

HPV 核酸检测标准物质研究进展

杨佳怡^{1§*}, 陈桂芳^{2§}, 高运华¹, 王志栋¹, 吴泉¹

1.中国计量科学研究院,北京 100029
2.沈阳化工大学化学工程学院,沈阳 110142

摘要: 2018 年全球癌症统计数据显示,我国宫颈癌发病率已高居世界第二位,且有发病年轻化的趋势,严重威胁着女性的身体健康。已有研究表明:高危型人类乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)的感染与宫颈癌的发生密切相关。针对 HPV 的检测对于宫颈癌的预防和诊断具有重要的意义,目前常见的检测方法是基于 PCR 技术,对 HPV 的核酸进行定性和定量分析。然而在缺乏统一标准的情况下,难以保证测量结果准确可比。标准物质作为计量校准的有力工具,可以应用于测量过程的质量控制。讨论了针对 HPV 的常见检测方法 with 检测过程中的影响因素,分析了不同形式核酸标准物质和参考品的特点,以期 为 HPV 核酸检测标准物质的研制和使用提供参考,以用于宫颈癌的科学诊断。

关键词: 人类乳头瘤病毒;宫颈癌;核酸检测;标准物质;计量校准

DOI:10.19586/j.2095-2341.2020.0098

Research Progress of Reference Material for HPV Nucleic Acid Detection

YANG Jiayi^{1§*}, CHEN Guifang^{2§}, GAO Yunhuan¹, WANG Zhidong¹, WU Xiao¹

1.National Institute of Metrology, Beijing 100029, China;
2.Department of Chemical Engineering, Shenyang Chemical Industry University, Shenyang 110142, China

Abstract: According to the global cancer statistics in 2018, the incidence of cervical cancer in China has ranked the second in the world, and it tends to occur at a younger age, posing a serious threat to women health. Research has shown that the infection of high-risk human papillomavirus (HPV) closely relates to the occurrence of cervical cancer. Hence, the detection of HPV is of great significance for the prevention and diagnosis of cervical cancer. The popular detection methods work based on PCR technology, which make qualitative and quantitative analysis of HPV nucleic acid. However, in the absence of uniform standards, it is difficult to ensure accurate and comparable measurement results. Reference material acts as a powerful tool for measurement and calibration, which could be applied to quality control of measurement process. This paper discussed the common detection methods for HPV and the influencing factors in the detection procedure, then analyzed the characteristics of different forms of reference materials for nucleic acid detection. It was expected to provide clues for the research and usage of the reference materials in HPV nucleic acid detection, which would be helpful for the scientific diagnosis of cervical cancer.

Key words: HPV; cervical cancer; nucleic acid detection; reference material; calibration

2008 年,德国癌症研究中心的科学家 Harald zur Hausen 因发现人乳头状瘤病毒(HPV)导致宫颈癌而获得诺贝尔生理学或医学奖。基于他的研究工作,HPV 获得性预防疫苗快速发展,显著降低了女性罹患宫颈癌的风险^[1]。与此同时,HPV 的检测在宫颈癌的筛查和诊断过程中发挥着重要的作用。在了解 HPV 基因功能与作用机制的基

础上,研究者研发了多种针对 HPV 核酸的检测方法,进而形成了商品化的检测试剂盒。在基于 PCR 扩增的 HPV DNA 检测试剂盒中,多数将编码衣壳蛋白 L1 的基因作为检测的目标区域,少数针对 E1、E2 基因或多种不同基因同时进行检测^[2-3]。随着对癌变发生机制的深入研究,E6/E7 mRNA 水平受到广泛的关注,也是 HPV RNA 检

收稿日期:2020-08-25; 接受日期:2020-10-14
基金项目:国家自然科学基金项目(31900433);中国计量科学研究院基本科研业务费项目(AKYZZ2023)。
联系方式:§ 杨佳怡与陈桂芳为本文共同第一作者。杨佳怡 E-mail:yangji2018@nim.ac.cn; 陈桂芳 E-mail:503211735@qq.com
* 通信作者 杨佳怡

