维普资讯 http://www.cqvip.com

Expression of CD40 on neonatal B lymphocytes adn function of B lymphocytes induced with CD40 McAb

Chen shi, et al
College of Pediatrics

Expression of CD40 on neonatal B lymphocytes (BL) were investigated with flow cytometry. Meanwhile proliferation and production in vitro of immunoglolulin (Ig)were also observed through using CD40 McAb to CD40 ligand (CD40L) on TH cells.The results showed that expression of CD40 on BL in neonates was almost identical to that in adults. Lowered proliferation and Ig production were significantly increased when neonatal BL were stimulated with Sac plus CD40 McAb.The results suggested that the dysfunction of neonatal BL is not caused by the expression of CD40.Lacking of CD40L or cytokines produced by TH cells may play an important role in the nathogenesis of the inability of antibody response in neonates.

KEY WORDS Newborns; CD40; CD40 ligand; Lmmunoglobulins

166-168

(18)

PCR用于尖锐湿疣诊断的价值

R752.530.4

临床学院泌尿外科 王德林*
尿外科 何士元 乔天恩
第二临床学院泌
妇产科 顾美礼

提 要 用人乳头瘤病毒基因L_1区通用引物(MY11/MY09)进行聚合酶链反应，检测50例尖锐湿疣新鲜组织，其中含3例病变不典型病理活组织检查不能确诊者。HPV.DNA阳性率100%HPV－6、11、16、18型分别为36%，70%，14%，8%。结果显示:(1)PCR检测HPV具有灵敏、特异、简单快速等优点，可有助于不典型尖锐湿疣患者的诊断，(2)MY11/MY09在筛选HPV感染时是较理想的引物，(3)尖锐湿疣组织中以HPV6、11为最常见型别。

关键词 聚合酶链反应; 人乳头瘤病毒; 尖锐湿疣
中图分类号 R752.53

尖锐湿疣是由人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)所致的性传播疾病，检测HPV的存在是诊断此病的辅助手段。过去检测HPV常采用核酸杂交和免疫组化等技术，都存在不同程度的局限性。本文采用通用引物介导的聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)检测湿疣组织中的HPV.DNA，并以其产物进行杂交，鉴别其类型，以探讨PCR对湿疣的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 组织标本

尖锐湿疣活检组织50例，其中包括表现不典型病检不

*男,1968－09出生，讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

能确诊者3例，男28例，病灶分别分布于尿道口、包皮系带、冠状沟、包皮。女22例，病灶分别分布于阴唇、阴道口、阴道。取材量50～100mg，置液氮保存。

1.2 主要试剂和仪器

DNA扩增试剂盒和PCR扩增仪TC－480型为Perkin－Elmer Cetus公司产品，[r－^{32}P]ATP为北京亚辉公司产品，DNA分子量标尺(123bp ladder)为日升公司产品。

1.3 引物和探针的选择与合成

选择Manos[1]等设计的MY11和MY09为HPV基因组中L1区通用引物，MY12、MY13、MY14、WD74分别为HPV－6、11、16、18的型特异寡核苷酸探针，序列如下:MY09 5′ CGTCCMARRGGAWACTGATC3′，MY11 5′ GCMCAGGGWCATAAYAATGG3′，MY12(HPV－6)5′CATCCGTAACTACATCTTCCA3′，MY13(HPV－11)5′ TCTGTGTCTAAATCTGCTACA3′，MY14(HPV－16) 5′CATACACCTCCAGCACCCTAA3′ WD74(HPV－18)5′ GGATGCTGCACCGGCTGA3′。以上寡核苷酸片段由中科院上海细胞生物学研究所合成。β球蛋白基因引物用做内阳性对照，序列如下:PC04 5′ CAACTTCATCCACGTTCACC3′，GH20 5′ GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3′，由Perkin－Elmer Cetus公司惠赠。

1.4 PCR实验

1.4.1 DNA抽提参照Baginski方法[2]，在液氮中击碎组织，移入缓冲液(10mM Tris:pH8，1mM EDTA，10mM NaCl,0.5%SDS，200μg/ml蛋白酶K)中裂解消化，饱和酚/氯仿抽提，无水乙醇沉淀DNA，干燥后以超纯水溶解备用。

1.4.2 PCR反应总体积为50μl，其中含模板5－10μl，200μM 4x dNTPs，10m MTris(pH8.3)，50mM Kcl，1.5mM MgCl，0.001%明胶(W/V)，50pmol(MY11/MY09，1.25单位Taq DNA聚合酶。加超纯水至50μl，并以50μl灭菌石蜡油覆盖进行PCR反应。若扩增β球蛋白基因，引物则为5pmol PC04/GH20。循环条件为95°C 30s,55°C 30s,72°C 1min，共30周期，分别设阳性和阴性对照。加酶扩增前，95°C变性10min，最后72°C额外延伸5－10min。取10μl PCR产物，以分子量标尺对照，在1.5%琼脂糖凝胶上电泳，经溴化乙锭染色后，在紫外光灯下观察结果。HPV.DNA阳性者在特定区域(约450bp)显示荧光条带。

