clin Microbiol*. 1991; 29(11):2412-2417
- 5 Cantin EM, Lange W, Openshaw H. Application of polymerase chain reaction assays to studies of herpes simplex virus latency. *Intervirology*. 1991;32:93-100

## Use of Polymerase Chain Reaction for the Infection with Herpes Simplex Virus in Chronic Cervicitis

Cai Hong Yao Kun Ji Xiaohui Zhou Yaoxi

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

PCR was adapted to detect HSV-DNA sequence in samples from 72 patients with chronic cervicitis and 30 healthy controls, and compared with McAb-ELISA and virus isolation (VI). The positive rate of HSV by these three methods was 28.4%, 22.5%, 20.6%, respectively, and coincident rates among three paired methods were all over 90%. It is shown that PCR combined with cell lysis is a fast, effective and reliable method to detect HSV in the cervix. It can detect not only very low quantity HSV-DNA, but also inactive and latent HSV. HSV positivity rate of chronic cervicitis is markedly higher than healthy control ( $P < 0.05$ ).

**Key words** Polymerase Chain Reaction, Herpes Simplex Virus, Cervicitis