测的主要内容^[4]。值得注意的是,HPV 核酸检测过程存在一些影响因素,例如病毒裂解与 DNA 提取和纯化效率、引物探针的通用性等;对于荧光定量 PCR 过程,标准曲线的准确性将直接影响测量结果。上述多种影响因素可能导致检测结果缺乏可比性,从而误导对病情的判断,不利于及时干预治疗。具有确定量值的标准物质可以对不同的检测试剂盒进行计量校准,提升检测的准确性。本文讨论了用于 HPV 核酸检测过程的标准物质研究进展,分析了不同形式的标准物质候选物的特性,为进一步提升 HPV 检测结果的准确性提供了参考。

1 高危型 HPV 常见检测方法

人乳头状瘤病毒(HPV)是一种无包膜的双链闭环 DNA 病毒,其基因组包括 3 个功能区:非编码上游调控区(URR)、早期转录基因(E1、E2、E4、E5、E6 和 E7)、晚期转录基因(L1 和 L2)^[5]。早期蛋白与病毒的细胞转化功能及致癌作用关系密切^[6];L1 和 L2 是 HPV 的主要和次要衣壳蛋白,共同形成病毒的衣壳,参与 HPV 感染细胞的过程。L1 具有自组装的功能,L2 不能单独自组装但可以与 L1 共同组装成病毒颗粒^[7]。按照感染引起疾病的严重程度,HPV 可以分为低危型(HPV6、11、40、42 等)和高危型(HPV16、18、52、58 等),高危型 HPV 感染与宫颈癌的发生具有密切关联^[8]。已有研究证明,高危型 HPV16、18 中的 E6 蛋白能与细胞中的 p53 蛋白结合并导致 p53 蛋白的降解,从而破坏 p53 抑制肿瘤发生的作用^[9];E7 蛋白则导致另一种抑制肿瘤发生的 Rb 蛋白降解^[10],E6、E7 可以导致两种重要的肿瘤抑制蛋白发生降解,解释了宫颈癌形成的重要机制。大部分的 HPV 感染可以被人体清除,只有高危型 HPV 的持续感染才会导致癌症的发生^[11]。宫颈癌早期没有明显的临床症状,因此针对 HPV 的检测对于相关疾病的及时筛查与治疗具有重要意义。

基于 PCR 扩增技术对 HPV 核酸进行分析是 HPV 检测最常见的方法。对 HPV DNA 进行检测可以诊断 HPV 的感染,并分析发生感染的 HPV 分型。现有的 HPV DNA 检测方法,主要针对 L1 基因的保守性区域设计 PCR 引物^[12-13],PCR 扩

增完成后,可以利用反向杂交法对 HPV 进行分型分析^[14]。一些检测试剂盒基于荧光定量 PCR 技术,通过特异性的荧光探针,可以实现对特定亚型 HPV 的半定量检测^[15-16]。在荧光定量 PCR 反应中,对多重荧光信号分别检测,可以同时实现 HPV 的分型与定量检测,提高了检测的效率^[17]。HPV 致病机制的研究揭示 E6/E7 mRNA 含量与病变过程密切相关^[18],因此 E6/E7 mRNA 的检测也受到了越来越多的关注,已有研究者开发了针对 E6/E7 mRNA 的检测试剂盒:利用逆转录酶和 RNA 聚合酶对 RNA 扩增,结合荧光标记的 DNA 探针进行检测^[3]。在分析比较 HPV DNA 和 RNA 检测结果参考意义的探讨中,有研究者提出,在 HPV DNA 检测结果为阴性的情况下,判断健康的参考性更好,而在 HPV RNA 阳性的情况下,判断患病的参考性更好^[19]。对于发生癌前病变的细胞(CIN3⁺),两种检测方法均表现出较好的灵敏性,且具有较高的符合率^[20]。

