PP1调控。综上所述，肾脏可通过分泌多巴胺来调节肾脏钠离子的重吸收。DARPP-32作为这条通路的一个中间环节，并受其它激酶、磷酸酶(如PKG，PP2B)调节[6]，成为一个关键的交汇、枢纽点。因此，研究肾脏在生理、病理状态下DARPP-32表达量和磷酸化状态的改变十分有意义。

参考文献：

[1] Greengard P, Allen PB, Nairn AC. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade[J]. Neuron, 1999, 23(3): 435-447.

[2] Svenningsson P, Nairn AC, Greengard P. DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse[J]. Anat Rec, 2005, 284(1): 341-348.

[3] Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, *et al*. DARPP-32: an integrator of neurotransmission[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44: 269-296.

[4] Brismar H, Holtback U, Aperia A. Mechanisms by which intrarenal dopamine and ANP interact to regulate sodium metabolism[J]. Clin Exp Hypertens, 2000, 22(3): 303-307.

[5] Ekdof AC, Holtback U, Svennilson J, *et al*. Increased blood pressure and loss of anp-induced natriuresis in mice lacking DARPP-32 gene[J]. Clin Exp Hypertens, 2001, 23(6): 449-460.

[6] Higuchi E, Nishi A, Higashi H, *et al*. Phosphorylation of protein phosphatase-1 inhibitors, inhibitor-1 and DARPP-32, in renal medulla[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 408(2): 107-116.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)13-1366-01

荧光定量PCR技术检测尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒感染的结果分析

Fluorescence quantitative PCR for detection of human papilloma virus of the patients infected condyloma acuminatum

冯文曦，梅 玲，王 宁，郑 红 (第三军医大学西南医院综合实验研究中心，重庆 400038)

女性生殖道尖锐湿疣(condyloma acuminatum，CA)发病率高，危害性大，如能早期发现亚临床和潜伏性人乳头瘤病毒(human papilloma virus，HPV)感染，可控制病情向临床期发展，同时也防止疾病的播散[1]。我们采用荧光定量PCR(FQ-PCR)技术对485例女性生殖道尖锐湿疣、疑尖锐湿疣患者进行了HPV-6、11 DNA检测分析。

1 材料与方法

1.1 标本来源及采样

标本来源于本院门诊妇产科共485例，其中被临床病理诊断为尖锐湿疣(CA)患者148例，疑为尖锐湿疣患者337例。可疑患者外观表现外阴为一般丘疹状突起，阴道壁可见扁平状突起，但表面光滑，无绒毛样感，无菜花样感，色泽和粘膜及皮肤颜色相同，而不呈典型的鸡冠样、菜花样的灰色赘生物。在临床上难以用肉眼与其它生殖道疾病相鉴别。

采样：采集女性阴道或宫颈口分泌物棉拭子样本。采样前，用棉拭子将阴道或宫颈口过多的分泌物轻轻擦拭干净，更用生理盐水浸润的棉拭子，紧贴阴道或宫颈口粘膜，稍用力转动2周，以取得分泌物及脱落细胞。将取样后的棉拭子，放入备有1 ml无菌生理盐水的样品管中，充分漂洗并将棉拭子贴壁挤干。

1.2 仪器与试剂

美国BIO-RAD iCylcer荧光PCR检测仪，人乳头瘤病毒6、11型检测试剂盒(深圳匹基生物技术开发有限公司提供)。

1.3 方法

1.3.1 荧光定量PCR原理 该技术在常规PCR基础上，添加了1条标记了2个荧光基团的荧光双标记探针，分别标记在探针的5′端和3′端。二者可构成能量传递结构，即5′端荧光基团所发出的荧光可被另一荧光基团吸收或抑制。探针的3′端羟基(·OH)已被去除或封闭，不具有延伸能力。当有特异性PCR扩增时，探针会被*Taq*酶的5′→3′外切酶活性作用切断，切下的3′端荧光基团抑制作用消失，从而引起切下的5′端荧光基团信号增长。荧光信号伴随着PCR的进行，PCR产物的增长而增长。

1.3.2 试剂盒使用方法 将标本13 000 r/min离心10 min，去上清液，采用常规碱裂解法提取HPV-DNA。将各反应管放入BIO-RAD iCylcer荧光PCR检测仪上，按下列条件进行扩增：37 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min；95 ℃ 5 s；60 ℃ 30 s。共作42个循环。反应体系设为40 μl。每次检验均做阳性和阴性对照。

1.4 结果分析条件设定

根据试剂盒说明书，建议使用BIO-RAD iCylcer进行结果分析时，基线(baseline)取为2～10或2～15个循环的荧光信号，阈值(threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点，且循环阈值(Ct值)=0.0为准。

1.5 质控标准

阴性对照的Ct值=0.0。阳性对照的Ct值≤30。结果判断：Ct值等于0.0或40.0的样本为阴性。Ct值≤37.0的检测样本为阳性。Ct值<37.0的样本建议重做。重做结果Ct值≤40.0者为阳性，否则为阴性。

(下转1369页)

作者简介：冯文曦(1972-)，男，重庆市人，主管技师，主要从事分子生物学方面的研究。电话：(023)68765466

收稿日期：2004-09-02；修回日期：2005-03-17

使中性粒细胞聚集，释放大量的蛋白酶即各种毒性氧自由基损伤肠道上皮细胞，破坏肠道屏障功能等[5]。IL-8 是一种中性粒细胞趋化因子，可通过特异性 G-蛋白耦联受体对靶细胞产生生物效应，诱导中性粒细胞粘附和聚集，引起中性粒细胞脱颗粒、呼吸爆发和溶酶体酶释放，从而导致炎症反应和炎性组织损伤[1,6]。机体促炎症细胞因子增加的同时抗炎症细胞因子的产生也明显增加，以维持炎症反应和抗炎症反应之间的平衡，其中 IL-10 是最重要的抗炎症细胞因子，能抑制 TNF-α、IL-6、IL-8 等促炎症细胞因子、粘附分子和趋化分子的产生，从而减轻促炎症细胞因子的生物学活性和对器官的损伤作用[7]。