1.5 斑点杂交

PCR产物经纯化后，加入等体积2xDNA变性液(10xSSC，2M NaOH,15%甲醛)，70°C变性10min，硝酸纤维膜置10xSSC浸泡数分钟，负压吸引点样，设阳性和阴性对照。将点样膜于80°C烘干2h后，置预杂交液(5xDenhardt's，0.1%SDS，6xSSC,100μg/ml鲑精DNA)内，50°C预杂交2hr，更换新的预杂交液，同时分别加入[r－^{32}P]末端标记的寡核苷酸探针(4.5×10^{6}cpm/ml)，55°C杂交3h后，用2xSSC,0.1%SDS于室温洗膜2次。MY12、MY13于56°C，MY14、WD74于58°C再漂洗2次，凉干，压X光片于－70°C进行放射自显影。

2 结果

50例尖锐湿疣活检组织中HPV.DNA阳性率为100%。通过PCR扩增的片断位于约450bp处，与预期扩增片断相符，其产物经杂交进行分型。结果:HPV－6 11例，HPV－11 25例，HPV－16 3例，HPV－18 1例，HPV 6/11 5例，HPV 11/18 1例，HPV 11/16 2例，HPV 6/11/16/18 2例。

3 讨论

近年发展的PCR技术能将微量DNA在数小时扩增数百万倍。本实验采用PCR－EB直接法检测HPV，其灵敏度为1pg，在检测50例湿疣组织中，其扩增片断与预期片断相符，并被杂交证实并进行分型，说明PCR检测HPV具有很高的灵敏度和特异性。此外，还具有检测时间短，操作较简单的优点。但是，PCR可因少量污染而出现假阳性结果[3]，亦可因DNA质量不佳或有酶抑制物存在而产生假阴性结果[4,5]。为提高实验的准确性，应选用特异的引物，严格操作规则，避免污染，同时设阳性和阴性对照。扩增产物应进行杂交证实，并以PC04/GH20作内阳性对照，尽可能排出假阴性结果。

扩增HPV.DNA的PCR引物有通用引物和特异性引物两类。后者只能检测一种HPV型别，在与人类肛门生殖器有关的HPV中，目前已阐明序列并已设计出相应引物的仅6种型别，使PCR技术的应用受到限制。本文选用L1区通用引物(MY-11/MY09)，其序列中各有3处碱基简并，可扩增约

维普资讯 http://www.cqvip.com

25种HPV.DNA序列中约450bpDNA片断[1]。本实验中，该引物可对50例标本的HPV.DNA都进行了有效扩增，表明该引物对筛选HPV感染是较理想的引物。

本组结果显示尖锐湿疣主要由HPV－6、11引起，少数病例为HPV－16、18感染，一般为单一型感染，亦可为混合型感染，与O'Brien和Zedric等报告基本一致[6,7]。目前该病的诊断主要依靠临床观察和组织学检查，一些临床表现不典型的可疑病例确诊常有困难。本组3例临床表现不典型且病理无法确诊的可疑病例，均经PCR检出HPV.DNA，表明PCR是从病原学角度诊断尖锐湿疣的先进方法，可作为诊断尖锐湿疣的一种补充手段，弥补组织学诊断的不足[8]。

Melchers和Das分别从男女尖锐湿疣患者之尿液中扩增到HPV.DNA[9,10]，我们亦选择5例女性生殖道和2例男性尿道口尖锐湿疣之尿液标本进行扩增，均未见HPV.DNA扩增带，以PC04/GH20再次扩增，结果仍为阴性。推测可能系尿液中HPV.DNA含量极少或有酶抑制物存在的缘故。

参考文献

1.Ting Y, et al. In:Innis MA,et al. PCR protocol:A guide to methods and applications. San Diego, Calif:Academic Press Inc; 1990:356
2.Baginshi I,et al. In: Innis MA,et al. PCR Protocol: A guide to methods and applications. San Diego, Calif: Academic Press Inc; 1990:348
3.Kwok S, et al. Nature, 1989;339:237
4.PAABO S. Proc Natl Acad Sci USA, 1989;86:1939
5.Ben－ezra J, et al. J Histochem Cytochem, 1991;39(3):351
6.O'Brien WM, et al. J Urol, 1989;141:863
7.Zedric SA, et al. J Urol, 1989;141:63
8.Toore GD, et al. Am J Pathol, 1992;141:1181
9.Melchers WJG, et al. J Clin Microbiol, 1989;27(8):1711
10.Das BC, et al. Lancet, 1992;390:1417

(收稿日期 1997－11－25)

Detection of human papillomavirus DNA in condyloma acuminata by general primer－mediated polymerase chain reaction

Wang Delin, et al
Department of Urology, College of Clinical Medicine

The detection and typing of human papillomavirus DNA in 50 biopsy samples of condyloma acuminata by HPV gene general primer mediated polymerase chain reaction was reported. HPV.DNA positive rate was 100%, the frequences of HPV－6,11,16,18 were 36%,70%,14% and 8% respectively. These results showed that HPV－6,11 were the most common types of HPV found in these cases. HPV.DNA detected by PCR has high specificity, high sensitivity and is easy to handle. PCR might be helpful in the diagnosis of atypical condyloma acuminata. Besides MY11/MY09 might be useful primers in the screening of HPV infection.

KEY WORDS Polymerase chain reation; Human papillomavirus; Condyloma acuminata