2 HPV 核酸检测过程的影响因素

对于基于 PCR 扩增的检测方法,需要在反应前对样品中的核酸进行提取,在针对人类巨细胞病毒 DNA 的定量检测中,研究者证明了 DNA 提取过程的效率直接影响后续的测量结果^[21];在本团队前期工作中,观察到不同逆转录试剂盒导致猪繁殖与呼吸综合征病毒 RNA 检测结果表现出显著差异^[22],提示为了全面理解核酸检测结果,应充分考虑 DNA 提取或 RNA 逆转录过程的影响。在检测 HPV 核酸的过程中,不同试剂盒提取 DNA 或逆转录 RNA 采用的试剂和方法不同,可能会对检测结果造成影响。与此同时,对于使用通用型引物进行检测的试剂盒,引物与不同亚型的 HPV 基因扩增区域的结合能力有所区别,在检测 HPV 混合性感染的样品时,可能会导致部分漏检^[23]。不同试剂盒引物和探针设计方法存在差异,其差异可能造成检出限不同,从而导致检测样品的有效范围不同^[13,24]。在以上影响因素之外,不同检测实验室中定量 PCR 仪等相关仪器的运行状态、实验人员操作的规范程度都可能影响检测结果。在缺乏计量标准的情况下,不同检测试剂盒测量的结果难以做到完全一致可比,可能影响判断的准确性并导致重复检测造

成的浪费。

荧光定量 PCR 的基本原理是测量 PCR 扩增过程中积累的荧光信号,在进行定量检测的过程中依赖于标准曲线^[25]。一般采用已知量值的工作标准物质绘制标准曲线,工作标准物质的量值准确性和溯源性是保证检测结果可信度的关键,根据 GB/T 21415—2008《体外诊断医疗器械生物样品中量的测量校准品和控制物质赋值的计量学溯源性》规定:为某一校准品或正确度控制品的一个指定值所赋的值的测量正确度取决于该值通过不同测量程序和测量标准(校准品)的不间断比较链而具有计量学溯源性,比较链逐级向上,测量不确定度不断减小。然而我国目前尚无针对核酸检测试剂盒溯源性的明确技术要求^[26],这样的情况也将导致不同的检测试剂盒定量检测的结果存在差异。

3 HPV 标准物质与参考品的研究

为了提高 HPV 检测结果的准确性和一致性,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)在 2008 年针对两种高危型 HPV16 和 HPV18,构建了包含全基因组序列的重组质粒,作为核酸标准物质对来自 13 个国家不同实验室的定性和定量检测结果进行了比对^[27]。随后,利用类似的方法,WHO 还研制了包含 2 种低危型(HPV6、11)和 5 种高危型(HPV31、33、45、52、58)的核酸标准物质^[28]。然而国际标准物质不易购买,很难满足国内计量校准的巨大需求。国内的研究者相继研制了包含 HPV L1 基因序列和全基因组基因序列的重组质粒 DNA 标准物质和质控品,涵盖了常见的低危和高危 HPV 亚型,为 HPV DNA 分型与检测过程提供了参考^[29-31]。常见的检测参考品形式还包括灭活的临床样品、细胞系以及假病毒等,下文将进行详细的介绍。

3.1 重组质粒 DNA 标准物质和参考品

在世界卫生组织的组织和管理下,英国国家生物标准品和参考品研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)于 2008 年建立了第一个包含全基因组序列的 HPV16 (1×10^7 IU·mL⁻¹; International Unit, IU)和 HPV18 (1×10^7 IU·mL⁻¹)国际标准物质。其定值方法是通过分光光度法测定量值后,对标准物质直接赋

值;在 260 nm 处测定标准物质原液的吸光度值并根据质粒分子量计算其浓度(genome equivalents·mL⁻¹, GE·mL⁻¹),按一定比例稀释到 1×10^7 GE·mL⁻¹,分装 0.5 mL·瓶⁻¹,冻干后赋值为 5×10^6 IU·瓶⁻¹^[27]。在此基础上,NIBSC 补充建立了 7 种 HPV 基因型的标准物质。定值时以已有标准物质为参照,使用实时荧光定量 PCR 建立标准曲线,并在不同实验室对多种检测试剂方法进行了评估比较^[28]。