本实验结果表明创伤失血性休克后肠组织 TNF-α、IL-6、IL-8 和 IL-10 的产生明显增加，说明创伤失血性休克后肠炎症反应被激活，与此同时肠抗炎症反应也被激活，以抑制炎症反应。本实验发现浅低体温、中低体温均能显著抑制创伤失血性休克后肠炎症反应；局部降温对创伤失血性休克后肠炎症反应也有明显的抑制作用，并且能促进肠抗炎症反应。另外本实验过程中观察到中低体温组动物在降温后呼吸道分泌物明显增加，需要吸痰才能维持呼吸道的通畅，在取肠组织标本后观察局部伤情发现骨折局部尚有不凝血液，而且中低体温对肠组织 TNF-α、IL-6 和 IL-8 产生的抑制作用也没有浅低体温明显，而浅低体温和局部降温没有出现上述现象。因此，浅低体温和局部降温对创伤患者的临床救治可能更有利。

总之，低体温对肠道炎症反应影响的研究目前尚少，但浅低体温和局部降温对肠道炎症反应影响及机制的研究，将为临床肠道屏障功能的保护提供新的思路。浅低体温和局部降温是否能通过减少肠道局部炎症介质的产生达到保护肠道屏障功能的目的，以及减少肠组织炎症介质产生的机制，都有待于进一步的研究。

参考文献：

[1] Falcone F H, Rossi A G, Sharkey R, *et al*. Ascaris suum-derived products induce human neutrophil activation via a G protein-coupled receptor that interacts with the interleukin-8 receptor pathway[J]. Infect Immun, 2001, 69(6): 4007－4018.

[2] Fergus S. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics[J]. Gastroenterology, 2001, 120(3): 622－635.

[3] 王正国. 创伤外科学[M]. 上海：上海科学技术出版社，2002. 102－112.

[4] Ruetten H, Thiemermann C. Combination immunotherapy which neutralizes the effect of TNF alpha and IL-1 beta attenuates the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat[J]. J Physiol Pharmacol, 1997, 48(4): 605－621.

[5] Wang W, Smail N, Wang P, *et al*. Increased gut permeability after hemorrhage is associatedwith upregulation of local and systemic IL-6[J]. J Surg Res, 1998, 79(1): 39－46.

[6] Miller E J, Kurdowska A, Nagao S, *et al*. Asynthetic peptide which specifically inhibits heat-treated interleukin-8 binding and chemotaxis for neutrophils[J]. Agents Actions, 1993, 40(314): 200－208.

[7] Moore K W, de Waal Malefyt R, Coffman R L, *et al*. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 683－765.

（编辑　薛国文）

（上接 1366 页）

2　结果

148 例经临床病理诊断为 CA 患者的标本，阳性率 100%，Ct 值均小于 37.0，平均为 22.45；337 例疑 CA 患者的标本，检出阳性 308 例，阳性率 91.4%，Ct 值均小于 37.0，平均为 26.7。

3　讨论

HPV 可以引起女性生殖道临床、亚临床和潜伏性感染，而亚临床和潜伏性感染缺乏典型形态学变化，HPV-DNA 检测是目前惟一的确诊方法。HPV 有多种亚型，不同亚型可引起不同的生殖道疾病。早期的 PCR 技术由于错误扩增和产物污染导致假阳性率高，不能正确指导临床实践。在常规 PCR 基础上荧光基因探针杂交定量 PCR 方法把目的基因扩增，特异分子杂交和荧光化学融为一体，利用基因扩增的灵敏性，分子杂交的特异性和光、化学反应的精确性[2]，实时在线探测 PCR 过程中荧光信号强弱的变化，获得 DNA 模板的准确定量结果。与竞争性 PCR 等定量 PCR 相比，荧光定量 PCR 不仅进一步提高了特异性，无需 PCR 后处理和冗长的电泳，紫外线或染色检测，还具有定量范围宽，定量准确等优点，使假阳性率降低到最低限度，并且从根本上解决了 PCR 扩增产物污染的难题[3]。

我们从 337 例无明显临床症状又疑为尖锐湿疣患者中检出 308 例 HPV-6、11 阳性，阳性率达 91.4%，表明使用 FQ-PCR 技术能为可疑患者提供早期诊断，从而有利于患者的早期发现和治疗。对于 148 例经临床病理诊断为 CA 的患者，HPV-6、11 DNA 阳性检出率为 100%，与临床病理诊断也完全相符，证明用 FQ-PCR 技术检测 HPV-DNA 灵敏度高、特异性强。因此，本方法不仅可对 HPV 感染进行早期诊断、早期治疗，预防病情进一步恶化，还可为评价临床治疗效果提供可靠的依据。

关键词： 荧光定量 PCR；尖锐湿疣；人乳头瘤病毒

中图法分类号： R752.530.4　　**文献标识码：** B

参考文献：

[1] 单可人，何　燕，吕　筠，等. 用 PCR 检测尖锐湿疣患者的 6，11 型人乳头瘤病毒[J]. 贵阳医学院学报，1999，24(3)：229－230.

[2] Heid C A, Stevens J, Livak K J, *et al*. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 986－994.

[3] 赖宏芳，付晓野，董玉琳，等. 荧光探针定量 PCR 检测 HBV-DNA[J]. 上海医学检验杂志，2000，15(1)：18－19.

（编辑　陈聪连）