我国卫生部临床检验中心参考国际标准物质研制方法,建立了以人基因组 DNA 为基质的 HPV16、18 全基因组重组质粒 DNA 标准物质。使用 4 种实时荧光 PCR 试剂联合测试,通过国际标准物质建立标准曲线完成定值,并计算不确定度,HPV16 标准物质质量值为 $(7.1 \pm 1.0) \times 10^6$ IU·mL⁻¹,HPV18 标准物质质量值为 $(3.5 \pm 0.7) \times 10^6$ IU·mL⁻¹;上海市临床检验中心、广州邦德盛生物科技有限公司等单位也分别研制了 HPV16 和 HPV18 全基因组重组质粒 DNA 的国家有证标准物质。这些标准物质具有确定量值和不确定度,量值均可溯源至国际标准物质 HPV16 或 HPV18,表 1 中列举了我国现有的可查询的 HPV 核酸检测的有证标准物质。

卫生部临床检验中心制备了 7 种常见 HPV 基因型(HPV6、11、31、33、39、51、52)的全基因组重组质粒 DNA 参考品并进行了定值:采用分光光度法测定重组质粒在 260 nm 处的吸光度值,根据质粒分子量计算得到 GE·mL⁻¹浓度值,用含人基因组 DNA 的 BSA 溶液梯度稀释至 10^6 GE·mL⁻¹和 10^5 GE·mL⁻¹^[29];中国药品生物制品检定所建立的包含 L1 基因的重组质粒 DNA 参考品,涵盖常见的 30 种 HPV 基因型^[30];中国食品药品检定研究院建立了包含 20 种 HPV 基因型的全基因组重组质粒 DNA 参考品,经 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人基因组溶液稀释至 10^6 copies·mL⁻¹^[31];长春理工大学也建立了涵盖 14 种中高危型和 6 种低危型的 HPV 全基因组重组质粒 DNA 参考品;将不同基因型参考品测定浓度值后统一调为 $50 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($10^8 \sim 10^9$ copies·mL⁻¹)^[32];利用 HPV DNA 分型参考品,可以对相关试剂盒和实验室的 HPV 分型检测过程进行质量评估。

3.2 阳性临床样品参考品

临床检测实验室的研究人员曾报道采用临床

表 1 HPV 核酸检测有证标准物质
Table 1 List of certified reference materials for HPV nucleic acid detection

基因型	形式	量值/(IU·mL ⁻¹)	定值方法	研发单位
HPV16	HPV 全基因组重组质粒	(7.1±1.0)×10 ⁶	采用荧光定量 PCR 试剂,通过国际标准物质 HPV16 建立标准曲线,计算平均定值和不确定度	卫生部临床 检验中心
	HPV 全基因组重组质粒	(6.9±1.0)×10 ⁶	采用 6 种实时荧光 PCR 试剂,通过国际标准物质 HPV16 建立标准曲线,计算平均定值和不确定度	上海市临床 检验中心
	HPV 全基因组重组质粒	(1.1±0.31)×10 ³	将国际标准物质 HPV16 梯度稀释,建立标准曲线,计算量值和不确定度	广州邦德盛 生物科技有 限公司
		(1.2±0.25)×10 ⁴		
		(1.1±0.20)×10 ⁵ (1.1±0.19)×10 ⁶		
HPV18	HPV 全基因组重组质粒	(3.5±0.7)×10 ⁶	采用荧光定量 PCR 试剂,通过国际标准物质 HPV18 建立标准曲线,计算平均定值和不确定度	卫生部临床 检验中心
	HPV 全基因组重组质粒	(2.3±0.7)×10 ⁶	采用 6 种实时荧光 PCR 试剂,通过国际标准物质 HPV18 建立标准曲线,计算平均定值和不确定度	上海市临床 检验中心
	HPV 全基因组重组质粒	(1.1±0.32)×10 ³	将国际标准物质 HPV18 梯度稀释,建立标准曲线,计算量值和不确定度	广州邦德盛 生物科技有 限公司
		(1.1±0.28)×10 ⁴		
		(1.0±0.23)×10 ⁵ (1.1±0.22)×10 ⁶		

注:以上标注物质均为液态保存,在(-20±5)℃环境中储存。

样品制备参考品进行室内质量控制:获取低危型(HPV6/HPV11)和高危型(HPV16/HPV18)的临床样品,经灭活、稀释后配制室内参考品,用于 HPV 检测的室内质量控制^[33]。宫颈癌细胞系也被用作质控参考品,上海市临床检验中心采用整合有 L1 基因的人宫颈癌细胞系(SiHa 和 HeLa)作为 HPV16 和 HPV18 检测参考品,用实时荧光 PCR 试剂盒检测,通过国际标准物质建立标准曲线计算定值为 10⁶ IU·mL⁻¹,梯度稀释为不同浓度的参考品^[34]。卫生部临床检验中心建立了 HPV16/HPV18 双阳性的参考品:将载有 HPV16 基因的重组质粒转染已包含 HPV18 的人宫颈癌细胞系(HeLa),灭活后获得同时含 HPV16/HPV18 基因组 DNA 的参考品,通过荧光定量 PCR 进行检测^[35]。与质粒 DNA 相比,灭活后的临床样品更加接近临床样品的状态,可以为临床实验室间的质量评估提供参考。

3.3 假病毒形式的参考品

近年来,假病毒技术的不断发展为 HPV 标准物质和参考品的研制提供了新的工具,假病毒可以携带外源病毒的特定基因片段,因为不包含外源病毒的完整基因,假病毒只能对细胞进行“一次性”感染,在研究致病性病毒的过程中具有较好的安全性^[36];假病毒颗粒具有衣壳蛋白包裹核

酸的完整结构,更接近真实病毒样品的状态,可以对病毒颗粒裂解、核酸提取纯化以及 PCR 扩增与检测的全过程进行质量控制。在衣壳蛋白的保护下,假病毒可以更好的抵抗核酸酶降解,利于在运输和储存过程中保持其稳定性。针对高危型 HPV 的衣壳蛋白编码基因(L1、L2),研究者制备了同时包含荧光蛋白报告基因的假病毒颗粒,并将其应用于血清中的免疫原性检测^[37-38]。在癌症发病进程的诊断中,HPV E6/E7 mRNA 水平逐渐受到更多的关注,利用大肠杆菌表达体系,研究者制备了包含 E6/E7 RNA 的假病毒质控品,并通过反转录-荧光定量 PCR 的方法进行了定值,为 HPV E6/E7 mRNA 检测试剂的应用提供了参考^[39]。表 2 总结了 WHO 研制的和国内常见的用于 HPV 核酸检测的标准物质和参考品。

3.4 分析比较

HPV 质粒 DNA 标准物质和参考品的应用过程中,虽然通过加入人类基因组 DNA,可以一定程度上模拟检测过程中的基质效应,但质粒 DNA 作为质控时,其应用范围仅限于 DNA 扩增和检测环节,很难对病毒颗粒裂解、DNA 提取与纯化等步骤的效率进行考察^[27]。虽然现阶段 HPV 核酸标准物质还是以质粒 DNA 的形式为主,但其明显的局限性也提示了研制不同形式标准物质的重要

表 2 常见用于 HPV 核酸检测的标准物质和参考品

Table 2 List of reference materials for HPV nucleic acid detection

检测对象	检测形式	HPV 类型	量值	定值方法	研发单位
HPV DNA ^[27]	HPV 全基因组重组质粒	HPV16、18	5×10 ⁶ IU·瓶 ⁻¹ 或 1×10 ⁷ IU·mL ⁻¹	分光光度法测定标准物质在 260 nm 的吸光度值, 根据质粒分子量计算其浓度 (GE·mL ⁻¹), 稀释至 1×10 ⁷ GE·mL ⁻¹ , 每支分装 0.5 mL, 则标准物质定值为 5×10 ⁶ IU·瓶 ⁻¹ (冻干后)	NIBSC
HPV DNA ^[28]	HPV 全基因组重组质粒	HPV6、11、31、33、45、52、58	HPV6 1×10 ⁷ IU·瓶 ⁻¹ HPV11 1×10 ⁷ IU·瓶 ⁻¹ HPV31 1.6×10 ⁷ IU·瓶 ⁻¹ HPV33 1.6×10 ⁷ IU·瓶 ⁻¹ HPV45 1×10 ⁷ IU·瓶 ⁻¹ HPV52 7.9×10 ⁷ IU·瓶 ⁻¹ HPV58 7.9×10 ⁷ IU·瓶 ⁻¹	量值溯源至 WHO HPV 国际标准物质: 将标准物质梯度稀释并建立定值标准曲线, 所得 C _t 值换算为 IU·mL ⁻¹ ; 冷冻干燥后量值标准为 IU·瓶 ⁻¹	NIBSC
HPV DNA ^[29]	HPV 全基因组重组质粒	HPV16、18	HPV16 (7.1±1.6) ×10 ⁶ IU·mL ⁻¹ HPV18 (3.5±0.9) ×10 ⁶ IU·mL ⁻¹	量值溯源至 WHO HPV 国际标准物质: 采用荧光定量 PCR 试剂, 通过与 HPV16/18 国际标准物质建立定值标准曲线, 计算平均定值和不确定度 (包括测定不确定度和标准曲线不确定度)	卫生部临床检验中心
		HPV6、11、31、33 等	10 ⁶ GE·mL ⁻¹ 10 ⁵ GE·mL ⁻¹	分光光度法测定参考品在 260 nm 处吸光度值, 根据质粒分子量计算其浓度 (copies·mL ⁻¹), 换算为 (GE·mL ⁻¹)	
HPV E6/E7 RNA ^[39]	假病毒溶液	HPV16、18	HPV16 C _t =27.5 HPV18 C _t =28.8	采用逆转录-荧光定量 PCR 法分别检测 HPV16 和 HPV18 的 E6/E7 假病毒溶液	中国食品药品检定研究院
HPV DNA ^[34]	含 L1 基因的宫颈癌细胞系 (Siha 和 HeLa)	HPV16、18	10 ⁶ 、10 ⁵ 、10 ⁴ IU·mL ⁻¹	量值溯源至 WHO HPV 国际标准物质: 将国际标准物质 HPV16、18 梯度稀释, 建立定值标准曲线	临床检验中心分子生物学室
HPV DNA ^[35]	含 HPV16/18 宫颈癌细胞系 (HeLa)	HPV16、18	—	将细胞系原液适当稀释, 通过荧光定量 PCR 法检测	卫生部临床检验中心
HPV DNA ^[30]	含 HPV L1 基因重组质粒	HPV6、11、16、18 等	HPV L1 基因分型参考品	对重组质粒进行 PCR 鉴定和序列测定, 测定结果用 BLAST 进行比对分析	中国药品生物制品检定所
HPV DNA ^[31]	HPV 全基因组重组质粒	HPV6、11、16、18 等	10 ⁶ copies·mL ⁻¹	对 HPV 全基因组重组质粒参考品进行浓度测定和序列测定, 经稀释 (10 ⁶ copies·mL ⁻¹) 后分装 (1.5 mL·支 ⁻¹) 并通过荧光 PCR 法等方法进行检验	中国食品药品检定研究院
HPV DNA ^[32]	HPV 全基因组重组质粒	HPV6、11、16、18 等	50 pg·mL ⁻¹ (10 ⁸ ~10 ⁹ copies·mL ⁻¹)	浓度统一为 50 pg·mL ⁻¹ 、分装并用表面等离子谐振法 (SPR)、基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱法 (MALDI-TOF-MS) 和 PCR-杂交法对参考品检验	长春理工大学
HPV DNA ^[40]	HPV16 重组质粒	HPV16	5.27×10 ³ 、5.27×10 ⁴ 、5.27×10 ⁵ 、5.27×10 ⁶ 、5.27×10 ⁷ 、5.27×10 ⁸ 、5.27×10 ⁹ copies·μL ⁻¹	分光光度法测定 HPV16 重组质粒在 260 nm 处吸光度值, 根据质粒分子量计算其浓度 (copies·μL ⁻¹)	四川大学华西第二医院

注: 表格中 IU 指国际单位; GE 指基因组当量; copies 指拷贝数; C_t 指扩增曲线的循环阈。

性。临床样品作为参考品存在的问题是来源不够稳定, 细胞系建立与培养的过程较为复杂。而假病毒不仅包含检测目标基因同时具有衣壳蛋白结

构、操作安全、存储稳定, 可以作为未来 HPV 核酸标准物质重点关注和研究的方向。

4 展望

标准物质是指足够均匀且具有确定的特征,用以校准测量装置、评价测量方法或给材料赋值的一种材料或物质。标准物质具有复现、保存和传递量值的作用,是保证测量结果准确性与可溯源性的重要计量“器具”,为了进一步提升 HPV 核酸检测的有效性,标准物质的研制工作必不可少。质粒 DNA 形式的标准物质无法对 DNA 提取纯化等过程进行质控,应用范围有所限制。假病毒具有安全稳定、包含完整病毒结构的优势,适用于相关试剂盒的整体检测过程,可以作为核酸标准物质的候选物质。HPV 致病机制的前期研究,揭示了不同基因的调控作用和编码蛋白的生物学功能,为检测目标的选择提供了基础。结合假病毒技术开展 HPV 标准物质的研究工作,有助于提升 HPV 检测的有效性,从而促进女性宫颈癌的准确诊断和及时治疗,改善患者的生存质量。与此同时,标准物质也将帮助解决众多检测试剂盒量值溯源混乱的问题,为实现量值准确可比提供计量支撑。

参 考 文 献

- [1] DE OLIVEIRA, CRISTINA M, FREGNANI J, *et al.*. HPV vaccine: updates and highlights[J]. *Acta Cytol.*, 2019, 63(2): 159–168.
- [2] YANG W W, WANG Z G, CHEN G F, *et al.*. Comparison of a newly developed HPV genotyping assay (Mojin HPV Kit) with cobas 4800 HPV test for detection of high-risk HPV in specimens collected in SurePath Solution[J]. *Clin. Labor.*, 2018, 64(3): 387–391.
- [3] 田亚宾, 张春涛. 人乳头状瘤病毒核酸分型检测试剂的研究进展[J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 40(10): 729–735.
- [4] HOPPE S K, BOSSLER F, BRAUN J A, *et al.*. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets[J]. *Trends Microbiol.*, 2018, 26(2): 158–168.
- [5] RODEN R B S, STERN P L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer[J]. *Nature Rev. Cancer*, 2018, 18(4): 240–254.
- [6] PIM D, BANKS L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses[J]. *Apmis*, 2010, 118(6–7): 471–493.
- [7] UNCKELL F, STREECK R E, SAPP M. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33[J]. *J. Virol.*, 1997, 71(4): 2934–2939.
- [8] KULMALA S M A, SHABALOVA I P, PETROVITCHEV N, *et al.*. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study [J/OL]. *British Med. J.*, 2016, 325(7364): 572 [2020–10–26]. <https://www.bmj.com/content/325/7364/572>.
- [9] SCHEFFNER M, WERNESSE B A, HUIBREGTSE J M, *et al.*. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53[J]. *Cell*, 1990, 63(6): 1129–1136.
- [10] WANG J, SAMPATH A, RAYCHAUDHURI P, *et al.*. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells[J]. *Oncogene*, 2001, 20(34): 4740–4749.
- [11] SCHIFFMAN M, CASTLE P E, JERONIMO J, *et al.*. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. *Lancet*, 2007, 370(9590): 890–907.
- [12] GARCÍA-VALLVÉ S, ÁNGEL A, BRAVO I G. Papillomaviruses: different genes have different histories[J]. *Trends Microbiol.*, 2005, 13(11): 514–521.
- [13] CASTRO F A, JILL K, WIM Q, *et al.*. Detection of HPV DNA in paraffin-embedded cervical samples: a comparison of four genotyping methods[J/OL]. *BMC Infect. Dis.*, 2015, 15(1): 544 [2020–10–26]. <https://www.bmj.com/content/325/7364/572>.
- [14] TSAKOGIANNIS D, GARTZONIKA C, LEVIDIOTOU-STEFANO S, *et al.*. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status [J/OL]. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2017, 19:e1 [2020–10–26]. <https://www.bmj.com/content/325/7364/572>.
- [15] ISIDEAN S D, FRANÇOIS COUTLÉE, FRANCO E L. Cobas © 4800 HPV Test, a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of human papillomavirus in cervical specimens [J]. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2014, 14(1): 5–16.
- [16] RAO A, YOUNG S, ERLICH H, *et al.*. Development and characterization of the cobas Human Papillomavirus Test[J]. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, 51(5): 1478–1484.
- [17] SUN Z, ZHANG R, LIU Z, *et al.*. Development of a fluorescence-based multiplex genotyping method for simultaneous determination of human papillomavirus infections and viral loads [J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 860 [2020–10–26]. <https://www.bmj.com/content/325/7364/572>.
- [18] KRISTENSEN A K, KRISTENSEN G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma[J]. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2008, 8(4): 405–415.
- [19] MARIA B, AMINA V, DONATELLA C, *et al.*. Sensitivity, specificity, and clinical value of Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test[J]. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, 49(7): 2643–2650.
- [20] 杜彩英, 李芳. 人乳头瘤病毒 DNA 及 E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变诊断中的比较研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2015(04): 42–44.
- [21] PAVŠIČ J, ŽEL J, MILAVEC M. Digital PCR for direct quan-

- tification of viruses without DNA extraction[J]. *Analyt. Bioanal. Chem.*, 2016, 408(1): 67-75.
- [22] 牛春艳, 杨佳怡, 王晶, 等. 逆转录过程对猪繁殖与呼吸综合征病毒定量检测的影响[J]. *中国动物传染病学报*, 2020, 28(2): 80-85.
- [23] VAN DOORN L J, MOLIJN A, KLETER B, *et al.*. Highly effective detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA by a testing algorithm combining broad-spectrum and type-specific PCR[J]. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(9): 3292-3298.
- [24] BERNHARD K, LEEN-JAN V D, SCHEGGET J, *et al.*. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses.[J]. *Am. J. Pathol.*, 1998, 153(6):1731-1739.
- [25] 廖璞, 吉权, 陈环. 一种基于数字 PCR 精准定量分型检测 HPV16/18 的试剂盒及其检测方法: CN201510462453.0 [P].2015-11-04.
- [26] 牛春艳, 高运华, 王晶, 等. 核酸检测试剂盒中标准物质溯源性现状[J]. *中国计量*, 2017(5):83-84.
- [27] WILKINSON D E, BAYLIS S A, PADLEY D, *et al.*. Establishment of the 1st World Health Organization international standards for human papillomavirus type 16 DNA and type 18 DNA[J]. *Int. J. Cancer*, 2010, 126(12): 2969-2983.
- [28] World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization: seventieth report [R/OL]. <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2019.2360>, 2019.
- [29] 张瑞.人乳头瘤病毒基因分型检测参考物质及其应用研究 [D].北京:北京协和医学院, 博士学位论文, 2013.
- [30] 黄杰, 曲守方, 徐任, 等. 人乳头瘤病毒基因分型质控品的建立[J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(6): 559-562.
- [31] 孙彬裕, 曲守方, 徐超, 等. 人乳头瘤病毒全基因组基因分型国家参考品的建立[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(9): 1597-1602.
- [32] 徐任. 生物与化学分析方法在诊断试剂标准品制备中的应用[D].长春:长春理工大学, 硕士学位论文, 2011.
- [33] 裴兵, 吴辉. 建立 FQ-PCR 检测 HPV(6/11)(16/18) 型核酸室内质量控制及应用[C]. 中华医学会、中华医学会检验分会. 中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议论文汇编, 2012:320.
- [34] 王雪亮, 刘芬, 蒋玲丽, 等. 人乳头瘤病毒 16 和 18 型核酸检测用质控品制备及其应用[J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(01):56-59.
- [35] 谢珊, 李金明. 人乳头瘤病毒 16, 18 型核酸检测质控物的研制及应用[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(026): 1862-1866.
- [36] 董占柱. 假病毒的应用研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2014, 42(2):59-64.
- [37] 李雄雄, 董占柱, 吴元元, 等. 两种高危型 HPV 假病毒的构建及其在血清中和抗体测定中的应用[J]. *微生物学免疫学进展*, 2019, 47(05):1-9.
- [38] 魏双萍, 范飞, 陈洁, 等. 三色混合荧光 HPV 假病毒中和检测系统的建立及评价[J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(10):1039-1044.
- [39] 黄杰, 于婷, 赵金银, 等. 高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 质控品的建立[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(4):595-599.
- [40] 郑莹, 彭芝兰, 楼江燕, 等. 多重实时 PCR 对宫颈癌及癌前病变 HPV-16 病毒整合状态的检测[J]. *现代妇产科进展*, 2006(08):573-577.